

UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA



TESIS DOCTORAL

**TIPIFICACIÓN MOLECULAR Y ESTUDIO DE
CLONALIDAD DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A
METICILINA, PRODUCTORES DE INFECCIONES
INTRAHOSPITALARIAS Y EXTRAHOSPITALARIAS EN
EXTREMADURA**

VICENTE AGUADERO ACERA

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR
Y GENÉTICA**

Conformidad de los Directores:

Fdo.: Carmen González Velasco

Fdo.: Jaime María Merino Fernández

2014

A MIS PADRES..... A MIS HIJOS

"La Naturaleza nos es hostil porque no la conocemos: sus crueldades representan la venganza contra nuestra indiferencia. Escuchar sus latidos íntimos con el fervor de apasionada curiosidad, equivale a descifrar sus secretos"

Santiago Ramón y Cajal. Nobel de Medicina, 1906.

Para la realización del presente trabajo de Tesis Doctoral hemos recibido la ayuda indispensable de diferentes personas, instituciones o empresas. Por ello, deseamos expresar nuestro sincero agradecimiento:

- A las Unidades o Secciones de Microbiología de cada uno de los hospitales extremeños, por la recolección y envío de las cepas SARM. En especial a: Eugenio Garduño, del Hospital Infanta Cristina de Badajoz; Carmen González, del Hospital Don Benito-Villanueva; Rosario Sánchez, del Hospital de Llerena; Purificación Hernández, del Hospital San Pedro de Alcántara de Cáceres; Pedro Aguirre, del Hospital Campo Arañuelo de Navalmoral de la Mata; Carlos García, del Hospital Virgen del Puerto de Plasencia; e Isaías Montes, del Hospital Ciudad de Coria.



- A Novartis España, y personalmente a Juan Carlos Muriel, por coordinar y costear los envíos mensuales de las cepas.



- Fundación para la Formación y la Investigación de los profesionales de la Salud de Extremadura (FUNDESALUD), por la concesión de una beca (PRIS09034) destinada a la compra del espectrofotómetro *Nanodrop® ND-1000*.



- A los Drs. Juan Fernando Díaz y Juan Ramón García Melgar de Biomerieux, por su instrucción y asesoramiento en la técnica rep-PCR/DiversiLab.



- A la Dra. Ana Vindel y a todo su equipo del Laboratorio de Infecciones Intrahospitalarias del Centro Nacional de Microbiología de Majadahonda, por su ayuda imprescindible en los ensayos de tipificación molecular.



- A Alvaro Aguadero por el diseño de los mapas indicadores de la distribución de pulsotipos en Extremadura
- Al Dr. Miguel González, del Departamento de Matemáticas de la UNEX, por su ayuda y asesoramiento en los procedimientos estadísticos

Igualmente, quiero agradecer al Dr. Juan José Moreno que hace cuatro años apostara por mí, que confiara en que podía llevar este proyecto adelante y su constante apoyo durante todo este tiempo. Al Dr. Jaime Merino por guiarnos y orientarnos para la consecución de esta Tesis. Y especialmente a la Dra. Carmen González Velasco, por subirse conmigo a un tren que ninguno teníamos muy claro donde nos llevaría, y si aquello podía merecer la pena. Gracias por tu tiempo, tu instrucción, tus consejos, tus correcciones y tu total implicación. Ha sido un placer trabajar contigo.

Quiero agradecer al Dr. Arturo Fernández de los Ríos, su permiso para utilizar las instalaciones de la Unidad de Análisis Clínicos del Hospital de Mérida para desarrollar los ensayos y experimentos, aún cuando dejé de ser Residente del Servicio. De igual forma a la Dra. Esther Salcedo, Jefa del Laboratorio Central del Hospital Virgen del Camino de Pamplona, que permitió utilizara las instalaciones para terminar los últimos ensayos que necesitaba.

Gracias a todo el equipo de la Sección de Microbiología del Hospital de Mérida, Julián, Juanjo, Juan Carlos, Jose Luís, Elvira, Manoli y Lourdes, por vuestra continua disponibilidad a ayudarme en lo que hiciera falta.

Me gustaría dar las gracias a mis amigos de la Facultad, hoy ya grandes profesionales, por haber sido siempre, y aún en la distancia, modelos y referencias para mí. Lara, Menchu, Silvia, Mónica, Pumu, María, P. Piercing, P. Mancheño, Guada, Angel, Jortxi..., es un orgullo contar con vuestra amistad.

A mi familia, tanto a los que estáis más cerca como más lejos, quiero agradecer vuestro continuo interés y apoyo en todo lo que hago. Sabéis que sin vosotros no habría llegado hasta aquí. Gracias.

Quiero agradecer a mi pareja, Patricia, su paciencia, apoyo, comprensión, ánimo y entendimiento, durante estos cuatro años de sacrificio y esfuerzo, también realizados por su parte. Han sido muchas tardes y fines de semana, los que te he cambiado por "mis bichos", pero ahora espero te sientas participe y orgullosa de este trabajo. Contigo a tu lado, ha sido más fácil.

COMUNICACIONES A CONGRESOS DERIVADAS DE ESTA TESIS DOCTORAL

XVII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Zaragoza, 29-31 Mayo 2013.

Patrón de sensibilidad antibiótica de *Staphylococcus aureus* resistente a Meticilina productor de infección en la Comunidad Autónoma de Extremadura.

53º Congreso Internacional de Agentes Antimicrobianos y Quimioterapia (ICAAC). Denver, Colorado (EEUU). 9-13 Septiembre 2013:

Evaluation of System rep-PCR/Diversilab vs. PFGE and Spa typing in Genotyping Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

VI Congreso Nacional del Laboratorio Clínico. Bilbao, 23-25 Octubre 2013.

Genotipaje de *Staphylococcus aureus* resistente a Meticilina en Extremadura y relación de los clones descritos con la infección extrahospitalaria e intrahospitalaria.

ÍNDICE

	<i>PÁG.</i>
➤ <i>ÍNDICE DE FIGURAS</i>	15
➤ <i>ÍNDICE DE TABLAS</i>	18
➤ <i>ABREVIATURAS</i>	21
1. INTRODUCCIÓN.	23
1.1. La enfermedad infecciosa.	24
1.2. Multirresistencia antibiótica.	24
1.3. Conceptos de Infección Nosocomial e Infección Asociada a los Cuidados Sanitarios.	25
1.4. Impacto y costos de la Infección Nosocomial en el sistema sanitario.	26
1.5. Contribución de la Epidemiología Molecular en el diagnóstico y control de la Infección Nosocomial y Comunitaria por microorganismos multirresistentes.	28
1.6. Género <i>Staphylococcus</i> .	32
1.6.1. <i>Staphylococcus aureus</i> .	34
1.6.1.1. Diagnóstico microbiológico.	34
1.6.1.2. Colonización y transmisión.	36
1.6.1.3. Factores de virulencia.	37
1.6.1.4. Bases genéticas y mecanismos moleculares de los factores de virulencia.	42
1.6.1.5. Cuadros clínicos y mecanismos patogénicos de <i>Staphylococcus aureus</i> .	47
1.6.1.6. Mecanismos de resistencia antibiótica en <i>Staphylococcus aureus</i> .	53
1.6.1.7. <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina (SARM)	65
1.6.1.7.1. Bases bioquímicas, moleculares y genéticas de la resistencia a meticilina.	66

1.6.1.7.2. Transmisibilidad y control epidemiológico de SARM.	72
1.6.1.7.3. Tipificación molecular de SARM.	74
1.6.1.7.3.1. Electroforesis en campo pulsante (PFGE).	77
1.6.1.7.3.2. Tipificación mediante la técnica de <i>Multilocus Sequence Typing</i> (MLST).	79
1.6.1.7.3.3. Tipificación mediante análisis de repeticiones spa (<i>spa typing</i>).	81
1.6.1.7.3.4. Tipificación del Cassette Cromosómico SCC _{mec} .	83
1.6.1.7.3.5. Tipificación mediante PCR de secuencias repetitivas (<i>rep-PCR</i>).	85
1.6.1.7.4. Estrategias terapéuticas frente a SARM.	89
1.6.1.7.5. Emergencia de SARM asociado a la Comunidad y sus diferencias con el SARM asociado a cuidados sanitarios.	90
2. OBJETIVOS.	97
3. MATERIAL Y MÉTODOS.	101
3.1. Definiciones.	102
3.2. Colección de los aislados microbiológicos y de los correspondientes datos demográficos.	104
3.3. Verificación de la condición de SARM de cada aislado y análisis de su espectro antibiótico.	105
3.4. Macrométodo E-test para la detección de cepas con resistencia heterogénea a vancomicina (h-VISA).	107
3.5. Muestreo y elección de los aislados a genotipar.	107
3.6. Fagotipia.	108
3.6.1. Propagación del juego internacional de fagos	108
3.6.2. Determinación del RTD.	109
3.6.3. Propagación en medio sólido.	110
3.6.4. Espectro lítico.	111

3.6.5. Fagotipaje.	112
3.6.5.1. Realización.	112
3.6.5.2. Lectura de resultados.	112
3.6.5.3. Interpretación de resultados.	113
3.6.5.4. Controles.	114
3.7. Tipificación molecular.	114
3.7.1. Sistema rep-PCR/Diversilab.	115
3.7.1.1. Extracción de ADN bacteriano.	115
3.7.1.2. Reacción de amplificación.	115
3.7.1.3. Electroforesis y análisis de resultados.	116
3.7.2. Electroforesis en Campo Pulsado (<i>PFGE</i>).	118
3.7.2.1. Preparación de los bloques de agarosa.	118
3.7.2.2. Estabilización y digestión de los bloques.	120
3.7.2.3. Electroforesis.	121
3.7.2.4. Tinción del gel y análisis de perfiles.	121
3.7.3. Tipificación mediante secuenciación del gen de la proteína A (<i>Spa typing</i>).	122
3.7.3.1. Preparación de extractos.	122
3.7.3.2. Preparación de primers.	122
3.7.3.3. Reacción de amplificación.	123
3.7.3.4. Purificación de productos de PCR.	123
3.7.3.5. Secuenciación.	123
3.7.3.6. Asignación de spa-tipos.	124
3.7.3.7. Análisis BURP y asignación de eBURST.	124
3.7.4. Tipificación mediante <i>Multilocus Sequence Type</i> (MLST).	127
3.7.4.1. Amplificación de los genes <i>housekeeping</i> .	127
3.7.4.2. Secuenciación y asignación de <i>sequence type</i> (ST).	129
3.7.5. Identificación del tipo estructural <i>SCCmec</i> .	129
3.7.5.1. Detección de los tipos <i>SCCmec</i> I, II, III y IV.	129
3.7.5.2. Subtipaje del cassette cromosómico <i>SCCmec</i> IV.	132
3.7.6. Detección de Leucocidina PVL y del gen ACME, en aislados SARM de origen comunitario.	133
3.7.6.1. Detección de PVL.	133

3.7.6.2. Detección del gen ACME.	134
3.7.7. Estudio estadístico. Índices que reflejan cuantitativamente el poder de discriminación y de concordancia de los diferentes métodos de genotipaje ensayados.	135
4. RESULTADOS.	137
4.1. Datos generales.	138
4.1.1. Descripción de la colección de aislados SARM.	138
4.1.2. Incidencia y Prevalencia de la infección producida por SARM en Extremadura y en sus diferentes Áreas Sanitarias.	143
4.1.3. Frecuencia de la infección SARM nosocomial y extrahospitalaria en Extremadura y en sus diferentes Áreas Sanitarias.	144
4.2. Patrón de sensibilidad antibiótica de los aislados SARM.	146
4.3. Fagotipos SARM.	149
4.4. Estudio molecular.	150
4.4.1. Patrones y Grupos genotípicos de SARM por método Diversilab/rep-PCR.	150
4.4.2. Genotipaje de SARM mediante Spa Typing, y clasificación en grupos clonales CCBURP y eBURST.	155
4.4.2.1. Genotipos SARM obtenidos por Spa Typing.	155
4.4.2.2. Definición de grupos clonales CCBURP.	156
4.4.2.3. Asignación de grupo clonal eBURST.	157
4.4.3. Genotipaje de SARM por MLST.	157
4.4.4. Genotipaje de SARM mediante Electroforesis en Campo Pulsado.	158
4.4.5. Tipos estructurales de SCCmec.	161
4.4.6. Asociación entre genotipos obtenidos mediante diferentes métodos de tipaje.	163
4.4.7. Poder de concordancia y discriminación de los métodos de genotipificación de SARM.	167
4.5. Variabilidad genética.	168
4.5.1. Variabilidad genética de SARM entre las diferentes AAM.	168

4.5.2. Variabilidad genética temporal de SARM.	175
4.5.3. Relación existente entre los patrones de resistencia antibiótica y los perfiles genotípicos.	175
4.5.4. Asociación entre genotipos y tipos de muestras biológicas en las que se aíslan.	182
4.5.5. Distribución de genotipos SARM según el entorno de aislamiento (intrahospitalario o extrahospitalario).	183
4.6. Características de los aislados SARM procedentes de hemocultivos.	184
4.6.1. Características epidemiológicas.	184
4.6.2. Sensibilidad antimicrobiana.	186
4.6.3. Distribución genotípica y fagotípica.	189
4.7. Características del SARM productor de infecciones extrahospitalarias en Extremadura.	190
4.7.1. Características demográficas.	190
4.7.2. Sensibilidad antibiótica.	192
4.7.3. Descripción genotípica.	193
4.8. Hallazgo y descripción de SARM asociado a la comunidad (CO-SARM).	195
5. DISCUSIÓN.	197
6. CONCLUSIONES.	221
7. BIBLIOGRAFÍA.	225

INTRODUCCIÓN

- Figura 1: Crecimiento en racimo de los estafilococos.....35
- Figura 2: Papel de la colonización en la epidemiología de.....36 las infecciones causadas por S.aureus.
- Figura 3: Estructura del transposon Tn1546.....61
- Figura 4: Representación esquemática de un puente cruzado entre.....66 dos cadenas de mureína en la capa de PG de un S.aureus.
- Figura 5: Diagrama esquemático del operón mecRI-mecI.....68
- Figura 6: Representación esquemática de los complejos génicos ccr y mec.....70
- Figura 7: Esquema de la distribución de los electrodos en el sistema.....78 CHEF de PFGE.
- Figura 8: Representación obtenida por eBURST de la relación evolutiva.....81 entre distintos clones de S.aureus genotipados por MLST.
- Figura 9: PCR múltiple para caracterización de SCCmec tipos I-IV.....83
- Figura 10: PCR múltiple para la caracterización de SARM de acuerdo al.....84 tipo de SCCmec.
- Figura 11: Sistema de genotipaje microbiano rep-PCR/Diversilab.....87
- Figura 12: Patrones de bandas más habituales en PFGE de SARM.....92
- Figura 13: Distribución según edad de los casos de CO-SARM frente.....94 a la distribución para ACS-SARM.

MATERIAL Y MÉTODOS

- Figura 14: Distribución geográfica de cada una de las AAM.....102
- Figura 15: Ficha con la información demográfica de cada aislado.....105 SARM aportada por la Unidad Colaboradora.
- Figura 16: E-test de Vancomicina, Tigeciclina, Daptomicina y Linezolid.....106
- Figura 17: Determinación del RTD en Fagotipia.....110
- Figura 18: Disposición de fagos en placa para fagotipaje.....112
- Figura 19: Lectura de resultados en fagotipia.....113
- Figura 20: Ejemplos de fagotipaje.....114
- Figura 21: Diferencias entre electroferogramas obtenidos.....117 mediante rep-PCR/Diversilab.
- Figura 22: Perfiles de los distintos pulsotipos de SARM obtenidos en.....122 estudio multicéntrico español.
- Figura 23: Captura de pantalla del software StaphType: visor que.....125 muestra las secuencias obtenidas a partir de los cebadores F y R, y la secuencia consenso; tipos de repeticiones encontradas automáticamente en la secuencia consenso; y diagrama que muestra la comparación entre el perfil de repeticiones de nuestra secuencia consenso y los perfiles de repeticiones más similares de diferentes spa-tipos ya registrados.
- Figura 24: Captura de pantalla del software StaphType. Ejemplo de un.....125 resultado de análisis BURP.
- Figura 25: Captura de StaphType software. Base de datos que relaciona.....126 el spa-tipo con los STs más probables, además de indicar el posible CC de eBURST y otras denominaciones en la literatura científica.
- Figura 26: Captura de StaphType software. Base de datos que muestra.....127 para cada spa-tipo la frecuencia registrada hasta el momento y los países

de origen en los que se ha detectado.

RESULTADOS

- Figura 27: Proporción de aislados SARM procedente de cada una de las provincias de Extremadura.....139
- Figura 28: Proporción de aislados SARM por mes y AAM.....139
- Figura 29: Proporción de aislados SARM procedente de cada una de las AAM.....140
- Figura 30: Distribución de aislados SARM según bloque estacional.....140
- Figura 31: Distribución de los aislados SARM según grupo de edades y sexo.....141
- Figura 32: Distribución de SARM según tipo de muestra donde se hizo el aislado.....142
- Figura 33: Frecuencias de los halos de inhibición que muestran los SARM en antibiograma disco-placa de cefoxitina.....142
- Figura 34: Incidencia y Prevalencia de SARM en las diferentes AAM de Extremadura.....143
- Figura 35: Proporción de aislados SARM intrahospitalarios y extrahospitalarios obtenido en Extremadura.....145
- Figura 36: Proporción de aislados SARM intrahospitalarios y extrahospitalarios para cada una de las AAM.....145
- Figura 37: Patrones de sensibilidad obtenidos para los antibióticos no específicos para la infección SARM.....147
- Figura 38: Distribución de valores de CMI mostrados por los aislados SARM, para los antibióticos Tigeciclina, Linezolid, Daptomicina, Vancomicina.....148
- Figura 39: Proporciones observadas para cada uno de los fagotitos.....149
- Figura 40: Distribución de frecuencias para los patrones genotípicos definidos por repPCR/DiversiLab.....151
- Figura 41: Distribución de frecuencias para los grupos genotípicos y patrones genotípicos que no forman grupo con ningún otro patrón.....152
- Figura 42: Dendograma creado por DiversiLab 3.4.....154
- Figura 43: Resultados obtenidos para el genotipaje de SARM mediante Spa Typing.....155
- Figura 44: Relación evolutiva entre los spa-tipos que componen cada CC-BURP.....156
- Figura 45: Distribución y proporción de los 27 pulsotipos descritos en los 100 aislados clínicos de SARM.....159
- Figura 46: Patrones de bandas en geles de agarosa de los distintos pulsotipos obtenidos en los 100 aislados SARM genotipados.....160
- Figura 47: Dendograma que muestra la relación grupal entre los diferentes pulsotipos descritos y una representación del patrón de bandas correspondiente a cada pulsotipo.....161
- Figura 48: Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR múltiple para detección de tipos SCCmec.....162
- Figura 49: Distribución de los tipos de cassette SCCmec en los 27 pulsotipos distintos.....162
- Figura 50: dendograma obtenido con DiversiLab 3.4. que muestra la relación entre los diferentes genotipos obtenidos por rep-PCR/Diversilab y su asociación con los resultados obtenidos por spa typing, CCBURP y

eBURST.

- Figura 51: Mapas indicadores de los porcentajes de incidencia de.....173 cada pulsotipo mayoritario y el conjunto de pulsotipos minoritarios, en cada AAM, con respecto al total de aislados de SARM en el AAM en concreto.
- Figura 52: Pulsotipo predominante en cada AAM.....173
- Figura 53: Porcentajes de sensibilidad y resistencia obtenidos para.....178 los perfiles mayoritarios, en los antibióticos no específicos para la infección por SARM.
- Figura 54: Distribución de los valores de CMI obtenidos para los.....188 antibióticos específicos para infección por SARM, en los aislados procedentes de hemocultivos
- Figura 55: Resultado positivo (CMI>8mg/l) obtenido en el ensayo para.....189 la cepa h-VISA Mu3
- Figura 56: Porcentajes de SARM de adquisición.....190 intrahospitalaria y extrahospitalaria en cada sexo.
- Figura 57: Porcentajes de SARM de adquisición intrahospitalaria.....191 y extrahospitalaria en cada tipo de muestra SARM.
- Figura 58: Comparativa de ratios de resistencia en los antibióticos.....192 no específicos para infección por SARM, entre los aislados de carácter extrahospitalario con respecto a los intrahospitalarios.
- Figura 59: Proporciones en las que se presenta cada pulsotipo.....195 mayoritario en el conjunto de aislados extrahospitalarios y en el de intrahospitalarios.

DISCUSIÓN

- Figura 60: Evolución de la prevalencia de SARM en España desde.....199 1986 hasta 2006.

INTRODUCCIÓN

- Tabla 1: Costes atribuidos a la IN según el lugar de la infección.....28
- Tabla 2: Ejemplos de fenómenos de resistencia a antimicrobianos en.....64 *S. aureus*.
- Tabla 3: Tipos de cassette SCCmec en función del tipo de complejo mec.....70 y complejo ccr.
- Tabla 4: Factores de riesgo para la adquisición de una infección.....73 nosocomial por SARM.
- Tabla 5: Cuadro de medidas para prevenir la extensión de SARM entre.....74 los pacientes infectados.
- Tabla 6: Posibilidades de secuencias diferentes para cada uno de los siete.....80 loci de la técnica MLST.
- Tabla 7: Códigos numéricos de cada tipo de repetición y asignación de.....82 un spa-tipo concreto a cada perfil distinto de repeticiones.
- Tabla 8: Perfiles de susceptibilidad antimicrobiana de cepas CO-SARM.....93 y cepas ACS-SARM.
- Tabla 9: Características diferenciales entre CO-SARM y ACS-SARM.....94

MATERIAL Y MÉTODOS

- Tabla 10: Descripción de cada AAM.....102
- Tabla 11: Distribución del número de cepas escogidas por bloque para.....108 genotipaje, según AAM, origen de la infección, y tipo de muestra.
- Tabla 12: Juego internacional de fagos.....109
- Tabla 13: Espectro lítico de los fagos del juego internacional.....111
- Tabla 14: Tabla de calibrado para preparar una solución bacteriana de.....119 10^9 ufc/ml.
- Tabla 15: Secuencias de los cebadores usados para cada gen *housekeeping*...128 en el MLST.
- Tabla 16: Dianas génicas específicas de los diferentes tipos de SCCmec.....130
- Tabla 17: Cebadores utilizados para la amplificación de cada locus.....131 implicado en el tipaje de SCCmec.
- Tabla 18: Cebadores utilizados en la MPCR del subtipaje del.....132 SCCmec IV y detección del tipo V.

RESULTADOS

- Tabla 19: Clasificación de aislados SARM incluidos en el estudio,.....138 según el área sanitaria, bloque estacional y mes en el que fueron aislados.
- Tabla 20: Valores de Incidencia y Prevalencia de la infección SARM.....143 en cada una de las AAM.
- Tabla 21: Proporción de aislados SARM intrahospitalarios y.....144 extrahospitalarios para cada una de las AAM.
- Tabla 22: Patrones de sensibilidad obtenidos para los antibióticos.....146 no específicos para SARM.
- Tabla 23: Resumen de estadísticos descriptivos obtenidos para.....147 antibióticos específicos en la infección por SARM.
- Tabla 24: Proporción de fagotipos obtenidos.....149
- Tabla 25: Resultados obtenidos en el genotipaje de SARM mediante.....150

- rep PCR/Diversilab.
- Tabla 26: Distribución genotípica de aislados SARM obtenida mediante.....153 sistema rep-PCR/Diversilab.
 - Tabla 27: Resultados obtenidos para el genotipaje de SARM mediante.....155 *Spa typing*.
 - Tabla 28 : Concordancia de la clasificación entre *spa typing*, CC-BURP,.....158 MLST y eBURST.
 - Tabla 29: Asociación entre tipo de SCCmec y genotipos SARM descritos.....162 por PFGE.
 - Tabla 30: Asociación entre los resultados obtenidos por los métodos PFGE,..163 *spa typing*, MLST, agrupación clonal CC-BURP y asignación eBURST.
 - Tabla 31: Asociación entre genotipos obtenidos por Diversilab y los.....164 obtenidos por PFGE.
 - Tabla 32: Asociación entre genotipos obtenidos por Diversilab y los.....165 obtenidos por *spa typing*.
 - Tabla 33: Poder de discriminación de cada método de genotipaje.....167
 - Tabla 34: Concordancia entre los métodos de tipaje usando coeficiente.....167 de Rand.
 - Tabla 35: Concordancia entre los métodos de tipaje usando coeficiente de....168 Wallace.
 - Tabla 36: Pulsotipos y número de aislados obtenidos en cada una de las.....168 AAM.
 - Tabla 37: Distribución de los pulsotipos mayoritarios y minoritarios en las...169 diferentes AAM.
 - Tabla 38: Pulsotipos y número de aislados obtenidos en cada uno de los.....175 bloques estacionales.
 - Tabla 39: Porcentajes de sensibilidad y resistencia obtenidos para cada.....176 pulsotipo (con más de un aislado) en los antibióticos no específicos para la infección por SARM.
 - Tabla 40: Porcentajes de sensibilidad y resistencia obtenidos en pulsotipos...177 representados por un único aislado, para los antibióticos no específicos para la infección por SARM.
 - Tabla 41: Valores de parámetros estadísticos para cada uno de los.....179 genotipos representados por más de un aislado, en relación a la CMI obtenida por E-test para los antib. espec. para infección SARM.
 - Tabla 42: Valores de CMI para los antibióticos específicos para la infección..180 por SARM, obtenidos para los pulsotipos representados por un único aislado.
 - Tabla 43: Porcentaje de aislados con CMI a Vancomicina superior e.....181 inferior a 1µg/ml, en cada uno de los genotipos mayoritarios.
 - Tabla 44: Relación de los cuatro tipos de muestras biológicas más.....182 frecuentes (exudados, hemocultivos, orina y muestras respiratorias) con los seis genotipos SARM mayoritarios.
 - Tabla 45: Relación de los seis genotipos SARM mayoritarios con el tipo.....183 de entorno de aislamiento.
 - Tabla 46: Distribución de aislados SARM procedentes de hemocultivos.....184 según el bloque estacional.
 - Tabla 47: Distribución de aislados SARM procedentes de hemocultivos.....185 según el AAM.
 - Tabla 48: Distribución de aislados SARM procedentes de hemocultivos.....185

según el Grupo de Edad.

- Tabla 49: Patrones de sensibilidad de los aislados SARM responsables.....186 de bacteriemias, con respecto a los antibióticos no específicos para infección por SARM.
- Tabla 50: Distribución de los valores de CMI para los antibióticos.....187 específicos para la infección por SARM, en el grupo de aislados procedentes de hemocultivos.
- Tabla 51: Resumen de genotipos representados y su frecuencia, en el.....190 conjunto de aislados SARM procedentes de muestras de hemocultivo.
- Tabla 52: Porcentajes de SARM de adquisición intrahospitalaria y.....191 extrahospitalaria en cada grupo de edad.
- Tabla 53: Comparativa de estadísticos de la CMI para antibióticos.....193 específicos para la infección por SARM, entre el grupo de aislados extrahospitalarios e intrahospitalarios.
- Tabla 54: Clasificación genotípica de los aislados SARM extrahospitalarios..194 e intrahospitalarios.
- Tabla 55: Resumen de las características epidemiológicas y.....196 microbiológicas de cepa CO-SARM.

DISCUSIÓN

- Tabla 56: Evolución en España de la resistencia de SARM a.....203 antimicrobianos de 1994 a 2010 y comparación con los resultados de nuestro estudio en Extremadura en 2010.

ABREVIATURAS:

- AAD: Aminoglucósido Adeniltransferasa
- AAM: Áreas de Atención Microbiológica
- ACME: Elemento Móvil para el Catabolismo de Arginina
- ACS-SARM: *S.aureus* Resistente a Meticilina Asociado al Cuidado Sanitario
- AFLP: Amplificación de Fragmentos de Longitud Polimórfica
- APH: Aminoglucosidasa Fosfotransferasa
- AS: Agar Sangre
- BLEEs: Enterobacterias productoras de Betalactamasas de Espectro Extendido
- BURP: Algoritmo informático que clasifica los tipos de secuencias *spa* relacionadas en diferentes grupos.
- CAT: Cloranfenicol Acetiltransferasa
- CC: Complejo Clonal
- CCBURP: Componente Clonal obtenido mediante algoritmo BURP
- CDC: Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de EE.UU.
- CHIPS: Proteína Inhibidora de Quimiotaxis de *S.aureus*
- CLSI: Instituto regulador de Estándares en el Laboratorio Clínico
- CMB: Concentración Mínima Bactericida
- CMI: Concentración Mínima Inhibitoria
- CO-SARM: *S.aureus* Resistente a Meticilina de Origen Comunitario
- DHFR: Dihidrofolato Reductasa
- EARS: Agencia Europea de Vigilancia de Resistencia Antimicrobiana
- eBURST: Algoritmo informático que divide a un conjunto de resultados obtenidos por MLST, en grupos de aislados relacionados
- ECN: Estafilococos Coagulasa Negativos
- ET: Toxinas Exfoliativas
- EUCAST: Comité Europeo para Test de Susceptibilidad Antibiótica
- FDA: Administración de los EE.UU para el Control de Alimentos y Drogas
- G: Grupo Diversilab
- GISA: *Staphylococcus aureus* Resistente a Glucopéptidos
- HCANM: Área de Navalmoral de la Mata
- HCC: Área de Coria
- HDBV: Área de Don Benito-Villanueva
- HGT: Transferencia Génica Horizontal
- HIC: Área de Badajoz
- HLLZ: Área de Llerena
- HM: Área de Mérida
- HSPA: Área de Cáceres
- h-VISA: *Staphylococcus aureus* con Resistencia Heterogénea a Vancomicina
- HVP: Área de Plasencia
- IACS: Infección Asociada a Cuidados Sanitarios
- IL: Interleuquina
- IN: Infección Nosocomial
- IR: Índice de Rand

- IR: Secuencias Repetidas Invertidas
- IS: Índice de Diversidad de Simpson
- IS: Secuencias de Inserción
- IW: Índice de Wallace
- LRSA: *Staphylococcus aureus* Resistente a Linezolid
- MET: Macrométodo
- MGEs: Elementos Génicos Móviles
- MH: Medio Muller-Hinton
- MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad
- MLS: Grupo de antibióticos constituido por Macrólidos, Lincosaminas y Estreptograminas
- MLST: Tipado mediante Secuencias Multilocus
- MMR: Microorganismo Multirresistente
- MPCR: PCR Múltiple
- MSCRAMMs: Receptores de Adhesión a Moléculas de la Matriz Extracelular
- NAG: Ácido-N-Acetilglucosamina
- NAM: Ácido-N-Acilmurámico
- NAVM: Neumonías Asociadas a Ventilación Mecánica
- NORA: Proteína de membrana de Flujo de Salida asociada a Antibióticos
- P: Patrón Diversilab
- PAP: Análisis Poblacional de cepas h-VISA
- PBP: Proteínas de Unión a Penicilina
- PFGE: Electroforesis de Campo Pulsado
- PG: Peptidoglicano
- PVL: Leucocidina de Panton Valentine
- RAPD: Amplificación con cebadores al azar de regiones polimórficas de ADN
- REA: Endonucleasas de Restricción
- rep-PCR: Análisis de amplificación de secuencias repetitivas
- RM: Sistema de Modificación-Restricción
- SaPIs: Islas de Patogenicidad Estafilocócica
- SARM: *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina
- SASM: *Staphylococcus aureus* Sensible a Meticilina
- SCCmec: Análisis molecular del cassette cromosómico *mecA* de *S.aureus*
- SCCs: Cassettes Cromosómicos Estafilocócicos
- SCIN: Inhibidor del Complemento Estafilocócico.
- SCVs: Variantes formadoras de Pequeñas Colonias
- SEI: Tóxicas similares a la Enterotoxina Estafilocócica
- SEs: Enterotoxinas Estafilocócicas
- *spa typing*: Análisis molecular del gen de la proteína A estafilocócica
- ST: Tipo de Secuencia obtenida mediante MLST
- Tn: Transposón
- TNF- α : Factor α de Necrosis Tumoral
- TSST1: Tóxina del Síndrome de Shock Tóxico
- VISA: *Staphylococcus aureus* con Resistencia Intermedia a Vancomicina
- VRE: Enterococos Resistentes a Vancomicina
- VRSA: *Staphylococcus aureus* Resistente a Vancomicina
- VSSA: *Staphylococcus aureus* Sensible a Vancomicina

1. INTRODUCCIÓN

1.1 LA ENFERMEDAD INFECCIOSA

Las enfermedades infecciosas han constituido siempre una amenaza continua para la humanidad. Desde las plagas bíblicas y la plaga de Atenas en la antigüedad, a la peste negra de la Edad Media, la pandemia de 1918 (“gripe española”), y más recientemente, la pandemia de VIH/SIDA, las enfermedades infecciosas han ido surgiendo o reapareciendo de una u otra forma desafiando a la Medicina (*Fauci y col., 2005*).

Las infecciones, aunque han abandonado los primeros puestos que ostentaban en el pasado, continúan siendo una importante causa de mortalidad en el mundo. Actualmente, son la segunda causa de muerte tras las enfermedades cardiovasculares (*Biedenbach y col., 2004*). Durante el siglo XX la mortalidad por enfermedad infecciosa disminuyó de forma drástica con el consiguiente incremento en la expectativa de vida. Estos cambios se debieron principalmente a la aparición de los antibióticos y a los avances en técnicas diagnósticas y terapéuticas medicoquirúrgicas. Sin embargo, en las últimas décadas, estos esfuerzos se han visto contrarrestados por el aumento constante del número de pacientes inmunodeprimidos, la aparición de bacterias resistentes a los antibióticos, las sobreinfecciones por hongos y virus, así como el uso frecuente de aparatos y procedimientos invasivos.

1.2 MULTIRRESISTENCIA ANTIBIÓTICA

La constante exposición de la flora bacteriana humana y animal a los antibióticos, ha favorecido la selección de organismos resistentes a antibióticos y su amplia diseminación en la población humana, y la transferencia de genes de resistencia entre cepas bacterianas ha ampliado la lista de organismos resistentes. Esta exposición continua tiene lugar gracias al uso generalizado de antibióticos en el ser humano y en la medicina veterinaria para el tratamiento o prevención de infecciones, en animales de granja para promocionar su crecimiento, y en varias ramas de la agricultura para el control de enfermedades (*World Health Organization, 1983*).

El aumento de la resistencia a los antimicrobianos de los microorganismos es un problema creciente de salud pública en todo el mundo y principalmente entre los microorganismos que causan infecciones nosocomiales. La resistencia a los

antimicrobianos conduce a un aumento de la morbilidad, la mortalidad y los costes hospitalarios (*Cercenado, 2010*).

No existe una definición universalmente aceptada de bacteria multirresistente que sea aplicable a todos estos microorganismos; el concepto puede tener matices diferentes en función del enfoque (clínico, microbiológico o epidemiológico). Desde un punto de vista general, la definición debe incluir al menos dos condiciones: que exista resistencia a más de una familia o grupo de antimicrobianos de uso habitual, y que esa resistencia tenga relevancia clínica (es decir, que suponga o pueda suponer una dificultad para el tratamiento) y epidemiológica (posibilidad de brotes epidémicos, transmisión del mecanismo de resistencia, etc.). Aceptando estas condiciones, y con las excepciones de *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus pneumoniae* y *Salmonella* spp., el término “microorganismo multirresistente” (MMR) se ha utilizado sobre todo para bacterias clásicamente hospitalarias que han desarrollado resistencia a múltiples antimicrobianos, y que son capaces de ocasionar brotes, como *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM), *Enterococcus* spp. resistente a glucopéptidos, enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEEs) y *Acinetobacter baumannii* o *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a distintos grupos de antimicrobianos. Además, se suele calificar como multirresistentes a bacterias intrínseca o naturalmente resistentes a múltiples antimicrobianos, como *Stenotrophomonas maltophilia* o *Clostridium difficile* (*Rodríguez-Baño y col., 2004*).

La bacteria puede obtener la resistencia antibiótica, por la adquisición horizontal de genes de resistencia (portados frecuentemente por plásmidos y transposones), por recombinación cromosómica con ADN foráneo, o por mutaciones cromosómicas en diferentes *loci* (*Martínez y col., 2000*).

1.3 CONCEPTOS DE INFECCIÓN NOSOCOMIAL E INFECCIÓN ASOCIADA A LOS CUIDADOS SANITARIOS

La infección nosocomial (IN) se define de manera tradicional como aquella que se desarrolla durante la hospitalización del enfermo y que no se hallaba presente o estaba en período de incubación, en el momento de admisión en el centro. Si el período de incubación de dicha enfermedad es desconocido, se acepta que la infección tiene carácter nosocomial cuando se desarrolla en cualquier momento tras la hospitalización, aunque de forma arbitraria suele considerarse un período de tiempo mínimo de 48 horas

después del ingreso. Una infección ya presente en el momento del ingreso puede catalogarse como nosocomial si está relacionada directamente con un ingreso previo en el mismo hospital o institución sanitaria o en otros. La aparición de una infección tras el alta del paciente debe considerarse infección hospitalaria si el contagio o colonización se produjo durante la estancia del paciente en el hospital, aunque no se manifieste hasta después del alta. De esta manera, las infecciones quirúrgicas que se desarrollan después de que el paciente haya sido dado de alta, son ejemplos de este tipo de infecciones (*Girón y col., 2002*).

Sin embargo, en la actualidad, el concepto de IN se extiende también a aquella infección que se relaciona con los cuidados sanitarios en un sentido amplio. Las camas hospitalarias han disminuido como consecuencia del aumento de plazas en otras formas de atención sanitaria. Actualmente, la atención hospitalaria está relacionada con los cuidados ambulatorios, la hospitalización a domicilio, los centros sociosanitarios y de larga estancia, e incluso con las instituciones geriátricas. Los pacientes pueden salir del hospital colonizados por bacterias resistentes y transmitirlos a otros pacientes atendidos en esas estructuras alternativas. En todos estos ámbitos asistenciales se genera un tipo de infección que se parece más a la nosocomial que a la comunitaria. Esto ha llevado a cambiar el clásico concepto de Infección Nosocomial, por el más actual de Infección Asociada a los Cuidados Sanitarios (IACS) que engloba ambos tipos de infecciones. Existe un importante desconocimiento sobre el verdadero impacto de estas infecciones al no disponer de tanta información como la que tenemos referida a los hospitales. Por todo esto, se entiende que no sea suficiente el mantener un estricto control de la IN y la multirresistencia sólo en el medio hospitalario, debe tenerse una visión más global con una coordinación de los esfuerzos en los diferentes ámbitos (*Olaechea y col., 2010*).

1.4 IMPACTO Y COSTES DE LA INFECCIÓN NOSOCOMIAL EN EL SISTEMA SANITARIO

Medir las consecuencias de las IN es complejo, sobre todo si nos preguntamos por la mortalidad y morbilidad atribuible a este tipo de infecciones. Responder a la pregunta de si el paciente fallece o tiene una estancia más prolongada por la IN, requiere valorar un conjunto de variables de confusión que influyen en distinto grado según la infección que se trate, y que pueden agruparse en factores vinculados con el paciente, relacionados con la infección y su agente etiológico, y los conectados con el tratamiento

recibido y la evolución posterior, en el que se incluyen protocolos de actuación propios de cada hospital en relación con el alta y con la limitación del esfuerzo terapéutico (*Blot y col., 2007*). Aún así, podemos encontrar estudios que se atreven a ofrecer ratios de mortalidad atribuibles a la IN situados entre el 6% y el 9% (*Schumacher y col., 2007; Gastmeier y col., 2007; Roberts y col., 2010*). Actualmente, se estima en los Estados Unidos una incidencia de 2 millones de casos de Infección Asociada al Cuidado Sanitario, de las cuales 90.000 terminan con el fallecimiento del paciente (*Stone y col., 2005*).

La presencia de IN siempre se asocia a un incremento de la estancia hospitalaria del paciente y de los costes consiguientes. En general, la IN se asocia a un incremento de la estancia hospitalaria que oscila entre los 3 y los 11 días según los estudios consultados (*Erbaydar y col., 1995; Schulgen y col., 2000; Roberts y col., 2010; Hassan y col., 2010*). Evidentemente los datos varían de acuerdo con la localización de la infección: con un mayor incremento de la estancia en las neumonías asociadas a ventilación mecánica (*Warren y col., 2003*) y bacteriemias (*Pirson y col., 2005*), y menos en infección urinaria (*Chant y col., 2011*) o infección de herida quirúrgica (*Kirkland y col., 1999; Lissovoy y col., 2009*), la adecuación del tratamiento antibiótico empírico y el patógeno causante. Por todo ello, también el impacto económico de la IN varía de unas a otras situaciones sanitarias (Tabla 1). Algunos estudios en Estados Unidos sitúan la factura media atribuible a la IN en 10.375 \$ por paciente, con un cifra global para el país de 4,5 a 16,6 billones de dólares al año (*Hassan y col., 2010; Stone y col., 2005*). En este cómputo se tienen en cuenta los gastos de personal, los medicamentos administrados y las pruebas diagnósticas necesarias para el diagnóstico de la infección.

La IN y la multirresistencia a antibióticos, afecta al hospital en tres aspectos (*Olaechea y col., 2010*):

1. Por la necesidad de que cada hospital disponga de equipos y programas de vigilancia de las IN, que busquen específicamente aquellos patógenos con mayor multirresistencia y con posibilidad de transmisión entre pacientes.
2. Porque hace que todo el hospital diseñe e implante un programa de política antibiótica, ya que el mal uso de antibióticos es una de las causas de aparición y persistencia de MMR.
3. Necesidad de mantener aislados a los pacientes con infecciones o colonizaciones por MMR, y por tanto, implica una mayor disponibilidad de camas,

modificaciones arquitectónicas, consumo de recursos materiales e incremento del personal para atender a estos pacientes.

Tipo de infección	Costes atribuibles (\$ / paciente)		Intervalo	
	Media	Des. Típica	Mínimo	Máximo
Infección de herida quirúrgica	25.546	39.875	1783	134.602
Infección en sangre	36.441	37.078	1822	107.156
Neumonía asociada a ventilación mecánica	9969	2920	7904	12.034
Infección del tracto urinario	1006	503	650	1361

Tabla 1. Costes (en dólares/paciente) atribuidos a la IN según el lugar de la infección (*Stone y col., 2005*)

1.5 CONTRIBUCIÓN DE LA EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR EN EL DIAGNÓSTICO Y CONTROL DE LA INFECCIÓN NOSOCOMIAL Y COMUNITARIA POR MICROORGANISMOS MULTIRRESISTENTES

La Epidemiología es una rama de la ciencia que se dedica al estudio de las enfermedades y los factores de riesgo que afectan a una población humana, su distribución y control (*Burton y col., 2005*). El conocimiento derivado de los estudios epidemiológicos permite determinar la historia natural de las enfermedades, es decir, su etiología, frecuencia de aparición, distribución, vías y patrón de diseminación, reservorios o factores que incrementen el riesgo de contraerla. Adicionalmente, ofrece una alternativa para establecer mecanismos que permitan prevenir o controlar la enfermedad, así como la eficacia de dichas medidas y la magnitud del beneficio al aplicarlas sobre la población (*Johnson y col., 2005*). La Epidemiología Molecular es una disciplina que permite abordar los estudios a través de la utilización de técnicas moleculares, combinando la epidemiología analítica con métodos avanzados de laboratorio (*Mathema y col., 2006*).

A través de la epidemiología molecular se ha incrementado el conocimiento sobre las bacterias, virus y parásitos causantes de enfermedades infecciosas. Se ha

convertido en una disciplina importante en la investigación de este tipo de enfermedades, lo que implica un mejor conocimiento de su distribución y la posibilidad de diagnosticarlas con mayor rapidez y ofrecer un mejor tratamiento.

Los métodos para tipificación de microorganismos pueden clasificarse en dos grandes grupos: fenotípicos y genotípicos. Los métodos fenotípicos se basan en la determinación de características bioquímicas y/o fisiológicas. Históricamente constituyeron la primera herramienta que permitió la comparación de microorganismos (*Singh et al., 2006*). Incluyen la determinación de actividades enzimáticas, capacidades metabólicas, determinantes antigénicos o susceptibilidad frente a antimicrobianos, entre otros. Las técnicas de tipificación genotípicas involucran el estudio del genoma del microorganismo causal de la enfermedad, permitiendo analizar propiedades, características o polimorfismos genéticos presentes en los agentes etiológicos (*Pfaller y col., 1999*).

Los métodos fenotípicos constituyen una herramienta de suma importancia para la tipificación de muchos patógenos, no obstante, el alcance de estos procedimientos puede encontrar serias restricciones. Los rasgos fenotípicos son susceptibles a la influencia del ambiente, que pueden provocar variaciones en la expresión genética, por lo cual, el resultado obtenido a través de la detección de este tipo de caracteres puede presentar poca estabilidad, reproducibilidad o poder discriminatorio. Adicionalmente, presentan la desventaja de encontrarse, en algunos casos, limitados a unas pocas especies. Resultan además, poco prácticos para el análisis de microorganismos de crecimiento lento, dificultoso o no cultivables ya que, generalmente, requieren la multiplicación de los mismos, y resultan poco apropiados para determinar las relaciones de clonalidad entre microorganismos, presentando una limitada capacidad de identificación a nivel de subespecie, subtipo o cepa (*Versalovic y col., 2002*).

Los métodos genotípicos están basados en la detección del material genético del organismo, por lo tanto son independientes de los cambios en el patrón de expresión genética y de las influencias ambientales, ofreciendo una alternativa con mayor estabilidad y reproducibilidad. No requieren necesariamente el aislamiento y cultivo de los microorganismos, siendo posible obtener los resultados en tiempos más cortos y, usualmente con mayor poder de resolución, sensibilidad y especificidad que los métodos fenotípicos. Los métodos de genotipificación se han constituido en una herramienta que complementa a los procedimientos fenotípicos, extendiendo los alcances de la epidemiología y permitiendo un mayor entendimiento de los problemas

asociados al proceso salud-enfermedad, incrementando la posibilidad de implementar medidas efectivas de control epidemiológico (*Versalovic y col., 2002*).

La aparición de un cuadro infeccioso en un paciente o de un brote en una comunidad u hospital pone en marcha una serie de medidas destinadas a su control, y éstas forman parte de un plan que se aplica en dos etapas. En primera instancia, se realiza el aislamiento del patógeno y su clasificación. Conocido el microorganismo responsable de la infección deben definirse con precisión su origen, la cadena epidemiológica que ha conducido a la infección y las medidas de control adecuadas. En ocasiones, para identificar al patógeno, su origen o las vías y patrón de diseminación, se requiere determinar las similitudes o diferencias filogenéticas entre diversos aislados. Para realizar este análisis se trabaja bajo el supuesto de que las cepas filogenéticamente relacionadas se han derivado, recientemente, de la expansión clonal de un precursor único, por lo tanto poseen un nivel de similitud entre sus genotipos, significativamente superior al que se encontraría entre cepas no relacionadas del mismo taxón, escogidas al azar. Los aislados no relacionados clonalmente, tendrán genotipos diferentes ya que provienen de ancestros distintos (*Sabriá-Leal y col., 1992*).

Los métodos de tipificación fenotípicos tienen un valor discriminatorio insuficiente para definir las relaciones filogenéticas entre microorganismos de la misma especie, no permitiendo establecer la clonalidad entre los aislados. En este sentido, las técnicas de genotipificación permiten determinar si los microorganismos analizados se encuentran genéticamente relacionados y por lo tanto, pueden ser considerados como representantes de una misma cepa o clon. Por esta razón, su uso se ha popularizado a lo largo de los años, habiendo sido modificadas y perfeccionadas en el sentido de incrementar su capacidad discriminatoria, reproducibilidad y versatilidad.

La determinación de la clonalidad entre bacterias es útil en varias situaciones, por ejemplo (*Singh y col., 2006*):

- a. Para discriminar infección *versus* contaminación, como por ejemplo el caso de la bacteriemia causada por múltiples cepas de *Estafilococos* coagulasa negativos
- b. En el caso de ser necesario evaluar el origen clonal frente a infecciones recurrentes, y así discriminar entre re-infección por el mismo clon o infección por un clon distinto. Si el microorganismo causante del segundo cuadro infeccioso es el mismo que causó la infección original, se puede considerar la posibilidad que se esté aplicando un tratamiento

antimicrobiano inadecuado o poco efectivo, siendo necesario entonces la implementación de una terapia alternativa.

- c. Para la evaluación de la clonalidad entre aislados, cuando se estudian brotes de infecciones intra o extrahospitalarias. Por ejemplo, para establecer la relación genética entre aislados de una misma fuente, pero que manifiestan diferencias a nivel fenotípico o, por el contrario, aislados provenientes de distintos pacientes pero que muestran características fenotípicas similares. La confirmación de la relación genética entre estos microorganismos permitiría determinar la fuente de la infección, el número de clones circulantes, el vehículo, la ruta y el patrón de distribución. El conocimiento que brindan las técnicas de genotipificación permite la implementación de nuevos programas que contribuyan a la detección, control y prevención de los brotes infecciosos.

Los métodos moleculares para genotipificación son variados y pueden estar basados en el análisis de polimorfismos de secuencias repetidas, de elementos variables o del genoma completo de los microorganismos. Desde el punto de vista metodológico, las técnicas moleculares para genotipificación pueden clasificarse en tres grandes grupos:

- a) Aquellas basadas en el estudio y comparación del electrocariotipo (de un segmento del genoma o del genoma completo) mediante electroforesis de campo pulsado (PFGE).
- b) Las relacionadas con la amplificación de fragmentos de DNA por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como es la rep-PCR.
- c) Las que involucran la secuenciación parcial del genoma de los microorganismos, como son el MLST o el *Spa typing*.

Son muchas las aplicaciones de los métodos de tipificación descritos anteriormente. Han sido publicados numerosos artículos en los cuales, a través de las técnicas de genotipificación, se han obtenido resultados de importancia epidemiológica en la infección nosocomial. Se ha logrado identificar toda una variedad de reservorios del foco de infección entre los que se encuentran: material médico-quirúrgico, mobiliario, soluciones empleadas en el tratamiento de los pacientes, o incluso, el personal médico-asistencial (*Stojowska y col., 2009; Denton y col., 2003; Rodríguez y col., 1997*). En el campo de la salud pública también han sido útiles estas técnicas. En el año 2007, mediante PFGE, se reveló como fuente de infección por *Salmonella enterica*,

un grupo de roedores domésticos (hamsters) vendidos por el mismo distribuidor a las personas afectadas. Los patrones de bandas, obtenidos después de digerir el ADN genómico de las cepas aisladas de los pacientes, eran idénticos entre sí, e indistinguibles del obtenido a partir de los animales (Swanson y col., 2007), hecho que corroboraba su asociación. Otro ejemplo interesante lo reporta el grupo de Gardella y col. (2005), quienes analizaron 40 cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (SARM) aislados de dos hospitales universitarios. Los resultados, obtenidos mediante Rep-PCR y PFGE, demostraron que un clon de SARM multirresistente, había sido desplazado por un clon con un perfil de resistencia a antibióticos distinto, información que contribuyó al tratamiento de pacientes con infecciones nosocomiales por SARM.

Los métodos genotípicos se han convertido en elementos esenciales en los análisis epidemiológicos, siendo poderosas herramientas que complementan las estrategias utilizadas para combatir la dispersión de las enfermedades infecciosas. El alcance de los resultados dependerá, en buena medida, de la selección adecuada de la técnica, de su correcta implementación y, frecuentemente, de la aplicación combinada con diversos procedimientos. Estas técnicas no son un sustituto de los métodos convencionales, utilizados de rutina en los estudios epidemiológicos. Se plantean como un nuevo elemento que cubre las limitaciones de las técnicas fenotípicas y permiten fortalecer el campo epidemiológico. De esta forma, muchas voces abogan por que el análisis del genoma de los microorganismos debe ser incorporado como un instrumento más, cuyos resultados permitan a la Epidemiología ampliar la dimensión del análisis y penetrar con mayor fuerza en la realidad infecciosa de una comunidad.

1.6 EL GÉNERO *Staphylococcus*

El género *Staphylococcus* está ubicado junto a los géneros *Micrococcus*, *Planococcus* y *Stomatococcus* dentro de la familia *Micrococcaceae*. Los miembros del género *Staphylococcus* son cocos grampositivos, inmóviles y no esporulados, de 0,15 a 1,5 μm de diámetro; aparecen solos y en parejas, en cadenas cortas y tienen tendencia a agruparse formando los racimos irregulares tridimensionales de los que deriva su nombre (del griego *staphulé*, “con forma de uva”), indicativo de la habilidad para dividirse en más de un plano. Los estafilococos son microorganismos poco exigentes en sus requerimientos nutricionales. Pueden crecer en muy diversas condiciones ambientales, pero lo hacen mejor a temperaturas entre 30 y 37°C y a un pH próximo a la

neutralidad. Son resistentes a la desecación y a los desinfectantes químicos, y toleran concentraciones de NaCl de hasta el 12%. Salvo raras excepciones, los estafilococos son anaerobios facultativos (*Kloos y col., 1999*). Se dividen en dos grupos: aquellos con la capacidad para coagular el plasma (coagulasa positivos) y aquellos que no pueden hacerlo (coagulasa negativos). De las seis especies de estafilococos coagulasa-positivos identificadas, el único patógeno importante para el ser humano es *Staphylococcus aureus*. Cuando crecen en medios con sangre, las colonias típicas de *Staphylococcus aureus* presentan una consistencia cremosa, se pigmentan de un color amarillo o dorado y se rodean de un halo de β -hemólisis o hemólisis completa. Algunas especies de estafilococos coagulasa negativos (ECN) son agentes etiológicos frecuentes de infección en el hombre. Se conocen 28 especies de ECN, de las cuales *Staphylococcus epidermidis* es la que se aísla más a menudo. Le siguen en frecuencia *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus haemolyticus* y *Staphylococcus warneri*. *Staphylococcus lugdunensis* constituye una causa cada vez más común de infección humana grave. *Staphylococcus saprophyticus* es el estafilococo que se aísla con mayor frecuencia en las muestras de orina. Las colonias de ECN desarrollan un aspecto variable en los diferentes medios de cultivo en función de la especie. Por ejemplo, las colonias de *Staphylococcus epidermidis* carecen de pigmentación y no son hemolíticas en agar sangre (*Rogers y col., 2009; von Eiff y col., 2002; von Eiff y col., 2001*).

Los estafilococos son colonizadores resistentes y ubicuos de la piel y las mucosas del ser humano, y figuran entre los primeros patógenos humanos identificados. Causan diversos síndromes, entre ellos infecciones piógenas superficiales y profundas, intoxicaciones generalizadas e infecciones urinarias. Los estafilococos constituyen la primera causa de bacteriemia, infecciones de la herida quirúrgica e infecciones de prótesis en los EE.UU (*Lindsay y col., 2004*). En España se mantienen como primera causa de bacteriemia representando el agente causal en el 45% de los casos, aunque en la infección de herida quirúrgica no es el patógeno predominante, aislandose sólo en el 15% de las infecciones (*EPINE 2010*).

Staphylococcus aureus es el patógeno humano más importante del género. Supone uno de los principales motivos de preocupación en el ámbito de la salud pública por su capacidad de permanencia en sus reservorios, su transmisibilidad, su capacidad destructora y su creciente resistencia a toda clase de antimicrobianos (*Lindsay y col., 2004*).

1.6.1 STAPHYLOCOCCUS aureus

Staphylococcus aureus ha sido reconocido como un importante patógeno humano, desde que Sir Alexander Ogston lo propusiera, por primera vez a finales del siglo XVIII, como la principal y más frecuente causa de la herida supurativa. Su virulencia quedó evidenciada en el año 1941 cuando se reportó que los ratios de mortalidad asociados a la bacteriemia por *Staphylococcus aureus* en 122 pacientes del *Boston City Hospital* eran del 82%. Evidentemente, la masiva introducción y distribución de los antibióticos β -lactámicos contribuyeron a descender de manera importante estos índices de mortalidad. Durante la década de los años 80 y 90, se publicaron numerosos trabajos que describían brotes de infección nosocomial producidos por *Staphylococcus aureus* en España. Como ejemplo, tenemos el descrito en el año 1988 en las salas de cirugía del Hospital General Gregorio Marañón, que posteriormente se propagó por toda la institución, llegando a causar un número total de infecciones de 245 hasta abril de 1990, con un índice de mortalidad del 30% (Parras y col., 1991). Otro ejemplo fue el descrito en el Hospital Clinic de Barcelona, con un total de afectados de 347 entre Septiembre de 1989 y Octubre de 1991 (Trilla y col., 1993). Hoy en día, y a pesar de la antibioterapia, *Staphylococcus aureus* sigue siendo uno de los patógenos causantes más frecuentes de infecciones en pacientes hospitalizados. Además, el incremento de la resistencia a distintos antibióticos indica que esa prevalencia continuará incrementándose en el futuro (Archer y col., 1998). Debido a todo esto, es importante entender la naturaleza y patogénesis del microorganismo, de las infecciones que provoca, y de las estrategias actualmente disponibles para la terapia y prevención.

1.6.1.1 DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

Staphylococcus aureus se recupera con facilidad a partir de las muestras clínicas. Por lo tanto, no requiere métodos especiales en la toma o conservación de las muestras para diagnóstico. El examen directo de la muestra, mediante tinción de Gram y microscopía, es de gran utilidad en fluidos habitualmente estériles y colecciones purulentas, donde la presencia de cocos grampositivos, agrupados formando racimos, es muy característica del género *Staphylococcus*, aunque no permite diferenciar *Staphylococcus aureus* de ECN.

Staphylococcus aureus crece en los medios sólidos habituales, formando las colonias características en un tiempo comprendido entre las 18 y 24 horas. También los medios líquidos convencionales, en especial los utilizados para hemocultivos, recuperan con facilidad a este microorganismo.

Una vez aislado, la identificación se lleva a cabo mediante pruebas de:

1. Cultivo: observación de una morfología típica de colonia (dorada y β -hemolítica en agar sangre).
2. Bioquímica: catalasa positiva, coagulasa positiva, fermentación del manitol, fermentación de la trehalosa, y producción de una nucleasa estable al calor (termonucleasa).

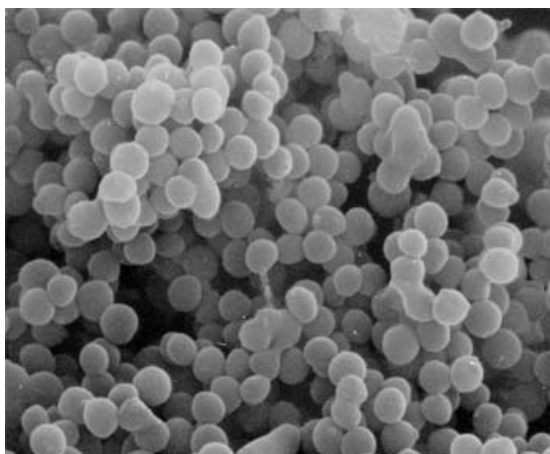


Figura 1. Imagen de microscopía electrónica de barrido donde se aprecia el típico crecimiento en racimo de los estafilococos (www.ucm.es)

La habilidad para coagular el plasma mediante su coagulasa, es el método más ampliamente utilizado para la identificación, pues permite diferenciar *Staphylococcus aureus* de los ECN. Existen diferentes técnicas para la detección de coagulasa en *Staphylococcus*. La prueba en portaobjetos para la coagulasa ligada o *clumping factor* es la manera de obtener una rápida identificación, y la prueba de la coagulasa en tubo con plasma reconstituido que detecta coagulasa libre, es definitiva. Así, siempre que se sospeche la presencia de *Staphylococcus aureus* y el resultado de la coagulasa en porta sea negativo, hay que confirmar por la técnica de coagulasa en tubo (Prats y col., 2005). Las pruebas de aglutinación de látex, como Slidex Staph Plus (Biomérieux) y Staphaurex Plus (Murex Biotech), consisten en partículas de látex revestidas con IgG (unidas por proteína A), fibrinógeno (unidas por factor de agregación), e IgG para antígenos específicos de *Staphylococcus aureus* (Andriessse y col., 2011).

La termonucleasa puede ser detectada usando un procedimiento de difusión en agar metacromático (*Lachica y col., 1972*). De la misma forma, como se tratará más adelante, se ha descrito la identificación rápida de *Staphylococcus aureus* mediante amplificación por PCR empleando cebadores que son específicos para esta especie.

1.6.1.2 COLONIZACIÓN Y TRANSMISIÓN

Los seres humanos constituyen el principal reservorio de *Staphylococcus aureus* en la naturaleza. En nuestro organismo se evidencia al mismo tiempo como un organismo comensal y un patógeno. Dado que las infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* son principalmente endógenas, la colonización del hospedador desempeña un papel básico en su epidemiología.

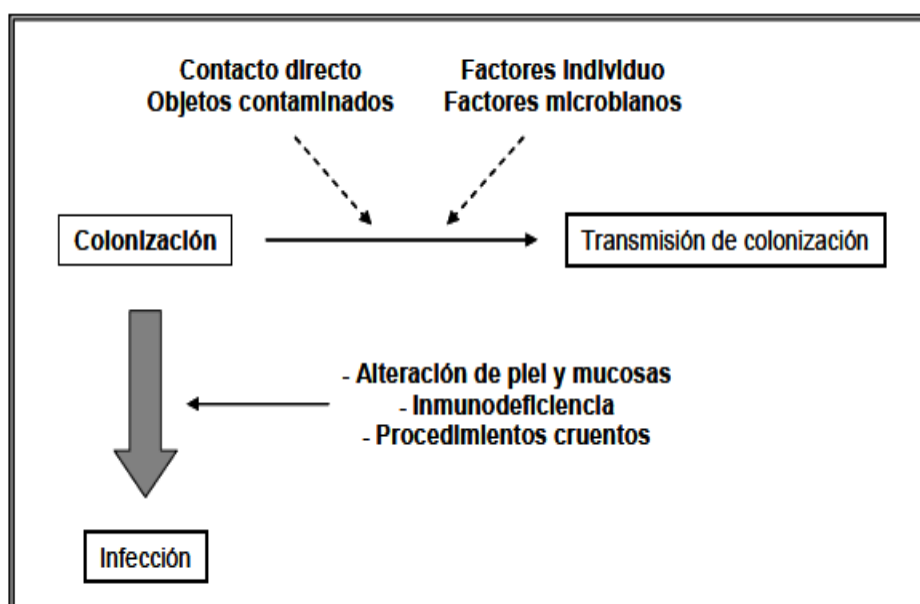


Figura 2. Papel de la colonización en la epidemiología de las infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* (*Domínguez-Luzón y col., 2006*)

El vestíbulo anterior de las fosas nasales constituye el principal nicho ecológico para *Staphylococcus aureus*. Aproximadamente el 20% de los individuos se encuentran colonizados en sus fosas nasales de manera persistente por *Staphylococcus aureus*, y el 30% lo son de manera intermitente (*Edwards y col., 2012*). Sin embargo, numerosos otros sitios pueden ser colonizados, incluyendo las axilas, las ingles y el tracto gastrointestinal. La colonización permite que la bacteria establezca un reservorio desde el cual poder introducirse en el organismo, una vez son superados los mecanismos

innatos de defensa, bien por afeitado, aspiración, inserción permanente de un catéter, o cirugía. La colonización claramente incrementa el riesgo para una posterior infección. Aquellos individuos con infecciones por *Staphylococcus aureus*, se infectan generalmente con su cepa colonizadora (Gordon y col., 2008). Como prueba, en un estudio de bacteriemias los aislados de sangre fueron idénticos a los aislados nasales en el 82% de los pacientes (Von Eiff y col., 2001). Por todo ello, una amplia mayoría de las infecciones de heridas postoperatorias de todos los tipos obedece a una cepa de *Staphylococcus aureus* presente en los orificios nasales antes de la intervención quirúrgica. Así, un estudio demostró que la infección de una herida quirúrgica tras una intervención cardiorácica resulta hasta 10 veces más probable entre pacientes que albergan antes de la operación *Staphylococcus aureus* en las fosas nasales, que en las demás personas (Kluytmans y col., 1997).

La colonización depende de diversos factores microbianos y del anfitrión, así como de la naturaleza de la microbiota no estafilocócica competidora. El estado de portador se da sobre todo en las personas expuestas con frecuencia a los estafilococos y en las que sufren heridas asiduas o crónicas del epitelio cutáneo. Así, la tasa de colonización más alta se da entre el personal sanitario, los pacientes en hemodiálisis, los enfermos con diabetes de tipo I, en usuarios de drogas por vía parenteral, en las personas infectadas por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y en pacientes que presentan enfermedades dermatológicas. Después de dos semanas en un hospital, la tasa de colonización llega a aumentar hasta un 50% (Kluytmans y col., 1997).

La colonización también permite a *Staphylococcus aureus* poder transmitirse horizontalmente entre individuos, por contacto directo o a través del contacto con objetos inanimados contaminados, en los cuidados sanitarios y en la comunidad (Gordon y col., 2008). Muchos casos de infección nosocomial se adquieren por la exposición a las manos de personal sanitario, después de que éstos hayan sido transitoriamente colonizados con *Staphylococcus aureus* desde su propio reservorio o a partir del contacto con un paciente infectado (Domínguez-Luzón y col., 2006).

1.6.1.3 FACTORES DE VIRULENCIA

El armamento de factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* es muy amplio, con productos tanto estructurales como secretados, que juegan un papel primordial en la patogénesis de la infección. Un hecho importante en estafilococos es que igual que un factor de virulencia puede tener amplias y distintas funciones en la

patogénesis, múltiples factores de virulencia pueden contribuir a una misma función. En el establecimiento de la infección, *Staphylococcus aureus* tiene numerosas proteínas de superficie que funcionan como receptores de adhesión a moléculas de la matriz (frecuentemente reciben el nombre de adhesinas), y con ello a los tejidos del huésped. Se denominan MSCRAMMs (*Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*). Las MSCRAMMs unen moléculas como el colágeno, fibronectina y fibrinógeno, y diferentes MSCRAMMs pueden adherirse al mismo componente tisular del hospedador. Estos componentes parecen jugar así un papel principal en la iniciación de infecciones endovasculares, óseas, articulares o dispositivos protésicos. Se estima que diferentes cepas de *Staphylococcus aureus* pueden tener diferentes conjuntos de MSCRAMMs y debido a esto podrían estar predispuestas a causar ciertas clases de infecciones (Hauck y col., 2006; Speziale y col., 2009). Por ejemplo, los dispositivos como catéteres intravenosos centrales son rápidamente revestidos con componentes del suero, tales como el fibrinógeno o la fibronectina, que permiten que los estafilococos se adhieran a través de los mecanismos mediados por las MSCRAMMs y elaborar superficies glicolíticas (similares al glicocalix celular) que facilitan aún más dicha colonización. Así, los catéteres intravenosos centrales de utilización a largo plazo, están frecuentemente implicados en la patogénesis de endocarditis nosocomiales (Cheung y col., 1990; Vaudaux y col., 1993; Flock y col., 1996).

Una vez que *Staphylococcus aureus* se adhiere a los tejidos del huésped o materiales protésicos, es capaz de crecer y persistir de diversas maneras. Una de ellas es la capacidad para formar biofilms. Estos se definen como comunidades de microorganismos que crecen adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo y embebidos en una matriz extracelular que ellos mismos han sintetizado. Esta estructura que *Staphylococcus* desarrolla en las superficies protésicas del huésped, le permite persistir, evadiendo las defensas del huésped y los antimicrobianos. La habilidad para formar y residir en biofilms es una de las razones por las que las infecciones derivadas de dispositivos protésicos pueden ser tan difíciles de erradicar, quedando en muchas ocasiones la retirada de dicho dispositivo como única solución (Donlan y col., 2002). In vitro, *Staphylococcus aureus* puede también invadir y sobrevivir dentro de células epiteliales, incluyendo las células endoteliales. Los estafilococos se adhieren de manera firme mediante unión específica de adhesina y receptor de la superficie endotelial. Estudios in vitro demuestran que después de la fase de adherencia, los estafilococos son fagocitados por células endoteliales. Teóricamente esta facultad le permitiría a

Staphylococcus aureus ocultarse de las defensas del huésped, hecho que particularmente se cree que ocurre en la endocarditis (Ogawa y col., 1985; Hamill y col., 1986). *Staphylococcus aureus* también puede formar pequeñas colonias denominadas SCVs (Small Colony Variants), las cuales deben contribuir a la consecución de una infección persistente y recurrente. In vitro, las SCVs pueden esconderse en el interior de las células sin causar daños significativos en el huésped, quedando relativamente protegidas de antibióticos y defensas del huésped. Más tarde, pueden revertir al fenotipo salvaje y virulento, ocasionando así la infección recurrente (Proctor y col., 1995; Proctor y col., 1998).

Staphylococcus aureus tiene muchas otras características que le ayudan a evitar el sistema inmunológico del huésped durante la infección. Así una MSCRAMM denominada proteína A, dispone de un dominio de unión a ligando en su extremo N-terminal, que reconoce y une específicamente la porción Fc de inmunoglobulinas, hecho que interfiere en el proceso de opsonización. Con esta misma finalidad muchos estafilococos producen microcápsulas. La cápsula puede inhibir la unión de anticuerpos y, por lo tanto, la opsonización y la fagocitosis. De los 11 serotipos de polisacáridos microcapsulares identificados, son los tipos 5 y 8 los que aparecen en el 75% de las infecciones humanas. El estudio de la composición química de cuatro de estos polisacáridos antifagocitarios, incluyendo el 5 y el 8, pone de manifiesto su estrecha relación (Thakker y col., 1998; Lowy y col., 1998).

Durante la infección, *Staphylococcus aureus* produce numerosas enzimas, como proteasas, lipasas y elastasas, que invaden y destruyen los tejidos del huésped, pudiendo así metastatizar a otros tejidos. *Staphylococcus aureus* es también capaz de producir shock séptico, gracias a su capacidad para interactuar y activar el sistema inmune del huésped y las vías de coagulación. Peptidoglicanos y los ácidos lipoteicoicos de la pared celular juegan un papel primordial en esta función (Lowy y col., 1998).

Al margen de los componentes estructurales anteriormente descritos, *Staphylococcus aureus* produce una gran cantidad de exoproteínas, la mayoría de ellas durante la fase de crecimiento exponencial. Estas proteínas degradan los tejidos del hospedador liberando nutrientes requeridos para el crecimiento de la bacteria y/o permiten a la bacteria penetrar más profundamente dentro de los tejidos (Dinges y col., 2000). La mayoría de las cepas producen hemolisinas, nucleasas, proteasas, lipasas, hialuronidasa y colagenasa. La hemolisina α (o α -toxina) es dermonecrótica, neurotóxica y lisa células animales, formando un poro en la membrana (Bhakdi y col.,

1991). La β -hemolisina actúa como esfingomielinasa, la γ -hemolisina tiene actividad leucocitolítica, y se ha sugerido que la δ -hemolisina tiene propiedades surfactantes o formadora de canales (Dinges y col., 2000). La quinasa estafilocócica o estafiloquinasa (Sak) es una proteína con capacidad de interactuar con el plasminógeno del hospedador. El complejo Sak-plasminógeno promueve la formación de plasmina activa, una enzima proteolítica de amplio espectro que favorece la penetración bacteriana en los tejidos circulantes (Bokarewa y col., 2006). La hialuronidasa digiere el ácido hialurónico presente en la piel, el hueso, el cordón umbilical, cuerpo vítreo del ojo y en el líquido sinovial.

Algunas cepas de *Staphylococcus aureus* producen exoproteínas adicionales, que como algunos componentes estructurales, pueden tener como función *in vivo* la evasión de las defensas del hospedador. Así, una proteasa de serina tiene la habilidad de digerir e inactivar los anticuerpos IgG (Prokesová y col., 1992). Otra función de las proteasas incluye la protección frente a péptidos antimicrobianos. Se ha propuesto que una enzima modificadora de ácidos grasos destoxifica los ácidos grasos bactericidas (Mortensen y col., 1992). La estafiloquinasa, además de unir y activar plasminógeno, se ha descrito su interacción con α -defensinas, péptidos bactericidas originados y secretados por los neutrófilos humanos. La estafiloquinasa se une a estas α -defensinas anulando sus propiedades antibacterianas (Bokarewa y col., 2006). Otro ejemplo es el inhibidor de complemento estafilocócico (SCIN), que actúa a nivel de la C3 convertasa (C3bBb), estabilizando y atrapando al complejo en un estado inactivo, incapaz de continuar con la cascada proteolítica de activación (García y col., 2010). La denominada proteína inhibidora de quimiotaxis de *Staphylococcus aureus* (CHIPS), bloquea el fragmento del complemento C5a receptor (C5aR) y el receptor del péptido formilado (IPA) en neutrófilos, inhibiendo por tanto la respuesta de las células inflamatorias (Deisenhofer y col., 1981; Gustafsson y col., 2009).

Algunas cepas de *Staphylococcus aureus* producen superantígenos (se unen a las proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad MHCII, provocando una activación inespecífica de Linfocitos T). Un tipo de ellos son las enterotoxinas (SEs, *Staphylococcal Enterotoxin*), responsables de la intoxicación de alimentos. Hasta el siglo pasado, únicamente se habían descrito 5 variaciones antigénicas de SEs, designadas con letras en mayúscula siguiendo el orden del abecedario según el orden de descubrimiento (SEA-SEE). Sin embargo a partir del año 2000 diferentes grupos aportaron nuevas nuevas variantes enterotoxigénicas, llegando en este tipo de

nomenclatura hasta la enterotoxina SEO (*Lina y col., 2004*). Las distintas enterotoxinas difieren en sus características químicas y moleculares, no así en sus actividades biológicas, mostrando todas la capacidad para estimular células CD4⁺ y CD8⁺ humanas, efecto pirogénico, y la habilidad para potenciar el efecto letal de las endotoxinas estafilocócicas (*Orwin y col., 2001*). Originalmente, se designó como enterotoxina toda aquella con capacidad para inducir el vómito cuando se ingiere por vía oral, jugando el papel clave de la toxiinfección alimentaria por *Staphylococcus aureus*. Sin embargo, recientemente algunos autores han publicado y designado como enterotoxinas a aquellas proteínas con actividades biológicas similares a las ya descritas, pero sin ser probada su capacidad para inducir el vómito. Lógicamente, existe un número muy limitado de laboratorios que estén en condiciones de probar las propiedades eméticas de las supuestas enterotoxinas. Así se propuso que solo aquellas toxinas que inducen el vómito tras su administración oral en un modelo primate, sean designadas como enterotoxina o SE. Las otras toxinas química y biológicamente relacionadas, en las que no ha sido testada la propiedad emética en estos modelos, pasan a denominarse toxinas similares a enterotoxina estafilocócica o SEI (*Staphylococcal Enterotoxin-like*). La más representativa de este último grupo sería la toxina *ssII* (*Lina y col., 2004*). Además de las enterotoxinas y las SEI, existe otro tipo de superantígeno estafilocócico muy importante que es la toxina TSST1 (*Toxic Shock Síndrome Toxin*). Ésta puede llegar a producir un síndrome similar a la sepsis, promoviendo una secreción y activación masiva de citoquinas, que terminan por ocasionar el denominado shock tóxico (*Moza y col., 2007*).

Algunas cepas *Staphylococcus aureus* producen y secretan epidermolisinas o toxinas exfoliativas (ET, del inglés *Exfoliative Toxin*), capaces de causar los síndromes de la piel escaldada o el impétigo ampolloso. Existen dos tipos, la ET de tipo A y la de tipo B. La exotoxina PVL (*Panton Valentine Leukocidine*) presenta una actividad leucocitolítica que le confiere a la cepa una destacada virulencia, relacionada epidemiológicamente con infecciones cutáneas severas y neumonías necrosantes. PVL pertenece a un grupo de toxinas bi-componentes citolíticas formadoras de poro, específicas de células mieloides, en especial macrófagos y neutrófilos, desencadenando la apoptosis de este tipo celular y consiguiente liberación de grandes cantidades de mediadores inflamatorios (*Ladhani y col., 1999; Dinges y col., 2000; Kaneko y col., 2004*).

Como último factor de virulencia de *Staphylococcus aureus*, y uno de los de mayor impacto, debemos referirnos a la diversa y cada vez más amplia resistencia a antimicrobianos. La descripción de la resistencia a cada grupo de antibióticos, y las bases moleculares y genéticas de cada una de ellas se tratan en el apartado 1.6.1.6.

1.6.1.4 BASES GENÉTICAS Y MECANISMOS MOLECULARES DE LOS FACTORES DE VIRULENCIA

Genoma de *Staphylococcus aureus*

El genoma de *Staphylococcus aureus* se compone de un único cromosoma circular de 2.7-2.8 mpb, además de un surtido de elementos accesorios que juegan un papel relevante en su capacidad patogénica (Mlynarczyk y col., 1998).

La comparación entre los genomas de las diferentes cepas de *Staphylococcus aureus* ha revelado gran homología entre ellos, y que consisten en un componente estable que contiene genes presentes en todas las cepas y también un componente variable que abarca genes encontrados únicamente en algunas de las cepas. Así, una investigación preliminar sobre la diversidad genética de las cepas de *Staphylococcus aureus* mediante el empleo de micromatrices de ADN, sugiere que aproximadamente el 22% del genoma de *Staphylococcus aureus* se compone de regiones variables (Fitzgerald y col., 2001). Adicionalmente, gran parte de la diversidad encontrada se ha asociado a grandes regiones de diferencia, muchas de las cuales se corresponden con elementos génicos móviles transferidos horizontalmente. De esta manera, se ha propuesto que el genoma se compone de genes que conforman el núcleo del genoma, la mayoría de los cuales están asociados al metabolismo central, síntesis de ADN (replicación) y ARN; y genes accesorios o auxiliares, que originarán la diversidad inter e intraespecie (Lan y col., 2000). Estos últimos juegan un papel crucial en la plasticidad del genoma bacteriano, permitiendo a la bacteria ajustarse de manera eficiente a las nuevas condiciones ambientales. La presión selectiva del ambiente conduce a una selección natural de aquellos genes que permiten y promueven la supervivencia bacteriana (Malachowa y col., 2010). Los genes accesorios comprenden aproximadamente el 25% de cualquier genoma de *Staphylococcus aureus*, y la mayoría consisten en elementos génicos móviles (MGEs, Mobile Genetic Elements). Estos son típicamente identificados como fragmentos de ADN que codifican una amplia variedad de factores de virulencia y elementos de resistencia, con mecanismos capaces de mediar su propia transferencia e integración en un nuevo ADN huésped. La transferencia de los

MGEs entre las células es conocida como transferencia génica horizontal (HGT), a diferencia de la transferencia vertical, en donde la información genética se transmite de una célula progenitora a su progenie. La HGT ocurre entre procariotas, aunque se ha descrito también entre procariotas y eucariotas, y entre eucariotas. Los MGEs pueden consistir en secuencias de inserción, transposones, fagos, plásmidos, islas de patogenicidad y cassettes cromosomales. En el genoma de *Staphylococcus aureus*, encontramos representación de todos y cada uno de ellos.

Plásmidos

La penicilina fue el primer antibiótico producido en masa para el uso en humanos. Aunque inicialmente su efectividad para el tratamiento de infecciones por *Staphylococcus aureus* era muy alta, hoy en día el 90% de las cepas de *Staphylococcus aureus* que infectan humanos son resistentes a este antibiótico. La resistencia a Penicilina es conferida por la enzima β -lactamasa, quien rompe el anillo β -lactámico de este antibiótico. En *Staphylococcus aureus* esta enzima es codificada por el gen blaZ, regulado a su vez por los genes blaI (codifica el represor BlaI que se une al ADN de blaZ impidiendo su transcripción) y blaR (codifica BlaR, un transductor de señal de la presencia de antibiótico, de manera que en presencia de β -lactámicos degrada BlaI permitiendo la transcripción y síntesis de β -lactamasa) (Chambers y col., 1997).

Más recientemente, se han descrito cepas de *Staphylococcus aureus* que han tomado elementos de resistencia a vancomicina, dando lugar a la emergencia de los VRSA (del inglés *Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus*). Al contrario que la resistencia intermedia a vancomicina (cepas VISA, con CMI= 4-8 μ g/ml), cuyo mecanismo no es bien conocido, la resistencia completa se encuentra bien caracterizada. Así, su ocurrencia se debe a la presencia y expresión del transposón Tn1546, que forma parte estructural de un plásmido conjugativo (de Niederhäusem y col., 2011; Perichon y col., 2009; Courvalin y col., 2006).

No solo encontraremos plásmidos que medien resistencia antibiótica en *Staphylococcus aureus*. También existen algunos que contienen genes codificantes de toxinas. Por ejemplo, el pRW001 contiene genes que codifican la toxina exfoliativa B (ETA B) (Jackson y col., 1986). Sin embargo no es el único elemento en el que se encuentran estos genes, pues también se han descrito en fagos ϕ ETA, en las islas genómicas vSA γ , y en otro plásmido, el pETB (Kato y col., 2011; Yamaguchi y col., 2002).

Bacteriófagos

Los fagos pueden tener un impacto importante en la expresión de factores de virulencia a través de mecanismos de conversión lisogénica, tanto positiva como negativa. En la positiva, la bacteria expresa los factores codificados por el genoma del profago, una vez se inserta en el cromosoma bacteriano. Por contra, la conversión lisogénica negativa ocurre cuando se produce la inactivación de genes bacterianos codificantes de factores de virulencia, al integrarse el ADN del fago dentro del cromosoma bacteriano. Esto último le ocurre por ejemplo a la β -hemolisina de *Staphylococcus aureus*. Sin embargo, aunque se produzca la pérdida de β -hemolisina durante la lisogenia, estos profagos contienen genes que codifican proteínas inmunomoduladoras, como el SCIN y el CHIPS (Van Wamel y col., 2006). Bacteriófagos del grupo serotipo F se han descrito como mediadores de una simultánea triple conversión lisogénica, que aporta a *Staphylococcus aureus* los genes codificantes de β -lisina, enterotoxina A y proteína Sak (Coleman y col., 1989). La toxina PVL también se encuentra codificada por un fago. De hecho algunos autores se refieren a esta toxina como el fago-PVL (Kreienbuehl y col., 2011). Recientemente se ha descrito al fago tipo 187 como portador de la toxinas TSST-1 y enterotoxina C (Piechowicz y col., 2008).

Los profagos y las moléculas codificadas por estos, también trabajan en asociación con otros MGEs en *Staphylococcus aureus*. Por ejemplo, algunos profagos mediante transducción, permiten la movilidad de algunas islas de patogenicidad estafilocócicas. El ejemplo más claro es la habilidad del fago 80 α para mediar la excisión y transferencia de la isla SaPII a otro estafilococo. Algunos fagos también tienen la habilidad, por el mismo fenómeno de transducción, de transferir genes de resistencia a antibióticos de una a otra célula. Como ejemplos, el plásmido pS194 con un gen de resistencia a cloranfenicol y el pI258 para eritromicina, son transducidos por los fagos ϕ 11 y ϕ 11de, respectivamente.

Islas de patogenicidad

Islas de patogenicidad estafilocócica (SaPIs) son MGEs de 14-17 kb de tamaño. Hasta hoy, al menos 16 tipos de SaPIs han sido descritas y secuenciadas, considerándose a SaPII como el prototipo de todas ellas. Las SaPIs constituyen una familia génica con un núcleo de genes muy conservados. Estos genes principales incluyen dos marcos de lectura codificantes de proteínas reguladoras de la transcripción, un gen codificante de una integrasa, y otro de una terminasa. Al margen de estos genes

conservados, todas las SaPIs, salvo algunas excepciones, contienen regiones codificantes de toxinas. Así el SaPI1 y SaPI2 codifican la toxina TSST-1, y las SaPI3 y SaPI4 hacen lo mismo con la enterotoxina B (Novick y col., 2003; Novick y col., 2007). La movilidad y transmisión entre células de las SaPIs se lleva a cabo fundamentalmente a través de bacteriófagos. Presentan seis sitios específicos diferentes para su integración en el genoma bacteriano, siempre en la misma orientación, que reciben el nombre de atts, y que coinciden con los lugares de excisión de profagos (Novick y col., 2007). Como ejemplo la excisión y movilidad de SaPI es inducida por el fago 80 α (Christie y col., 2010). Existen diferentes hipótesis que explican el origen y la evolución de la existencia de SaPIs. Una de ellas propone la existencia de un elemento génico ancestral común, probablemente un profago, para todas las SaPIs. A partir de éste, y por distintos fenómenos de recombinación, se generó la diversidad de SaPIs que actualmente se encuentran descritas (Yarwood y col., 2002).

Islas genómicas

Dada que la composición de las islas genómicas se caracteriza por conservar genes de transposasa y tener un contenido en G+C que difiere del resto del genoma estafilocócico, una hipótesis actual es que estas regiones fueron uno de tantos tipos de elementos móviles adquiridos por HGT (Ito y col., 2003; Dobrindt y col., 2004). Entre las cepas de *Staphylococcus aureus* existen tres familias de islas genómicas cuyos genomas han sido secuenciados. Éstas se denominan vSA α , vSA β y vSA γ . Las tres se encuentran flanqueadas en su parte anterior por un gen de transposasa quebrado, y en su parte posterior por un sistema de modificación-restricción (RM) tipo I. Los genes hsdM y hsdS, que forman parte del RM tipo 1, se han encontrado en posición yuxtapuesta a las islas genómicas de *Staphylococcus aureus*, y se les atribuye la estabilidad de éstas dentro del cromosoma del microorganismo (Waldron y col., 2006). La lipoproteína estafilocócica lpl y el superantígeno ssl se encuentran en la isla vSA α (Lina y col., 2004). En la vSA β encontramos genes codificantes de enterotoxinas, hialuronidasa y el de la serin-proteasa estafilocócica. La tercera isla genómica vSA γ , contiene un grupo de genes codificantes de enterotoxinas similar al que se encuentra en vSA α (Gill y col., 2005).

Cassettes cromosómicos

Los cassettes cromosómicos estafilocócicos (SCCs) son fragmentos relativamente largos de ADN que siempre se insertan dentro del cromosoma de *Staphylococcus aureus* dentro del gen orfX. Un SCC puede codificar resistencia a

antibióticos y/o diferentes factores de virulencia. Considerando que muchos SCCs codifican la resistencia a meticilina (SCCmecA), los SCCs pueden clasificarse en dos tipos: los SCCmecA y los cassettes no-SCCmec (Mongkolrattanothai y col., 2004; Zhang y col., 2009). Las bases moleculares y propiedades biológicas del primero serán explicadas ampliamente en el apartado 1.6.1.7.1, centrándonos ahora en los no-SCCmec

Los cassettes no-SCCmec contienen determinantes génicos importantes para la virulencia y la supervivencia del *Staphylococcus aureus*. Como ejemplo, la cepa de *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina (SASM) 476, contiene un cassette que codifica resistencia a cloranfenicol y ácido fusídico (Holden y col., 2004). El SCCmercury proporciona a la bacteria capacidad para resistir la acción del antiséptico cloruro mercuríco. Probablemente *Staphylococcus aureus* obtienen este cassette a partir de un estafilococo coagulasa negativo por integración de un plásmido que contiene dicho cassette (Chongtrakool y col., 2006).

Algunas cepas de *Staphylococcus aureus* producen el polisacárido capsular 1, molécula que confiere a la célula resistencia a la fagocitosis. Los genes que codifican la síntesis del polisacárido 1 son localizados en un elemento SCC especial denominado SCCcapI (Luong y col., 2002).

Secuencias de inserción

Aunque las secuencias de inserción (IS) puedan existir como elementos independientes dentro del genoma de *Staphylococcus aureus*, la forma más común de presentación es por pares formando parte de la estructura de un transposón (Tn). Las IS se introducen dentro de diferentes loci y pueden causar cambios en la expresión de genes en el cromosoma principal bacteriano. Generalmente inactivan la expresión de un gen por su integración directa dentro del marco de lectura de dicho gen (Jansen y col., 2007). Por ejemplo, la región tcaRBA de *Staphylococcus aureus* se relacionaba desde hace algún tiempo con el incremento de la resistencia a teicoplanina. Mediante el análisis por Northern Blot realizado en cepas con resistencia a Glicopéptidos (GISA) se encontró truncado el gen tcaA. Más tarde se demostró que la responsabilidad de este hecho recaía en la inserción de IS256 (Maki y col., 2004). La activación de genes por IS suele mediar a través de promotores que portan los propios elementos IS, o por la formación de un promotor híbrido con el promotor nativo del gen en particular. Como ejemplo de esto último, los elementos IS256 e IS257, que forman parte de los trasposones Tn4001 y Tn4003 de *Staphylococcus aureus*, forman un promotor híbrido que potencia la expresión del operón de resistencia a gentamicina y kanamicina (aacA-

aphD), y del gen que codifica resistencia a trimetoprim (dfrA), respectivamente (Rouch y col., 1987; Rouch y col., 1989).

Transposones

Los transposones (Tn) frecuentemente codifican para genes de resistencia a antibióticos. Los transposones de pequeño tamaño usualmente se presentan en múltiples copias en el genoma de *Staphylococcus aureus*, bien insertados dentro del cromosoma principal bacteriano, o bien dentro de diferentes clases de MGEs, como cassettes SCC o plásmidos. El ejemplo más descrito en *Staphylococcus aureus* es el del transposon Tn554, al que se asocia con la resistencia a eritromicina, espectinomicina, lincosaminas y estreptogramina en *Staphylococcus aureus* (Tillotson y col., 1989; Murphy y col., 1983).

Los transposones largos, con tamaños superiores a las 18 kbp, se presentan generalmente en copias únicas. Así encontramos al Tn6009 que codifica resistencia para tetraciclinas (Soge y col., 2008); el ya comentado anteriormente Tn4003 que otorga resistencia a trimetoprim (Rouch y col., 1989); y el Tn4001 que codifica resistencia a gentamicina, kanamicina y tobramicina (Byrne y col., 1989).

1.6.1.5 CUADROS CLÍNICOS Y MECANISMOS PATOGENICOS DE STAPHYLOCOCCUS aureus

Staphylococcus aureus es un microorganismo que causa un amplio abanico de infecciones, entre las cuales están aquellas en las que el mecanismo patogénico fundamental es la producción de una toxina (intoxicación alimentaria, síndrome de la piel escaldada, síndrome del shock tóxico) y otras que se consideran como infecciones piogénicas, como por ejemplo las infecciones de la piel y partes blandas, incluyendo foliculitis, forunculosis, celulitis e impétigo. De mayor trascendencia son las infecciones invasivas (ostearticulares, endocarditis, etc.). Otras infecciones son aquellas del tracto respiratorio y del tracto urinario. La bacteriemia por *Staphylococcus aureus*, puede ocurrir a partir de catéteres intravenosos entre otros muchos focos, y en ocasiones puede facilitar la diseminación del microorganismo a otras zonas del huésped (Musher y col., 1994).

Bacteremia

Se trata de un cuadro clínico muy grave que consiste en el aislamiento del patógeno en la sangre junto con síntomas clínicos.

La célula endotelial es el eje central del proceso patogénico de la bacteriemia por *Staphylococcus aureus*. No solo es un objetivo potencial para el microorganismo, sino que también su activación contribuye a la progresión endovascular de la enfermedad. Los estafilococos se unen con gran avidez a la superficie de las células endoteliales a través de la interacción específica entre sus adhesinas (MSCRAMMs) y los receptores de la superficie endotelial. Los estudios in vitro demuestran que después de la fase de adhesión, los estafilococos son fagocitados por las células endoteliales. El entorno intracelular protege a los estafilococos de los mecanismos de defensa del huésped, así como del efecto bactericida de los antibióticos. El fenómeno contribuye al desarrollo de infecciones persistentes y/o recurrentes (Lowy y col., 1998).

La bacteremia por *Staphylococcus aureus* está asociada con una mortalidad significativa y con complicaciones importantes, como la osteomielitis vertebral, la endocarditis infectiva, o infecciones recurrentes. En una serie de 724 pacientes consecutivos con bacteremia por *Staphylococcus aureus*, el 34% desarrollaron infecciones metastásicas, el 12% recibieron diagnóstico de endocarditis, y 157 finalmente murieron, situándose el ratio de mortalidad en el 22% (Fowler y col., 2003). Los pacientes con infecciones por SARM complicadas con bacteremia, son significativamente de mayor edad, con más enfermedades subyacentes, y son más proclives a desarrollar una sepsis severa, que aquellos cuya bacteremia es provocada por SASM. En consecuencia, los primeros presentan un mayor ratio de mortalidad que los segundos (excepto en las neumonías) (Shurland y col., 2007). La publicación de estudios con conclusiones contrarias (Lowy y col., 1998; Romero-Vivas y col., 1995), ha instalado una controversia acerca de si existe una asociación directa e independiente entre la mortalidad por bacteremia por *Staphylococcus aureus* y la resistencia a meticilina.

En el último estudio EPINE, *Staphylococcus aureus* se considera el tercer microorganismo más común causante de infecciones bacteriémicas intrahospitalarias, con el 10.5% de los casos, y el tercero también como causante de bacteremias comunitarias, con el 10.4%. El SARM, concretamente aparece como el responsable del 2.7% y el 1.4% de las bacteremias intrahospitalarias y comunitarias respectivamente (EPINE, 2010). Los pacientes con mayor riesgo de presentar bacteriemia intrahospitalaria son aquellos que están en hemodiálisis, los usuarios de drogas inyectadas, y los pacientes diabéticos o con otras comorbilidades (Mitchell y col., 2005). Una gran parte de las bacteriemias son las relacionadas con catéteres y otros

dispositivos como marcapasos o válvulas protésicas. La persistencia de fiebre y/o bacteriemia después de 3 días de la retirada del catéter y del inicio de la terapia con antibióticos, sugiere un curso sumamente complicado que requerirá en la mayoría de los casos un tratamiento prolongado (Hill y col., 2007a). Las bacteriemias de la comunidad se asocian con diabetes, infección por VIH, y hepatopatías crónicas (Bassetti y col., 2011).

Endocarditis

Staphylococcus aureus ha sobrepasado a los estreptococos como causa principal de endocarditis infecciosa, con una prevalencia alrededor del 31% (Hill y col., 2007b, Fowler y col., 2005). Según la ICE-MD (*The International Collaboration on Endocarditis Merged Database*), *Staphylococcus aureus* es responsable del 34% de las endocarditis sobre válvula nativa, con ratios de mortalidad significativamente mayores, que para aquellas provocadas por otros patógenos (Miró y col., 2005). En endocarditis de válvula protésica, la prevalencia de *Staphylococcus aureus* disminuye hasta el 15-29%, aunque sigue siendo el principal agente etiológico (Hill y col., 2007b, Fowler y col., 2005).

La endocarditis es una de las más graves complicaciones de la bacteriemia por *Staphylococcus aureus*. En la válvula dañada, la adherencia de las células estafilocócicas al trombo constituido por plaquetas y fibrina que se ha formado en esa válvula dañada, es mediada de manera fundamental por la unión de las proteínas MSCRAMMs a las moléculas que quedan expuestas de la matriz extracelular. A partir de ahí, *Staphylococcus aureus* inicia su colonización. Se ha demostrado in vitro, que los cultivos humanos de endotelio de válvula cardíaca, una vez son infectados con *Staphylococcus aureus*, comienzan a expresar factor tisular. Inducir la expresión de esta proteína en la superficie endotelial, podría ser el mecanismo empleado por *Staphylococcus aureus* para desencadenar la formación del trombo y finalmente la endocarditis en una válvula cardíaca que en principio no se encontraba dañada (Drake y col., 1988).

La endocarditis por *Staphylococcus aureus* ocurre con más frecuencia en los adictos a drogas por vía parenteral, pacientes hospitalizados, pacientes ancianos, y por último en pacientes con válvulas protésicas. En los cuatro grupos, la sintomatología inicial puede limitarse a fiebre y malestar general, haciendo difícil su diagnóstico clínico. A diferencia de las endocarditis causadas por patógenos menos virulentos, la endocarditis por *Staphylococcus aureus* se caracteriza por un inicio rápido, fiebre

elevada, frecuente implicación de válvulas cardíacas nativas, y la ausencia de signos físicos en la fase inicial de la enfermedad (*Chambers y col., 1983*).

En un estudio con seguimiento de los pacientes durante seis meses, el 79% presentaron al menos una complicación, y entre las más frecuentes se encontraban la insuficiencia cardíaca (74%), embolismos cerebrales o periféricos (28%), shock séptico (16%) e infecciones metastásicas (11%) (*Hill y col., 2007b*). Aunque las tasas de mortalidad se han reducido en las tres últimas décadas, todavía la mortalidad es alta oscilando entre 20-33% (*Mylonakis y col., 2001; Hill y col., 2007b*).

Shock séptico

Los eventos celulares que desencadenan el shock tóxico en la infección estafilocócica, son similares a los ocurridos durante la infección de una bacteria gram negativa. En ambos casos, los monocitos y los macrófagos tienen un papel central, aunque los leucocitos polimorfonucleares, las células endoteliales y las plaquetas, también toman parte. Los monocitos liberan factor α de necrosis tumoral (TNF- α), interleuquina-6 (IL-6), e IL-8, después del contacto con el ácido lipoteicoico y el peptidoglicano de la pared celular del estafilococo (*Timmerman y col., 1993; Heumann y col., 1994*). En cambio, la expresión y liberación de IL-1 e IL-6 por las células endoteliales requiere la fagocitosis de la bacteria (*Yao y col., 1995*). Como resultado de la activación celular y la liberación de citoquinas, son activadas las vías del complemento y la coagulación, el ácido araquidónico es metabolizado, y es liberado el factor activador de plaquetas. Estos hechos causan fiebre, hipotensión, coagulación intravascular diseminada, depresión de la función miocárdica, y por último fallo multiorgánico. Varios componentes estafilocócicos parecen ser capaces de iniciar el síndrome de sepsis. Los peptidoglicanos, especialmente cuando se combinan con los ácidos lipoteicoicos, y la toxina α , reproducen en modelos animales, muchos de los hechos que ocurren en una sepsis, incluyendo hipotensión, trombocitopenia, y oxigenación reducida. Por suerte, solo una minoría de las bacteremias o infecciones locales por *Staphylococcus aureus* progresan a sepsis. Los factores de riesgo para que esto ocurra incluyen edad avanzada, inmunosupresión, quimioterapia, y procedimientos terapéuticos invasivos (*Naber y col., 2009; Ferry y col., 2005*).

Infecciones de las vías urinarias

Staphylococcus aureus es una causa poco común de la infección del tracto urinario en la población general. Este aislamiento suele obtenerse en situaciones donde el microorganismo asciende por el tracto urinario colonizándolo y provocando

infección, pero generalmente de manera secundaria a una bacteremia o situaciones sobrevenidas como endocarditis. La instrumentación del tracto urinario y las prácticas terapéuticas invasivas, como su cateterización, incrementan el riesgo de una infección por *Staphylococcus aureus* en el tracto urinario. La mayoría de los casos de bacteriuria de *Staphylococcus aureus* no se asocian con síntomas propios de infección del tracto urinario. La significación clínica de un aislamiento de *Staphylococcus aureus* en orina es inespecífica en muchos pacientes, ya que la bacteriuria se considera que ocurre de manera concomitante con la cateterización urinaria a largo plazo. Así la diferenciación entre bacteriuria asintomática e infección real del tracto urinario es difícil de discernir en este tipo de pacientes, fundamentalmente en pacientes ancianos (Muder y col., 2006).

Infecciones de piel y partes blandas

Staphylococcus aureus se asocia con una gran variedad de infecciones de la piel y las partes blandas. Entre ellas destacan algunas como foliculitis, que es una infección superficial de folículo piloso. La extensión de esta infección a la zona perifolicular más profunda, produce el forúnculo. Otras infecciones son el impétigo, que es una infección superficial que afecta más a los niños o a los adultos inmunodeprimidos, y puede aparecer como simple o ampolloso, y la celulitis que es una infección que se puede extender más profundamente a tejidos subcutáneos. La dermis, la hipodermis y la fascia superficial son las estructuras implicadas en estas infecciones. También *Staphylococcus aureus* es un patógeno que muy frecuentemente está involucrado como causa de las infecciones de la herida quirúrgica (Jurado y col., 2002).

Infecciones osteoarticulares

Las infecciones osteoarticulares se pueden dividir en: osteomielitis, artritis e infecciones asociadas a implantes.

Se define como artritis séptica la infección de la articulación nativa causada por la llegada de bacterias patógenas de forma directa o, con mayor frecuencia, por vía hematógena. Los microorganismos causantes varían con la edad y las características del paciente, pero en general, *Staphylococcus aureus* es el microorganismo más frecuente tanto en los adultos de cualquier edad, como en los niños (Shirtliff y col., 2002; Al Shaadi y col., 2009). Además, *Staphylococcus aureus* es el agente causal en el 80% de las articulaciones infectadas en pacientes con artritis reumatoide (Dubost y col., 1994).

La osteomielitis se define como la infección de la cortical, la médula o ambas estructuras del hueso. Actualmente, se observa un aumento de su incidencia en relación con el aumento de pacientes politraumatizados, diabéticos con lesiones en los pies,

pacientes con úlceras por presión y portadores de implantes osteoarticulares. La etiología más frecuente es bacteriana y con un claro predominio de los cocos grampositivos, siendo *Staphylococcus aureus* el agente más frecuente.

De todas las complicaciones que se pueden presentar tras la implantación de una prótesis articular, la más grave es la infección, que requiere tratamientos largos y complejos con una elevada morbilidad asociada. La infección de prótesis articular se asocia a un alto índice de recidivas y produce un elevado número de fracasos quirúrgicos que hacen necesarias las reintervenciones y en muchas ocasiones, la retirada del implante. En algunas series, *Staphylococcus aureus* es responsable del 12-23% de este tipo de infecciones (Cercenado y col., 2009).

Infecciones respiratorias

Staphylococcus aureus es un patógeno común entre las neumonías intrahospitalarias. Es un cuadro grave que aparece secundariamente a una broncoaspiración en situaciones en las que *Staphylococcus aureus* coloniza la vía respiratoria, como determinadas infecciones víricas (gripe, sarampión), fibrosis quística, pacientes que residen en centros sociosanitarios o pacientes hospitalizados, sobre todo si han estado sometidos a ventilación mecánica. Se trata de una neumonía necrotizante con rápida progresión, que puede llegar a alcanzar una mortalidad del 30-50% (Rodríguez-Pardo y col., 2006).

En cuanto a la neumonía estafilocócica de la comunidad, ésta suele observarse con más frecuencia después de una infección viral y frecuentemente están producidas por cepas de SARM portadoras de la LPV, tratándose en muchos casos de una neumonía necrotizante que afecta a niños y adultos jóvenes. Se caracteriza por fiebre, hemoptisis y leucopenia, con rápida progresión a distrés respiratorio y elevada mortalidad (Hageman y col., 2006; Rodríguez-Pardo y col., 2006; Francis y col., 2005).

Toxi-infecciones estafilocócicas

Síndrome del shock tóxico:

Es un cuadro clínico similar al shock séptico por endotoxina bacteriana, producido por la toxina TSST-1. Se trata de una toxina miembro de la familia de los superantígenos, que se une de manera inespecífica a todas las regiones variables β -2 de las células T, causando una expansión clonal de éstas, que resulta en una liberación masiva de citoquinas por parte de macrófagos y células T, siendo las más relevantes TNF- α y la IL-1 (Bohach y col., 1990).

Síndrome de la piel escaldada:

El síndrome de escaldadura estafilocócica, o enfermedad de Ritter, fue descrita por primera vez en 1878. Es una enfermedad cutánea ampollosa causada por *Staphylococcus aureus* productor de toxinas exfoliativas, *ETA* y *ETB*, ambas con actividad proteasa y epidermolítica. La presentación clínica es característica. Se produce un cuadro de descamación intraepidérmica por diseminación hematogena de la toxina desde lesiones cutaneomucosas. Entre los efectos secundarios están la deshidratación, la sobreinfección de estas lesiones, y por último la sepsis (Nso y col., 2008).

Intoxicación alimentaria:

Se debe a la ingestión de alimentos contaminados por enterotoxinas producidas por los estafilococos. El tiempo de incubación es de 2 a 6 horas, los primeros síntomas son náuseas y vómitos, y posteriormente con gran frecuencia también dolor abdominal y diarrea (Jurado y col., 2002).

1.6.1.6 MECANISMOS DE RESISTENCIA ANTIBIÓTICA EN STAPHYLOCOCCUS aureus

Staphylococcus aureus es un buen ejemplo de la evolución adaptativa de una bacteria en la era de los antibióticos. Ha demostrado una habilidad única para responder rápidamente a cada nuevo antibacteriano, con el desarrollo de diferentes mecanismos de resistencia, empezando en los años 60 con los de penicilina y meticilina, hasta el momento actual, contra nuevos antibióticos como linezolid o daptomicina (Pantosti y col., 2009).

Resistencia a antibióticos β -lactámicos

El mecanismo de resistencia a penicilina ha sido explicado en el apartado “Plásmidos”, y el de meticilina se abordará ampliamente en el apartado “Resistencia a meticilina”

Resistencia a macrólidos, lincosaminas o estreptogramina (Grupo MLS)

Los antibióticos macrólidos como la eritromicina, las lincosaminas como lincomicina y clindamicina, y la estreptogramina tipo B, funcionan deteniendo la síntesis proteica, mediante su unión a la subunidad ribosomal 50S que causa la disociación del complejo peptidil-ARNt durante la elongación. La resistencia al grupo de antibióticos MLS resulta de una dimetilación en posición N6 de un residuo de adenina en el ARNr 23S, lo cual causa una reducción en la afinidad de la subunidad 50S por el antibiótico (Roberts y col., 1999).

La resistencia inducible a los antibióticos MLS es frecuentemente codificada por el gen de la ARNr metilasa, denominado *erm(C)*, que se encuentra en pequeñas copias repetidas en el interior de plásmidos, siendo el prototipo el pE194 (*Shivakumar y col., 1981*). Se ha descrito otro mecanismo de resistencia inducible a antibióticos MLS, debido a un gen homólogo denominado *erm(A)*, combinado con resistencia al anillo de aminociclitol de la espectinomicina mediada por el gen *spc*, y producida por la inserción cromosomal del transposon Tn554. Existe también resistencia constitutiva a antibióticos MLS. Ésta se encuentra mediada por el gen *erm(B)*, incluido en el transposon Tn551, que a su vez es portado por el plásmido de resistencia pI258 (*Jensen y col., 2009*).

Resistencia a cloranfenicol

El cloranfenicol causa un efecto bacteriostático por unión a la subunidad ribosomal 50S e inhibe el paso de la transpeptidación en la síntesis proteica. La resistencia a cloranfenicol en *Staphylococcus aureus* es más frecuente debido a la actividad de una enzima de detoxificación inducible, la cloranfenicol acetiltransferasa (CAT). Los genes de CAT en *Staphylococcus aureus* se encuentran exclusivamente en los plásmidos RC. Estos son fundamentalmente cuatro: pC221, pUB112, pC223 y pC194; y se caracterizan por tener regiones de replicación diferentes, lo que sugiere una historia evolutiva distinta para cada plásmido (*Schwarz y col., 2004*).

Resistencia a fluorquinolonas

La resistencia a fluorquinolonas emergió rápidamente en *Staphylococcus aureus* (especialmente en SARM), poco después de la introducción de ciprofloxacino. Hoy en día, la resistencia a ciprofloxacino puede ser considerada una marca inconfundible del SARM intrahospitalario en muchas regiones del mundo, incluida España. La resistencia es debida a mutaciones espontáneas que causan un cambio de aminoácidos en enzimas implicadas en la replicación del ADN y que son las dianas de las quinolonas, la ADN girasa y la Topoisomerasa IV. Concretamente, en *Staphylococcus aureus*, la resistencia se produce primero por una mutación puntual en la subunidad *GrlA* de la Topoisomerasa IV, y secundariamente en la subunidad *GyrB* de la ADN girasa, que inhabilitan la unión del antibiótico. Posteriormente éste, por acción de bombas de la membrana plasmática, será expulsado fuera de la célula. De hecho, en algunas cepas, una sobreexpresión de la “proteína de membrana de flujo de salida asociada a antibióticos”, también llamada NORA, contribuye a un fenotipo de resistencia a quinolonas más importante. Muchas de las cepas de SARM, tienen al menos dos

mutaciones, una en *GrlA* y otra en *GyrB*, suficiente para conferir resistencia (*Schmitz y col., 1998; Hooper y col., 2002; Tanaka y col., 2000*).

Resistencia a tetraciclinas

La tetraciclina y la minociclina inhiben la síntesis proteica bacteriana, mediante su unión a la subunidad ribosomal 30S, e impidiendo la unión del complejo aminoacil-ARNt al sitio específico de unión. El mecanismo de resistencia a tetraciclinas en *Staphylococcus aureus*, consiste en una vía de expulsión del antibiótico por bombas de membrana de la familia *tetA*, siendo la más importante la *tetA(K)*. El gen que codifica dicha proteína, se ha encontrado en plásmidos RC como el pT181, o en plásmidos de multiresistencia mucho más grandes que tienen una copia integrada del pT181 (*Guay y col., 1993*). Se ha descrito en cepas de SARM una resistencia a tetraciclinas codificada en el cromosoma, asociada a la integración de estos plásmidos dentro de elementos SCCmec tipo III, y flanqueados por la secuencia de inserción IS257 (*Ito y col., 2001; Werckenthin y col., 1996*).

Resistencia a aminoglucósidos

Los aminoglucósidos inhiben la síntesis proteica por su unión a la subunidad ribosomal 30S e inhibiendo la traslocación del complejo peptidil-ARNt. El mecanismo de resistencia a aminoglucósidos mejor conocido es la modificación enzimática de los grupos amino del antibiótico por aminoglucosidasas, que hace inviable la unión de la molécula a los ribosomas. Existen dos tipos de aminoglucosidasas: las aminoglucósido adeniltransferasa (AAD) y las aminoglucosidasa fosfotransferasa (APH) (*Shaw y col., 1993*).

La resistencia a estreptomicina se asocia con un transposon localizado en el cromosoma de *Staphylococcus aureus*, el Tn5405, el cual porta el gen *aadE* que codifica la actividad AAD(6'). Tn5405 también porta genes de resistencia a neomicina y kanamicina, concretamente el *aphA-3*, que codifica por la actividad APH(3')III. Este gen se ha descrito también formando parte de la estructura del plásmido pWA1, donde a su vez algunos estudios describen su asociación con resistencia a estreptomicina, vía actividad AAD(3') (*Kayser y col., 1981; Derbise y col., 1997*).

La resistencia a gentamicina y de antibióticos relacionados como amikacina, tobramicina y netilmicina, es mediada por las actividades AAD(6') y APH(2''), codificadas por los genes *aacA-aphD* (*Lyon y col., 1984*). Por ello, la resistencia a gentamicina debe asociarse con resistencia a todos los aminoglucósidos de utilización clínica (la propia gentamicina, tobramicina, amikacina, netilmicina y además

kanamicina, con la excepción de la estreptomina). Sin embargo, la situación opuesta no existe, es decir, no se debe asumir que la sensibilidad a la gentamicina implica también sensibilidad al resto de los aminoglucósidos, puesto que la presencia de la enzima ANT(4')₄ que determina la resistencia a la tobramicina, también confiere resistencia a kanamicina y amicacina, pero nunca a gentamicina. Esta última forma de resistencia es frecuente entre las cepas de SARM de los hospitales españoles y del resto de Europa (Morosini y col., 2012).

Los genes que codifican las enzimas inactivadoras de aminoglucósidos, son transportados por el transposon Tn4001, que a su vez se encuentra formando parte de los plásmidos multiresistencia pSK1 y pSK41, o del propio cromosoma de *Staphylococcus aureus* (Lyon y col., 1984).

Sulfonamidas y Trimetoprim

Las sulfonamidas y el trimetoprim son antibióticos sintéticos que interfieren en diferentes pasos de la ruta de síntesis de novo del tetrahidrofolato, el cual es un precursor esencial de múltiples aminoácidos y nucleótidos. Las sulfonamidas son análogos estructurales del ácido p-aminobenzoico e inhiben competitivamente la dihidropteroato sintasa, que cataliza la conversión del p-aminobenzoico a ácido dihidropteroico. El trimetoprim tiene una elevada afinidad por la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR), que cataliza la última reacción de la vía de síntesis del tetrahidrofolato, y sobre la cual lleva a cabo una inhibición competitiva (Huovinen y col., 1995; Skold y col., 2001). Los aislados clínicos de *Staphylococcus aureus* que son resistentes a sulfonamidas, han mostrado tener mutaciones cromosómicas en el gen que codifica para la dihidropteroato sintasa, con las que disminuye su afinidad por estos antibióticos. La resistencia intermedia a trimetoprim en *Staphylococcus aureus* es mediada por mutaciones cromosómicas en el gen *dfrB*, el cual codifica la DHFR. Sin embargo, una elevada resistencia a trimetoprim es mediada por un plásmido, el pSK639, el cual porta el gen *dfrA*, que codifica una DHFR con afinidad reducida para trimetoprim (Tennent y col., 1988; Young y col., 1987).

Linezolid y daptomicina

Linezolid y daptomicina son dos antibióticos relativamente nuevos, especialmente indicados para el tratamiento de infecciones por SARM. Actualmente en España la ocurrencia de resistencias en *Staphylococcus aureus* para estos antibióticos es testimonial (Gómez-Garcés y col., 2010; Picazo y col., 2011a), sin embargo, cada vez

es mayor el número de trabajos que comunican la aparición de cepas resistentes en otros países.

Hace pocos años aparecieron los primeros trabajos que informaban sobre la aparición de cepas de *Staphylococcus aureus* (todas eran SARM) resistentes a linezolid. Éste es un antibiótico que inhibe la síntesis proteica por su unión al dominio V del ARNr 23S de la bacteria. La primera resistencia a linezolid en *Staphylococcus aureus* fue reportada en una cepa de SARM aislada a partir de un paciente afectado de peritonitis (*Tsiodras y col., 2001*). Presentaba una mutación puntual de una guanina por una citosina (G2576T) en la secuencia codificante para el sitio de unión a linezolid en la subunidad ribosomal. En años posteriores se han descrito aislados resistentes a linezolid con otra mutación (T2500A). Así, hoy en día, la resistencia se asocia a múltiples y diversos genes mutantes de ARNr 23S. Uno de los más reportados es el gen *cfr* que codifica una de las ARNr 23S metiltransferasa. Se ha sugerido que la ocurrencia de múltiples genes mutantes podría ser debida a una recombinación homóloga entre cepas con genes mutantes y cepas salvajes, bajo la presión selectiva del linezolid (*Meka y col., 2004*). La resistencia de SARM a linezolid se ha descrito generalmente en pacientes tratados con este antimicrobiano durante largos periodos, pero también como consecuencia de la diseminación plasmídica de la resistencia a linezolid o por diseminación clonal entre pacientes hospitalizados generalmente en UCI (*Cercenado y col., 2010*). En el año 2010, el grupo de *Picazo y col.*, en un estudio sobre actividad comparativa de daptomicina, describe el hallazgo de una cepa SARM con resistencia a linezolid. En ese mismo año se describe un brote de *Staphylococcus aureus* resistente a Linezolid (LRSA) en la UCI de un hospital español, con 12 pacientes afectados en apenas dos meses. La resistencia a linezolid debida a mutación en *cfr* se demostró en todos los aislados. Entre las muestras de los potenciales portadores pertenecientes al equipo sanitario, una de ellas fue positiva para LRSA. Así este brote se asoció a transmisión nosocomial y un uso extensivo del linezolid (*Sánchez-García y col., 2010*).

La daptomicina es un antibiótico lipopeptídico, con un único mecanismo de acción que implica la unión e inserción dentro de la membrana citoplasmática en presencia de concentraciones fisiológicas de iones calcio. La resistencia a daptomicina se asocia con varias mutaciones puntuales, que habrían ido apareciendo en respuesta a la presión selectiva de daptomicina, en al menos tres proteínas diferentes: MprF (una lisisfosfatidilglicerol sintasa), YycG (una histidina quinasa) y Rpo (forma parte de la RNA polimerasa). Esta mutaciones dan como resultado un incremento en la diferencia

de potencial a través de la membrana citoplasmática bacteriana y una reducción de la capacidad de la molécula de daptomicina para unirse a su receptor específico en esa membrana (Vikram y col., 2005; Friedman y col., 2006; Kaatz y col., 2006). Algunos indicadores de la resistencia a daptomicina la asocian a cepas SARM con sensibilidad reducida a vancomicina y persistencia bacteriémica. Así, recientemente, se publicó un trabajo que describía como una cepa SARM con sensibilidad heterorresistente e intermedia a vancomicina, desarrolla una resistencia a daptomicina (a pesar de ser en principio sensible) en el marco de una bacteremia persistente secundaria a una osteomielitis vertebral (Van Hal y col., 2011a).

Resistencia a vancomicina

Durante la emergencia generalizada de SARM, la vancomicina ha representado la piedra angular de la terapia para infecciones por este microorganismo. En los últimos quince años, el fenómeno al que tanto se le temía, finalmente ha ocurrido: la aparición de cepas que no son susceptibles a vancomicina, que se muestran con una resistencia intermedia (cepas VISA, del inglés *vancomycin intermediate Staphylococcus aureus*), o peor aún, una resistencia completa a este antibiótico (cepas VRSA, del inglés *vancomycin resistance Staphylococcus aureus*) (Pantosti y col., 2007). De acuerdo con el Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), las cepas VISA son aquellas que presentan una concentración mínima inhibitoria (CMI) entre 4-8µg/ml, mientras que las cepas VRSA son aquellas que presentan una CMI $\geq 16\mu\text{g/ml}$ (Appelbaum y col., 2007). Hay que puntualizar que la resistencia no se desarrolla en pasos, es decir, que las VISA no progresan a VRSA, ni estas últimas provienen de las primeras, si no que son fenómenos independientes y además presentan mecanismos completamente diferentes. La primera cepa VISA se registró en Japón en 1996, para después pasar a reportarse también en otros países (Tenover y col., 2001).

Puede ocurrir que cuando se realiza un test de sensibilidad a glicopéptidos de rutina en el laboratorio, algunas cepas que se muestran como sensibles, contengan subpoblaciones con resistencia intermedia o resistencia completa a vancomicina. Es decir, son susceptibles a vancomicina porque tienen una CMI $< 4\mu\text{g/ml}$, pero hay una o varias subpoblaciones celulares con una CMI $\geq 4 \mu\text{g/ml}$. A este fenómeno se le denomina heterorresistencia y se habla de cepas h-VISA. Suele darse en cepas con CMI entre 1-4 µg/ml (Tenover y col., 2001; Appelbaum y col., 2007; Cercenado y col., 2010). Algunos autores sugieren que la colonización o infección con VISA puede ser precedida por infección con h-VISA, y luego la exposición prolongada al antibiótico

lleva a la aparición de una población con resistencia uniforme (*Hiramatsu y col., 1997, Appelbaum y col., 2007*). Desde un punto de vista biológico, el *status* h-VISA conferiría una ventaja de supervivencia a *Staphylococcus aureus*, ya que si bien dosis terapéuticas de vancomicina eliminan el 99.9% de la población, la fracción restante sobrevive y es capaz de crecer a concentraciones de antibiótico de 4 µg/ml o superiores. Estas células VISA gastan gran cantidad de energía para engrosar la pared celular y tienen una adaptabilidad evolutiva menor que las cepas VSSA, por lo cual tienden a revertir al fenotipo h-VISA una vez cesa la presión del antibiótico. Sin embargo, cuando se exponen nuevamente a vancomicina generan mutantes resistentes con una alta frecuencia, lo que asegura la supervivencia de la cepa (*Rodríguez y col., 2005*). Así pues, el fenómeno h-VISA es muy importante para la epidemiología de la resistencia a glicopéptidos en *Staphylococcus aureus*, pues las células resistentes presentes en una mayoría de población sensible, pueden seleccionarse durante el tratamiento con vancomicina. Además, existen varios trabajos que alertan sobre el fracaso terapéutico con vancomicina en infecciones producidas por cepas h-VISA y por cepas con CMI *boderline* entre las categorías de susceptibilidad y resistencia intermedia (*Liu y col., 2003*). Por esto, se ha recomendado a las sociedades científicas bajar los puntos de corte para vancomicina en *Staphylococcus aureus*. Así el Comité Europeo para Test de Susceptibilidad Antibiótica (EUCAST) ha disminuido recientemente el punto de corte a una CMI > 2µg/ml para la definición de VISA (<http://mic.eucast.org>) (*Morosini y col., 2010*).

Los informes de h-VISA son más frecuentes entre cepas resistentes a meticilina. En un estudio con 7.920 cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas en diferentes países en el período de 1997 a 2001, se encontró una frecuencia 43 veces mayor de h-VISA en las cepas resistentes a meticilina (2.16%) que en las cepas sensibles (0.05%); este hecho sugería que estas cepas más expuestas a los glucopéptidos tendrían mayor capacidad para desarrollar el fenómeno h-VISA (*Liu y col., 2003*). Se estima que las cepas h-VISA son más comunes que las reportadas en la bibliografía científica, debido a la dificultad que entraña detectarlas en el laboratorio con los métodos rutinarios (*Rodríguez y col., 2005*). Actualmente no hay un método estandarizado para identificar las cepas h-VISA. El Análisis Poblacional (PAP) se ha propuesto como la técnica más precisa. Sin embargo la naturaleza laboriosa de esta técnica y el requerimiento de un costoso equipo electrónico para siembra en espiral en medio sólido, la hacen poco práctica para la mayoría de laboratorios. En su lugar han aparecido nuevos procedimientos,

técnicamente menos complejos, basados en los valores de CMI obtenidos mediante E-test en medios sólidos de agar, como son el GRD E-test o el Macrométodo (MET), con porcentajes de sensibilidad y especificidad entre el 89-98% y el 55-97%, respectivamente, según los estudios (*Walsh y col., 2001; Voss y col., 2007; Yosuf y col., 2008; Van Hal y col., 2011*), lo que les permite presentarse como buenas herramientas de cribado.

La resistencia intermedia a vancomicina ha sido asociada a la presencia de una pared celular engrosada. Esta pared es rica en cadenas de peptidoglicano no reticuladas y que muestran un dipéptido D-Ala-D-Ala, diana de la vancomicina, completamente libre. Sin embargo, las dianas “correctas” de la vancomicina son los dipéptidos D-Ala-D-Ala pertenecientes a los precursores de los peptidoglicanos en formación, y situados en las capas internas de la pared celular. Es aquí donde la vancomicina ejerce su acción bactericida bloqueando la incorporación del precursor al peptidoglicano en construcción. De esta manera, los residuos D-Ala-D-Ala de la pared celular engrosada, actúan como señuelos para la vancomicina, bloqueándola en la parte externa de la pared, e impidiendo que llegue a unirse a sus “verdaderas” dianas. Además, esto provoca la acumulación de vancomicina y la obturación de la pared, lo que a su vez dificulta la penetración de otras moléculas de vancomicina hasta los niveles más internos. Ningún rasgo genético ha sido hasta la fecha relacionado directamente con el fenómeno VISA. Sin embargo, se ha descrito el gen regulador accesorio *agr* como regulador de la virulencia en estas cepas. La pérdida de las funciones *agr* ha sido relacionada con una ventaja selectiva para la supervivencia celular en presencia de vancomicina (*Cui y col., 2006; Sakoulas y col., 2003*).

Mientras el mecanismo de resistencia de las cepas VISA no se conoce de manera completa y en profundidad, el correspondiente a las cepas VRSA se conoce perfectamente. Estas cepas han adquirido el aparato genético completo para resistencia a glicopéptidos de los enterococos resistentes a vancomicina (VRE). Por lo tanto, las bases genéticas y bioquímicas de resistencia son idénticas a las descritas para VRE (*Courvalin y col., 2006*). Hasta este momento, se han descrito 6 cepas de VRSA, todas son SARM y todas pertenecientes al grupo clonal USA. Todas han adquirido el operon *vanA* que confiere elevado nivel de resistencia a los glicopéptidos, tanto teicoplanina como vancomicina. Este operón contiene dos genes ensamblados, el *vanA* y el *vanH*, implicados en la síntesis de un precursor de peptidoglicano modificado. Esta alteración consiste en que en lugar de contener el dipéptido terminal D-Ala-D-Ala, contiene el D-

Ala-D-Lac, con una afinidad por la vancomicina sensiblemente inferior a la mostrada por el péptido salvaje. Además el operon cuenta con un gen accesorio, denominado *vanX*, encargado de eliminar en la pared celular la existencia de posibles dianas D-Ala-D-Ala susceptibles de unirse a vancomicina. El mecanismo de resistencia se encuentra bajo la actividad reguladora de dos genes, el *vanS* y el *vanR*, que se activan y permiten la transducción de los genes *vanH*, *vanA* y *vanX*, solo en presencia de vancomicina.

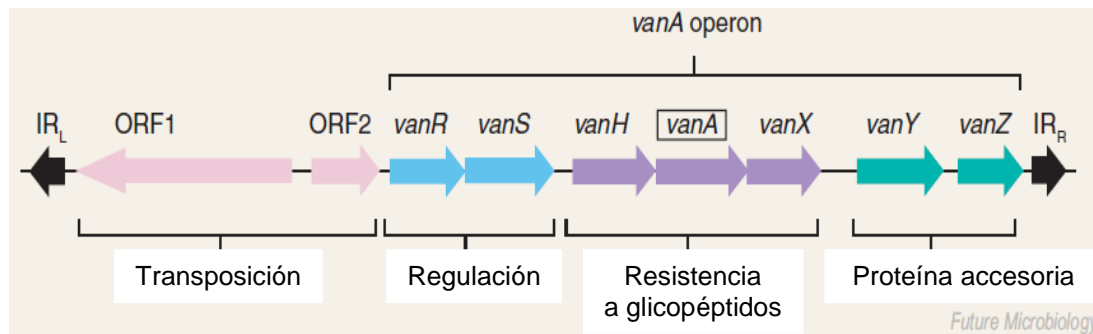


Figura 3. Estructura del transposón Tn1546. La región rosa con las secuencias ORF1 y ORF2 serán las responsables de la movilización del transposón, el cual se encuentra delimitado por las secuencias repetidas invertidas correspondientes (IR_R e IR_L). La región en azul, formada por los componentes *vanR* y *vanS* será la encargada de la regulación del operón. En morado, los tres genes esenciales para la resistencia a vancomicina: *vanR*, que codifica una deshidrogenasa para la producción del lactato, *vanA*, que codifica una ligasa para la producción del péptido diana alterado, y *vanX* que codifica una dipeptidasa que elimina los péptido diana salvajes. La región verde, con *vanY* y *vanZ*, parece tener un papel importante en la resistencia a teicoplanina (*Pantosti y col., 2007*)

El operon *vanA* se incluye en un transposón de 11kb llamado Tn1546 (Fig. 3). Los estudios moleculares sugieren que la transferencia horizontal de Tn1546 de VRE a VRSA ha ocurrido *in vivo*, probablemente durante una infección mixta provocada simultáneamente por los dos microorganismos, y vehiculizado por un plásmido. La replicación ineficiente de los plásmidos enterocócicos en las cepas de SARM podría contribuir a mantener limitado el número de VRSA detectados en el mundo hasta el día de hoy (*Weigel y col., 2003; Tenover y col., 2004; Weigel y col., 2007*).

A pesar de la emergencia sobre la aparición de cepas VISA, VRSA y h-VISA, la vancomicina sigue siendo hoy en día uno de los antibióticos más utilizados para el tratamiento de la bacteriemia por SARM, así como de otras infecciones menos graves producidas por este microorganismo. Sin embargo, el fracaso del tratamiento con vancomicina no es infrecuente, incluso cuando las cepas de SARM son completamente

sensibles a la vancomicina según los criterios del CLSI, es decir, $CMI \leq 2$. Se ha descrito una reducción en la eficacia de la vancomicina frente a SARM cuando las CMI de vancomicina son elevadas, aunque dentro del rango de sensibilidad (CMI 1-2 $\mu\text{g/ml}$), lo que sugiere que elevaciones moderadas en las CMI podrían explicar algunas evoluciones clínicas no satisfactorias (Soriano y col., 2008). Por otra parte, múltiples estudios han demostrado discrepancias entre los resultados de las pruebas de sensibilidad *in vitro* a la vancomicina (sensible o resistente) y la evolución clínica en pacientes infectados por SARM y tratados con este glucopéptido. Por este motivo, es frecuente que a los laboratorios de microbiología se les solicite la determinación del valor exacto de CMI de vancomicina por un método de referencia (microdilución en caldo) o por métodos alternativos (E-test). En este sentido, algunos estudios han demostrado que la mortalidad asociada a la bacteriemia por SARM es significativamente mayor si se obtienen valores de CMI de vancomicina $> 1 \text{ mg/l}$ por E-test. Con todo esto, los aislados de SARM que actualmente reportan una CMI para vancomicina en el intervalo de 1 a 2 $\mu\text{g/ml}$, recibirán el nombre de cepas con “sensibilidad disminuida a vancomicina” (Cercenado y col., 2010).

Las cepas de SARM han respondido a la presión ejercida por el consumo de vancomicina con un abanico de cambios metabólicos que incluye además de la resistencia a vancomicina (en sus distintos fenotipos anteriormente descritos), la tolerancia. La tolerancia a glucopéptidos presenta dos características comunes con la heterorresistencia: la ausencia de su determinación en rutina por parte del laboratorio y la disminución de la actividad antimicrobiana que puede tener implicaciones clínicas. Otra característica en común con la heterorresistencia es que la disminución de la actividad antimicrobiana que ambas conllevan no queda reflejada en el valor de la CMI, por lo que, en ausencia de su determinación específica, su presencia no es conocida por el clínico. La tolerancia a un antibiótico puede definirse como la capacidad de las bacterias para sobrevivir en un ambiente con dosis letales de ese antibiótico, pero no crecer, es decir, el antibiótico frente a esa cepa, pierde su capacidad bactericida, manteniendo la capacidad bacteriostática. Se considera que existe tolerancia cuando el valor del cociente concentración bactericida mínima (CMB) y la CMI (CMB/CMI) es ≥ 32 ó ≥ 16 (en este caso con una CMB de vancomicina $\geq 32 \mu\text{g/ml}$). Esto implica que las concentraciones séricas obtenidas tras dosis estándar superan el valor de la CMI, pudiendo no superar el valor de la CMB (Aguilar y col., 2009).

En estudios epidemiológicos recientemente publicados en Estados Unidos, la tolerancia a vancomicina y teicoplanina fue del 6.1% y 18.8% respectivamente en *Staphylococcus aureus* (Traczewski y col., 2009). Sin embargo, estos porcentajes aumentan cuando se trata exclusivamente de aislados causantes de cuadros clínicos serios. Así, aumenta hasta el 20% cuando el estudio se limita a bacteremias o endocarditis (Perry y col., 1999; Sader y col., 2009). El único estudio publicado hasta la fecha, que valora la incidencia de la tolerancia a glucopeptidos en *Staphylococcus aureus* en España, es un estudio multicéntrico realizado sobre la base de más de 187 aislados SARM causantes de bacteremia, donde el 9.6% de las cepas resultaron tolerantes a vancomicina (Picazo y col., 2011b).

Mecanismos de resistencia para otros antibióticos

La resistencia a **ácido fusídico**, está asociada con mutaciones en el gen *fusA*, de localización cromosómica, el cual codifica el factor G de elongación, diana del ácido fusídico; y la adquisición del *fusB*, cuyo mecanismo de resistencia aún se desconoce (Pantosti y col., 2007).

La resistencia a **rifampicina** ocurre rápidamente, si la droga es usada en monoterapia, de manera que se recomienda que sea utilizada siempre en asociación con otro agente. La resistencia es debida a mutaciones puntuales en los genes que codifican para la subunidad β de la ARN polimerasa dependiente de ADN (*rpoB*), diana de rifampicina, que ocasiona un descenso de la afinidad por este agente (Maranan y col., 1997).

La resistencia a **clindamicina** se debe a una clase de genes denominados *erm*, los cuales codifican la metilación de un residuo de adenina de la región de ADN que codifica el ARNr 23S, y confiere resistencia, no solo a clindamicina, sino a un grupo más amplio de antibacterianos como eritromicina, lincosaminas y estreptogramina. El gen *erm(A)* es transportado por el Tn554-like, mientras que el *erm(C)*, usualmente se encuentra localizado en un plásmido, más común entre los SASM (Renushri y col., 2010).

AGENTE ANTIMICROBIANO	GEN DE RESISTENCIA	MECANISMO DE RESISTENCIA	ELEMENTO GENÉTICO
Grupo MLS	<i>erm(A)</i>	ARNr adenina N-6-metiltransferasa	Tn554
	<i>erm(B)</i>		Tn551/pl258
	<i>erm(C)</i>		pE194
Cloranfenicol	<i>cat</i>	Cloranfenicol acetiltransferasa	pC221,pC223,pUB112,pC194
Fluorquinolonas	<i>grlA</i>	Topoisomerasa IV	MC
	<i>gyrB</i>	ADN girasa	
	<i>norA</i>	Bombas de flujo de salida multidrogas	
Espectinomicina	<i>spc</i>	espectinomicina acetiltransferasa	Tn554
Tetraciclina	<i>tet(A)K</i>	Bombas de flujo de salida multidrogas	Pt181
Estreptomicina	<i>aadE</i>	Estreptomicina adeniltransferasa (AAD(6'))	Tn5405
	<i>aadD</i>	Aminoglucósido adeniltransferasa (AAD(3'))	Tn5405/pWA1
Neomicina, Kanamicina	<i>aphA-3</i>	Aminoglucósido fosfotransferasa (APH(3'))	
Gentamicina, Tobramicina	<i>aacA</i>	AAD(6')	Tn4001/pSK1/pSK2
	<i>aphD</i>	APH(2')	
Trimetoprim	<i>dfrA</i>	DHFR	pSK239
	<i>dfrB</i>		MC
Linezolid	<i>gen ARNr23S</i>	reducción de la afinidad por ARNr 23S	MC
Daptomicina	<i>MprF, YycG, Rpo</i>	MprF, YycG, Rpo	MC
Vancomicina, Teicoplanina	<i>operon vanA</i>	precursores con D-Ala-D-Lac	Tn1546
Meticilina, Oxacilina	<i>mec A</i>	PBP2a	Cassette SCCmec
Ac. Fusídico	<i>fusA, fusB</i>	Factor G de elongación	MC
Rifampicina	<i>rpoB</i>	Subunidad β de RNAPol dependiente de DNA	MC
Clindamicina	<i>erm</i>	metilación RNAr 23S	Tn554-like

Tabla 2. Ejemplos de fenómenos de resistencia a antimicrobianos en *Staphylococcus aureus*

1.6.1.7 STAPHYLOCOCCUS aureus RESISTENTE A METICILINA

Staphylococcus aureus resistente a meticilina (SARM) permanece hoy en día como uno de los principales agentes patógenos bacterianos en humanos multirresistentes, causante de complicaciones importantes en infecciones de la piel y tejidos blandos, y graves infecciones adquiridas en el hospital, especialmente bacteremias, endocarditis y neumonías asociadas a ventilación mecánica (NAVM).

En España, la última estimación sobre prevalencia de SARM con respecto al total de aislados de *Staphylococcus aureus*, fue del 29% (Vindel y col., 2009). Actualmente se estima que SARM causa al año 171.200 infecciones asociadas a cuidados sanitarios (IACS) en Europa, lo que corresponde al 44% del total. También se estima que las infecciones por SARM causan 5.400 muertes anuales asociadas al cuidado sanitario, y la dilación de la estancia hospitalaria en alrededor de un millón de días entre todos los pacientes que adquieren la infección (Gould y col., 2012). Diferentes trabajos cifran este aumento de la estancia hospitalaria entre 10 y 26 días por paciente (Ben-David y col., 2009; Goetghebeur y col., 2007). Esto por supuesto conlleva un exceso de gasto importante para los sistemas de salud, en forma de medidas de control especiales, tratamientos caros y vigilancia extensiva. Existen diferentes trabajos que calculan el gasto hospitalario por paciente infectado por SARM. Los resultados oscilan entre los 12.000 y 39.000\$, variación asociada al contexto de los diferentes sistemas de salud (que incluso se producen dentro de un mismo país), y el ensayo metodológico elegido, como comparar los costes con los casos de SARM o frente a los de pacientes sin infección alguna (Gould y col., 2010). Así, en el año 2010 se publicaron los resultados de un estudio estadounidense que incluía alrededor de 700 pacientes, infectados por SARM y SARM en proporción similar. El coste medio por paciente infectado por SARM fue de 34.657\$, frente a los 15.923\$ de los infectados por SARM. El ratio de mortalidad era significativamente mayor para los primeros con un 23.6% frente a un 11.5% (Filice y col., 2010). Un estudio similar realizado unos años antes en Canadá, obtuvo un coste por paciente infectado por SARM de 12.216\$, atribuyendo un 81% a la hospitalización, un 13% a las medidas de vigilancia y control epidemiológico, un 4% a la terapia antibiótica y un 2% a las investigaciones del laboratorio (Goetghebeur y col., 2007). Se calcula que en la Unión Europea el coste hospitalario adicional atribuible a las infecciones por SARM alcanza los 380 millones € al año (Gould, 2010).

1.6.1.7.1 BASES BIOQUÍMICAS, MOLECULARES Y GENÉTICAS DE LA RESISTENCIA A METICILINA

La célula de estafilococo se encuentra rodeada, como todas las bacterias gram positivas, por una pared celular con 20-40 nm de ancho y cuya principal molécula estructural es la mureína o peptidoglicano (PG), el cual se dispone tridimensionalmente constituyendo una red o malla reticulada. El PG es un polímero constituido por residuos alternos de dos derivados de azúcares, el ácido-N-acetilmurámico (NAM) y N-acetilglucosamina (NAG), unidas por puentes β -1,4-glucosídicos. Unidas al grupo carboxilo del NAM, hay cadenas peptídicas constituidas por cuatro aminoácidos: L-alanina, D-glutamina, L-lisina y D-alanina. Las cadenas de PG están conectadas entre sí a través de estos tetrapéptidos. En *Staphylococcus aureus*, los tetrapéptidos de las cadenas de PG adyacentes, se unen por puentes transversales de pentapéptidos de glicina (que unen el grupo ϵ - amino de la L-lisina con el grupo carboxilo de la D-alanina, Fig. 4). Estos son preformados en el citoplasma por las proteínas FemX, FemA y FemB, que también se encargarán de unir la glicina del extremo del pentapéptido, a la L-lisina del tetrapéptido del NAM (Fig. 4). El establecimiento definitivo del puente de pentaglicinas entre los tetrapéptidos de NAM de cadenas de PG adyacentes, se denomina transpeptidación, y es llevada a cabo en la superficie externa de la membrana citoplasmática, en una reacción catalizada por las proteínas de unión a penicilina o PBPs.

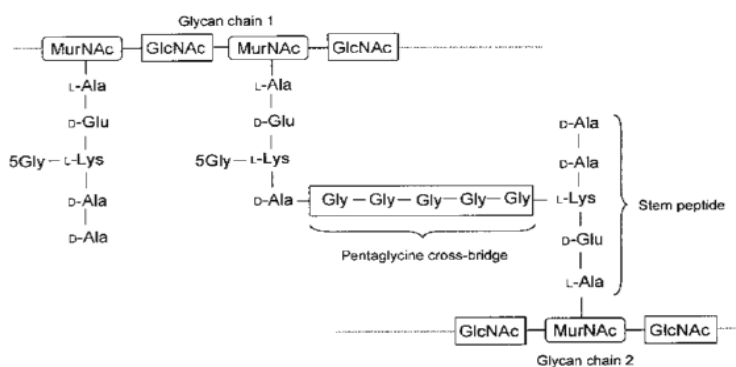


Figura 4. Una representación esquemática de un puente cruzado entre dos cadenas de mureína en la capa de PG de un *S.aureus* (Stapleton y col., 2002)

En *Staphylococcus aureus* se han descrito cuatro PBPs: PBP1, PBP2, PBP3 y PBP4. Todas poseen dos dominios, uno involucrado en la reacción de transpeptidación y el otro implicado en la transglicosilación de la cadena de mureína. El antibiótico β -lactámico actúa inhibiendo el dominio de transpeptidación de las PBPs, interfiriendo de

esta manera en la construcción de los puentes cruzados entre las cadenas de PG. Sin estos, la pared celular es inestable y débil mecánicamente, se producirá la liberación de contenido celular, y la bacteria muere (*Georgopapadakou et al., 1986; Giesbrecht y col., 1998; Berger-Bächli y col., 1998*).

Genéticamente, la diferencia de un SARM con un *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina (SASM), es la presencia en el cromosoma bacteriano de un largo fragmento (40-60 kb) de ADN foráneo, al que se le conoce con el nombre de elemento *mec*, y la presencia en éste, del gen *mecA*, que codifica para una proteína de unión a penicilina de 75 KDa denominada PBP2a o PBP2'. Hasta la fecha, no se ha descrito un equivalente alélico del gen *mecA* en las cepas de *Staphylococcus aureus* susceptibles a meticilina (*Berguer-Bächli y col., 1999; Stapleton y col., 2002*).

El origen de la resistencia a meticilina no está del todo claro. Un homólogo de *mecA* con una similitud de 88% de los aminoácidos con el gen *mecA* de *Staphylococcus aureus* se ha identificado en *Staphylococcus sciuri*. Cabe destacar que este homólogo del gen *mecA* es ubicuo en esta especie y fenotípicamente se expresa como sensible a meticilina (*Couto y col., 1996; Wu y col., 2001*). Por lo tanto, se piensa que el gen *mecA* se ha originado en ECN y probablemente de una cepa estrechamente relacionada con *Staphylococcus sciuri*. Los estudios de secuenciación del gen *mecA* demuestran una secuencia muy conservada entre diferentes cepas de SARM y de ECN resistentes a meticilina. Esto hace pensar que todas las cepas estafilocócicas resistentes a meticilina descienden de un único clon ancestral que adquirió el gen *mecA*. Probablemente la transposición es el mecanismo de transferencia horizontal para la adquisición de *mecA*, según los estudios publicados hasta el momento. Una o más copias de la secuencia de inserción IS431 (también conocida como IS257) ubicadas al lado del complejo *mec* dentro del *cassette* cromosómico, con dos IR (*invert repeats*) en los extremos y dos genes conocidos como *ccrA* y *ccrB* que codifican para recombinasas, son las razones que apoyan la idea de que el gen *mecA* y su ADN asociado, son móviles (*Berguer-Bächli y col., 1999; Stapleton y col., 2002*).

El principal mecanismo de resistencia a meticilina en *Staphylococcus aureus* se produce a través de la expresión de la proteína foránea PBP2a, a la cual no se puede unir la meticilina, y toma el mando de las reacciones de transpeptidación de las PBPs endógenas. La síntesis de PBP2a normalmente se encuentra regulada para que el nivel de expresión sea bajo, sin embargo este puede potenciarse si se producen mutaciones en los genes reguladores, *mecI* y *mecR1*.

Los genes *mecR1* y *mecI* son reguladores de la transcripción localizados inmediatamente corriente arriba del promotor del gen *mecA*. El gen *mecI* codifica MecI, una proteína homodimérica de unión a ADN que reprime la expresión del gen *mecA* mediante bloqueo de la región promotora. El gen *mecR1* codifica MecR1, una proteína transmembrana (metaloproteasa dependiente de Zn^{2+}) que actúa como transductor de señal en presencia de antibióticos β -lactámicos. En ausencia de antibiótico, MecI se encuentra fijado al promotor *mecA*, inhibiendo su expresión. Bajo presión selectiva, MecR1 detecta la presencia de antibiótico y desencadena su respuesta hidrolizando el dímero MecI, el cual se desune del promotor permitiendo la expresión del gen *mecA* (Sharma y col., 1998).

Se ha descrito que las cepas que presentan secuencias intactas y por tanto, una completa funcionalidad de los genes *mecR1* y *mecI*, presentan una fuerte represión en la expresión de PBP2a, ya que el gen *mecA* está reprimido efectivamente por MecI. Estas cepas pueden llegar a mostrarse susceptibles a meticilina. Sin embargo, parece probable que los polimorfismos de *mecI* y las mutaciones en el promotor de *mecA* se encuentren en muchos aislados clínicos de SARM, reflejando una presión selectiva positiva ejercido por los β -lactámicos sobre los mutantes que carecen o presentan menor actividad represora. Para estas cepas, la cantidad de PBP2a producida les es suficiente para conferirle una ventaja evolutiva sobre las demás, en aquellos medios con presencia de meticilina (Chambers y col., 1997). El caso más extremo lo ejemplifican las cepas COL de SARM, en las que se ha descrito una delección que afecta al dominio de unión del antibiótico de *mecR1* y la completa eliminación de *mecI*, lo que origina una expresión constitutiva de PBP2a (Fig. 5) (Niemeyer y col., 1996).

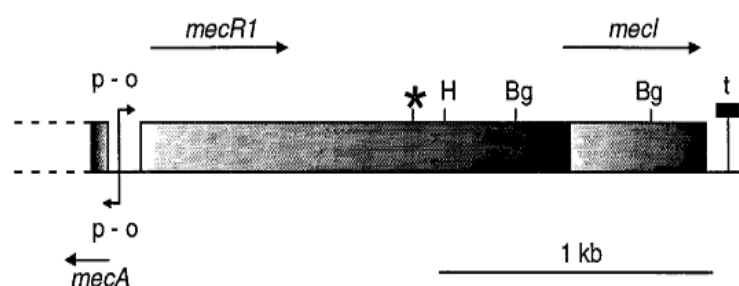


Figura 5. Diagrama esquemático del operón *mecRI-mecI*. Se muestra como la delección de 1 Kb descrita en las células COL, elimina la porción 3' de *mecR1* que contiene su dominio de unión a penicilina, y todo el gen *mecI* (Niemeyer y col., 1996)

Hay que indicar que la expresión constitutiva de la resistencia a meticilina requiere, no solo las alteraciones en los genes *mecR1* y *mecI* ya indicadas, sino también la ausencia de los genes reguladores de β -lactamasas (*blaI* y *blaR1*), los cuales son capaces también de reprimir *mecA* (Hackbarth y col., 1993).

Entre el caso de las cepas COL y aquellas en las que las secuencias de los genes reguladores están intactas, se pueden encontrar cepas que expresan diferentes niveles de resistencia, incluso subpoblaciones resistentes a elevadas concentraciones de meticilina, dentro de una población con sensibilidad al antibiótico. Es lo que se denomina resistencia heterogénea, análoga a la que puede mostrar *Staphylococcus aureus* con respecto a la vancomicina (Markova y col., 2008).

Actualmente se considera al conjunto compuesto por el gen *mecA*, los genes del operon regulador *mec* y las secuencias de inserción, una unidad denominada “complejo génico *mec*”. El conjunto de genes *ccr*, que codifica recombinasas específicas de sitio responsables de la movilidad del complejo génico *mec*, constituyen otra unidad denominada “complejo *ccr*”. Los dos complejos, constituyen en conjunto un elemento génico de *Staphylococcus* denominado *cassette* SCCmec. Éste se describe como una isla genómica con un tamaño entre 21 y 67 kb, que se integra en el cromosoma siempre al final del extremo 3' de la región *orfX*, un punto de lectura abierta de función desconocida, que se localiza cerca del origen de replicación de *Staphylococcus aureus* (Baba y col., 2002).

Según la distribución de *mecI*, *mecR1*, y la posición exacta de IS431, el complejo *mec* se puede clasificar en seis tipos diferentes (IWG-SCC, 2009):

- Clase A - **Down** IS431-*mecA*-*mecR1*-*mecI* **Up** -
- Clase B - **Down** IS431-*mecA*-*mecR1*-IS1272 **Up** -
- Clase B2 - **Down** IS431-*mecA*-*mecR1*-Tn4001-IS1272 **Up** -
- Clase C2 - **Down** IS431-*mecA*- *mecR1*-IS431 **Up** -
- Clase C1 - **Down** IS431-*mecA*-*mecR1*-IS431 **Up** -
- Clase D - **Down** IS431-*mecA*- *mecR1* **Up** -

De la misma manera, para el complejo génico *ccr*, se han identificado cinco tipos diferentes: Tipo 1, *ccrB1-ccrA1*; Tipo 2, *ccrB2-ccrA2*; Tipo 3, *ccrB3-ccrA3*; Tipo 4, *ccrB4-ccrA4*; Tipo 5, *ccrC* (Zhang y col., 2005).

Según la combinación encontrada en los SCCmec, de tipo de complejo génico *mec* con tipo de complejo génico *ccr*, se han descrito para SCCmec ocho variantes hasta la fecha (Tabla 3).

Complejo mec	Complejo ccr	SCCmec
B	1	I (1B)*
A	2	II (2A)
A	3	III (3A)
B	2	IV (2B)
C2	5	V (5C2)
B	4	VI (4B)
C1	5	VII (5C1)
A	4	VIII (4A)

Tabla 3. Tipos de cassette SCCmec en función del tipo de complejo mec y complejo ccr.

* Otras denominaciones aceptadas

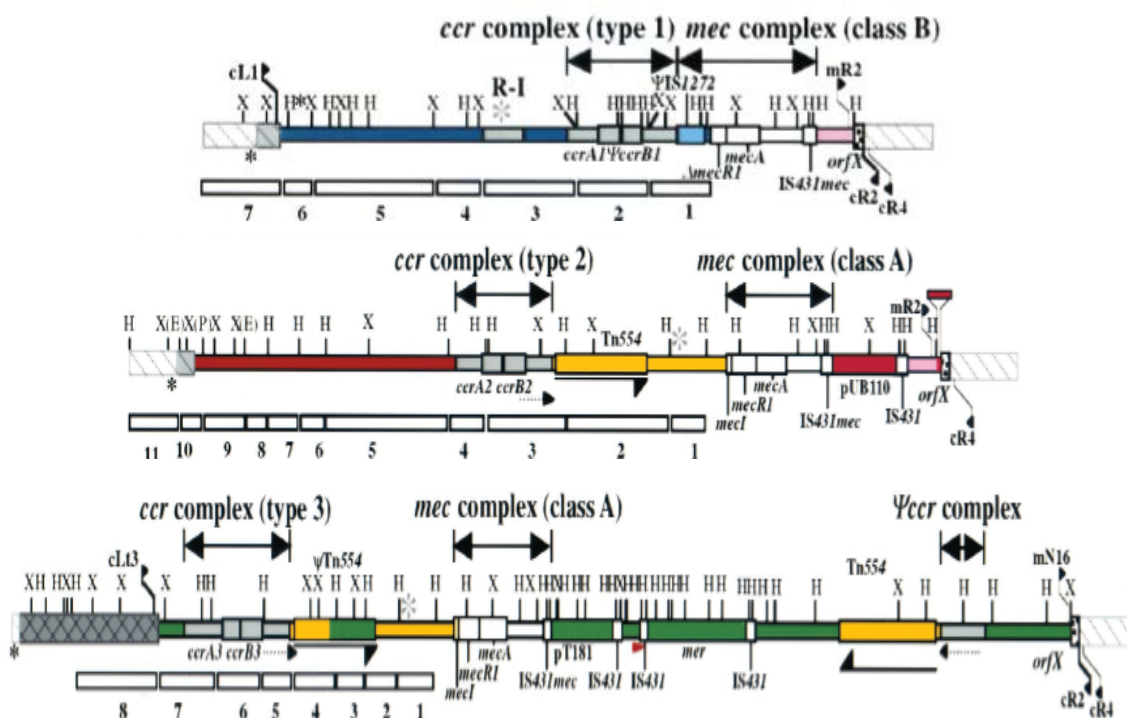


Figura 6. Representación esquemática de los complejos genéticos *ccr* y *mec* que constituyen los SCCmec tipo I, II y III (arriba, centro y abajo, respectivamente) (Ito y col., 2001).

La región del *cassette mec* que no comprende a los complejos genéticos *mec* y *ccr*, se le denomina región J. Esta región contiene genes y pseudogenes que no parecen ser esenciales, exceptuando algunos genes de resistencia a antibióticos β -lactámicos y metales pesados (Zhang y col., 2005). Ocurre que dentro de algunos tipos de SCCmec, se pueden encontrar variantes en base a la secuencia de la región J, que son clasificadas como subtipos. Estos incluyen por ejemplo el SCCmec IA, que se diferencia del SCCmec I por la presencia del plásmido pUB110 integrado corriente abajo del complejo

mec; el SSC*mec* IIIA, que se diferencia del SSC*mec* III por la ausencia del plásmido pT181 y los elementos *IS431* flanqueantes; y el SCC*mec* tipo IIIB que carece de las copias integradas del Tn454, del plásmido pT181 y del operón *mec* con sus IS asociadas (Oliveira y col., 2002). Variantes del SCC*mec* tipo IV son el SCC*mec* IVa, IVb, IVc y IVd, que se diferencian en sus secuencias nucleotídicas del extremo izquierdo del complejo *ccr* (región L-C). El IVc tiene una copia integrada del Tn4001 flanqueada a cada lado por la IS256. El IVa porta integrado el pUB110 (Ma y col., 2002).

El SCC*mec* tipo I se diseminó en cepas de SARM recolectadas a principios de la era antibiótica, en la década de los años 60, y a excepción del gen *mecA*, no posee genes de resistencia adicionales (Hiramatsu y col., 2001). Los SCC*mec* tipo II y III emergen en la década de los años 80 y son portadores de otros genes de resistencia accesorios. En ambos tipos de SCC*mec* se encuentra insertado el Tn554, aunque en diferentes lugares, el cual confiere resistencia a eritromicina y espectinomicina. Además, en ambos tipos hay integrados pequeños plásmidos movilizables entre secuencias de inserción IS431, ubicados corriente abajo del gen *mecA*. En el tipo II se encuentra el plásmido pUB110 que confiere resistencia a tobramicina y bleomicina, mientras que en el tipo III se encuentra el plásmido pT181, que codifica resistencia a tetraciclina. Los SCC*mec* tipo IV y V, al igual que ocurriera con el SCC*mec* tipo I, no poseen genes de resistencia adicionales. A diferencia de los tipos I, II y III, detectados en cepas de SARM de origen hospitalario, los tipo IV y V se descubrieron en cepas de origen comunitario (Ma y col., 2002; Ito y col., 2004).

Otros factores ambientales y genéticos aparte del SCC*mec* también influyen en la resistencia a meticilina. Los estudios empleando inactivación por inserción, han permitido identificar varios genes *housekeeping* estafilocócicos necesarios para la resistencia a meticilina. Mutaciones en los factores esenciales para la resistencia a meticilina, factores *fem* (*Factors Essential for Methicillin Resistance*), o auxiliares, factores *aux* (del inglés *auxiliary*), inhiben la formación del precursor del PG. Las proteínas FemA, FemB y FemX añaden residuos de glicina en el puente de pentaglicinas entre las cadenas de PG (Berger-Bächi y col., 1998). Se ha comprobado que la amidación del glutamato en el péptido nascente es inhibida en mutantes *femC*, que la formación de glucosalina-1P se ve inhibida en mutantes *femD*, y que la formación del precursor se bloquea en el paso de adición de lisina en mutantes *femF* (Ludovico y col., 1998; Jolly y col., 1997; Gustafson y col., 1994). Otro tipo de factor que puede tener influencia en la resistencia a meticilina es el gen *ilm*, que codifica una

proteína de membrana lipofílica, la cual afecta a los niveles de ratio de lisis bacteriana en presencia de meticilina, aunque se desconoce a través de qué proceso bioquímico. La inserción del transposon Tn918 en dicho gen provoca una reducción de la resistencia a meticilina de alto nivel y homogénea, a un fenotipo heterorresistente. A los genes denominados reguladores globales *agr* y *sar*, se les otorga un efecto modulador en la resistencia heterogénea a meticilina. La correlación entre la reducción del nivel de resistencia máximo alcanzable en los dobles mutantes *agr-/sar-*, y la reducción de los niveles de PBP1 y PBP3, conducen a la hipótesis de que las PBPs endógenas podrían contribuir parcialmente a la acción de la PBP2a (*Berger-Bachi y col., 1999*).

1.6.1.7.2 TRANSMISIBILIDAD Y MEDIDAS DE CONTROL EPIDEMIOLÓGICO DE SARM

En los hospitales, el principal reservorio de SARM son los pacientes infectados o colonizados. Las fosas nasales, heridas y el recto, son los sitios más comunes de la colonización de los pacientes en la atención aguda o en los cuidados crónicos (*Herwaldt y col., 1999*). El personal sanitario, aunque puede servir como reservorio de SARM y puede albergar el microorganismo durante meses, actúa principalmente como mecanismo de transmisión mediante sus manos contaminadas a partir de los pacientes infectados o colonizados, las zonas de infección o colonización propias, y de los instrumentos o superficies ambientales contaminados con líquidos corporales que contengan SARM (Tabla 4). Por tanto, parece razonable que los intentos de controlar la propagación de SARM se hayan basado principalmente en tres estrategias: la higiene de las manos de los trabajadores sanitarios, la mejora en la utilización de los antibióticos, y la detección y el aislamiento de los pacientes infectados o colonizados para aplicarles medidas de contención (*Asensio y col., 2006*).

El aislamiento de los pacientes de cuidados intensivos en habitaciones individuales, o su agrupamiento (*cohorting*), no ha demostrado una reducción de la diseminación de SARM. Y más aún, en una revisión sistemática reciente de la literatura médica sobre la eficacia de las medidas de aislamiento para SARM, los autores concluyen que no existen estudios lo suficientemente bien diseñados para analizar la efectividad de cada una de esas medidas por separado aunque, probablemente, los programas que incluyen este tipo de medidas pueden reducir la prevalencia de SARM incluso en ambientes con concentraciones endémicas (*Cepeda y col., 2005*).

Elevar el nivel general de adherencia a las precauciones básicas evitaría la adopción de otras medidas más costosas, ya que el cumplimiento de las precauciones estándares con una adecuada higiene de las manos, complementada con las precauciones de contacto para los pacientes infectados o colonizados debería contener la diseminación de SARM en la mayor parte de las ocasiones (*Asensio y col., 2006*). La recomendación actual del Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de EE.UU. (CDC) sobre la higiene de las manos, es la utilización de friegas con productos basados en alcohol (*Boyce y col., 2002*).

-
- Permanencia hospitalaria prolongada
 - Exposición a antibióticos de amplio espectro
 - Exposición a gran número de agentes antimicrobianos
 - Terapia antimicrobiana de larga duración
 - Permanencia en unidades de cuidados intensivos o quemados
 - Presencia de herida quirúrgica
 - Proximidad a otro paciente con SARM
-

Tabla 4. Factores de riesgo para la adquisición de una infección nosocomial por SARM
(*Herwaldt y col., 1999*)

En cuanto a la presión selectiva de los antibióticos, cada vez se acumulan más argumentos que relacionan el uso de determinadas clases de antimicrobianos de amplio espectro (fluorquinolonas, cefalosporinas de tercera generación y carbapenemes) y la prevalencia de SARM. Esta restricción debería complementar otras medidas que promueven la buena utilización de los antimicrobianos tales como la realización de un diagnóstico etiológico rápido y preciso, la optimización de la terapia empírica y profiláctica basada en la información local, el evitar el tratamiento de las contaminaciones o de las colonizaciones (mediante antibioterapia sistémica), o la suspensión del antibiótico cuando la infección ya no es probable o ya se ha curado (*Monnet y col., 2005*).

Otro medio para evitar la transmisión de *Staphylococcus aureus* ha sido la eliminación del estado de portador nasal, la que ahora se puede lograr, al menos temporalmente, con tratamiento antiestafilocócico local u oral. Se debe tener cuidado al utilizar compuestos antibacterianos a los cuales los estafilococos sean y permanezcan

sensibles. Debe comprenderse que la prevención puede ser sólo de corta duración, siendo la recolonización la regla con el tiempo. Mupirocina al 2% intranasal aplicada dos veces por día durante 5 días, parece el agente tópico más efectivo, tanto en el caso de SASM como en el caso de SARM, y resuelve el 91% de los casos de portación nasal estable. Rifampicina y ciprofloxacino, y sus combinaciones, han mostrado ser sustancialmente eficientes, con una recidiva parcial en todos los casos con un seguimiento de 1 mes (Amerlaan y col., 2009).

La última y más actual medida para la contención de la infección por SARM es identificación genotípica de las cepas SARM aisladas y productoras de infección, y el posterior análisis epidemiológico. La contribución de la epidemiología molecular en el control de la infección por SARM será ampliamente tratada en el siguiente apartado.

Las normas de consenso para el control de la infección por *Staphylococcus aureus* en general y por SARM en particular, quedan citadas en la Tabla 5.

-
- Higiene de manos de los trabajadores sanitarios
 - Mejora en la utilización de los antibióticos
 - Detección y aislamiento de los pacientes y personal colonizado
 - Eliminación del estado de portador nasal
 - Identificación genotípica de las cepas SARM y su análisis epidemiológico
-

Tabla 5. Cuadro de medidas para prevenir la extensión de SARM entre los pacientes infectados

1.6.1.7.3 TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE SARM

El protagonismo de SARM en la infección nosocomial, las graves infecciones que de ella pueden derivar, su implicación en la infección asociada a los cuidados sanitarios en el ambiente extrahospitalario, y el aumento progresivo de aislamientos de cepas de SARM con resistencia a glucopéptidos o nuevos antibióticos como daptomicina o linezolid, revela la importancia del uso de medidas de control de la infección por SARM en el ambiente sanitario. Según lo dicho en el apartado anterior, la activa vigilancia, las precauciones en el manejo y contacto con los pacientes, así como la concienciación de una buena higiene de manos del personal sanitario, son algunas de las estrategias recomendadas para conseguir descender la ocurrencia nosocomial de SARM. Sin embargo, la microbiología siempre consideró importante para conseguir

limitar la propagación de SARM, desarrollar paralelamente métodos que permitieran tipificar las cepas productoras de enfermedad, y de esta manera, obtener información acerca de los reservorios, fuentes de infección y forma de transmisión de cada una de ellas, así como poder distinguir la ocurrencia de reinfecciones. Los primeros métodos surgieron en los años 50 y 60, siendo todos métodos fenotípicos. Los que mayor trascendencia tuvieron fueron: tipificación según los perfiles de sensibilidad antibiótica, de manera que las cepas con perfiles diferentes eran “antibiotipos” diferentes (*Shittu y col., 2006; Krynski y col., 1966*); y el fagotipaje, es decir, el tipaje de las células en función del perfil de fagos que son capaces de causarles lisis bacteriana (*del Valle y col., 1999; Williams y col., 1952*). Sin embargo, la exactitud y el poder discriminatorio de estos métodos, fueron superados por las técnicas de tipaje basadas en el análisis del genoma celular, que irrumpieron a finales del siglo pasado. Inmediatamente surgieron diferentes publicaciones que demostraron los beneficios de la incorporación rutinaria del análisis y tipaje molecular de las cepas de SARM, en los programas hospitalarios de control de la infección nosocomial. En esta línea, se realizó un estudio a finales de la pasada década (*Hacek y col., 1999*) con el objetivo de determinar los beneficios, tanto médicos como económicos, de un programa de control de infección nosocomial que incluye la determinación rutinaria de la clonalidad microbiana en los laboratorios clínicos, mediante un análisis por endonucleasas de restricción (REA). La aplicación exhaustiva de las medidas preventivas de higiene en aquellos lugares donde se demostraba la ocurrencia de un brote, el cuidado posterior en el manejo de esos pacientes y el tratamiento de los posibles reservorios, resultó en un descenso del 23% en el número anual de pacientes que adquirieron una infección hospitalaria por SARM (*Hacek y col., 1999*). De esta manera se sientan las bases sobre las cuales muchos autores recomiendan el tipaje molecular de las cepas de SARM, y el posterior estudio de los diferentes clones, como un arma valiosa para rastrear y limitar la propagación de este microorganismo.

El sistema de análisis molecular de las cepas de SARM debe tener una serie de características para que resulte útil en la consecución de los objetivos. Así, para cada aislado, el sistema debe proporcionar un resultado interpretable, preferiblemente basado en criterios objetivos. Los resultados deben ser reproducibles de un día para otro, así como entre diferentes laboratorios, y permitir la diferenciación de cepas no relacionadas. Es importante que el método se pueda estandarizar y por tanto, de manera

ideal, debe ser técnicamente sencillo y rápido, y con un coste económico efectivo para los laboratorios (Shutt y col., 2005).

En la actualidad, son ya varios los métodos moleculares que han sido ensayados y usados para el estudio de la relación entre aislados de diferentes especies patógenas, tanto bacterianas como fúngicas. A finales de la década de los ochenta emergieron un grupo de técnicas, que con el tiempo revelaron una serie de limitaciones importantes. Entre ellas se incluyen el análisis de plásmidos, ribotipaje por PCR, amplificación de fragmentos de longitud polimórfica (AFLP), la amplificación con cebadores al azar de regiones polimórficas de ADN (RAPD), o la electroforesis en campo pulsado (PFGE) (Olive y col., 1999). El análisis plasmídico es fácil de implementar, pero con frecuencia no tiene poder discriminante porque muchas especies bacterianas tienen pocos o no tienen plásmidos o por el contrario diferentes especies bacterianas portan los mismos plásmidos (Seifert y col., 1994). El tipaje por análisis molecular de los ARNr por PCR no es capaz de distinguir entre diferentes subtipos dentro de la misma especie microbiana (Clementino y col., 2001). El AFLP produce resultados en forma de perfiles muy complejos difíciles de interpretar. RAPD, a pesar de su alto poder discriminatorio, demuestra una pobre reproducibilidad intra e interlaboratorio, posiblemente debido a la corta longitud de los cebadores y a su baja temperatura de anillamiento en la reacción de PCR (Versalovic y col., 2002).

En los últimos años, se han revelado una serie de técnicas moleculares basadas en la biología genómica específica de *Staphylococcus aureus*, que han resultado ventajosas para el genotipado de los aislados de SARM, con respecto a estas técnicas más generales anteriormente descritas. Así disponemos del análisis molecular del gen de la proteína A estafilocócica (*spa typing*), que se ha convertido en una herramienta de primera línea para la tipificación epidemiológica de rutina, y la combinación de los resultados obtenidos con el tipado mediante secuencia multilocus (MLST) y el análisis molecular del cassette cromosómico *mecA* de *Staphylococcus aureus* (SCC*mec*), que ofrecen una exactitud y reproducibilidad muy cercanas a la técnica que es considerada, hoy por hoy, el método de referencia para el análisis epidemiológico local a corto plazo, la electroforesis en campo pulsado post-digestión con SmaI (PFGE) (Vindel y col., 2009).

La PFGE es la técnica más usada y considerada actualmente el “gold standard”, gracias a su excelente poder discriminatorio. La mayor ventaja es que los resultados de la PFGE han sido correlacionados con la información clínica y se han publicado guías

con los criterios para su correcta interpretación. Además, su elevada reproducibilidad, los estudios realizados entre diferentes laboratorios, y la estandarización de protocolos técnicos y de la interpretación de los resultados, ha hecho posible la creación de una extensa base de datos para diferentes especies microbianas patógenas, entre ellas SARM. Sin embargo, la PFGE tiene desventajas acusadas. La más importante es el tiempo requerido para obtener resultados finales, que dependiendo del protocolo escogido puede variar entre 2 y 4 días. Otra desventaja es que la interpretación de sus resultados es bastante subjetiva, pues se basa en el análisis visual de un patrón de bandas electroforéticas. Esto hace de la PFGE un método que requiere de personal experimentado y adiestrado, tanto para la interpretación de los resultados, como para el desarrollo de la técnica, pues se trata de una herramienta compleja y laboriosa (*Ross y col., 2005*). Esto último ha lanzado a los expertos en el campo, a buscar técnicas con el mismo poder discriminatorio que la PFGE, pero más rápidas y sencillas, que se adapten mejor al trabajo rutinario de un hospital, donde la celeridad en la emisión de resultados es pieza clave. Entre ellas aparece el análisis de amplificación de secuencias repetitivas o rep-PCR, método de genotipaje a evaluar en este trabajo.

1.6.1.7.3.1 Electroforesis en campo pulsante (PFGE)

Durante los años 70, se observó que bajo la acción de un campo eléctrico, las moléculas de ADN se reorientaban y desplegaban avanzando en dirección al polo positivo. Cuando el campo eléctrico cesaba, las moléculas de ADN se relajaban recuperando su estado inicial. La aplicación de un segundo campo eléctrico, con una orientación distinta del primero, obligaba al ADN a cambiar su conformación y a reorientarse de nuevo para poder avanzar en la dirección del segundo campo eléctrico. El tiempo requerido para que tuviera lugar esta reorientación era dependiente de la longitud de la molécula, esto es, de su peso molecular (*den Dunnen y col., 1993*). Tras un cambio de orientación del campo eléctrico, las moléculas grandes tardan más tiempo en alinearse y poder comenzar el avance a través del gel, de lo que tardan las moléculas de ADN más pequeñas. Mientras que los campos eléctricos que se alternen tengan la misma intensidad y voltaje, la migración final del ADN será en línea recta, aunque el patrón final de separación de los fragmentos revelará la suma de todos los avances cortos en zig-zag que ha realizado el ADN. Este principio fue el que llevó al grupo de Schwartz en el año 1984 a la descripción de las técnicas de PFGE (*Schwartz y col.,*

1984) y su utilidad en la separación de moléculas grandes de ADN, capaz de separar moléculas de un tamaño entre las 10 kb y 10 Mb.

Desde la primera descripción del sistema, se han realizado modificaciones de la técnica original, diseñándose diferentes sistemas de PFGE que varían en la forma y en la orientación en que los campos eléctricos son aplicados al gel (Carle y col., 1984; Chu y col., 1986). Todos los sistemas son capaces de separar un amplio rango de moléculas de ADN de diferentes tamaños, aunque difieren en la velocidad de separación y en la resolución obtenida en un rango de peso molecular dado. De todos los sistemas desarrollados el más extendido ha sido el CHEF (del inglés *Clamped Homogeneous Electric Field*). Sus mayores ventajas son la facilidad de manejo y la capacidad de separar múltiples muestras generando patrones de bandas rectos, lo que hace mucho más fácil la comparación entre ellos. Este sistema dispone de veinticuatro electrodos dispuestos periféricamente por la fuente de electroforesis, de manera que se crea un gradiente constante a lo largo de todo el gel (Fig. 7).

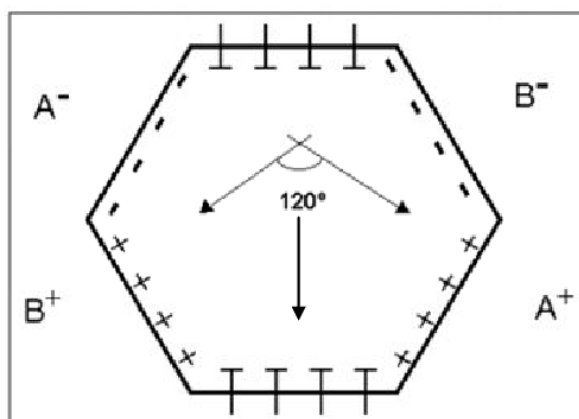


Figura 7. Esquema de la distribución de los electrodos en el sistema CHEF de PFGE. El ángulo señalado (120°) es el ángulo de reorientación entre el campo eléctrico A y el B, siendo la resultante una recta.

El ángulo de reorientación aplicado debe ser superior a 90° y habitualmente se trabaja con ángulos de 120°. El ángulo de reorientación es el ángulo que forman los vectores correspondientes a los dos campos eléctricos que se van alternando, y que refleja los grados de reorientación que deben realizar las moléculas de ADN para poder avanzar en la dirección de los campos eléctricos que se apliquen al gel.

El PFGE ha permitido avanzar enormemente en el estudio de la organización genómica de los microorganismos: número de elementos genómicos, así como el tamaño y la topología de los mismos. Además, el uso combinado del PFGE con endonucleasas de restricción de baja frecuencia de corte, ha permitido la obtención de

patrones de macrorrestricción cromosómicos, característicos de cada aislado bacteriano estudiado. Esta última aplicación se considera el método de tipificación molecular intraespecífico por excelencia en los estudios de epidemiología local de muchas especies bacterianas y para la mayoría de patógenos, incluyendo a SARM (*Murchan y col., 2003*). La utilización de endonucleasas de restricción de baja frecuencia, permite la división del ADN en pocos fragmentos (entre 10 y 30). Muchos de estos fragmentos son de gran tamaño, más de 40 kb y no pueden separarse por técnicas de electroforesis convencional, requiriendo la aplicación del PFGE. Para *Staphylococcus aureus*, la endonucleasa utilizada generalmente es la enzima *SmaI*, cuyo lugar de restricción (5'CCCGGG3') se encuentra menos representado en el cromosoma de lo previsto para una diana de 6 nucleótidos, debido al bajo contenido en GC (38%) del genoma de *Staphylococcus aureus*.

La combinación de estas dos técnicas, macrorrestricción del ADN y separación de los fragmentos por PFGE, se aplica con mucha frecuencia en estudios epidemiológicos de bacteriología. El objetivo de un estudio de este tipo es encontrar la relación existente entre los aislados clínicos objeto de estudio, es decir, obtener evidencias de que los aislados que están relacionados epidemiológicamente, lo están también genéticamente, y que por tanto, representan la misma cepa bacteriana, la cual se ha ido dispersando. El principal problema que ha existido cuando se ha utilizado el PFGE con este propósito es la falta de un criterio estandarizado para el análisis de los patrones. En el año 1995 se propusieron una serie de directrices para interpretar dichos patrones de restricción (*Tenover y col., 1995*). Estas directrices son utilizadas en prácticamente todos los trabajos epidemiológicos que emplean el PFGE y se hace referencia a ellas en la mayor parte de las publicaciones.

1.6.1.7.3.2 Tipificación mediante la técnica de *Multilocus Sequence Typing* (MLST)

El método de MLST (*Multilocus Sequence Typing*) es una técnica que ofrece un elevado poder de reproducibilidad a la hora de caracterizar aislados bacterianos. Se basa en las diferencias existentes en secuencias de alrededor de 450 pb, de fragmentos internos de siete genes implicados en el metabolismo celular procariota (genes housekeeping). Para cada fragmento génico, cada secuencia diferente se asume como un alelo distinto, y cada aislado es definido por los alelos de cada uno de los siete *loci housekeeping*. Así, cada aislado queda definido con respecto a esos siete genes, con un

perfil alélico o de tipo de secuencia (ST, *Sequence Type*). Como existen muchos alelos para cada uno de los siete loci (Tabla 6), es muy poco probable que perfiles alélicos idénticos, lo sean por casualidad, de manera que los aislados con el mismo perfil alélico puede ser asignado al mismo clon. Los datos de los tipos de secuencias pueden ser comparados fácilmente entre distintos laboratorios, encontrando que la mayor ventaja de usar MLST es la posibilidad de comparar vía *on-line* los resultados obtenidos por diferentes estudios. Además, los resultados obtenidos del MLST pueden ser usados para responder preguntas básicas acerca de la relación evolutiva, tanto de diferentes tipos de ST, como de diferentes especies bacterianas (*Enright y col., 2000*).

Gen	Longitud de secuencia (pb)	Nº de alelo	Nº de sitios polimórficos
<i>arcC</i>	456	17	19
<i>aroE</i>	456	17	23
<i>glpF</i>	465	11	14
<i>gmk</i>	429	11	13
<i>pta</i>	474	15	18
<i>tpi</i>	402	14	18
<i>vaiL</i>	516	16	19

Tabla 6. Posibilidades de secuencias diferentes para cada uno de los siete loci (*Enright y col., 2000*).

El inconveniente del método MLST es que es una técnica relativamente cara y que es necesario el acceso a un equipo de secuenciación de ADN de alto rendimiento, lo que muchos laboratorios clínicos no pueden permitirse (*Olive y col., 1999*). Además ofrece un escaso poder discriminatoio para SARM, obteniendo con esta técnica pocos grupos clonales.

Una vez tenemos el tipaje de las cepas a estudio, sea por MLST u otra técnica como PFGE o rep-PCR, son muy útiles las herramientas de clasificación grupal, donde se representa la conexión entre los diferentes grupos en base a sus índices de similaridad. El ejemplo más claro y más utilizado de este tipo de representaciones es el dendograma. Sin embargo, éstos proporcionan una pobre información de los eventos evolutivos recientes, ya que reconstruyen las relaciones en ausencia de un modelo realista en el que los clones bacterianos surgen y se diversifican para formar nuevos grupos o tipos clonales. Así, una herramienta cada vez más popular, llamada BURST ha sido utilizada como alternativa, aunque actualmente ya no es capaz de hacer frente al enorme tamaño de diferentes clones que se obtienen en los estudios epidemiológicos

modernos, ofreciendo unas gráficas toscas y de difícil interpretación. Sin embargo, ésta ha servido de base para que recientemente saliera a la luz un nuevo algoritmo informático, denominado eBURST, que divide a un conjunto de resultados obtenidos por MLST, sea cual sea su tamaño, en grupos de aislados relacionados o complejos clonales, dentro del cual se define el genotipo ancestral o fundador a partir del cual ha surgido el resto (Fig. 8). La herramienta representa de manera sencilla la relación evolutiva entre los clones que previamente has definido por MLST.

El algoritmo eBURST es una aplicación informática tipo Java, que se puede encontrar en el siguiente enlace: <http://eburst.mlst.net>.

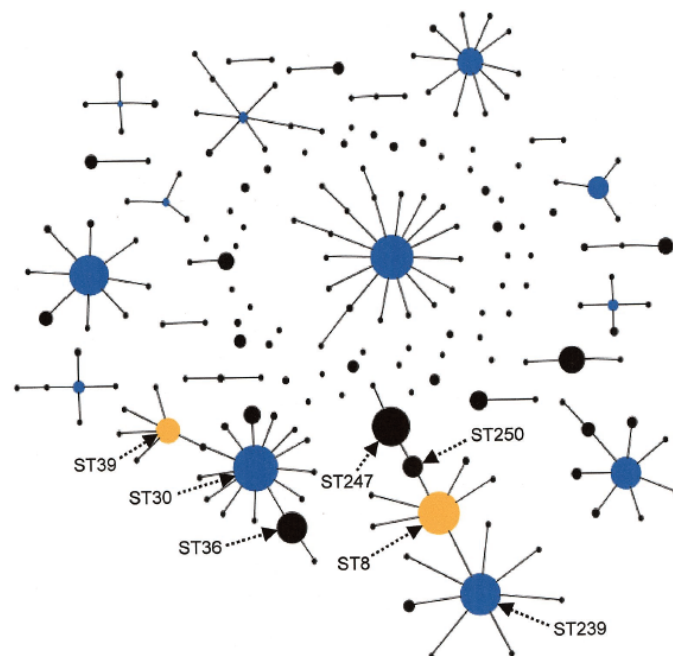


Figura 8. Representación obtenida por eBURST de la relación evolutiva entre distintos clones de *Staphylococcus aureus* genotipados por MLST. El genotipo fundador se muestra en azul. El fundador de un subgrupo en amarillo.

1.6.1.7.3.3 Tipificación mediante análisis de repeticiones spa (spa typing)

Existen métodos basados en la secuenciación de un único locus cromosómico, con el que analizamos las regiones repetidas que contiene. A este tipo corresponde el tipaje del gen de la coagulasa (*coa typing*) y el del gen de la proteína A estafilocócica (*spa typing*). Estos pueden ser usados para obtener un tipaje fiable y preciso de los SARM. El *spa typing* es una técnica especialmente interesante para un hospital, por ser más rápido y ofrecer mayor poder de resolución que el *coa typing* (Harmsen y col., 2003). La secuencia de la región X del gen de la proteína A está sujeta a diversas

mutaciones espontáneas, que pueden consistir en mutaciones puntuales, deleciones, duplicaciones e inserciones, que conllevan tanto la ganancia como la pérdida de repeticiones, hecho en el que se basa su elevado polimorfismo. A cada repetición se le asigna un código alfanumérico, y el tipo de *spa* para cada cepa se otorga en función de las repeticiones que se encuentren en su región X y el orden en el que éstas estén dispuestas (Tabla 7). El software informático Ridom StaphType es una herramienta que permite de manera relativamente sencilla, determinar el tipo y el orden de las repeticiones ubicadas en la secuencia (obtenida previamente mediante secuenciación) y designar el tipo de *spa*, mediante conexión con un servidor central de datos (<http://www.spaserver.ridom.de>) (Strommenger y col., 2006).

<i>spa</i> type	Repeats ^a
01r26r30r17r34r17r20r17r12r17r16
02r26r23r17r34r17r20r17r12r17r16
03r26r17r20r17r12r17r17r16
04r09r02r16r13r13r17r34r16r34
05r26r23r13r23r31r05r17r25r17r25r16r28
06r26r23r13r23r31r05r17r17r25r16r28
08r11r19r12r21r17r34r24r34r22r25
09r11r12r21r17r34r24r34r22r24r34r22r33r25
10r26r17r34r17r20r17r12r17r16
11r08r16r02r25r34r24r25
12r15r12r16r02r16r02r25r17r24r24
13r26r30r17r34r17r20r17r12r17
14r26r17r20r17r12r17r17r16
16r26r23r13r23r31r05r17r25r16r16r28
17r15r12r16r16r02r16r02r25r17r24r24
18r15r12r16r02r16r02r25r17r24r24r24
19r08r16r02r16r02r25r17r24
20r26r23r31r29r17r31r29r17r25r17r25r16r28
23r26r37r17r12r17r16
24r11r12r21r17r34r24r34r22r25
25r26r23r23r13r23r29r17r31r29r17r25r17r25r16r28
26r08r16r34
27r26r17r13

Tabla 7. Códigos numéricos de cada tipo de repetición, y asignación de un *spa*-tipo concreto a cada perfil distinto de repeticiones (Harmsen et al., 2003).

Los estudios publicados muestran que existe una buena correlación entre los grupos clonales de SARM obtenidos por *spa typing* y los obtenidos por otras técnicas, incluso algunos trabajos le otorgan mayor poder de resolución que a MLST (Crisostomo y col., 2001). Con respecto a este último método en particular, parece que existen repeticiones específicas y determinadas sucesiones de repeticiones, que están asociadas con un particular tipo de ST obtenido por MLST. Actualmente en el programa Ridom StaphType disponemos de un algoritmo denominado BURP (del inglés *Based Upon Repeat Pattern*), que tiene en cuenta esta asociación, y clasifica los tipos de secuencias *spa* relacionadas, dentro de diferentes grupos BURP. La nomenclatura de estos es de un

número con el prefijo CC BURP (del inglés *clonal complex BURP*) (*Strommenger y col., 2006*).

1.6.1.7.3.4 Tipificación del Cassette Cromosómico SCCmec

En el año 2002 el grupo de *Oliveira y col.*, publicaron el desarrollo y la validación de una PCR múltiple, que permitía de manera rápida una tipificación genómica de aislados de SARM, basada en las características estructurales diferenciales de los diferentes tipos de cassette SCCmec, previamente descritos (del I-IV). Esta estrategia fue validada usando una colección representativa de clones pandémicos de SARM en los cuales la estructura completa de los elementos *mec* asociados era previamente determinada por: a) análisis de hibridación mediante Southern blot, usando tres enzimas de restricción y distintas sondas específicas para cada tipo de SCCmec; b) detección por PCR de múltiples loci, cubriendo la totalidad de la estructura del elemento *mec* (PCR screenings); c) por secuenciación de DNA, basándose en la información ofrecida por estudios previos, en los que se había clonado y secuenciado de manera completa el elemento *mec* de SARM y comparado estructuralmente los diferentes tipos de SCCmec conocidos (*Ito y col., 1999; Ito y col., 2001; Oliveira y col., 2002*).

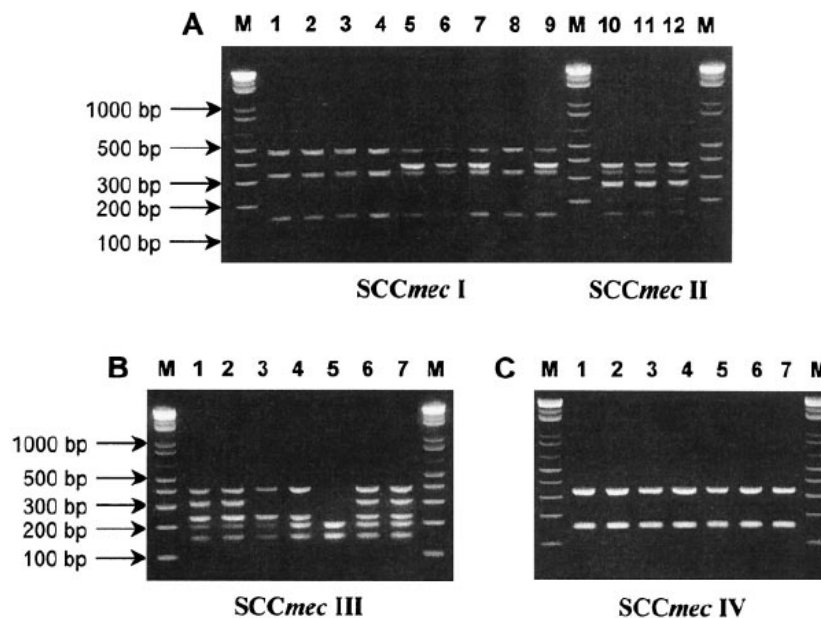


Figura 9. PCR múltiple para caracterización de SCCmec tipos I-IV. A) Líneas de 1-4 y 8 corresponden a SCCmecI; líneas 5-7 y 9 a variantes IA; líneas 10-12 son el SCCmecII. B) Líneas 1, 2, 6 y 7 corresponden al tipo SCCmecIII, mientras que las líneas 3 y 4 representan la variante IIIA, y la 5 la variante IIIB. C) SCCmecIV (*Oliveira y col. 2002*).

En el año 2002 se describió por vez primera el SCC*mec* IV en dos cepas de SARM pertenecientes a aislados procedentes de la comunidad, sin aparente relación con el ambiente hospitalario. Fue a partir de este hallazgo cuando se empezaron a reportar cada vez más aislamientos de SARM comunitario y cuando se generalizó la emergencia de su propagación (Ma y col., 2002). En este sentido, la PCR múltiple que se ha descrito previamente, permite la detección de este tipo IV, pero no así de sus múltiples subtipos que posteriormente se describieron (IVa, IVb, IVc y IVd), cuya discriminación se antoja fundamental para estudiar la epidemiología del SARM comunitario y su relación con el intrahospitalario. Así, tres años más tarde se valida una PCR múltiple que permite la detección simultánea del gen *mecA* (permite una rápida confirmación de la resistencia a meticilina de un aislado de *Staphylococcus aureus*, además de servir de control interno) y de los tipos de SCC*mec* I, II, III, IVa, IVb, IVc, IVd, y V (éste último descrito por Ito y col. en 2004). Ésta técnica alcanza una sensibilidad y especificidad del 100% en la caracterización de 54 aislados de SARM (pertenecientes a varios tipos y subtipos de SCC*mec* conocidos), cuando se compararon con los métodos de tipificación previamente descritos (Zhang y col., 2005).

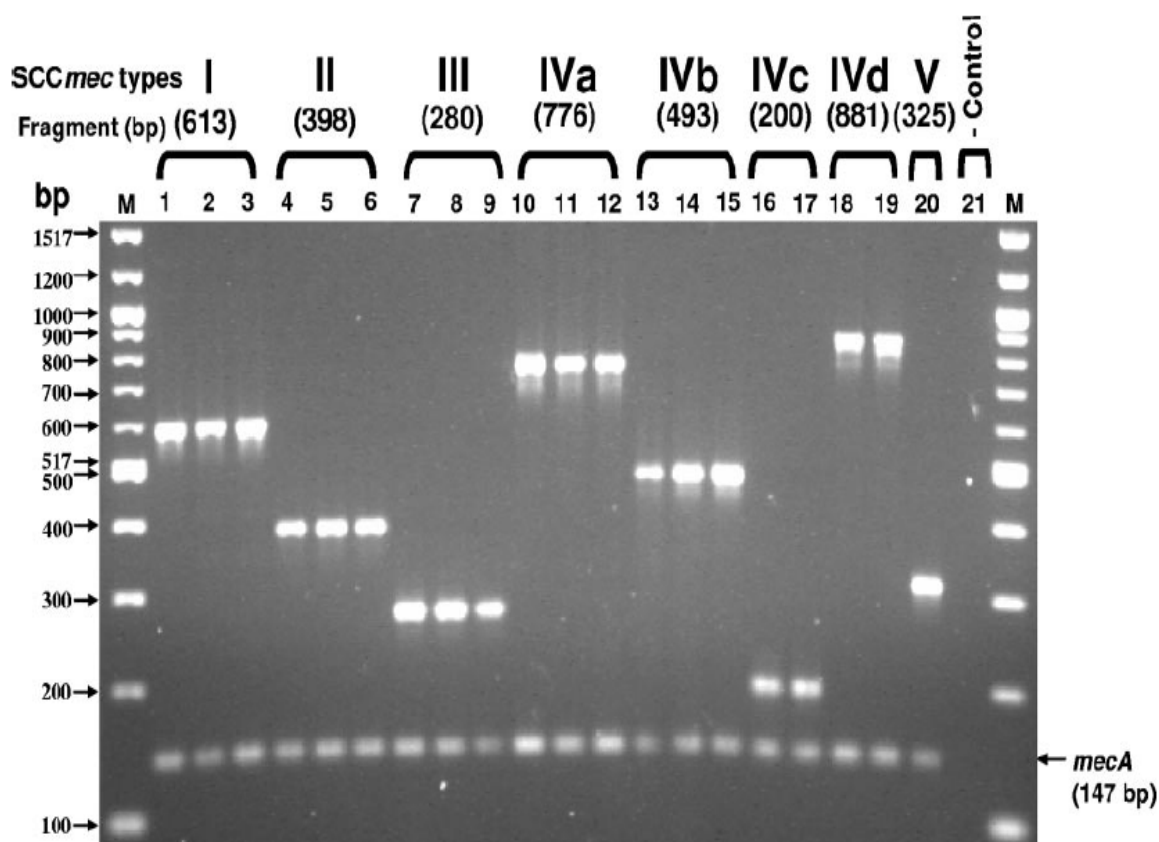


Figura 10. PCR múltiple para la caracterización de SARM de acuerdo al tipo de SCC*mec*: tipos I-V, y subtipos SCC*mec*IVa-d (Zhang y col., 2005).

1.6.1.7.3.5 Tipificación mediante PCR de secuencias repetitivas (rep-PCR)

Actualmente, sólo un sistema de tipificación molecular microbiana está comercialmente disponible como un kit estandarizado, que engloba todos los reactivos necesarios desde la extracción de ADN microbiano, hasta la electroforesis capilar en chip, pasando por la amplificación mediante PCR, incluyendo además un software informático para el procesamiento y análisis automático de los datos. Este sistema se denomina: DiversiLab System (*Spectral Genomics, Inc., Houston, Tex.*) el cual usa la tecnología denominada “PCR de secuencias repetitivas” o rep-PCR. Hace unos años, se publicaron los primeros artículos en los que se utiliza rep-PCR como método molecular de genotipado microbiano. Estos primeros trabajos tienen en común que son especies fúngicas las primeras en las que se ensaya la técnica, más concretamente de los géneros *Aspergillus* (Healy y col., 2004), *Fusarium* (Healy y col., 2005) y *Candida* (Wise y col., 2007). La relativa rapidez y sencillez de la técnica, junto a resultados convincentes, animan a otros grupos a trasladar el método al campo de la bacteriología. Así, en los últimos años se publican varios trabajos con el objeto de clasificar por rep-PCR, aislados de diferentes especies bacterianas, que como SARM, ostentan una fácil propagación intrahospitalaria y/o multirresistencia antimicrobiana, lo que hace interesante estudiar los tipos de brotes, identificar y clasificar los diferentes tipos de subespecies o clones asociados a cada uno de los brotes, o si existen resistencias antimicrobianas especialmente asociadas a uno u otro clon. Para todo esto, la utilización de la rep-PCR como método molecular de tipaje microbiano arroja resultados satisfactorios una vez se comparan con los obtenidos por el método de referencia (PFGE). Tales son los casos para *Enterococcus faecium* (Chuang y col., 2010), *Pseudomonas aeruginosa* (Ratkai y col., 2010), *Serratia marcescens* (Ligozzi y col., 2010), *Salmonella enteritidis* (Kilic y col., 2010) o *Acinetobacter Baumannii* (Yan y col., 2010; Higgins y col., 2010).

Una vez extraído y purificado el ADN bacteriano, el método de rep-PCR utiliza cebadores que hibridan con secuencias repetitivas (con una longitud que oscila entre 30 y 500 pb) intercaladas a lo largo de todo el genoma bacteriano y ubicadas en regiones no codificantes. Una condición particular de estos cebadores es que sus extremos 3´ quedan orientados hacia el exterior de la secuencia repetitiva, de manera que en la PCR se amplifican, no los elementos repetitivos, sino los fragmentos genómicos situados entre ellos (Fig. 11A). Así, como producto de PCR obtenemos múltiples amplicones de

ADN de diferentes tamaños y cantidades (*Grisold y col., 2010*). El método automático de rep-PCR tiene tres componentes:

- el bioanalizador *Agilent 2100*, el cual separa los fragmentos amplificados en un chip por el que discurre la fase líquida de electroforesis. Junto al producto de PCR se agrega un marcador fluorescente que interacciona con el ADN, y que permite una vez terminada la carrera, mediante la excitación del fluoróforo por una fuente de luz situada en la salida del canal, detectar cada uno de los productos de PCR separados en la electroforesis.
- El kit comercial con los reactivos de extracción de ADN y amplificación por PCR.
- Software DiversiLab (versión 3.4). Para cada muestra, elabora un perfil de picos que responden a cada uno de los fragmentos amplificados, cada uno con un tiempo de migración y una intensidad (altura), de acuerdo al tamaño y cantidad del fragmento respectivamente (Fig. 11B). Estos gráficos reciben el nombre de electroferogramas. El programa informático se encuentra integrado dentro de una página web de acceso restringido que sirve como base de datos, muy útil para que el estudio pueda ser seguido por personal asociado a la investigación de diferentes centros de trabajo.

El software analiza los resultados mediante la creación de una matriz de proximidad usando la correlación de Pearson, y calcula así el porcentaje de similaridad entre todas las muestras testadas. El informe generado por el sistema DiversiLab incluye un dendograma (el cual ilustra la relación jerárquica entre los aislados) (Fig. 11C) y un gráfico de dispersión (el cual proporciona una visión espacial y no jerárquica del grado de similitud entre aislados). El software, extrapolando los tiempos de migración y la altura de los picos de las gráficas de cada aislado, es capaz de crear siluetas que simulan las bandas que debiéramos obtener en un gel clásico de electroforesis. Estas imágenes también pueden incorporarse al informe.

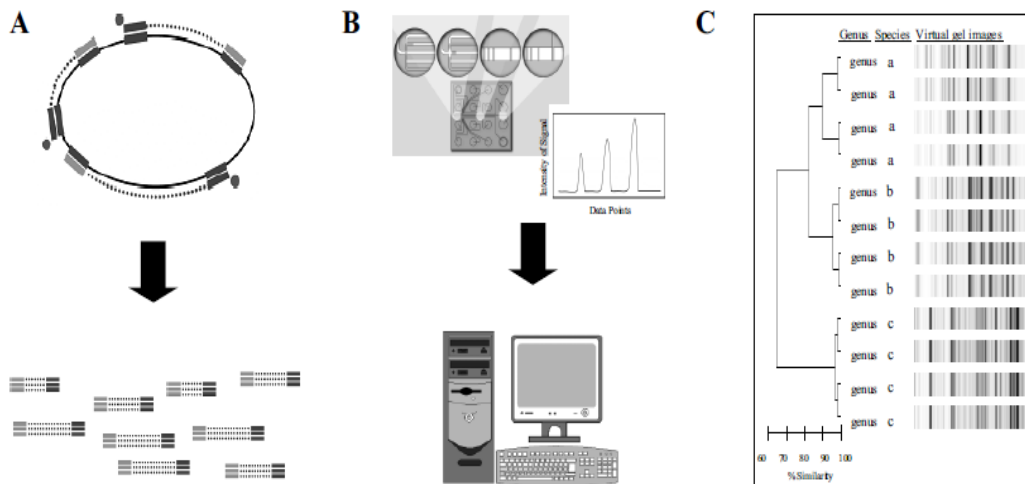


Figura 11. Sistema de genotipaje microbiano rep-PCR/Diversilab (Healy y col., 2005).

La disposición comercial de todos los componentes, la automatización, la simplicidad técnica, la rapidez, y los informes producidos, fáciles de elaborar y sencillos de interpretar, son características que hacen al sistema DiversiLab muy atractivo para su uso extendido en la práctica rutinaria de los laboratorios de microbiología clínica (Healy y col., 2005).

La bibliografía publicada acerca de la utilización del método rep-PCR y sistema DiversiLab para el genotipado de cepas de SARM es escasa, en comparación con lo divulgado para otras especies microbianas como *Aspergillus* o *Acinetobacter*. Si bien es cierto, dentro de ese número reducido, ya existen estudios publicados acerca del rendimiento del sistema DiversiLab con respecto a la técnica de referencia, el PFGE, para tipaje molecular de aislados de SARM. Por ejemplo, en el año 2005 se publica un trabajo en el que se genotipan 89 aislados de SARM de 19 brotes, tanto por PFGE como por rep-PCR-DiversiLab, resultando concordancia en 15 de ellos. Los cuatro restantes se tipifican también por la técnica del *spa typing* resultando tres de ellos concordantes con los resultados de rep-PCR y sólo uno de ellos es similar a los resultados de PFGE (Shutt y col., 2005). En ese mismo año el grupo otro estudio genotipa 109 aislados, obteniendo 18 resultados discrepantes (85% de concordancia). De esos aislados 14 eran un patrón o pulsotipo único para la PFGE, hecho que no consigue discriminar la rep-PCR que los asigna a diferentes agrupaciones o *clusters*. En este trabajo se destaca la excelente reproducibilidad intra y interlaboratorio de los resultados (Ross y col., 2005). En el año 2009 se publican otros dos trabajos, con objetivos y resultados similares. Como ejemplo, uno de ellos, analiza 105 aislados de SARM, dentro de los cuales se

encuentran representados los 11 clones descritos hasta ahora de SARM en EE.UU. (USA100 → USA1100, además del clon brasileño). DiversiLab distribuye estos aislados en 17 patrones, 6 de ellos representados por una única cepa, y designa tres *clusters* en donde se ubican más de un pulsotipo (*Tenover y col., 2009*). En ese mismo año se publican los resultados del genotipaje por rep-PCR de una selección representativa de la “*Harmony collection*” (recopilación de aislados de SARM que han circulado entre 1981 y 1998 en 11 países europeos, y que suponen la mayor colección de clones de SARM causantes de enfermedades intrahospitalarias) (*Millán y col., 2009*). La rep-PCR muestra buena correlación con los patrones clonales definidos por MLST, pero menor concordancia con los pulsotipos definidos por PFGE. El poder discriminatorio calculado como “Índice de Diversidad de Simpson” (IS) es de 0.860, 0.877 y 0.905 para DiversiLab, MLST y PFGE respectivamente. El nivel aceptable de discriminación depende de varios factores, como los datos epidemiológicos, pero es deseable un DI > 0.900 para que los resultados de genotipaje sean interpretados con confianza (*Witt y col., 2009*).

Todos estos grupos de investigación llevan a cabo una reflexión final muy similar: el sistema DiversiLab es un método de genotipaje más sencillo (no necesita un personal técnico especialmente adiestrado en la técnica), más rápido (hasta 13 aislados en 4-5 horas), logísticamente más cómodo (todos los reactivos necesarios están disponibles en un kit comercial) y de interpretación más objetiva (existencia de un software informático que procesa y analiza los datos automáticamente), que el método de referencia de PFGE. Además parece claro que los aislados sin relación genotípica según el sistema DiversiLab, tampoco presentan nunca relación según PFGE (*Tenover y col., 2009*). Estas características podrían compensar el menor poder discriminatorio que los primeros estudios publicados le atribuyen a la rep-PCR, y hacer del sistema DiversiLab un método de genotipaje muy interesante para incorporar al trabajo rutinario de un laboratorio de microbiología clínica de un centro hospitalario, como pieza central en trabajos de investigación en torno a posibles brotes de SARM, tanto nosocomiales como comunitarios dentro de una determinada área sanitaria. Pero quizás esta hipótesis necesite todavía mayor experimentación y la publicación de un mayor número de estudios, que terminen por corroborarla.

1.6.1.7.4 ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS FRENTE A SARM

La emergencia en torno al aumento de VISA y VRSA en hospitales y el aumento de la incidencia del CO-SARM en la comunidad, nos ha llevado a considerar el uso de nuevos antibióticos antiestafilocócicos, como alternativa, o como drogas en combinación con vancomicina.

El uso de trimetoprim-sulfometoxazol y las tetraciclinas de larga actividad (doxiciclina), se ha incrementado para el tratamiento de infecciones en piel y tejidos blandos ocasionadas por SARM, y en especial por CO-SARM. La gran mayoría de estos aislados, hoy en día son susceptibles a estos antibióticos. El tratamiento de las infecciones de la piel con preparaciones tópicas de ácido fusídico, se encuentran actualmente con el problema de la emergencia en el aumento de la resistencia. La gran mayoría de las cepas de SARM, son susceptibles a rifampicina, de manera que este antibiótico todavía puede representar una solución en infecciones problemáticas. Sin embargo, la resistencia a rifampicina se desarrolla rápidamente si la droga es usada en monoterapia, de manera que se recomienda que sea utilizada siempre en asociación con otro agente (*Pantosti y col., 2007*). La quinupristina/dalfopristina no ha sido formalmente estudiada para el tratamiento de bacteremia o endocarditis por SARM, aunque existen trabajos publicados en los que se ha usado de forma satisfactoria en estas situaciones (*Drew y col., 2000*).

Linezolid está aprobado e indicado para el tratamiento de infecciones cutáneas y de partes blandas complicadas, y para la neumonía, tanto nosocomial, como asociada a la comunidad, particularmente aquella causada por USA300. Se ha postulado que los antibióticos que actúan inhibiendo la síntesis proteica, reducirían la capacidad de la bacteria para producir toxinas (*Micek y col., 2007*). Así, un estudio reciente realizado en un modelo in vitro, reporta que linezolid junto con clindamicina, reduce la producción de leucocidina PVL, α -hemolisina y TSST-1; mientras que vancomicina incrementa dicha producción (*Stevens y col., 2007*). Una de las ventajas para el tratamiento con linezolid de infecciones comunitarias o extrahospitalarias, es la posibilidad de su administración por vía oral.

Tigeciclina ha sido la primera droga de la clase de las gliciliclinas en ser aprobada para su uso clínico. Ésta se une a la subunidad ribosomal 30S bacteriana inhibiendo la síntesis de proteínas. Tigeciclina presenta un extenso volumen de distribución y produce elevadas concentraciones fuera de la circulación sanguínea, incluidos el árbol y vesícula biliar, colon y pulmón. Con CMI₉₀ en un rango de 0.25-0.5

µg/ml para SARM, este antibiótico podría ser utilizado con precaución en pacientes con sospecha o probada bacteremia (*Micek y col., 2007*).

Daptomicina es un antibiótico indicado para el tratamiento de infecciones cutáneas y partes blandas complicadas, endocarditis derecha y bacteremias. Sin embargo no está indicada para el tratamiento de neumonía por SARM, porque la actividad de la droga es inhibida por el surfactante pulmonar (*Garnacho-Montero y col., 2011*).

Ceftobiprol y ceftarolina son cefalosporinas sintética, diseñadas para unirse con elevada afinidad a la PBP2a producida por las cepas SARM. El ceftobiprol fue el primer antibiótico β-lactámico con actividad, tanto contra SARM, como frente a estreptococos resistentes a penicilina. Los dos han sido aprobados recientemente por la FDA (*US Food and Drug Administration*) para el tratamiento de infecciones cutáneas complicadas y neumonías asociadas a cuidados sanitarios (*Saravolatz y col., 2009; Tattevin y col., 2010; Saravolatz y col., 2011*).

Actualmente existen diferentes antimicrobianos todavía en fase de estudio o ensayos clínicos, que muestran actividad frente a SARM. Estos son los ejemplos de la telavancina, dalbavancina y oritavancina, lipoglicopeptidos semisintéticos que inhiben la síntesis de la pared celular, y demuestran una actividad in vitro contra SARM. Actualmente se encuentran en investigación para el tratamiento de infecciones cutáneas, neumonía nosocomial y bacteremias no complicadas debidas a *Staphylococcus aureus*. Es más, recientemente, la telavancina ha sido aprobada por la FDA para el tratamiento de infecciones complicadas de piel y tejidos blandos en los Estados Unidos (*Mendes y col., 2010; Billeter y col., 2008*).

1.6.1.7.5 EMERGENCIA DE SARM ASOCIADO A LA COMUNIDAD Y SUS DIFERENCIAS CON SARM ASOCIADO A CUIDADOS SANITARIOS

Las cepas SARM son una de las principales causas de infecciones hospitalarias y, en general, de infecciones asociadas a los cuidados sanitarios (IACS). Un caso de infección por SARM asociado a cuidados sanitarios se define como un paciente con: 1) una infección con SARM identificada 48 horas después del ingreso hospitalario; 2) una historia previa de hospitalización, cirugía, diálisis, o haber recibido atención durante un largo periodo de tiempo en centros sociosanitarios o instituciones geriátricas, dentro del primer año previo al cultivo positivo para SARM; 3) un tratamiento permanente con

catéter o dispositivo médico percutáneo (tubo de traqueotomía, tubo de gastrostomía, etc.); o 4) un cultivo positivo para SARM previo al periodo de estudio. Estas cepas se denominan SARM asociado al cuidado sanitario (ACS-SARM) (Naimi y col., 2003).

A pesar del aumento de la prevalencia de SARM en los hospitales, estas cepas se han aislado con poca frecuencia en la comunidad. En muchas situaciones los SARM se detectan en la comunidad cuando los pacientes, todavía infectados o colonizados por estos microorganismos, son dados de alta de un centro hospitalario, o bien cuando se transmiten a la comunidad a partir de personal hospitalario colonizado. Estas cepas se asocian con infecciones que comienzan en la comunidad pero que presentan factores de riesgo hospitalarios, y por tanto siguen definiéndose como ACS-SARM (Cercenado y col., 2008a). Si queremos hacer referencia de manera específica a su lugar de aislamiento, podemos dividir a los ACS-SARM en dos grupos: extrahospitalarios e intrahospitalarios.

Sin embargo, en la última década, numerosas comunicaciones han descrito la existencia de infecciones por SARM en la comunidad, cuyo origen no está relacionado con el hospital o con los cuidados sanitarios. Además, hay evidencia molecular que permite identificar a estas cepas de SARM como verdaderas comunitarias y que demuestra que también han evolucionado en la comunidad, se han adaptado bien a sobrevivir allí y están causando brotes comunitarios. Estas cepas son las denominadas SARM de origen comunitario (CO-SARM), las cuales se aíslan en pacientes que no cumplen ninguno de los requisitos anteriormente descritos para ACS-SARM (Cercenado y col., 2008a).

El espectro clínico de CO-SARM es similar al de *Staphylococcus aureus* sensible a la meticilina (SASM), e incluye la colonización asintomática, las infecciones de piel y partes blandas, y las infecciones invasivas. La mayoría de las infecciones producidas por CO-SARM son leves, y se limitan a piel y partes blandas, principalmente forúnculos y abscesos, que constituyen la presentación clínica más común. Sin embargo, también han sido descritos casos de manifestaciones clínicas serias y potencialmente fatales, asociadas a una infección por CO-SARM. Estas incluyen neumonías necrosantes, fascitis necrotizante, sepsis grave, y el síndrome de Waterhouse-Friderichsen (caracterizado por rash petequial, coagulopatía y colapso cardiovascular). Estas infecciones severas son asociadas con cepas de CO-SARM portadores de genes codificantes de la leucocidina de Panton-Valentine (PVL), y con un

aumento de la prevalencia de los genes para α -toxina y enterotoxina estafilocócica B, con respecto a la encontrada en la población de ACS-SARM (Boucher y col., 2010).

Diferentes trabajos demuestran que PVL induce una rápida activación y muerte celular de los neutrófilos en humanos y conejos (no así en roedores y simios). Estudios en modelos de conejo han confirmado que la expresión de PVL en las cepas USA 300 de *Staphylococcus aureus*, está asociada con lesiones cutáneas más severas, comparado con las cepas no productoras de PVL. En un modelo de osteomielitis en conejo, la expresión de PVL se asocia con el aumento de la persistencia de la infección y con una mayor probabilidad de deformación del hueso y extensión de la infección al músculo o a otros puntos. La evidencia en modelos de neumonía, sugieren que la necrosis pulmonar está causada directamente por PVL, por activación y lisis de los leucocitos polimorfonucleares (Gould y col., 2012).

En España, hasta el momento actual, todos los CO-SARM descritos presentan el SCCmec de tipo IV (con las variantes IVa y IVc); sin embargo, este tipo IV también es el más frecuente entre los aislados hospitalarios, por lo que la simple caracterización de este *cassette* no permite en nuestro medio diferenciar entre CO-SARM y ACS-SARM. No obstante, las cepas de CO-SARM, en comparación con las cepas de ACS-SARM, presentan diferentes patrones de bandas en la electroforesis de campo pulsado (Fig. 12) y diferentes tipos de secuencia en el MLST (Cuevas y col., 2007).

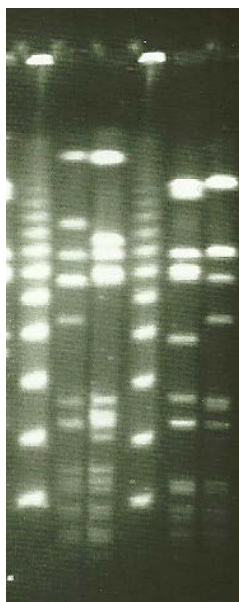


Figura 12. Gel de Electroforesis en campo pulsado (PFGE). Carriles de izq. a derecha: 1) Marcador Peso Molecular, 2) Pulsotipo A, 3) Pulsotipo A1 (CO-SARM), 4) Pulsotipo E8a, 5) Pulsotipo E7b. Nótese el diferente patrón de bandas entre el pulsotipo CO-SARM y los otros pulsotipos muy frecuentes en España.

Desde el punto de vista de la resistencia, CO-SARM se caracteriza por una generalizada mayor susceptibilidad antimicrobiana (Tablas 8 y 9). Esto se debe a que como ya se ha indicado en apartados anteriores, el SCC mec de tipo IV no contiene otros determinantes de resistencia salvo *mecA*. Sin embargo, no hay nada que impida que las cepas de CO-SARM puedan adquirir resistencia a múltiples antimicrobianos mediante la adquisición de plásmidos. Así, cada vez es más frecuente que presenten resistencia a la eritromicina y a la clindamicina por la adquisición de genes *erm* y *msrA*, o a las tetraciclinas por la adquisición de genes *tet* (Tenover y col., 2006).

Type of Antibiotic	No. (%) Susceptible*	
	Community-Associated (n = 106)	Health Care-Associated (n = 211)
Oxacillin (methicillin)	0	0
Ciprofloxacin	84 (79)	33 (16)
Clindamycin	88 (83)	44 (21)
Erythromycin	47 (44)	18 (9)
Gentamicin	100 (94)	168 (80)
Rifampin	102 (96)	199 (94)
Tetracycline	98 (92)	194 (92)
Trimethoprim-sulfamethoxazole	101 (95)	189 (90)
Vancomycin	106 (100)	211 (100)

Tabla 8. Perfiles de susceptibilidad antimicrobiana de cepas CO-SARM y cepas ACS-SARM, en un estudio prospectivo de SARM aislados durante todo el año 2000 en el Laboratorio del Departamento de Salud de Minnesota (Naimi y col., 2003).

Aunque el incremento de CO-SARM se ha notificado en diferentes países y áreas geográficas, la mayor incidencia de CO-SARM se da en Estados Unidos, donde los clones más frecuentes son USA 400 y USA 300, pertenecientes a las secuencias ST1 y ST8 respectivamente. Sin embargo, el USA 300, parece haber desplazado al USA 400 en los últimos años, siendo responsable en la actualidad de la mayoría de las infecciones por CO-SARM en Estados Unidos, ampliando su diseminación a Australia y Europa (Tenover y col., 2006; Faria y col., 2005; Nimmo y col., 2008). En España el clon CO-SARM más frecuente pertenece al ST8 y está relacionado con el clon USA 300 (Cercenado y col., 2008b).

Characteristic	Community-associated MRSA	Health care-associated MRSA
Susceptibility, ^a drug		
Chloramphenicol	Usually susceptible	Frequently resistant
Clindamycin ^b	Usually susceptible	Frequently resistant
Erythromycin	Usually resistant	Usually resistant
Fluoroquinolone	Geographic variability	Usually resistant
TMP-SMZ	Usually susceptible	Usually susceptible
SCC <i>mec</i> type	IV	II
Lineage	USA 300, USA 400	USA 100, USA 200
Toxin-producing	More	Fewer
Panton-Valentine leukocidin-producing	Common	Rare
Health care exposure	Less frequent	More frequent

Tabla 9. Características diferenciales entre CO-SARM y ACS-SARM (Weber y col., 2005).

Algunos estudios señalan que este incremento de infecciones por CO-SARM está siendo particularmente importante en población pediátrica. Un estudio poblacional realizado en Estados Unidos durante 2001 y 2002 mostraba que la incidencia anual de infecciones por CO-SARM en la población general oscilaba entre 18 y 25,7 casos por 100.000 habitantes, y esta era significativamente más alta en niños menores de 2 años (Fridkin y col., 2005). De hecho en España, la mayor parte de los casos de infección por CO-SARM se han descrito en niños, además de en pacientes sudamericanos (Broseta y col., 2006; Manzur y col., 2008) (Fig. 13).

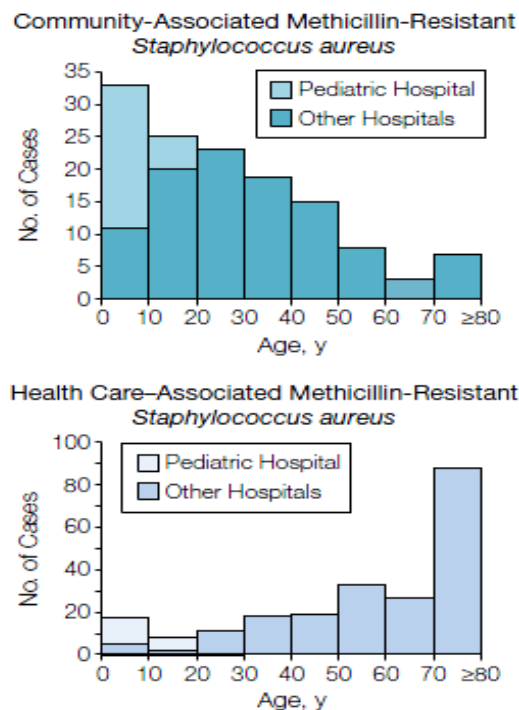


Figura 13. Distribución según edad de los casos de CO-SARM frente a la distribución para ACS-SARM. (Naimi y col., 2003)

Recientemente, un estudio de secuenciación del genoma de la cepa USA 300-0114, identificó una nueva región genética, designada ACME (*Arginine Catabolic Mobile Element*), que potencialmente aumenta la virulencia y la habilidad para la colonización en humanos por parte de *Staphylococcus aureus*. Esta región codifica una vía de desaminación de la arginina y un sistema de oligopéptido permeasa que podría contribuir a facilitar el crecimiento y supervivencia de USA 300. El ACME se integra en *orfX* del cromosoma de *Staphylococcus aureus*, en un sitio adyacente al cassette *SCCmec*, lo que sugiere que la integración y excisión del ACME podrían ser catalizadas por la recombinasa del *SCCmec*. Varios autores sostienen que el ACME ha sido transferido a las cepas USA 300 desde *Staphylococcus epidermidis*, por transferencia horizontal, aunque se desconoce exactamente el mecanismo utilizado. El ACME de momento solo se ha localizado en aislados de USA 300, no existiendo en ninguna otra cepa de *Staphylococcus aureus* de secuencia ST8 (Diep y col., 2006; Goering y col., 2007; Miragaia y col., 2009). De esta manera, su amplificación por PCR existe hoy en día como técnica para comprobar si un aislado de SARM es concretamente un USA 300.

2. OBJETIVOS

El objetivo global de la presente tesis doctoral es el estudio de la tipificación molecular y estudio de clonalidad de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM), como productores de infecciones intrahospitalarias y extrahospitalarias en Extremadura.

Pretendemos abordar este objetivo global con los siguientes objetivos parciales:

1. Conocer la prevalencia e incidencia de la infección producida por SARM en la Comunidad Autónoma de Extremadura y en cada una de sus áreas sanitarias.

2. Estudio del patrón de sensibilidad antibiótica de los SARM aislados en Extremadura. Identificación de cepas con sensibilidad disminuida a vancomicina.

3. Realizar el análisis molecular mediante rep-PCR y con ello, una tipificación genética, de una muestra de 100 cepas de SARM aisladas en los hospitales extremeños. Asimismo, realizar el análisis molecular de esas mismas cepas por los otros métodos disponibles referidos en la literatura: Fagotipia, Tipaje del Cassette Cromosómico Mec (SCC*mec*), Secuenciación de gen de la Proteína A (*Spa typing*), y Electroforesis en Campo Pulsado (PFGE).

4. Calcular los índices estadísticos que ofrezcan información sobre el poder de concordancia entre los diferentes métodos y el poder de discriminación de cada uno de ellos, prestando especial atención a los reportados por rep-PCR y PFGE. Evaluar en función de esto, el beneficio de disponer de la tecnología rep-PCR/Diversilab para la detección de brotes de SARM en los hospitales extremeños o áreas sanitarias.

5. Valorar la variabilidad genética existente en SARM entre las diferentes áreas sanitarias de Extremadura, identificar el tráfico de clones entre éstas, y describir la variabilidad genética a lo largo del año.

6. Valorar la relación existente entre los patrones de resistencia antibiótica y los perfiles genotípicos. Evaluar la asociación entre la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de vancomicina y la clonalidad encontrada.

7. Evaluar la distribución de clones según tipo de muestra (lugar de la infección) y el entorno de aislamiento (intrahospitalario / extrahospitalario).

8. Describir las características epidemiológicas, microbiológicas y moleculares de los aislados de SARM procedentes de hemocultivos; así como valorar en este grupo el fenómeno de resistencia heterogénea a vancomicina.

9. Determinar la prevalencia de SARM extrahospitalario en Extremadura. Definir los patrones genéticos y de sensibilidad con los que se relaciona. Comprobar en este grupo de aislados la existencia de algún patrón asociado a la Comunidad (CO-SARM), y en este caso, analizar por PCR la capacidad para producir Leucocidina de Pantone-Valentine (LPV) y la existencia de la secuencia “arginine catabolic mobile element” (ACME) relacionada con el clon USA-300.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 DEFINICIONES

En la Comunidad Autónoma de Extremadura existen ocho hospitales que disponen de Unidad de Microbiología, asumiendo cada una de ellas las muestras correspondientes a una zona geográfica específica (Tabla 10). Siguiendo este criterio, definimos ocho **Áreas de Atención Microbiológica en Extremadura (AAM)**, cuya distribución geográfica se muestra en la Fig.14.

Área de Atención Microbiológica	Ciudad	Provincia	Abreviatura
Hospital Infanta Cristina de Badajoz	<i>Badajoz</i>	Badajoz	HIC
Hospital de Mérida	<i>Mérida</i>		HM
Hospital de Don Benito-Villanueva	<i>Don Benito-Villanueva de la Serena</i>		HDBV
Hospital de Llerena	<i>Llerena</i>		HLLZ
Hospital San Pedro de Alcántara	<i>Cáceres</i>	Cáceres	HSPA
Hospital Campo Arañuelo	<i>Navalmoral de la Mata</i>		HCANM
Hospital Virgen del Puerto	<i>Plasencia</i>		HVP
Hospital Ciudad de Coria	<i>Coria</i>		HCC

Tabla 10. Descripción de cada AAM

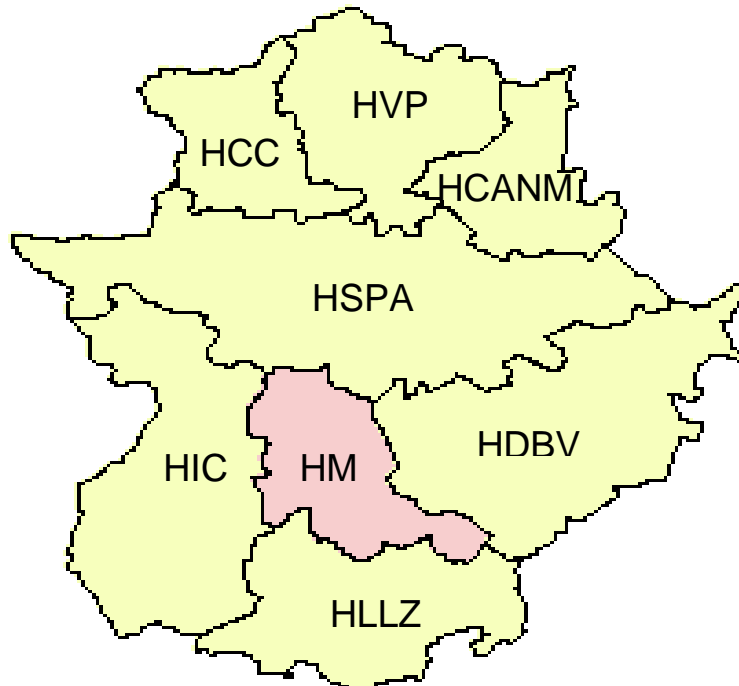


Figura 14. Distribución geográfica de cada una de las AAM

Definimos la **infección por SARM extrahospitalaria**, como aquella en la que el aislamiento microbiológico de SARM se produce a partir de muestras clínicas obtenidas en la comunidad, incluyendo centros de salud, consultorios de salud, hospitalización domiciliaria y centros sociosanitarios; o en un hospital, siempre que la toma de muestra se haya realizado dentro de las primeras 48 horas después del ingreso del paciente. Por el contrario, definimos la **infección intrahospitalaria** como aquella en la que el aislamiento microbiológico de SARM se produce a partir de muestras obtenidas en hospital y después de las 48 horas desde el ingreso del paciente.

Se clasifican como **muestra respiratoria** las muestras de esputos, aspirados traqueales y broncoaspirados. Se clasifican como **exudado**, las muestras tomadas de heridas quirúrgicas, úlceras, aspirados de abscesos, bilis, líquidos normalmente estériles (sinovial, ascítico, pericárdico y cefalorraquídeo), exudados óticos, exudados conjuntivales y exudados de heridas no quirúrgicas.

Siguiendo la norma propuesta por EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*), definimos un aislado de ***Staphylococcus aureus* resistente a meticilina**, como todo aislado que muestre un halo de inhibición inferior o igual a 21mm en un antibiograma disco-placa, incubado a 37°C durante 16-18 horas, con un disco de Cefoxitina de 30 µg en medio Muller-Hinton.

Se considera como **antibióticos no específicos para la infección por SARM**, a todos aquellos antimicrobianos que, estando aceptado su empleo en el tratamiento frente a SARM, comúnmente se emplean en el tratamiento de infecciones producidas por otros muchos y diferentes microorganismos. Éstos son: Tobramicina, Levofloxacino, Eritromicina, Clindamicina, Fosfomicina, Mupirocina, Gentamicina, Rifampicina, Ác. Fusídico, Nitrofurantoina, SXT y Quinupristina/Dalfopristina. Mientras que se han considerado como **antibióticos específicos en la infección por SARM**, a aquellos antimicrobianos con una indicación más restringida, diseñados para actuar sobre microorganismos gram positivos multirresistentes, de aceptación relativamente reciente, sin importantes ratios de resistencia, y que normalmente permanecen de reserva en los protocolos del tratamiento frente a SARM. Estos son: Tigeciclina, Linezolid, Daptomicina y Vancomicina.

Se clasifican las cepas en función del periodo estacional en el que son aisladas. Según esto definimos cuatro **bloques**. Los SARM aislados en los meses de Enero, Febrero y Marzo se clasifican en el **Bloque 1**; los aislados en Abril, Mayo y Junio, se clasifican en el **Bloque 2**; los aislados en Julio, Agosto y Septiembre se clasifican en el

Bloque 3; y los aislados en Octubre, Noviembre y Diciembre se clasifican en el **Bloque 4.**

Definimos como **pulsotipos o perfiles genotípicos mayoritarios** a aquellos cuya frecuencia en el total de aislados genotipados representa más del 3%. Por el contrario, aquellos pulsotipos que engloben el 3% o menos de los aislados genotipados, se denominarán **perfiles minoritarios.**

3.2 COLECCIÓN DE LOS AISLADOS MICROBIOLÓGICOS Y DE LOS CORRESPONDIENTES DATOS DEMOGRÁFICOS

Entre el 1 de Enero de 2010 y el 31 de Diciembre de 2010, todos los aislados de SARM procedentes de muestras clínicas sembrados y procesados en el trabajo rutinario y diario de cada una de las Unidades de Microbiología de cada AAM, son remitidos a la Unidad de Microbiología del Hospital de Mérida.

Las cepas corresponden a muestras de exudado, hemocultivos, orina, muestras respiratorias, hueso, catéter, frotis conjuntival, y frotis nasal. Las Unidades colaboradoras mantienen congelados los aislados, de manera que al término de cada mes, cada uno de ellos es descongelado, sembrado en una placa de Agar Sangre e incubado a 37°C durante 24h, para después realizar un segundo pase a placa e incubar de nuevo en las mismas condiciones. Posteriormente se impregna una torunda con punta de rayón inerte con las colonias crecidas, y se introduce en un dispositivo con medio de transporte Stuart-Amies (*Copan Italia S.p.A*), medio especialmente indicado para el mantenimiento de la viabilidad de microorganismos aerobios. Este dispositivo es el elegido para el transporte de las muestras. Cada cepa es identificada con su número de origen (el utilizado por la Unidad colaboradora) y con una ficha (Fig. 15), que recoge diferentes datos demográficos en relación a ella:

- N° de aislado (el utilizado por la Unidad colaboradora) y mes en que se ha producido
- Nombre del paciente (únicamente las dos primeras iniciales de Nombre, Primer Apellido y Segundo Apellido)
- Fecha de Nacimiento del Paciente
- Sexo del Paciente
- Fecha concreta de extracción de la muestra clínica a la que pertenece el aislado

- Lugar de adquisición de la infección: Extrahospitalario / Intrahospitalario

Un servicio de mensajería se encarga de la recogida de las muestras acumuladas a lo largo del mes y de su posterior envío hasta la Unidad de Microbiología de Mérida. El periodo de recogida se extiende durante todo el año 2010.

Gracias a la información obtenida a través de los nombres y las fechas de nacimiento, se puede establecer en la recogida de las muestras un *screening*, por el que se asegura la aceptación de una única muestra por paciente.

NÚMERO DE AISLADO Y MES				
NOMBRE* (Únicamente iniciales)				
FECHA NACIMIENTO		SEXO	V	M
TIPO MUESTRA				
FECHA EXTRACCIÓN				
LUGAR ADQUISICIÓN	INTRAHOSPITALARIA		COMUNITARIA	

Figura 15. Ficha que acompaña a cada aislado SARM, con su información demográfica, aportada por la Unidad colaboradora.

3.3 VERIFICACIÓN DE LOS AISLADOS RECIBIDOS

La Unidad de Microbiología del Hospital de Mérida, recibe en los primeros días de cada mes un paquete por cada una de las AAM, que contiene las torundas con las cepas de SARM aisladas el mes anterior. Con cada cepa o aislado se procede de igual manera: se identifica según una numeración específica utilizada para este estudio, se recopilan los datos demográficos de cada uno en una hoja de cálculo *Microsoft Excel*®, y se procede a verificar la condición de SARM de cada cepa. Para esto último se siembra cada una en medio Agar Sangre (AS) y se incuba 24h a 37°C. Se realiza un segundo pase a placa AS de una colonia aislada de *Staphylococcus aureus*, y se vuelve a incubar 24h a 37°C. Una vez se tiene un cultivo puro de *Staphylococcus aureus*, se hace un test de actividad coagulasa en plasma de conejo (*BD BBL™*), y una suspensión microbiana de 0.5-0.6 en la escala de Mc.Farland que se siembra en medio Muller-Hinton (MH), en el que se coloca un disco de 30 µg de Cefoxitina, y se incuba 24h a 37°C. Tras esto, son incluidas en estudio las cepas que muestran un halo de resistencia

inferior o igual a 21 mm.

Para cada una de las cepas se procede a una identificación automática con las tarjetas GP y AST-588 del sistema Vitek 2® (*Biomerieux*), hecho que confirma la identidad del microorganismo como *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. La tarjeta de sensibilidad AST-588 nos reporta, tanto la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) como la interpretación sensible / resistente / intermedio, con respecto a los siguientes antibióticos: Bencilpenicilina, Oxacilina (un resultado de *Resistente*, confirma la resistencia a Meticilina del aislado analizado), Gentamicina, Tobramicina, Levofloxacino, Eritromicina, Clindamicina, Quinupristina / Dalfopristina, Linezolid, Teicoplanina, Vancomicina, Tigeciclina, Fosfomicina, Nitrofurantoína, Ácido Fusídico, Mupirocina, Rifampicina, y Trimetoprima / Sulfametoxazol.

Una vez esto, se realizan las CMI por método E-test, que presentan los aislados con respecto a los antibióticos específicos en la infección causada por SARM: Tigeciclina, Vancomicina, Daptomicina y Linezolid. Para ello se realiza para cada cepa una suspensión microbiana de 0.5-0.6 en la escala de Mc.Farland, que se siembra en una placa de 15 cm de diámetro de medio MH, en la que disponemos en forma de cruz las tiras de E-test correspondientes a los cuatro antibióticos. Se incuban 24h a 37°C, y se valora la CMI para cada antibiótico (Fig. 16).



Figura 16. E-test de Vancomicina, Tigeciclina, Daptomicina y Linezolid.

Una vez realizados a cada aislado los test anteriormente descritos, se utiliza una torunda estéril para tomar la cepa del medio AS y se congela mediante el sistema de Criobolas de *Oxoid S.A.*, siguiendo las normas del fabricante. De esta manera, al

término del año 2010, finaliza la confección de un cepario anual de SARM productor de infecciones nosocomiales y comunitarias en la Comunidad Autónoma de Extremadura.

El sistema de criobolas para la congelación y almacenamiento microbiano, permite de una manera sencilla obtener un cultivo puro de cualquier aislado de la colección. Para ello se extrae una criobola, y ayudándonos con el extremo de un asa de siembra, se dibuja con la criobola una estría sobre un medio de AS, y se deja incubar a 37°C durante 24h. A partir de aquí trabajamos con un cultivo puro para la fabricación de extractos de ADN, iniciar técnicas de tipificación molecular, o fagotipaje.

3.4 MACROMÉTODO E-TEST PARA LA DETECCIÓN DE CEPAS CON RESISTENCIA HETEROGÉNEA A VANCOMICINA (h-VISA).

El conjunto de aislados SARM procedentes de hemocultivos, se somete a la técnica de Macrométodo (MET), para la detección de posibles cepas con fenotipo h-VISA. La técnica consiste en inocular en una placa de 90 mm de Agar BHI 200 µl de una suspensión de la cepa a analizar, preparada en caldo BHI y ajustada al 2 en la escala de Mc.Farland. Posteriormente se extiende con un asa de siembra por toda la placa. Una vez seca, se aplica sobre la superficie del agar la tira de E-test de Vancomicina de manera que quede centrada en la placa. Se realiza la lectura de la CMI después de una incubación de 48 h a 37°C en aire, de manera que el test es considerado positivo cuando la CMI a Vancomicina es superior o igual a 8 mg/l (*Van Hal y col., 2011*). La cepa h-VISA Mu3 (*Staphylococcus aureus* ATCC 700698) es utilizada como control positivo (*Morosini y col., 2010*).

3.5 MUESTREO Y ELECCIÓN DE LOS AISLADOS A GENOTIPAR

El número de aislados coleccionados al término del año 2010 es de 309, de los cuales se desea genotipar una muestra representativa. Así se lleva a cabo un muestreo aleatorio simple estratificado para escoger una muestra de 100 aislados en la que se vean reflejadas de manera proporcional las siguientes variables: Bloque Estacional, Área de Atención Microbiológica, y origen Intrahospitalario/Extrahospitalario.

Dentro de cada bloque y respetando las normas del muestreo antes explicadas, la elección de las cepas es aleatoria. Se hace de tal manera que estén representados los cuatro tipos de muestras mayoritarias de la base de datos. Éstas son: Hemocultivos, Muestra Respiratoria, Orina y Exudado. Según las reglas del muestreo, el número de cepas escogidas para el genotipaje por cada bloque, y según la AAM, el origen de infección y el tipo de muestra, se recoge en la Tabla 11.

NÚMERO CEPAS SARM		BLOQUE				TOTAL
		1	2	3	4	
AAM	HM	3	4	1	2	10
	HDBV	2	4	7	4	17
	HIC	8	8	3	3	22
	HLLZ	5	3	1	3	12
	HSPA	7	7	4	6	24
	HCC	2	0	1	0	3
	HCANM	2	1	3	1	7
	HVP	3	1	0	1	5
	TOTAL	32	28	20	20	100
ORIGEN DE INFECCIÓN	IN	21	19	15	10	65
	EX	11	9	5	10	35
	TOTAL	32	28	20	20	100
TIPO DE MUESTRA	EXUDADO	10	10	4	7	31
	M.RESPIRATORIA	7	6	7	7	27
	ORINA	8	4	4	3	19
	HEMOCULTIVO	7	8	5	3	23
	TOTAL	32	28	20	20	100

Tabla 11. Distribución del número de cepas escogidas por bloque para genotipaje, según AAM, origen de la infección y tipo de muestra. AAM: Área de Atención Microbiológica. Bloque 1: cepas aisladas en Enero, Febrero y Marzo; Bloque 2: aisladas en Abril, Mayo y Junio; Bloque 3: Julio, Agosto y Septiembre; Bloque 4: Octubre, Noviembre y Diciembre. HM: AAM de Mérida, HDBV: AAM de Don Benito-Villanueva, HIC: AAM de Badajoz, HLLZ: AAM de Llerena-Zafra, HSPA: AAM de Cáceres, HCC: AAM de Coria, HCANM: AAM de Navalmoral de la Mata, HVP: AAM de Plasencia. IN: cepa de origen intrahospitalaria. EX: cepa de origen extrahospitalaria

3.6 FAGOTIPIA

3.6.1 PROPAGACIÓN DEL JUEGO INTERNACIONAL DE FAGOS

Los fagos utilizados en este estudio fueron propagados en el laboratorio de Infecciones Intrahospitalarias del Servicio de Bacteriología de CNM (Instituto de Salud Carlos III) a partir del juego básico suministrado por el Laboratorio Internacional de

Referencia de Fagotipia de *Staphylococcus aureus* de Colindale (Central Public Health Laboratory, Londres), que consta de 23 fagos.

FAGOGRUPO	FAGOS				
I	29	52	52A	79	80
II	3A	3C	55	71	
III	6	42E	47	53	54
	75	77	83A	84	85
IV	94	96			
Sin agrupar	95	80			

Tabla 12. Juego internacional de fagos

Además de los fagos, el juego incluye las cepas propagadoras de estos, que se designan con el mismo número que los fagos, excepto la cepa 52A/79, que sirve para propagar tanto el fago 52A como el 79. Se utilizan también seis cepas de estafilococos cuyos fagotitos son conocidos para realizar diversos controles. Estas cepas son: W57, 1030, 42C, 2009, 8719 y 18042.

3.6.2 DETERMINACIÓN DEL RTD

Antes de realizar la propagación de un fago, hay que determinar su RTD (“routine test dilution”) titulándolo sobre su cepa propagadora. Para ello, se inunda una placa de agar común 1.1 con un cultivo de caldo de la cepa propagadora, retirando el exceso de líquido con una pipeta Pasteur. A continuación se colocan sobre la superficie de la placa de agar, ya inoculada y seca, gotas de diluciones crecientes del fago que queremos titular, desde 10^{-1} hasta 10^{-7} . Tras incubar durante 18 horas a 30°C se observa la presencia de placas de lisis, considerando como RTD la máxima dilución que produce lisis confluyente.

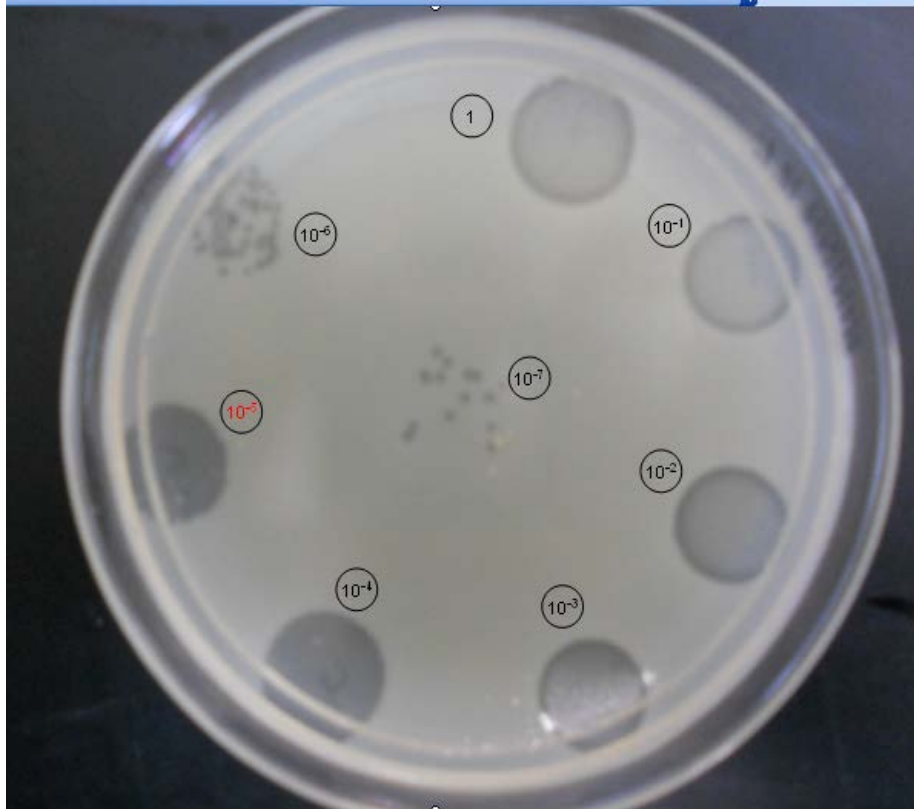


Figura 17. Determinación del RTD. En este caso el RTD resultó ser la dilución 1×10^{-5}

3.6.3 PROPAGACIÓN EN MEDIO SÓLIDO

Se realizó por el método de agar semisólido descrito por *Swastrom y col. (1951)*. Se calentó el tubo de agar semisólido distribuido en 6 ml para fundirlo, dejándolo enfriar a 45°C. Se añadió entonces:

- 0.6 ml de un cultivo en caldo común de la cepa propagadora crecido a 37°C durante 4 horas en agitación
- 0.6 ml de fago diluido a su RTD
- 0.25 ml de cloruro cálcico al 1%

Sobre una placa de agar común 1.1 de 15 cm de diámetro, se añadió el agar semisólido que contenía la mezcla de fago y de la cepa propagadora en proporciones equilibradas, para que se produjera una lisis semiconfluyente. Se incubó durante 18 horas a 30°C. Después se recogió el contenido crecido en la sobre placa, donde debe encontrarse el fago, añadiendo 15 ml de caldo común y ayudándonos de una pipeta Pasteur doblada en ángulo recto que utilizamos a modo de rastrillo. La suspensión recogida, se centrifugó a 5000 r.p.m una hora y el sobrenadante fue recogido y filtrado mediante unas membranas de 0.22 μm .

Por último, se realiza una nueva titulación sobre la cepa propagadora y se desecharon aquellos fagos cuyo título no era elevado. Se conservaron a 4°C hasta su uso. También fueron guardados a -70°C y liofilizados.

3.6.4 ESPECTRO LÍTICO

Cada fago propagado fue enfrentado a 20 cepas patrón para comprobar su espectro lítico. Así se consigue detectar cualquier modificación que haya podido tener lugar durante la propagación.

El espectro lítico se determinó según la descripción de *Blair et al. (1961)*. Cada fago se tituló sobre las siguientes cepas del juego: 29, 52, 52A/79, 80, 2009, 3A, 3C, 71, 8719, 42C, 42E, 47, 53, 54, 75 y 77, y se comparaban los títulos obtenidos sobre ellas con el título obtenido sobre la cepa propagadora. Se evaluaron estos títulos en una escala de 1 a 5, en la que el número 5 se adjudicaba a aquellas cepas en las que el título obtenido era igual al de la cepa propagadora, el 4 a las cepas que presentaban un título 10^{-1} o 10^{-2} menor, el 3 a títulos de 10^{-3} o 10^{-4} menor y así sucesivamente.

Los valores del espectro lítico de cada fago fueron comparados con los ya conocidos (Tabla 13) y se desecharon aquellos cuyo espectro no coincidía.

Una vez obtenido el concentrado del fago en las condiciones mencionadas se conservaba a 4°C. A partir de ellos se prepararon las diluciones del RTD y 100 x RTD para hacer la fagotipia y se repusieron periódicamente en previsión de una posible pérdida de título en el futuro.

CEPAS	FAGOS																							
	29	52	52A	79	80	3A	3C	55	71	6	42E	47	53	54	75	77	83A	84	85	81	94	95	96	
29	5	0	0	0	0	0
52	0	5	4	0	4	0
52A/79	.	3	5	5	3	0	.	3	.	.	.	2	2
80	0	1	1	0	5	2	5	.	2	0	0
2009	3	5	2	.	0	.	.	.	1	2
3A	1	1	1	1	1	5	4	4	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	2	2
71	1	5	5	5	1	.	1	1	0
8719	5	0
42C	2	0	0	0	0	3	4	0/2	4	.	3	2	3	3	2	0	.	0	0	3	3	.	0	
42E	0	0	0	0	0	5	.	3	2	.	.	3	.	3	3	.	2	2	
47	3	3	3	3	3	2	.	5	5	3	5	5	0	5	5	0	2	3	2	
53	0	.	0	5	4	5	5	0	5	5	1	.	.	0	
54	1	.	.	2	.	2	2	.	.	.	3	5	5	5	5	5	1	5	5	3	3	.	0	
75	.	.	.	2	1	.	2	.	.	.	1	0	4	0	5	5	0	5	5	.	.	.	0	
77	2	2	4	0	.	5	0/2	4	5	0	

Tabla 13. Espectro lítico de los fagos del juego internacional (0 = reacción de inhibición; 0-2 = reacciones variables, pueden aparecer como inhibición o como verdadera reacción lítica; = sin efecto lítico)

3.6.5 FAGOTIPAJE

3.6.5.1 REALIZACIÓN

En primera instancia, el fagotipaje es realizado al 100 X RTD. Para esto, cada aislado se inoculó en un tubo de caldo común a partir de un cultivo puro y se incubó a 37°C durante 4 horas en agitación. Una vez crecidos los cultivos líquidos, se sembraron por inundación en placas de agar común 1,1 secadas previamente a 37°C durante al menos 2 horas. Se retiró el exceso de líquido con una pipeta Pasteur y se dejaron secar las placas, destapadas y boca arriba, entre 15 y 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación en cada placa se aplicó una gota de 25 µl de cada uno de los fagos (dilución 100 X RTD) con la distribución que muestra la Fig. 18. Cuando las gotas estuvieron secas, se taparon las placas, se incubaron a 37°C durante 18 horas y se procedió a su lectura.

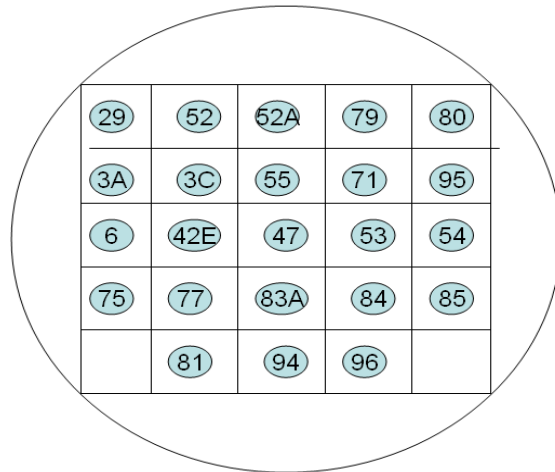


Figura 18. Disposición de fagos en placa para fagotipaje

3.6.5.2 Lectura de resultados

Se realizó según el siguiente criterio:

- Cl: lisis confluyente
- ++: más de 50 placas de lisis
- +: de 20 a 50 placas de lisis
- +/-: menos de 20 placas de lisis

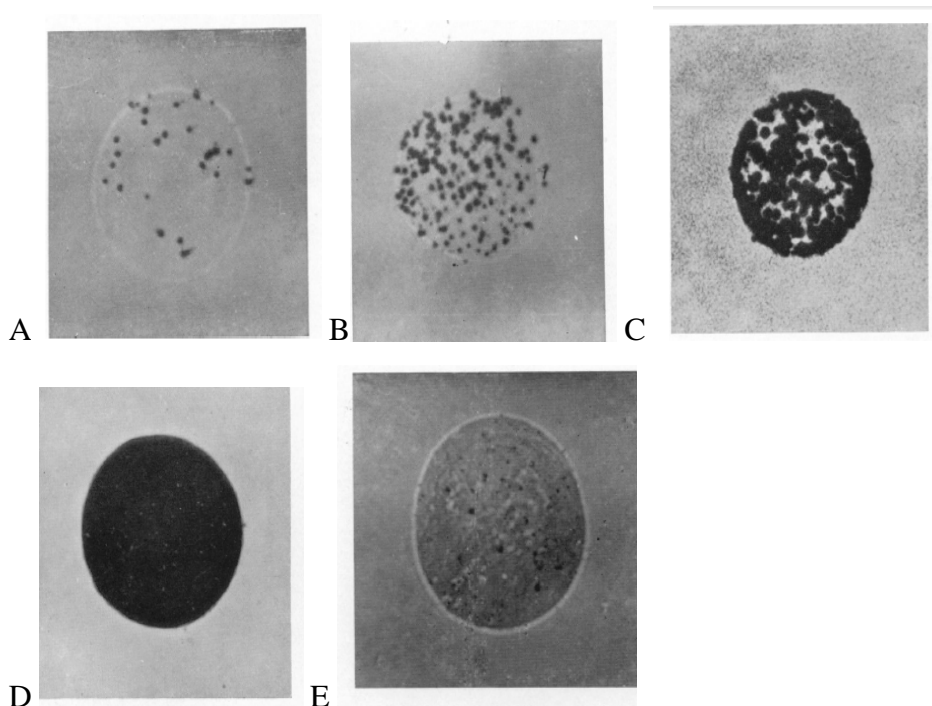


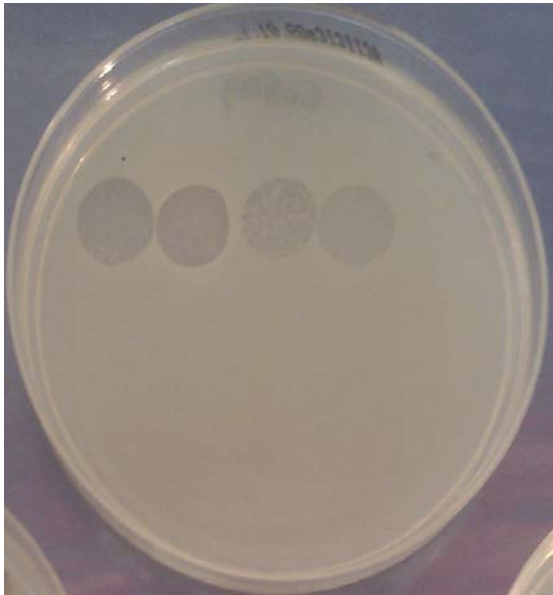
Figura 19. Lectura de resultados en fagotipia: +- (A), + (B), ++ (C), Cl (D), crecimiento secundario en el área de la lisis confluyente, con la consiguiente placa secundaria (E) (*Williams et al., 1952*).

3.6.5.3 INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Siguiendo las directrices mostradas en la Tabla 12, a cada aislado se le asignó un fagotipo, del I al V, en función del perfil de fagos que le hayan provocado placas de lisis (cada uno de estos recibe el nombre de “fagotipo”). Quedarán como “No tipables” aquellos en los que no se obtenga lisis con ningún fago. Los aislados que muestren lisis con los fagos 95 u 81, no se asignan a ningún fagotipo, quedan simplemente como fagotipos de ese número. Aquellos que muestren simultáneamente perfiles compatibles con los fagotipos I y III, se interpretan como “Fagotipo Mixto”, y aquellos que presenten un perfil de fagotipos del grupo III, además del 81, se clasifican como “III/81”.

Como describieron *Williams y col. (1952)*, se pueden encontrar pequeñas diferencias en el fagotipo de cultivos individuales derivados de la misma cepa. Estos autores sugirieron la aplicación de la “norma de las dos diferencias”, según la cual, cuando dos cultivos presentan dos o más diferencias significativas, la posibilidad de que tengan un origen común es menor del 5%. Así pues, la fagotipia, igual que otros métodos de tipificación, reconocerá aislados diferentes, pero, en el caso de ofrecer patrones iguales, indicará una probable (aunque no segura) identidad.

A



B

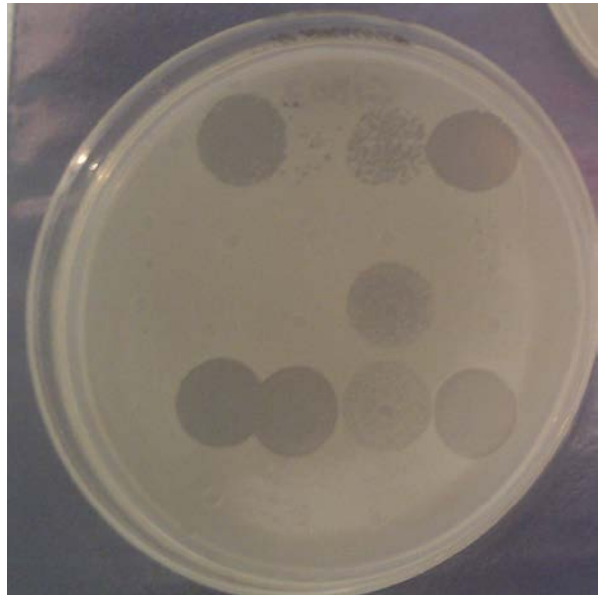


Figura 20. Ejemplos de fagotipaje: A) aislado fagotipo I; B) aislado fagotipo MIXTO (I y III)

3.6.5.4 CONTROLES

Para garantizar la reproductibilidad de la técnica de fagotipia, es necesario realizar controles de forma continuada. Así, en la rutina de la fagotipia se incluían siempre dos cepas patrón polivalentes (1030 y W57), cuyo fagotipo es conocido, corrigiendo aquellas diluciones cuyo efecto no era el esperado. Estas dos cepas se incluían tanto si la técnica se realizaba al RTD como al 100 X RTD.

3.7 TIPIFICACIÓN MOLECULAR.

La caracterización molecular de la muestra de 100 aislados de SARM se realizó mediante las siguientes técnicas: rep-PCR /DiversiLab, Electroforesis en Campo Pulsado (PFGE) y Secuenciación del gen de la proteína A (*Spa Typing*) y Componente Clonal BURP (CCBURP). A partir de los resultados reportados por este último método, el software informático *Ridom StaphType* nos da el tipo más probable de MLST asociado a cada tipo de CCBURP, denominado eBURST Presuntivo. Aún así se realiza el análisis por *Multilocus Sequence Typing (MLST)* de un representante de cada tipo de CCBURP obtenido (excepto de los Singletons), y obtener así el *Sequence Type (ST-)* al que corresponde.

Además se lleva a cabo la tipificación molecular por caracterización del

Cassette Cromosómico SCC_{mec} de un representante de cada pulsotipo.

3.7.1 SISTEMA REP-PCR/DIVERSILAB

3.7.1.1 EXTRACCIÓN DE ADN BACTERIANO

De una placa de cultivo puro de *Staphylococcus aureus* recogemos todas las colonias posibles que rellenen un asa de siembra calibrada de 10 µl. El ADN de esta muestra es extraído usando un método de purificación a través de columna denominado *Ultra Clean Microbiol DNA Isolation Kit*® (*Mo Bio Laboratories*), siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante. La presencia y concentración del ADN en el producto de extracción es estimada con el espectrofotómetro *Nanodrop*® *ND-1000* (*Thermo Scientific*), considerando una extracción satisfactoria la obtención de entre 100-300 ng/µl de ADN, con un ratio de absorbancia 260nm/280nm alrededor de 1.9, lo que refleja una contaminación por proteínas prácticamente nula. El DNA de cada una de las cepas se guarda y almacena congelado a -80°C.

3.7.1.2 REACCIÓN DE AMPLIFICACIÓN

La amplificación se realiza usando el *Staphylococcus DNA fingerprinting kit* ® (*Spectral Genomics*) el cual incluye: un tampón denominado *rep-PCR MMI*, los cebadores específicos para *Staphylococcus aureus* (*Primer Mix*), y un conjunto de controles positivos y negativos para verificar el correcto desarrollo de la reacción de amplificación. La polimerasa utilizada es *Ampli Taq DNA Polymerase*® (*Applied Biosystems*), suministrada por el fabricante junto al tampón *10X PCR buffer*. La reacción necesita como sustrato entre 50-100 ng de ADN, por lo que en primer lugar debemos preparar las diluciones pertinentes a partir de la solución madre obtenida del proceso de extracción. Nosotros concretamente preparamos una dilución que se ajusta a una concentración de 35 ng/µl de ADN. La Master Mix de la PCR se prepara con los siguientes volúmenes por muestra: 18 µl de *repPCR MMI*, 2.5 µl de *10X PCR buffer*, 2 µl de *Primer Mix* y 0.5 µl de *Ampli Taq Polymerase*. Añadimos 23 µl de Master Mix a cada tubo de reacción. Por últimos añadimos 2 µl de la dilución de DNA, alcanzando un volumen final de 25 µl en el tubo de reacción.

Las etapas y los tiempos para el termociclador *2720 Thermal Cycler* (*Applied Biosystems*) son los siguientes: una desnaturalización inicial a 94°C durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, anillamiento a

45°C durante 30 segundos, y extensión a 70°C durante 90 segundos, y una extensión final a 70°C durante 3 minutos.

3.7.1.3 ELECTROFORESIS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

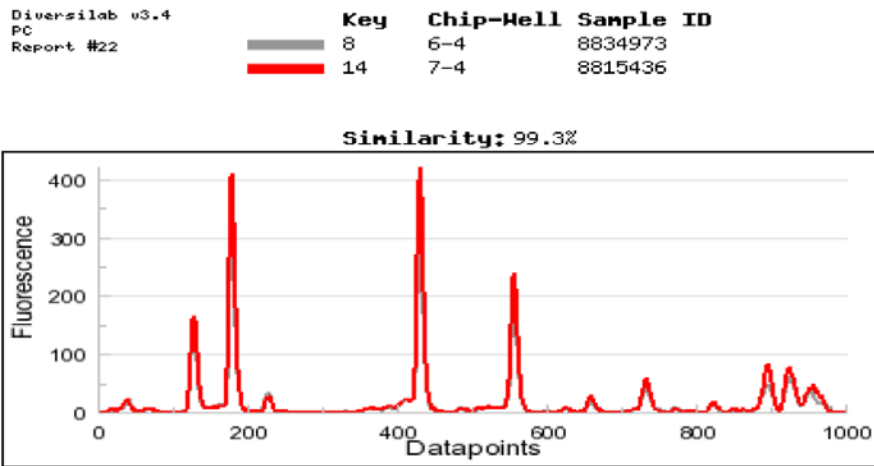
El análisis de los productos de la rep-PCR es realizado usando el *Bioanalizador B2100 (Agilent Technologies)*, en el cual los fragmentos amplificados, de tamaños y cantidades variables, son separados y detectados después de una electroforesis capilar en el Labchip.

La fase sólida que transcurre a través del chip es confeccionada a partir de los reactivos *DNA Gel Matriz (gel)* y *DNA Dye Concentrate (colorante)* del kit comercial *DNA Reagents & Supplies* de la Plataforma Diversilab. Estos reactivos deben mezclarse en proporción 1:20 colorante / gel antes de usar, y cargar en el Labchip junto con los productos de rep-PCR según indicaciones del fabricante.

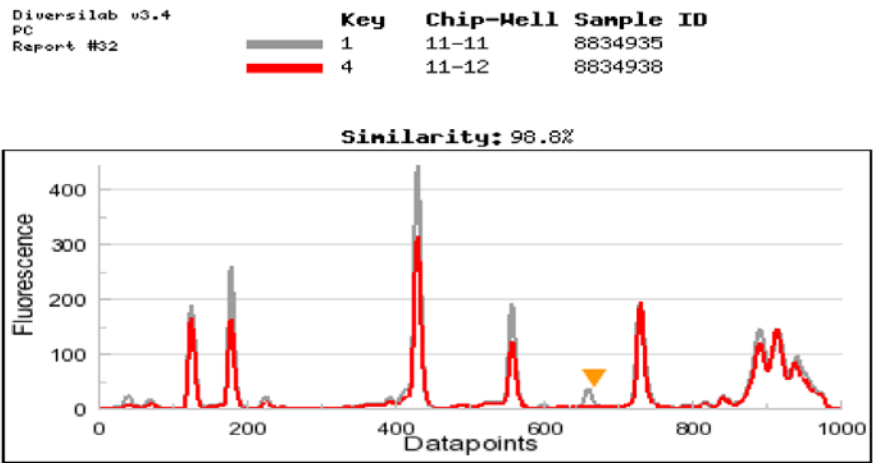
En un chip se pueden cargar los productos de rep-PCR de hasta 12 muestras o cepas diferentes, reservando el último pocillo para el marcador de peso molecular. El volumen de carga de producto rep-PCR es únicamente de 1 µl.

La comparación de resultados y los porcentajes de similitud entre cepas es calculado por el software *DiversiLab version 3.4*, quién determina las distancias matrices en función del coeficiente de correlación de Pearson y utiliza medias aritméticas no ponderadas para muestras apareadas (*UPGMA*) para la creación de los dendogramas. Los informes son automáticamente generados e incluyen dendograma, electroferogramas, imágenes virtuales de geles y gráficos de dispersión. El programa informático permite añadir en cada informe hasta cuatro variables diferentes de información demográfica para cada cepa.

A



B



C

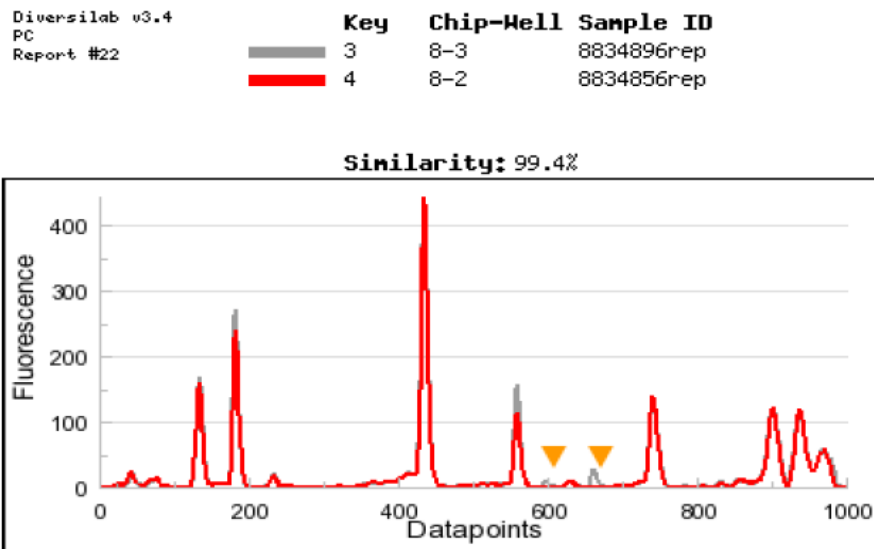


Figura 21. Perfiles indistinguibles de cepas correspondientes al mismo patrón (A). Perfiles con solo una diferencia de cepas correspondientes al mismo grupo (B). Perfiles con dos diferencias de cepas sin relación genotípica (C)

Los aislados son clasificados, según su grado de relación como “indistinguibles”, “similares” o “diferentes”, siguiendo los criterios recomendados por el fabricante. Así sólo consideramos que pueden ser “similares” o “indistinguibles”, aquellos que presenten índices de similaridad superiores al 95%. Una vez se cumpla dicha condición, pasamos a comparar los perfiles de los electroferogramas, de manera que perfiles completamente exactos con ningún pico diferente (ejemplo: Fig. 21A), incluyendo no diferencia en la intensidad (con excepción de que en conjunto, entre los dos perfiles se observe una diferencia de intensidad proporcional en todos sus picos), son considerados “indistinguibles”. Las cepas indistinguibles se clasifican dentro de un mismo clon o “Patrón” (P). Si encontramos diferencia en un único pico (ejemplo: Fig. 21B), son considerados “similares” y se clasificarían dentro de un mismo “Grupo” (G). Si se encuentran ≥ 2 picos diferentes (ejemplo: Fig. 21C), se clasificarían como “diferentes”, sin posibilidad de agrupación alguna.

3.7.2 ELECTROFORESIS EN CAMPO PULSADO (ECP)

3.7.2.1 PREPARACIÓN DE LOS BLOQUES DE AGAROSA

A partir de un cultivo puro de cada cepa, se toma medio asa de siembra calibrada de 10 μ l, y se resuspende en un tubo Eppendorf con 1 ml de buffer SE (10 mM Tris HCl, 10 mM EDTA, 10 mM EGTA, 1 M ClNa, pH 7.5). A esta suspensión la denominamos “Suspensión n° 1”. Con el objeto de que las suspensiones de todas las cepas contengan la misma concentración celular, se transfieren 0.4 ml de cada Suspensión n° 1 a un tubo *Greiner* que contiene 4.6 ml de buffer SE (Suspensión n° 2). Se mide la absorbancia a 420 nm de cada Suspensión n° 2 en un espectrofotómetro *Spectronic 20 (Bausch & Lomb)*. Con ayuda de la Tabla 14 (obtenida tras la curva de calibrado), determinamos el volumen a tomar de: a) suspensión bacteriana (Suspensión n° 1) y b) buffer SE; para un volumen global final de 0.5 ml. Esto constituye la Suspensión n° 3 que contiene 10^9 ufc/ml.

Los tubos *Eppendorf* con la Suspensión n° 3 se introducen en un baño termostaticado a 56°C entre 5-10 minutos, con el fin de atemperarlos. Después se transfiere 0.5 ml de *Agarosa CMBA (Biorad)* al 1 % en buffer SE (previamente fundida también en el baño a 56°C) a cada *Eppendorf* y mezclamos varias veces por inversión, hasta corroborar la completa homogeneización de la solución, a la que damos el nombre de “Suspensión n° 4”. De ésta se toman 0.5 ml para rellenar 3 moldes para

PFGE (*Biorad*) por muestra. Los moldes se dejan en nevera a 4°C durante 10 minutos para su completa homogeinización.

DO (420nm)	ufc/ml x 10 ⁹	ul de suspensión bacteriana	ul buffer SE pH 7.5
0,275	1,25	400	100
0,3	1,25	400	100
0,325	1,5	335	165
0,35	1,5	335	165
0,375	1,75	285	215
0,4	1,75	285	215
0,425	2	250	250
0,45	2	250	250
0,475	2,25	220	280
0,5	2,25	220	280
0,525	2,25	220	280
0,55	2,5	200	300
0,575	2,5	200	300
0,6	2,75	180	320
0,625	2,75	180	320
0,65	3	165	335
0,675	3	165	335
0,7	3,25	155	345
0,725	3,25	155	345
0,75	3,5	145	355
0,775	3,5	145	355
0,8	3,5	145	355
0,825	3,75	135	365
0,85	3,75	135	365
0,875	4	125	375
0,9	4	125	375
0,925	4,25	120	380
0,95	4,25	120	380
0,975	4,5	110	390
1	4,5	110	390
1,25	5	100	400

Tabla 14. Tabla de calibrado para preparar una solución bacteriana de 10⁹ ufc/ml

En tantos tubos *Bijoux* como muestras tenemos, añadimos 1 ml de Solución de Lisis Bacteriana, cuya composición por cepa es:

- 1 ml Buffer de Pre-lisis (6 mM Tris ClH, 100 mM EDTA, 1 M ClNa, 0.5% Brij 59, 0.2 % Deoxicolato sódico, 0.5 % Lauril Sarcosil, pH 7.5)
- 1.5 µl de Lisostafina (*Ambicin*) 20 U/µl
- 500 µg de Liozima 44700 U/mg de proteína (*Sigma*)

Con ayuda de un asa se liberan los 3 moldes por muestra en cada tubo *Bijoux* con 1 ml de Solución de Lisis Bacteriana (asegurándonos que quedan bien cubiertos) y se mantienen a 37°C durante una noche. Al día siguiente eliminamos la Solución de Lisis con una pipeta Pasteur y reemplazamos con 1 ml de Solución de Proteolisis, cuya composición por cepa es:

- 1 ml de Buffer de Lisis (0.25 mM EDTA, 20 mM EGTA, 1 % Lauril Sarcosil, pH 9.5)
- 1.5 µl de Proteinasa K 50 mg/ml (*Roche*)

Los tubos *Bijoux* se incuban en baño a 56°C con la Solución de Proteolisis durante una noche. Al día siguiente se elimina dicha solución lavando al menos cuatro veces con buffer TE (10 mM Tris-HCl, 0.1 M EDTA, pH 7.5) dejando como mínimo entre cada lavado 30 minutos a 4°C. Una vez lavados, estos bloques se conservaron a 4°C hasta su utilización, durante un periodo máximo de 6 meses, cambiando el buffer TE una vez al mes.

3.7.2.2 ESTABILIZACIÓN Y DIGESTIÓN DE LOS BLOQUES

Comenzamos la digestión extrayendo un bloque por cada muestra, que es cortado aproximadamente a la mitad, y ésta la incorporamos a un *Eppendorf* con 100 µl de Solución de Estabilización, constituida por: 10 % Buffer Y Tango 10X con BSA (*Fermentas*) en H₂O libre de nucleasas. Se dejó incubando 30 minutos a 4°C. Posteriormente eliminamos esta solución, para reemplazarla por 100 µl de Solución de Digestión, constituida por: 10% Buffer Y Tango 10X, 4% de Sma I 10 U/µl (*Fermentas*), en H₂O libre de nucleasas. Mantenemos al menos 3 horas en un termobloque a 30°C. A cabo de este tiempo, añadimos 100 µl de buffer TE en cada *Eppendorf* para detener la actividad enzimática.

3.7.2.3 ELECTROFORESIS

Para la electroforesis de los fragmentos de DNA utilizamos un gel de 150 ml de agarosa CMBA al 1% en buffer TBE 0.5X (45 mM Tris, 45 mM Ácido Bórico, 1 mM EDTA; pH 8.4). En su solidificación se utiliza un peine de 30 pocillos, que suponiendo la utilización del marcador de peso molecular *100 bp DNA ladder (Biolabs)* en los extremos, nos permite correr simultáneamente hasta 28 cepas diferentes.

Cada bloque digerido es introducido en cada pocillo procurando situarlo en la parte inferior y perfectamente adherido al gel (evitamos que queden burbujas de aire). Posteriormente sellamos los pocillos con la agarosa CMBA al 1% en buffer TBE 0.5X.

El gel fue sumergido en el tanque del aparato CHEF-DRIII (*BioRad*), al que previamente se añadieron 2 litros de tampón TBE 0.5X que se mantendrán circulando entre 80 y 90 r.p.m. y a una temperatura de 12°C. Las condiciones de electroforesis fueron optimizadas para obtener el resultado más óptimo, llevándose a cabo finalmente en las siguientes condiciones: temperatura de electroforesis de 12°C, gradiente de voltaje de 6 V/cm, y dos bloques de pulsos. El primer bloque durante 10 horas con pulso de 5 a 15 segundos; el segundo bloque durante 13 horas con pulsos de 15 a 60 segundos.

3.7.2.4 TINCIÓN DEL GEL Y ANÁLISIS DE PERFILES

Una vez terminada la electroforesis, el gel se tiñó con bromuro de etidio (5 mg/ml) durante 15 minutos a temperatura ambiente, y se reveló una con luz ultravioleta en el transiluminador. Los patrones de banda se analizaron visualmente, tomando como referencia los publicados en la Fig. 22.

Una vez asignado el pulsotipo a cada uno de los perfiles, seleccionamos un representante de cada pulsotipo, y utilizamos la herramienta informática InfoQuestTM Bioinformatics Software (*Biorad*), quien usando el *Coeficiente de Dice*, construye un dendograma que permite apreciar claramente las relaciones de agrupación entre los diferentes pulsotipos.

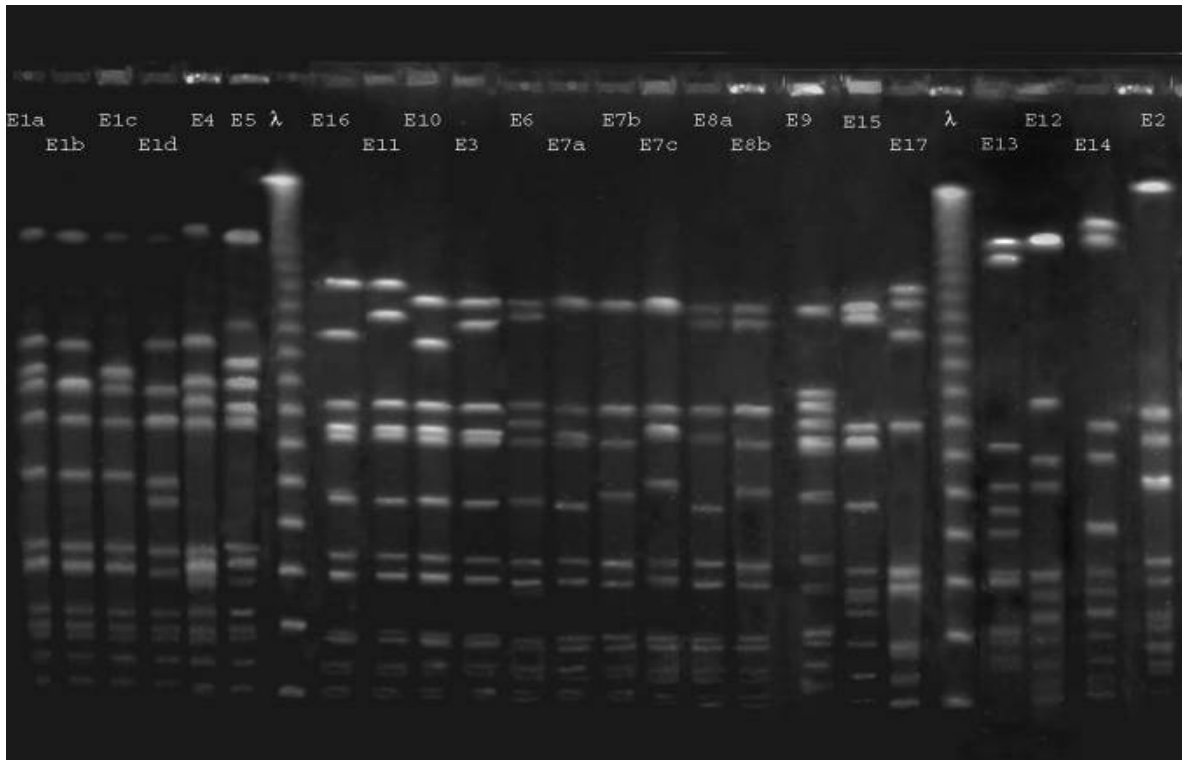


Figura 22. Perfiles de los distintos pulsotipos de SARM obtenidos en un estudio multicéntrico en hospitales españoles entre 1996 y 2002 (*Vindel et al., 2006*).

3.7.3 TIPIFICACIÓN MEDIANTE SECUENCIACIÓN DEL GEN DE LA PROTEÍNA A (*Spa typing*)

3.7.3.1 PREPARACIÓN DE EXTRACTOS

Para cada aislado de SARM y a partir de un cultivo puro, resuspendemos un asa de siembra de 10 µl en un Eppendorf de 1.5 ml con 100 µl de Solución de Extracción (10% EGTA 0.1 M; 1% Tris HCl 1 M pH 7.5; 88,6% de H₂O libre de nucleasas; 0.4% de Lisostafina 2000 U/ml). Estos tubos fueron introducidos en un termobloque e incubados primeramente 30 minutos a 37°C, y a continuación 10 minutos a 95°C. Se dejaron enfriar y se les añadió 900 µl de H₂O libre de nucleasas. Se mezcló en el vortex y se centrifugaron a 13.000 r.p.m durante 10 minutos. Después, de cada tubo, separamos la fase del sobrenadante donde se encuentran el ADN bacteriano. Es lo que denominamos “Extracto”. Estos se mantuvieron guardados a -20°C mientras no fueran utilizados.

3.7.3.2 PREPARACIÓN DE PRIMERS

Los primers fueron suministrados liofilizados, con una masa y un peso molecular (PM) determinado. Se añadió a cada liofilizado el mismo volumen de agua

que la masa indicada, de manera que el primer quedó reconstituido a una concentración de 1 µg/µl. Esta dilución se dejó en el propio vial de envase y se deja guardada a -20°C hasta su uso. De ella se prepara la dilución de uso con una concentración de 100 µM.

3.7.3.3 REACCIÓN DE AMPLIFICACIÓN

Para la amplificación por PCR de la región X del gen de la proteína A estafilocócica, se utiliza por cada aislado un tubo *Pure Taq Ready To Go*® (*GE Healthcare Life Science*) (contiene un liofilizado con las concentraciones óptimas de dNTPs, Cl₂Mg y polimerasa, adecuadas para la reacción de amplificación) y los primers: *Forward* (5_-AGACGATCCTTCGGTGAGC-3_) y *Reverse* (5_-GCTTTTGCAATGTCATTTACTG-3_) (*Harmsen et al., 2003*). Para la Master Mix se utiliza por muestra: 1 µl de Primer Forward, 1 µl de Primer Reverse y 18 µl de H₂O libre de nucleasas. Por cada aislado se utiliza un *Pure Taq Ready To Go*® en el que se añade 20 µl de Master Mix y 5 µl del Extracto de ADN correspondiente. Los cebadores quedan a una concentración final de 4 pmol/µl.

Los tubos son introducidos en el Termociclador *2720 Thermal Cycler* (*Applied Biosystems*) bajo las condiciones del siguiente programa: 5 minutos a 94°C; 35 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 60°C, y 1 minuto y medio a 72°C; y por último una fase final de extensión de 10 minutos a 72°C.

3.7.3.4 PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR

Se añaden a un *Eppendorf* de 0,2 ml, 5 µl de este producto de PCR y 2 µl de *ExoSAP-IT*® (*GE Healthcare Life Science*). Los tubos son introducidos nuevamente en el termociclador y se mantienen, un primer periodo de 15 minutos a 37°C, y uno segundo de 15 minutos a 80°C.

3.7.3.5 SECUENCIACIÓN

La secuenciación del producto amplificado y por tanto de la región X de cada muestra, se llevó a cabo mediante un sistema basado en el método de Sanger y usando el *The BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*® (*Applied Biosystems*), mezcla de reactivos que proporciona los componentes necesarios para la reacción de secuenciación. El usuario solo debe añadir el ADN molde y los cebadores específicos que hibriden con los extremos y de manera bidireccional con el fragmento que se desea secuenciar. Así, preparamos dos mezclas, una denominada Master Mix Forward y otra

Master Mix Reverse, en que que añadimos por cada muestra: 0.5 µl de *Ready Reaction Mix*, 1.5 µl de *BigDye Terminator v1.1/3.1 Sequencing Buffer (5X)*, 1 µl de Primer *Forward / Reverse* (según corresponda) y 5 µl de H₂O libre de nucleasas. Por cada muestra se rotulan dos *Eppendorf* de 0.2 ml especiales para secuenciación, en el que se añaden a cada uno: 8 µl de Master Mix (*Forward* o *Reverse* según corresponda) y 2 µl de producto amplificado. Para la reacción de secuencia, los tubos se introducen en el Termociclador *2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems)* y son sometidos a 25 ciclos de 10 minutos a 96°C, seguidos de 4 minutos y medio a 60°C (previo a los 25 ciclos hay una fase inicial de desnaturalización de 3 minutos a 94°C). Los productos de la reacción de secuenciación fueron pasados a través de una columna de Sephadex G-50 para retirar los dideoxiNTPs fluorescentes terminadores de cadena no incorporados. Las secuencias de ADN fueron obtenidas con el Secuenciador *3130 Genetic Analyser® (Applied Biosystems)*.

3.7.3.6 ASIGNACIÓN DE SPA-TIPOS

Las secuencias de ADN son analizadas con el *StaphType software® (Ridom)*. Este software construye una secuencia consenso, automáticamente detecta las repeticiones “spa”, les asigna su código alfa-numérico, y en función del perfil de repeticiones le asigna a cada muestra uno u otro spa-tipo (Fig. 23).

3.7.3.7 ANÁLISIS BURP Y ASIGNACIÓN DE eBURST

Aquellos aislados con el mismo spa-tipo fueron considerados indistinguibles, pero utilizamos el algoritmo BURP del *StaphType software* para clasificar dentro de un mismo grupo o “cluster” aquellos spa-tipos con perfiles similares. Distintos spa-tipos son agrupados en el mismo cluster cuando al aplicar el algoritmo se obtienen diferencias entre ellos menores o igual a 6. Los cluster se nombran con las siglas CC (de componente clonal) seguido de un número que corresponde al del spa-tipo representado con el mayor número de aislados (Fig. 24).

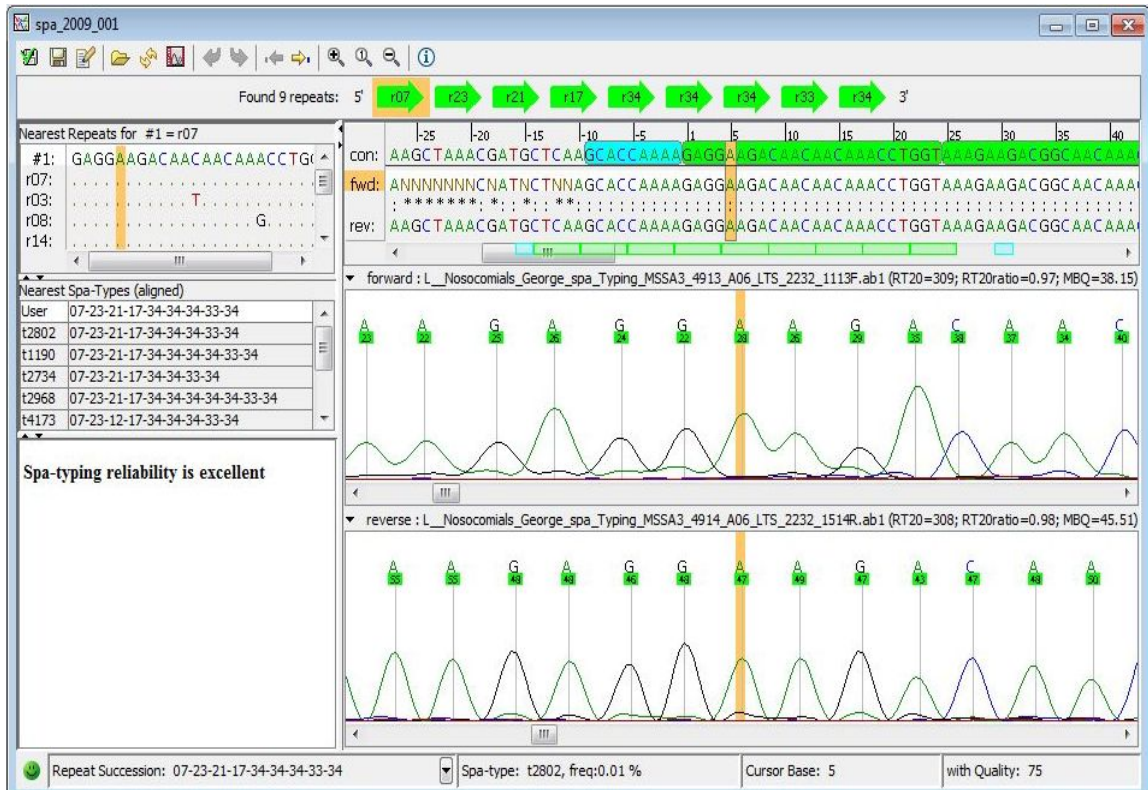


Figura 23. Captura de pantalla del software StaphType. A) Visor que muestra las secuencias obtenidas a partir de los cebadores F y R, y la secuencia consenso. Puedes ir avanzando en la secuencia verificando la conformidad en la secuenciación con los picos correspondientes a cada fluorocromo. B) Tipos de repeticiones (*r*) encontradas automáticamente en la secuencia consenso. C) Se indican los nucleótidos en los que existe discrepancia entre la secuencia consenso y la secuencia del tipo de repetición encontrada. D) Diagrama que muestra la comparación entre el perfil de repeticiones de nuestra secuencia consenso (*user*) y los perfiles de repeticiones más similares de diferentes spa-tipos ya registrados. A medida que bajemos con el cursor, disminuye la similitud.

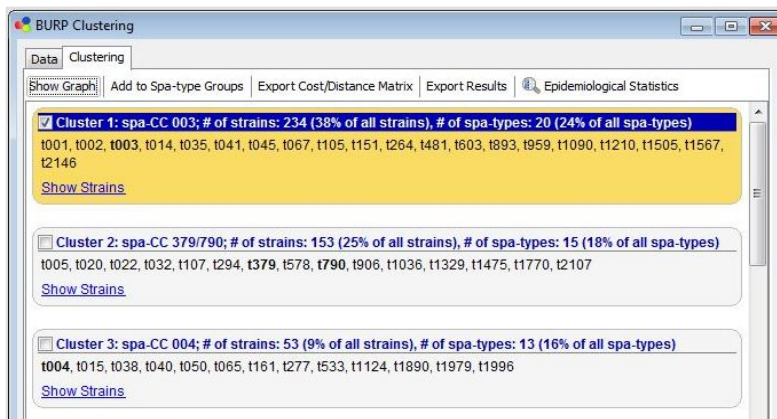


Figura 24. Captura de pantalla del software StaphType. Ejemplo de un resultado de análisis BURP. Los spa-tipos similares entre ellos son agrupados en *Clusters*. El spa tipo representado con el mayor número de aislados dentro de un Cluster, y por tanto el que le da nombre, se muestra en negrita.

Los spa-tipos con una longitud inferior a cinco repeticiones fueron excluidos del análisis BURP, por lo que no se incorporan a cluster alguno. Quedan definidos como “Excluded”. Aquellos spa-tipos, que no se encuentran en el presente estudio representados por un número suficiente de cepas, son denominados “no founder”. Aquellos spa-tipos que no presentan suficiente similitud con ningún otro spa-tipo descrito hasta la fecha, quedan como “singletons”.

El *StaphType software* nos permite además realizar automáticamente la asignación eBURST para cada spa-tipo, dándonos idea del origen filogenético de estos. Así los spa-tipo serán agrupados en nuevos clusters, también referidos como CC (de componente clonal) seguido de un número.

StaphType software dispone de una base de datos muy útil en la que puedes observar que tipos de ST (por MLST) se corresponden estadísticamente con un determinado spa-tipo, con qué otras denominaciones se les hace referencia en la literatura (entre ellas los CC de eBURST), en qué porcentaje se encuentra representado un determinado spa-tipo a nivel mundial según los registros de SARM hechos hasta la fecha, o las zonas geográficas de origen de cada spa-tipo (Fig. 25 y Fig. 26).

The screenshot shows the 'Ridom SpaServer - SpaTypes' interface. It includes a search bar, a 'Download spa-types (CSV)' link, and a table with the following data:

Spa-type	Repeat succession	MLST	Comment
r001	26-30-17-34-17-20-17-12-17-16	ST-5, ST-222, ST-228	CC5, Southern German MRSA (prototype & subclone), Rhine Hesse MRSA (subclone), EMRSA-3, New York clone
r002	26-23-17-34-17-20-17-12-17-16	ST-5, ST-231	CC5, Rhine Hesse MRSA (prototype), EMRSA-3, New York clone, Japan clone, Pediatric, USA100 ORSA II, USA800 ORSA IV, ST 5 ORSA I
r003	26-17-20-17-12-17-17-16	ST-5, ST-225	CC5, Rhine Hesse MRSA (subclone), EMRSA-3, New York clone
r004	09-02-16-13-13-17-34-16-34	ST-45	CC45, Berlin MRSA (prototype), USA600 ORSA II, USA600 ORSA IV
r005	26-23-13-23-31-05-17-25-17-25-16-28	ST-22, ST-23, ST-60	
r006	26-23-13-23-31-05-17-17-25-16-28	ST-134	
r007	15-12-16-16-16-16-02-25-17		
r008	11-19-12-21-17-34-24-34-22-25	ST-8, ST-247, ST-250, ST-254	CC8, Northern German MRSA (subclone), USA300 ORSA IV (cMRSA in the US), Archaic/Iberian, ST250 ORSA I
r009	11-12-21-17-34-24-34-22-24-34-22-33-25	ST-254	CC8, Hannover MRSA, EMRSA-10
r010	26-17-34-17-20-17-12-17-16	ST-5	
r011	08-16-02-25-34-24-25		
r012	15-12-16-02-16-02-25-17-24-24	ST-30	
r013	26-30-17-34-17-20-17-12-17		
r014	26-17-20-17-12-17-17-16		
r015	08-16-02-16-34-13-17-34-16-34	ST-45	
r016	26-23-13-23-31-05-17-25-16-16-28		

Figura 25. Captura de *StaphType software*. Base de datos que relaciona el spa-tipo con los STs más probables, además de indicar el posible CC de eBURST y otras denominaciones en la literatura científica.

Ridom Spa Server SpaServer.ridom.de

Overview

- Home
- Background
- Policy
- Submit

Database

- Frequencies**
- Spa-types
- Repeats
- MLST Mapping

Contact

- Imprint
- Contact us

Ridom SpaServer - Frequencies

Relative global frequencies of spa-type occurrences:

Spa-type	Frequency	Countries of origin	MLST	Comment
t003	10.90 %	Austria, Belgium, Canada, Croatia, Czech Republic, Denmark, France, Germany, Greece, Netherlands, Norway, Poland, Spain, Sweden, Switzerland, United Arab Emirates, United Kingdom, United States	ST-5, ST-225	CC5, Rhine Hesse MRSA (subclone), EMRSA-3, New York clone
t032	10.34 %	Austria, Belgium, Canada, Czech Republic, Denmark, France, Germany, Hungary, Iceland, Israel, Italy, Lebanon, Malaysia, Netherlands, New Zealand, Norway, Sana Klinikum Lichtenberg, South Africa, Spain, Sweden, Switzerland, United Arab Emirates, United Kingdom, United States	ST-22	Barim MRSA (prototype & subclone), EMRSA-15, prototype of ST-22, CC22
t002	6.18 %	Afghanistan, Islamic State of, Argentina, Austria, Belgium, Canada, Chile, China, Croatia, Cyprus, Czech Republic, Denmark, Estonia, Finland, France, Gabon, Germany, Hungary, Iceland, Israel, Italy, Japan, Jordan, Lebanon, Martinique, Netherlands, New Zealand, Norway, Poland, Romania, South Africa, Spain, Sweden, Switzerland, Taiwan, United Arab Emirates, United Kingdom, United States	ST-5, ST-231	CC5, Rhine Hesse MRSA (prototype), EMRSA-3, New York clone, Japan clone, Pediatric, USA100 ORSA II, USA800 ORSA IV, ST 5 ORSA I
t008	6.16 %	Argentina, Australia, Austria, Belgium, Bulgaria, Canada, Chile, Croatia, Czech Republic, Denmark, Estonia, Finland, France, Gabon, Germany, Hungary, Iceland, India, Israel, Italy, Japan, Jordan, Lebanon, Netherlands, New Zealand, Norway, Poland, Slovakia, South Africa, Spain, Sweden, Switzerland, United Arab Emirates, United Kingdom, United States	ST-8, ST-247, ST-250, ST-254	CC8, Northern German MRSA (subclone), USA300 ORSA IV (cMRSA in the US), Archaic/Iberian, ST250 ORSA I
t011	3.53 %	Austria, Belgium, Croatia, Czech Republic, Denmark, France, Germany, Italy, Netherlands, Norway, Poland, Spain, Sweden, Switzerland		

Figura 26. Captura de *StaphType software*. Base de datos que muestra además para cada spa-tipo la frecuencia registrada hasta el momento y los países de origen en los que se ha detectado.

3.7.4 TIPIFICACIÓN DE *MULTILOCUS SEQUENCE TYPE* (MLST)

Como se ha explicado en el apartado de Introducción, este método se basa en la secuenciación de 7 genes de *Staphylococcus aureus* conocidos como “housekeeping”. Son los siguientes: *arcD*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi* y *yqiL*. La técnica consta de una primera PCR de amplificación de un fragmento de aproximadamente 500 pb, y posteriormente una segunda como reacción de secuenciación, en la que se emplean 2´, 5´-dideoxiNTPs marcados con fluoróforos como terminadores de cadena (basado en método de Sanger).

Solo resultaba de nuestro interés el tipaje por MLST de un representante del CC-3 y 2 representantes, uno del spa-tipo t045 y otro del t-1399, del CC-1399 (complejos clonales por BURP).

Partimos de un extracto de ADN bacteriano de cada aislado obtenido de la misma forma que se explica en apartado 3.6.3.1

3.7.4.1 AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES *HOUSEKEEPING*

Las directrices para la preparación, concentración de las soluciones de uso, y concentración final en la reacción de PCR de los primers a utilizar, son idénticas a las

explicadas en el apartado 3.5.3.2. Los primers utilizados para cada uno de los genes se muestran en la Tabla 15.

Gene	Primer	Sequence (5'-3')
Carbamate kinase (<i>arcC</i>)	<i>arcC</i> -Up <i>arcC</i> -Dn	TTGATTCACCAGCGCGTATTGTC AGGTATCTGCTTCAATCAGCG
Shikimate dehydrogenase (<i>aroE</i>)	<i>aroE</i> -Up <i>aroE</i> -Dn	ATCGGAAATCCTATTTACATTC GGTGTGTGATTAATAACGATATC
Glycerol kinase (<i>glpF</i>)	<i>glpF</i> -Up <i>glpF</i> -Dn	CTAGGAACTGCAATCTTAATCC TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC
Guanylate kinase (<i>gmk</i>)	<i>gmk</i> -Up <i>gmk</i> -Dn	ATCGTTTTATCGGGACCATC TCATIAACTACAACGTAATCGTA
Phosphate acetyltransferase (<i>pta</i>)	<i>pta</i> -Up <i>pta</i> -Dn	GTTAAAATCGTATTACCTGAAGG GACCCTTTTGTGAAAAGCTTAA
Triosephosphate isomerase (<i>tpi</i>)	<i>tpi</i> -Up <i>tpi</i> -Dn	TCGTTCAATTCTGAACGTCGTGAA TTTGCACCTTCTAACAATTGTAC
Acetyl coenzyme A acetyltransferase (<i>yqiL</i>)	<i>yqiL</i> -Up <i>yqiL</i> -Dn	CAGCATACAGGACACCTATTGGC CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC

Tabla 15. Secuencias de los cebadores usados para cada gen *housekeeping* en el MLST (Enright *et al.*, 2000).

Para cada muestra, se rotularon siete tubos *Pure Taq Ready To Go*® (*GE Healthcare Life Science*), uno por cada gen a amplificar. Se preparó la Master Mix, con los siguientes volúmenes por muestra: 1 µl de Primer Forward, 1 µl de Primer Reverse, y 18 µl de H₂O libre de nucleasas. A cada *Pure Taq Ready To Go*® se añaden 20 µl de Master Mix y 5 µl del extracto de ADN del aislado correspondiente. Los tubos son introducidos en el Termociclador *2720 Thermal Cycler* (*Applied Biosystems*) bajo las condiciones del siguiente programa: 5 minutos a 95°C; 30 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 55°C, y 1 minuto a 72°C; y por último una fase final de extensión de 5 minutos a 72°C.

Los productos de esta PCR son valorados en una electroforesis realizada en un gel de agarosa MS-8 (*Pronadisa*) al 8% en buffer TAE 1X, donde se cargan 2 µl de cada producto de PCR junto con 2 µl de Tampón de carga. El gel se sumerge en una cubeta de electroforesis con TAE1X, y se conecta a la fuente de alimentación a 100 V. Posteriormente se tiñe el gel con Bromuro de Etidio 0.1%. Al visualizar el gel en el transluminador se observa en todos los carriles una banda de tamaño aproximado de 500 pb.

Estos productos de PCR deben ser purificados siguiendo el mismo protocolo descrito en el apartado 3.6.3.4.

3.7.4.2 SECUENCIACIÓN Y ASIGNACIÓN DE *SEQUENCE TYPE* (ST)

Al igual que para el método de *spa typing*, utilizamos el *The BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*® (*Applied Biosystems*) para la secuenciación de los fragmentos amplificados. Por cada muestra y por cada uno de los 7 genes *housekeeping* amplificados, se prepararon dos tubos *Pure Taq Ready To Go*®, uno destinado a la secuenciación en la dirección *Forward* y el otro para la dirección *Reverse*.

Por cada uno de los 7 genes, se preparan dos mezclas de Master Mix, una con el primer *Forward* y otra con el primer *Reverse*. Los volúmenes por muestra son: 0.5 µl de *Ready Reaction Mix*, 1.5 µl de *BigDye Terminator v1.1/3.1 Sequencing Buffer (5X)*, 1 µl de Primer *Forward / Reverse* (según corresponda) y 5 µl de H₂O libre de nucleasas. A cada tubo *Pure Taq Ready To Go*® se le añade 8 µl de Master Mix (*Forward* o *Reverse* según corresponda) y 2 µl de producto amplificado correspondiente.

La reacción de secuenciación se lleva a cabo en Termociclador *2720 Thermal Cycler* (*Applied Biosystems*) bajo las condiciones del siguiente programa: 5 minutos a 95°C; 20 ciclos de 50 segundos a 95°C y 3 minutos a 55°C. Los productos de la reacción de secuenciación fueron pasados a través de una columna de Sephadex G-50 para retirar los dideoxiNTPs fluorescentes terminadores de cadena no incorporados. Las secuencias de ADN fueron obtenidas con el Secuenciador *3130 Genetic Analyser*® (*Applied Biosystems*).

A las secuencias obtenidas se les asignaron los números de alelo correspondientes mediante comparación con las secuencias de los alelos de aislados previamente tipificados y depositadas en Internet en la dirección <http://www.mlst.net>. Para cada aislado, los números de los alelos en el orden *arcC-aroE-glpF-gmk-pta-tpi-yqiL* definen su perfil alélico. Tras consultar la información depositada en la base de datos, a cada perfil alélico se le asignó el ST correspondiente.

3.7.5 IDENTIFICACIÓN DEL TIPO ESTRUCTURAL DE SCCmec

3.7.5.1 DETECCIÓN DE LOS TIPOS SCCMEC I, II, III Y IV.

El tipo de SCCmec se determinó aplicando una PCR Múltiple (MPCR) con la que se obtiene un patrón de amplificación específico para cada uno de los tipos estructurales existentes para SCCmec. Dicha MPCR permite la identificación de los

SCC*mec* tipo I, II, III, y IV, así como las variantes IA y IIIA, basándose en la amplificación de 8 loci (denominados A, B, C, D, E, F, G, y H), con cebadores que han sido seleccionados en base a las secuencias de los elementos *mec* previamente descritos (Ito *et al.*, 1999; Ito *et al.*, 2001). Para la elección de estos 8 loci, los autores siguieron tres criterios. Los dos primeros consistieron en la inclusión para cada tipo de SCC*mec* de un locus localizado corriente arriba del gen *mecA* y un segundo locus localizado corriente abajo del *mecA*. El tercer criterio fue la selección de un locus exclusivo en cada uno de los tipos de SCC*mec*. Adicionalmente, se incluye en el protocolo el *mecA* como control positivo interno. El locus A se localiza corriente arriba del gen *pls* y es específico del SCC*mec* tipo I; el locus B se sitúa en el interior del operón *kdp*, el cual es específico del SCC*mec* tipo II; el locus C se sitúa en el interior del gen *mecI* presente en los SCC*mec* tipo II y III; el locus D se encuentra en el interior de la región *dcs*, presente en los SCC*mec* tipo I, II y IV; el locus E se localiza en la región entre el plásmido integrado *pI258* y el transposón *Tn554*, específico para el SCC*mec* tipo III; el locus F, que también es específico del SCC*mec* tipo III, se localiza en la región entre *Tn554* y la unión cromosómica derecha (*orfX*). Los loci G y H se incluyeron para distinguir las variantes estructurales IA y IIIA, respectivamente. El locus G es la unión izquierda entre *IS431* y *pUB110*, y el locus H es la unión izquierda entre *IS431* y *pT181* (Tabla 16). Los fragmentos van de 162 a 495 pb, diferenciándose al menos en 40 pb, lo que permite distinguir a cada uno de ellos (Duarte *et al.*, 2002) (Tabla 17)

Locus	Cebadores	Diana génica	Tipo de SCC <i>mec</i>
A	CIF2 F2/CIF2R2	<i>pls</i>	I
B	KDP F1/KDP R1	<i>kdp</i>	II
C	MECI P2/MECI P3	<i>mecI</i>	II, III
D	DCS F2/DCS R1	<i>dcs</i>	I, II, IV
E	RIF4 F3/RIF4 R9	<i>pI258/Tn554</i>	III
F	RIF5 F10/RIF5R13	<i>Tn554/orfX</i>	III
G	IS431 P4/pUB110 R1	<i>pUB110</i>	IA (no en I)
H	IS 431 P4/pT181 R1	<i>pT181</i>	III (no en IIIA)
<i>mecA</i>	MECA P4/MECA P7	<i>mecA</i>	Control interno

Tabla 16. Dianas génicas específicas de los diferentes tipos de SCC*mec*

Locus	Primer	Oligonucleotide sequence (5'-3')	Location	Amplicon size (bp)	Specificity ^c (SCC _{mec} type)
A	CIF2 F2 CIF2 R2	TTCGAGTTGCTGATGAAGAAGG ATTTACCACAAGGACTACCAGC	18398–18419 ^a 18892–18871 ^a	495	I
B	KDP F1 KDP R1	AATCATCTGCCATTGGTGATGC CGAATGAAGTGAAAGAAAGTGG	10445–10467 ^b 10728–10707 ^b	284	II
C	MECI P2 MECI P3	ATCAAGACTTGCATTTCAGGC GCGGTTTCAATTCACCTTGTC	42428–42447 ^b 42636–42617 ^b	209	II, III
D	DCS F2 DCS R1	CATCCTATGATAGCTTGGTC CTAAATCATAGCCATGACCG	38011–37992 ^a 37670–37689 ^a	342	I, II, IV
E	RIF4 F3 RIF4 R9	GTGATTGTTTCGAGATATGTGG CGCTTTATCTGTATCTATCGC	45587–45607 ^c 45829–45809 ^c	243	III
F	RIF5 F10 RIF5 R13	TTCTTAAGTACACGCTGAATCG GTCACAGTAATTCATCAATGC	59573–59594 ^c 59986–59965 ^c	414	III
G	IS431 P4 pUB110 R1	CAGGTCTCTTCAGATCTACG GAGCCATAAACACCAATAGCC	49963–49982 ^b 50343–50323 ^b	381	
H	IS431 P4 pT181 R1	CAGGTCTCTTCAGATCTACG GAAGAATGGGGAAAGCTTCAC	29654–29673 ^c 29976–29956 ^c	303	
<i>mecA</i>	MECA P4 MECA P7	TCCAGATTACAACCTTCACCAGG CCACTTCATATCTTGTAACG	1190–1211 ^d 1351–1332 ^d	162	Internal control

Tabla 17. Cebadores utilizados para la amplificación de cada locus, el tamaño del fragmento amplificado, y la correspondencia con el tipo de SCC_{mec} (Duarte et al., 2002).

Los primers utilizados para cada uno de los locus se muestran en la Tabla 17. Se preparan siguiendo las directrices del apartado 3.6.3.2, utilizando una solución de 100 µM para la reacción de PCR.

Para la reacción de amplificación se utilizó por aislado un tubo *Pure Taq Ready To Go*®. Se preparó una Master Mix con los siguientes volúmenes por muestra: 0.5 µl para de cada primer, excepto para el primer IS431P4 del que se utiliza 1 µl (concentraciones finales de 2 pmol/µl y 4 pmol/µl, respectivamente); 1 µl de MgCl₂ 15 mM; 12 µl de H₂O libre de nucleasas. A cada tubo tubo *Pure Taq Ready To Go*® se le añadió 22 µl de la Master Mix y 3 µl del extracto de ADN correspondiente según aislado. Los tubos son introducidos en el Termociclador *2720 Thermal Cycler* (*Applied Biosystems*) bajo las condiciones del siguiente programa: 5 minutos a 94°C; 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 50°C, y 2 minutos a 72°C; y por último una fase final de extensión de 10 minutos a 72°C.

Los fragmentos amplificados se separaron por electroforesis en un gel de agarosa MS-8 (*Pronadisa*) al 2% en buffer TAE1X, cargando 7 µl de producto amplificado junto con 3 µl de Tampón de Carga. Después el gel es teñido con Bromuro de Etidio 0.1% durante 10 minutos. Como referencia cargamos en los pocillos extremos

el marcador de peso molecular *Gene Ruler 100bp DNA ladder plus (Biolabs)* Los patrones de bandas se observan tras visualizar el gel en un transiluminador con luz UV.

3.7.5.2 Subtipaje del cassette cromosómico SCCmec IV.

La detección de tipos de SCCmec descubiertos recientemente, como el tipo V, y subtipos del IV (IVa, IVb, IVc, IVd y IVh) se realizó con una MPCR distinta de la utilizada para los tipos I, II, III y IV. Esta MPCR se practicó con las cepas que mostraban un perfil de amplicones en la MPCR de los cassette tipo I, II, III, IV, compatible con el SCCmec IV, y en aquellas que no mostraban fragmento amplificado alguno.

Primer	Oligonucleotide sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)	Specificity
Type I-F Type I-R	GCTTTAAAGAGTGTGTTACAGG GTTCTCTCATAGTATGACGTCC	613	SCCmec I
Type II-F Type II-R	CGTTGAAGATGATGAAGCG CGAAATCAATGGTTAATGGACC	398	SCCmec II
Type III-F Type III-R	CCATATTGTGTACGATGCG CCTTAGTTGTGCTAACAGATCG	280	SCCmec III
Type IVa-F Type IVa-R	GCCTTATTCGAAGAAACCG CTACTCTTCGAAAAGCGTCC	776	SCCmec IVa
Type IVb-F Type IVb-R	TCTGGAATTACTTCAGCTGC AAACAATATTGCTCTCCCTC	493	SCCmec IVb
Type IVc-F Type IVc-R	ACAATATTTGTATTATCGGAGAGC TTGGTATGAGGTATTGCTGG	200	SCCmec IVc
Type IVd-F5 Type IVd-R6	CTCAAATACGGACCCCAATACA TGCTCCAGTAATTGCTAAAG	881	SCCmec IVd
Type V-F Type V-R	GAACATTGTTACTTAAATGAGCG TGAAAGTTGTACCCCTTGACACC	325	SCCmec V
ccrC-F ccrC-R	ATGAATTCAAAGAGCATGGC GATTTAGAATTGTCGTGATTGC	336	Type 5 ccr

Tabla 18. Cebadores utilizados en la MPCR del subtipaje del SCCmec IV y detección del tipo V. Se muestran las secuencias de cada uno de ellos, el tamaño del fragmento amplificado y el subtipo de SCCmec al cual se asocian (*Zhang et al., 2005*).

Se rotuló por cada aislado a tipificar, un tubo *Pure Taq Ready To Go®*. Se preparó una Master Mix con los siguientes volúmenes por muestra: 1 µl de cada primer 5 pmol/µl, excepto para los Reverse y Forward de IVa y IVh, de los cuales se añaden 2 y 3 µl respectivamente (Tabla 18). A cada tubo *Pure Taq Ready To Go®* se le añadió 22 µl de la esta Master Mix y 3 µl del extracto de ADN correspondiente según aislado. Los tubos son introducidos en el Termociclador *2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems)* bajo las condiciones del siguiente programa: 4 minutos a 94°C; 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 48°C, y 2 minutos a 72°C; y por último una fase final de extensión de 4 minutos a 72°C.

Los fragmentos amplificados se separaron por electroforesis en un gel de agarosa MS-8 (*Pronadisa*) al 2% en buffer TAE1X, cargando 7 µl de producto

amplificado junto con 3 µl de Tampón de Carga. Después el gel es teñido con Bromuro de Etidio 0.1% durante 10 minutos. Como referencia cargamos en los pocillos extremos el marcador de peso molecular *Gene Ruler 100 bp DNA ladder plus (Biolabs)* Los patrones de bandas se observan tras visualizar el gel en un transiluminador con luz UV.

3.7.6 DETECCIÓN DE LEUCOCIDINA PVL Y DEL GEN ACME EN AISLADOS SARM DE ORIGEN COMUNITARIO

Se valoró la capacidad para producir la leucocidina de Panton-Valentine (PVL) y la presencia de la secuencia ACME, en aquellos aislados cuyos pulsotipos indican un origen comunitario (A y A1). En este estudio fueron un total de 4 aislados.

3.7.6.1 DETECCIÓN DE PVL

Se realizó a través de una MPCR, en la que además de detectar el gen codificante de la leucocidina PVL, a modo de controles, introducimos cebadores para amplificar una secuencia específica de *Staphylococcus aureus (sau)* y el gen estructural para la proteína 2a fijadora de penicilina (*mecA*), específica de SARM.

Las secuencias de los primers para el gen PVL fueron las siguientes: luk-PV-1, 5'-ATCATTAGGTA AAA-ATGTCTGGACATGATCCA-3'; para luk-PV-2, 5'-GCATCAA-STGTATTGGGATAGCAAAAAGC-3'. Fueron diseñadas de acuerdo a las secuencias publicadas de los genes PVL (números de acceso en GenBank: X72700 y AB0067796). Dan lugar a un amplicón de 433 pb. (*Lina et al., 1999*).

Las secuencias de los primers para detectar el gen *mecA* fueron las siguientes: *mecA1*, 5'-GTA GAA ATG ACT GAA CGT CCG ATA A-3'; *mecA2*, 5'-CCA ATT CCA CAT TGT TTC GGT CTA A-3'. Originan la amplificación de un fragmento de 310 pb (*Geha et al., 1994*).

Las secuencias utilizadas como cebadores para la detección de *sau* fueron: *sau-1*, 5'-AAT CTT TGT CGG TAC ACG ATA TTC TTC ACG-3'; *sau-2*, 5'-CGT AAT GAG ATT TCA GTA GAT AAT ACA ACA-3'. Dan lugar al producto amplificado más pequeño con únicamente 107 pb (*Strommenger et al., 2003*).

Las directrices para la preparación y concentración de las soluciones de uso, y concentración final en la reacción de PCR de los primers a utilizar, son idénticas a las explicadas en el apartado 3.6.3.2.

Para la reacción de PCR se preparó una Master Mix con los siguientes volúmenes por muestra a analizar: 1 µl de Primer Luk-PV-1, 1 µl de Primer Luk-PV-2, 1 µl de Primer MecA1, 1 µl de Primer MecA2, 1 µl de Primer sau-1, 1 µl de Primer sau-2, y 18 µl de H₂O libre de nucleasas. Por cada aislado se utiliza un tubo *Pure Taq Ready To Go*® al que se añade 24 µl de Master Mix y 1 µl de extracto de ADN correspondiente. Los tubos son introducidos en el Termociclador 2720 *Thermal Cycler* (*Applied Biosystems*) bajo las condiciones del siguiente programa: 5 minutos a 94°C; 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C, y 1 minuto a 72°C; y por último una fase final de extensión de 7 minutos a 72°C.

Las condiciones para la electroforesis y visualización de los fragmentos amplificados son las mismas que las indicadas en el apartado 3.6.5.2.

3.7.6.2 DETECCIÓN DEL GEN ACME

Se realizó a través de una PCR simple en el que se utilizaron cebadores con las siguientes secuencias: Primer arcA R, 5'-TGCTAACTTTTCTATTGCTTGAGC-3'; Primer arcA F, 5'-GCAGCAGAATCTATTACTGAGCC-3'.

Las directrices para la preparación, obtención y concentraciones finales de las soluciones de uso de los primers a utilizar, son idénticas a las explicadas en el apartado 3.6.3.2.

Para la reacción de PCR se preparó una Master Mix con los siguientes volúmenes por muestra a analizar: 2 µl de Primer ARCA R, 2 µl de ARCA F, y 18 µl de H₂O libre de nucleasas. Por cada aislado se utiliza un tubo *Pure Taq Ready To Go*® al que se añade 22 µl de Master Mix y 3µl de extracto de ADN correspondiente. Los tubos son introducidos en el Termociclador 2720 *Thermal Cycler* (*Applied Biosystems*) bajo las condiciones del siguiente programa: 5 minutos a 95°C; 10 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C, y 45 segundos a 72°C; y por último una fase final de extensión de 4 minutos a 72°C.

Las condiciones para la electroforesis y visualización de los fragmentos amplificados son las mismas que las indicadas en el apartado 3.6.5.2.

3.7.7 ESTUDIO ESTADÍSTICO. ÍNDICES QUE REFLEJAN CUANTITATIVAMENTE EL PODER DE DISCRIMINACIÓN Y CONCORDANCIA DE LOS DIFERENTES MÉTODOS DE GENOTIPAJE ENSAYADOS.

Se han utilizado los siguientes índices estadísticos: Test Exacto de Fisher, Test de Chi-Cuadrado, Anova, Correlación de Pearson, Test de Kruskal-Wallis, y la Prueba T de Student, a través del software informático *IMB Statistics SPSS 19*. Mediante el programa *Statistical Software and Programming Language R 3.0.1* es calculado el estadístico FDR (*False Discovery Rate*).

El poder de discriminación de cada técnica de genotipaje se asevera usando el Índice de Diversidad de Simpson (IS), cuyo valor refleja la probabilidad de que dos cepas no relacionadas sean asignadas a grupos de tipaje diferentes (*Hunter y col., 1988*). Los intervalos de confianza del 95% de los valores de IS, fueron calculados como describen *Grundmann y col. (2001)*.

La concordancia entre los diferentes métodos es analizada usando los coeficientes de Rand y Wallace ajustados. Para comparar dos conjuntos de resultados correspondientes a métodos de genotipaje distintos, es necesaria una medida objetiva de la coincidencia existente. Han sido desarrolladas muchas y diferentes formas de medida de la concordancia entre dos conjuntos de particiones, con diferentes enfoques en cuanto a cómo deben ser comparadas estas particiones. Por su facilidad de interpretación, en este estudio utilizamos el índice de Rand y el coeficiente de Wallace. Rand es un coeficiente simétrico, es decir, no toma en cuenta que partición se considera la norma o referente, cosa que si hace el coeficiente de Wallace. También es importante tener en cuenta en este contexto que ninguna de las particiones analizadas se consideran la partición "de referencia" en términos de tipificación microbiana (*Carrizo y col., 2006*). El índice de Rand ajustado calcula la probabilidad de que dos cepas sean clasificadas bien en el mismo genotipo o en genotipos diferentes por ambos métodos. El índice de Wallace ajustado (IW) indica la probabilidad de que dos cepas clasificadas en el mismo genotipo por un método, sea también clasificadas como iguales por otro método. Un elevado valor de IW de un método A con respecto al B, significaría que los resultados obtenidos con el primero predicen con elevada probabilidad los que puedan resultar del segundo (*Carrizo y col, 2006*).

Para agilizar el cálculo de estos índices estadísticos se recurre al software de la web <http://darwin.phylovis.net/ComparingPartitions/index.php> (Carrizo y col., 2006; Pinto y col., 2008; Severiano y col., 2011; Francisco y col., 2012).

4. RESULTADOS

4.1 DATOS GENERALES

4.1.1 DESCRIPCIÓN DE LA COLECCIÓN DE AISLADOS

SARM

Desde Enero de 2010 hasta Diciembre de 2010, nuestro laboratorio recibe un total de 372 aislados. Una vez analizados, se confirmaron como *Staphylococcus aureus* meticilin-resistente un número total de 309 aislados, siendo los 63 restantes no admitidos a estudio por diferentes motivos (sensibles a meticilina, sin actividad coagulasa o diferentes aislados de un mismo paciente en breve espacio de tiempo atribuidas a la misma infección). La Tabla 19 muestra la distribución de aislados incluidas en el estudio, clasificados según la AAM y mes en el que fueron aislados. Nótese la enorme variabilidad en la incidencia de SARM en los diferentes meses, sin seguir patrón alguno, efecto observado en todas las AAM (Fig. 28). El porcentaje de aislados correspondientes a cada AAM y provincia, se representan en las Figuras 27 y 29, respectivamente.

BLOQUE	PROVINCIA	BADAJOZ				CÁCERES				TOTAL	% Total	BLOQ.	% Bloq.
	MES/ÁAM	HIC	HDBV	HM	HLLZ	HVP	HSPA	HCC	HCANM				
1	Enero	8	1	1	4	3	9	1	3	30	9,7	102	32,9
	Febrero	8	3	3	4	2	12	4	2	37	12,3		
	Marzo	11	2	3	7	6	2	2	1	34	11,0		
2	Abril	14	3	4	5	3	5	0	1	34	11,0	90	29,0
	Mayo	6	6	6	4	0	4	0	1	27	8,7		
	Junio	5	3	2	2	1	16	0	0	29	9,4		
3	Julio	2	8	0	0	1	5	3	0	19	6,1	62	20,0
	Agosto	1	4	1	0	4	4	0	0	14	4,5		
	Septiembre	5	10	2	4	3	3	2	0	29	9,4		
4	Octubre	5	3	1	1	3	0	0	0	14	4,5	56	18,1
	Noviembre	2	3	5	5	0	9	0	0	25	8,1		
	Diciembre	1	7	1	2	1	3	1	1	17	5,5		
TOTAL		68	53	29	38	27	72	13	9	309	100	309	100
%		22	17,2	9,4	12,3	8,7	23,3	4,2	2,9				
%		60,8				39,2							

Tabla 19. Distribución de aislados SARM incluidos en el estudio clasificados según el área sanitaria, bloque estacional y mes en el que fueron aislados.

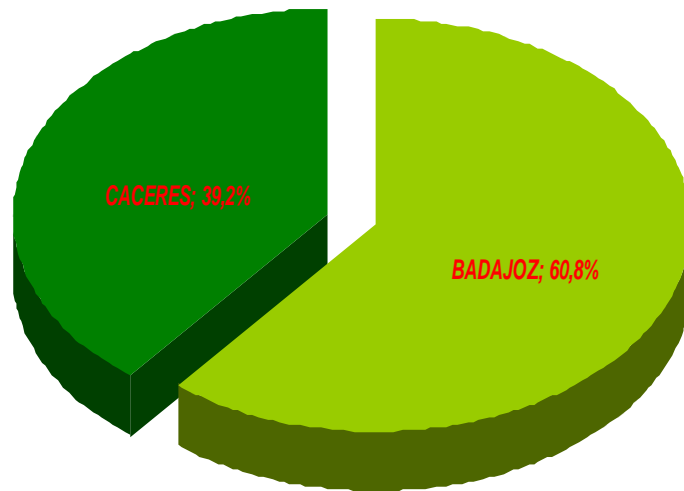


Figura 27. Proporción de aislados SARM procedente de cada una de las provincias de Extremadura

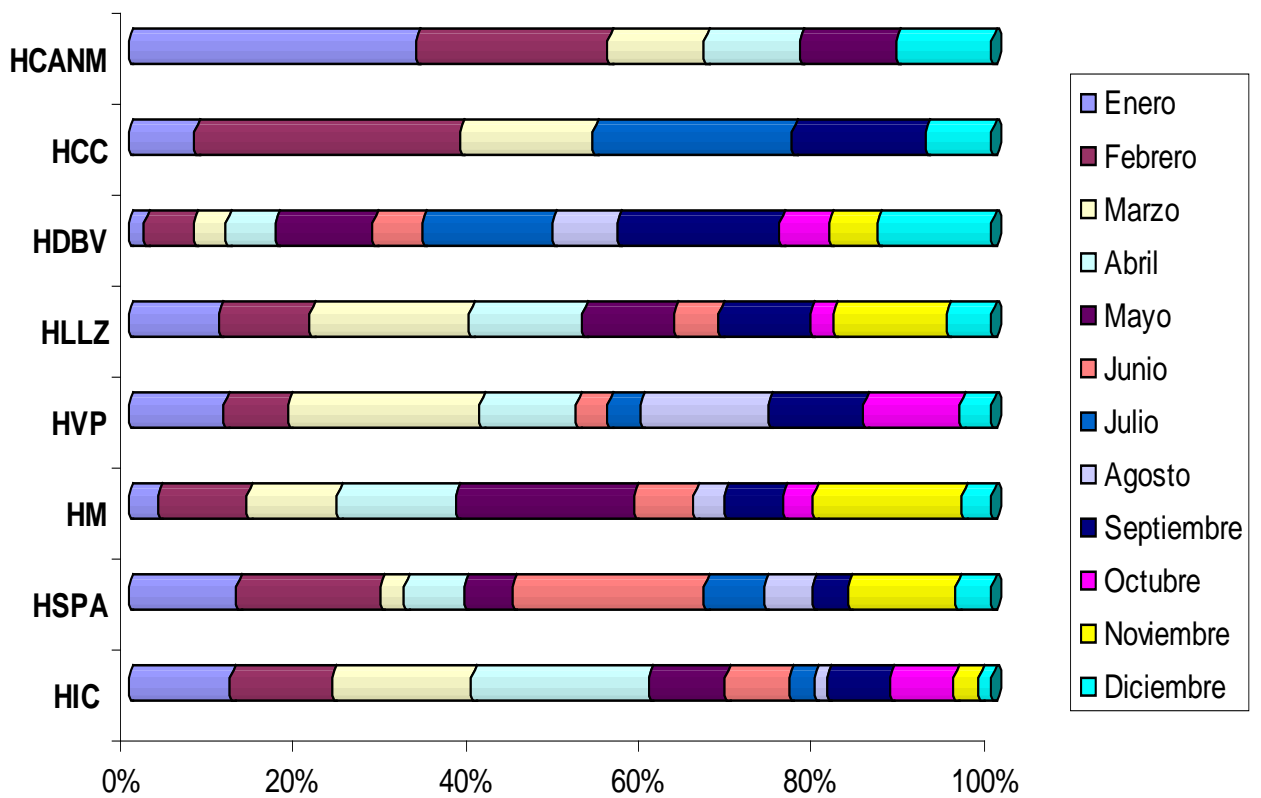


Figura 28. Proporción de aislados SARM por mes y AAM

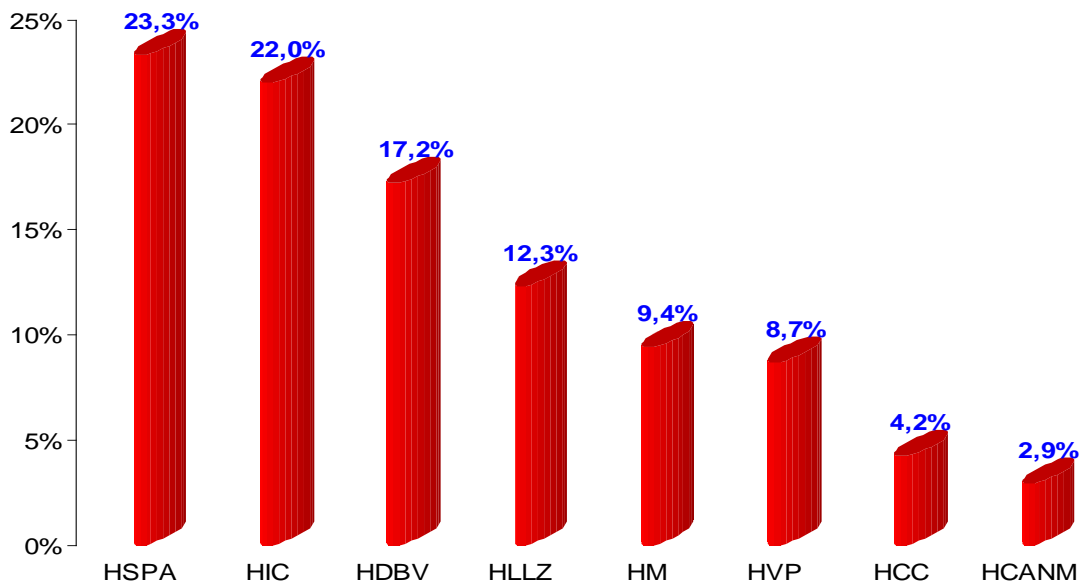


Figura 29. Proporción de aislados SARM procedente de cada una de las AAM

Empezando la recogida de aislados de SARM en Enero de 2010, y clasificándolos dentro del bloque estacional correspondiente, encontramos un descenso progresivo en el número de aislados de SARM a medida avanza el año (Tabla 19 y Fig. 30).

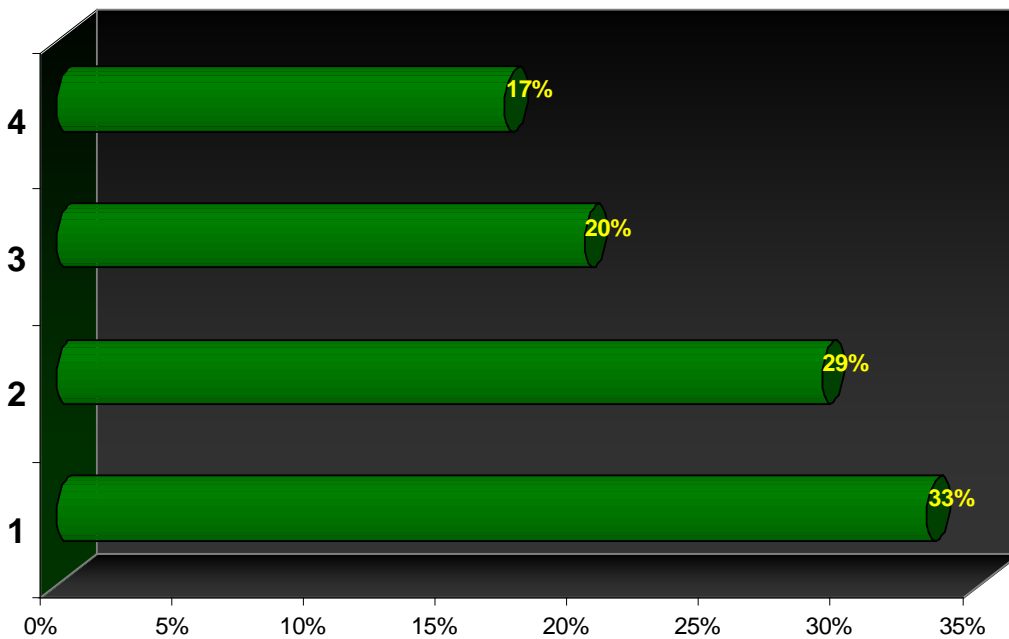


Figura 30. Distribución de aislados SARM según bloque estacional al que pertenecen

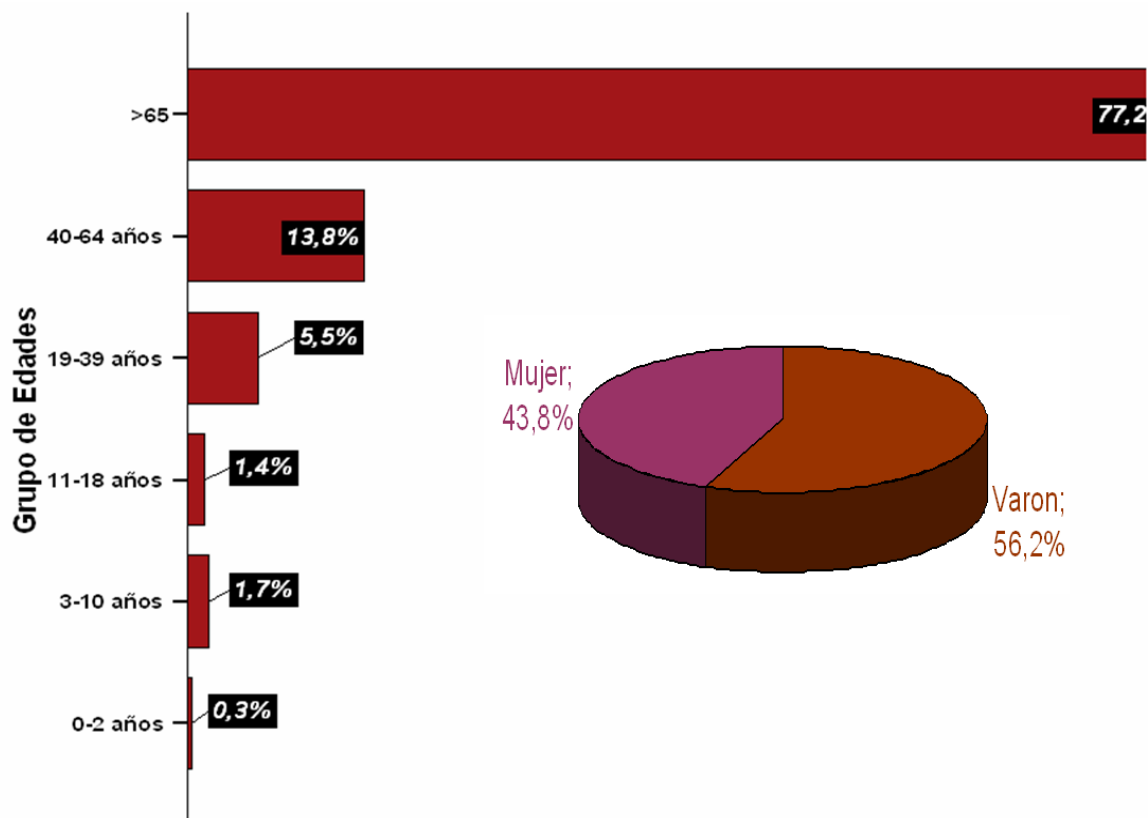


Figura 31. Distribución de los aislados SARM según grupo de edades y sexo

Obtenemos aislados en todos los grupos de edades, con una clara evolución exponencial a medida que aumenta la edad. Tal es así que la incidencia de infección por SARM es significativamente mayor por encima de los 65 años ($p=0,000$ - Chi cuadrado de Pearson), grupo al que pertenecen el 77% de todos los aislados. La ocurrencia de la infección por SARM en neonatos, infancia y adolescencia (<18 años) es prácticamente testimonial. Se obtiene una mayor incidencia de la infección en varón, sin resultar ésta significativa por encima del porcentaje obtenido en mujeres (Fig. 31).

El tipo de muestra donde se aísla con mayor frecuencia SARM es el exudado (44%), seguido a distancia por la muestra respiratoria (21%, se incluyen aspirados traqueales, bronco aspirados y esputos), orina (12%) y hemocultivo (9%). Recibimos aislados de otros tipos de muestra como catéter intravascular o hueso, pero su ocurrencia es mínima en comparación con las cuatro mayoritarias (Fig. 32).

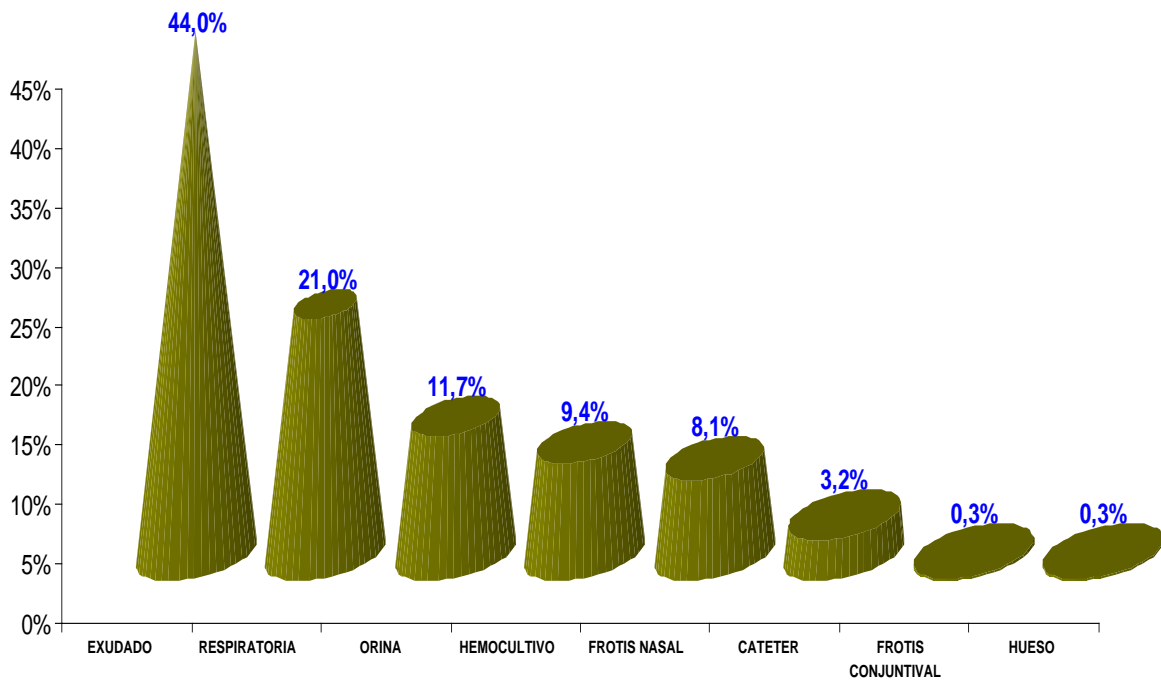


Figura 32. Distribución de SARM según tipo de muestra donde se hizo el aislado

La clasificación de los aislados de SARM en función al diámetro de halo de inhibición mostrado en los antibiograma disco-placa (con disco de 30 µg de cefoxitina), sigue una clara distribución Normal, donde el 55% de los aislados muestran diámetros entre los 14 y los 17 mm, siendo la media aritmética de 14.9 mm (Fig. 33). Los 7 mm corresponden al diámetro del disco de cefoxitina, y todos los aislados que no mostraron halo de inhibición se clasificaron con este diámetro.

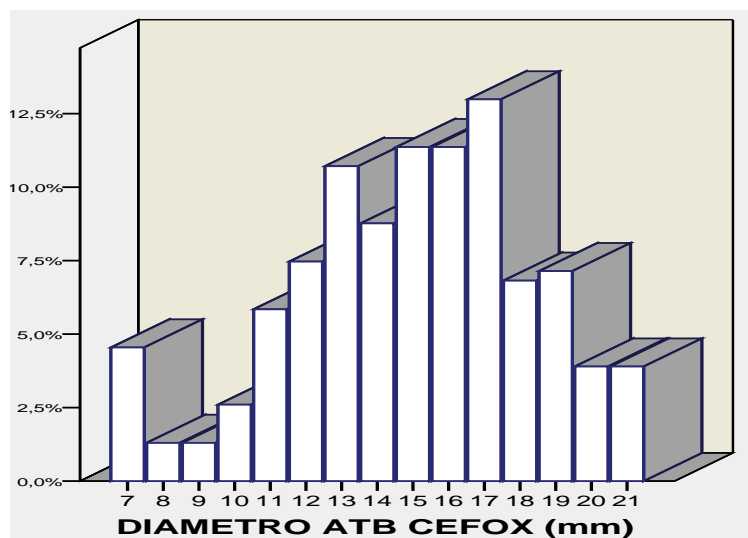


Figura 33. Frecuencias de los halos de inhibición que muestran los SARM en antibiograma disco-placa de cefoxitina.

4.1.2 INCIDENCIA Y PREVALENCIA DE LA INFECCIÓN PRODUCIDA POR SARM EN EXTREMADURA Y EN SUS DIFERENTES ÁREAS SANITARIAS.

Calculamos la prevalencia y la incidencia de la infección por SARM en la región de Extremadura y por separado en cada una de las AAM. La prevalencia de SARM se describe como el ratio de aislados SARM con respecto al de aislados de *Staphylococcus aureus* total. La incidencia la expresamos como el número de aislados SARM por cada 10.000 habitantes (Tabla 20 y Fig. 34).

AAM	HSPA	HDBV	HLLZ	HCC	HVP	HIC*	HM	HCANM
Población (nºhab)	196400	142448	106731	49530	111927	270317	165750	54630
nº aislados	73	53	38	13	27	46	29	9
Prevalencia (SARM / S.aureus total)	20,0%	35,0%	18,0%	26,0%	11,0%	25,0%	16,0%	23,0%
Incidencia (nº SARM / 10000 hab)	3,7	3,7	3,6	2,6	2,4	1,7	1,7	1,6

Tabla 20. Valores de Incidencia y Prevalencia de la infección SARM en cada una de las AAM

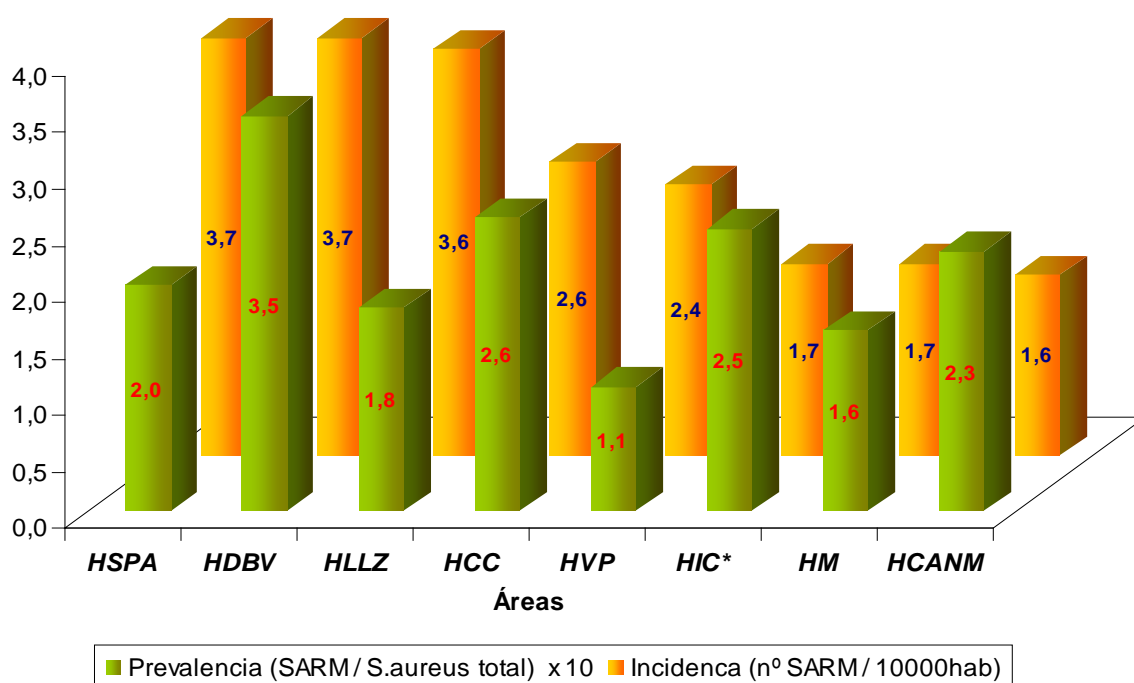


Figura 34. Incidencia y Prevalencia de SARM en las diferentes AAM de Extremadura (* para el cálculo de la Incidencia y Prevalencia, no se tienen en cuenta los aislados (n=25) correspondientes a screening de “frotis nasal” remitidas por el Área de HIC, pues no se consideran productoras de infección)

La Fig. 34 hace referencia a los resultados obtenidos en cada AAM para la Incidencia de SARM, con respecto al tamaño de población a la que asiste cada AAM; y a la Prevalencia de SARM, con respecto al número total de *Staphylococcus aureus* aislados en cada AAM.

4.1.3 FRECUENCIA DE LA INFECCIÓN SARM NOSOCOMIAL Y EXTRAHOSPITALARIA EN EXTREMADURA Y EN SUS DIFERENTES ÁREAS SANITARIAS

Los aislados se clasifican según el carácter intrahospitalario o extrahospitalario que se otorga a la infección de la que eran responsables (Tabla 21) (el criterio para considerar un aislado de SARM como extrahospitalario es el indicado en el apartado *Definiciones*). En las Figuras 35 y 36 se representan los porcentajes otorgados a cada categoría, de manera global en Extremadura y de manera parcial en cada una de las áreas sanitarias, respectivamente.

		ADQUISICION			
		Extrahospitalario		Intrahospitalario	
		Recuento	%	Recuento	%
AAM	HCANM	8	88,9%	1	11,1%
	HCC	13	100,0%	0	0%
	HDBV	22	41,5%	31	58,5%
	HLLZ	7	18,4%	31	81,6%
	HVP	14	56,0%	11	44,0%
	HM	15	53,6%	13	46,4%
	HSPA	28	50,0%	28	50,0%
	HIC*	13	28,3%	33	71,7%
	Total	120	44,8%	148	55,2%

Tabla 21. Proporción de aislados SARM intrahospitalarios y extrahospitalarios para cada una de las AAM. * Para el estudio del carácter Intrahospitalario/Extrahospitalario de SARM, no se tienen en cuenta los aislados (n=25) correspondientes a screening de “frotis nasal” remitidas por el Área de HIC, pues no se consideran productoras de infección.

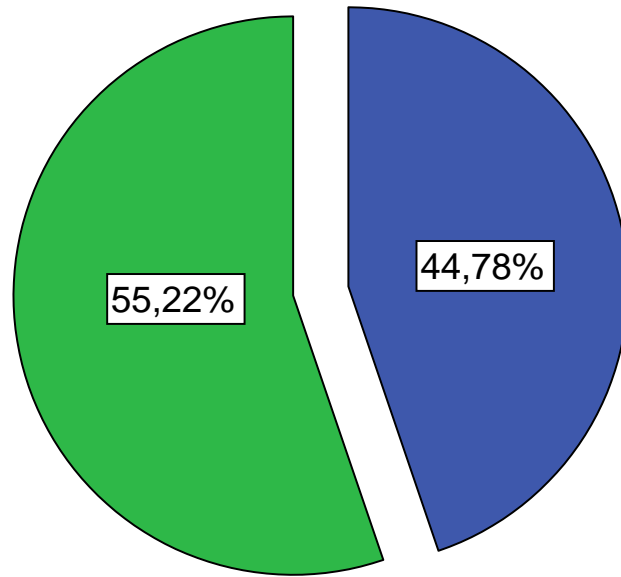


Figura 35. Proporción de aislados SARM intrahospitalarios y extrahospitalarios obtenido en Extremadura. Verde: Intrahospitalario. Azul: Extrahospitalario

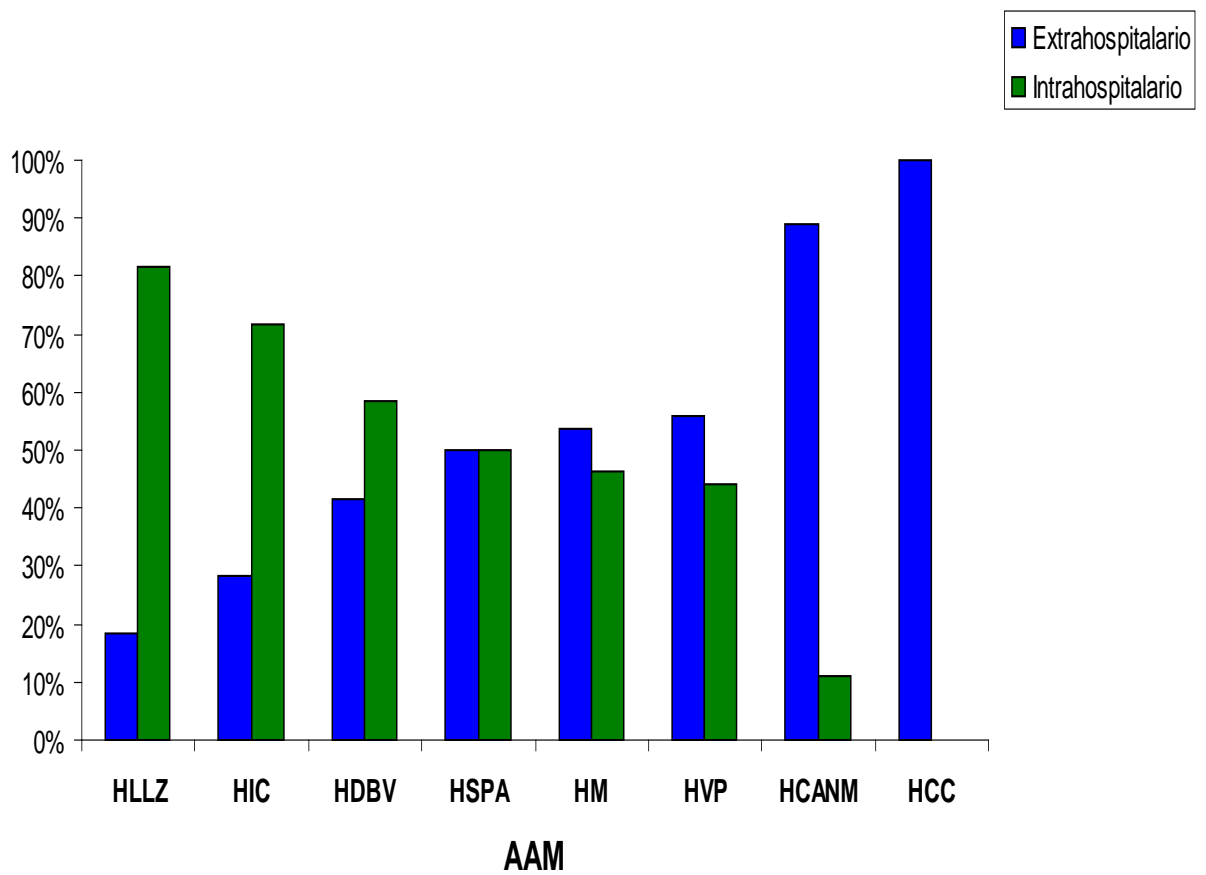


Figura 36. Proporción de aislados SARM intrahospitalarios y extrahospitalarios para cada una de las AAM.

4.2 PATRÓN DE SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA DE LOS AISLADOS SARM

Los resultados obtenidos mediante la tarjeta de sensibilidad AST-588 del Sistema Vitek-2 (*Biomerieux*) para los antibióticos no específicos para la infección por SARM, nos reporta los porcentajes de resistencia mostrados en la Tabla 22 y Fig. 37

ANTIBIÓTICO	R	I	S
TOBRAMICINA	79,3%	1,3%	19,4%
LEVOFLOXACINO	72,5%	22,7%	4,9%
ERITROMICINA	63,8%	0,3%	35,9%
CLINDAMICINA	26,5%	0,3%	73,1%
FOSFOMICINA	9,7%	0,0%	90,3%
MUPIROCINA	7,4%	0,0%	92,6%
GENTAMICINA	5,2%	0,3%	94,5%
RIFAMPICINA	1,0%	0,3%	98,7%
AC.FUSÍDICO	0,6%	0,3%	99,0%
NITROFURANTOINA	0,6%	0,3%	99,0%
SXT	0,0%	1,6%	98,4%
QUINUPRISTINA	0,0%	0,0%	100,0%

Tabla 22. Patrones de sensibilidad obtenidos para los antibióticos no específicos para SARM. R: resistente; I: intermedio; S: sensible.

Los resultados obtenidos mediante E-test para los antibióticos específicos en la infección por SARM quedan resumidos en la Tabla 23 y Figura 38.

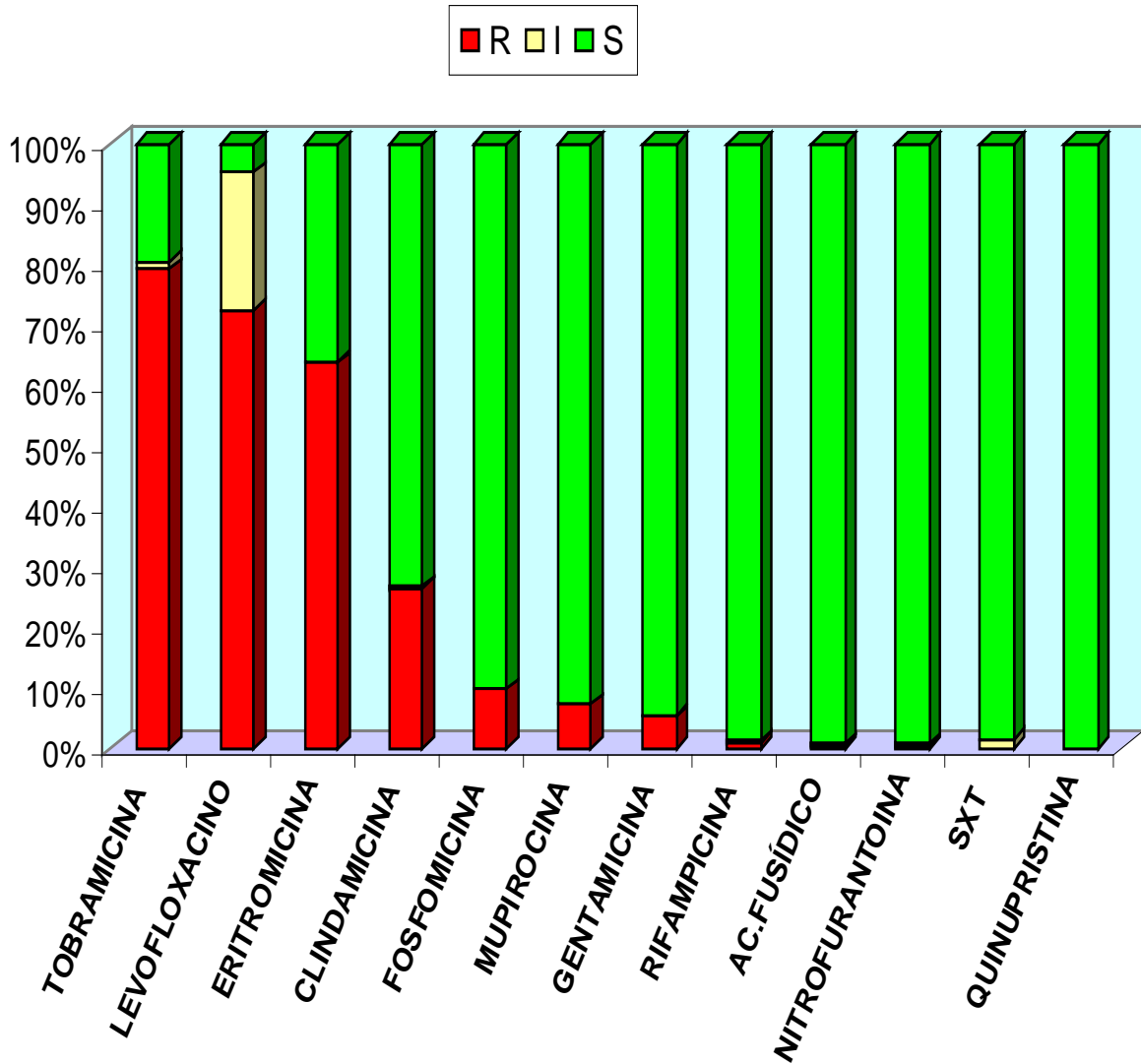


Figura 37. Patrones de sensibilidad obtenidos para los antibióticos no específicos para la infección SARM.

	TIGECICLINA	DAPTOMICINA	VANCOMICINA	LINEZOLID
Mediana (µg/ml)	0,19	0,125	1	0,75
Media (µg/ml)	0,186	0,146	1,176	0,96
Desv. típ.	0,06	0,09	0,34	0,43
Mínimo	0,064	0,047	0,38	0,38
Máximo	0,38	1,5	2	2

Tabla 23. Resumen de estadísticos descriptivos obtenidos para antibióticos específicos en la infección por SARM.

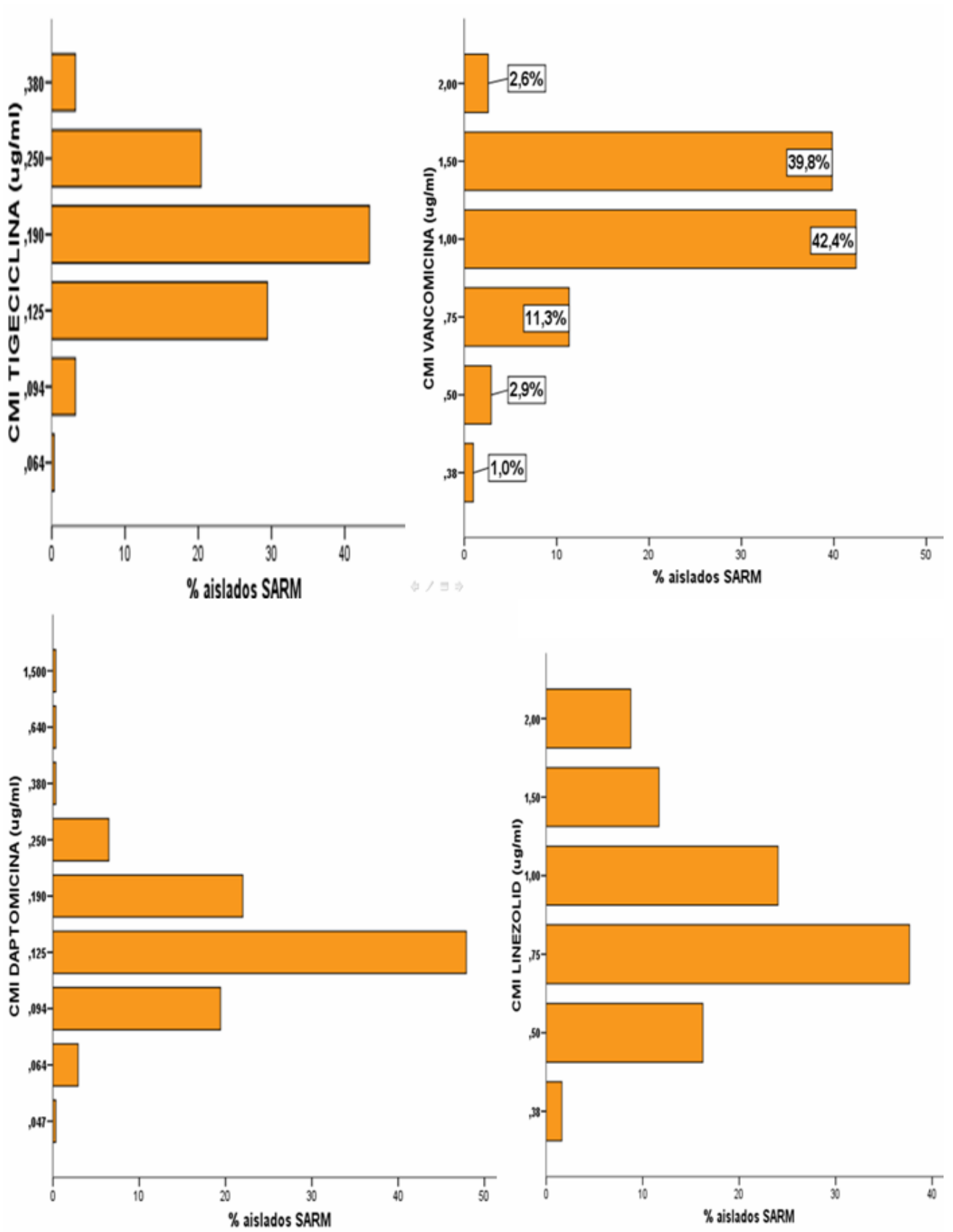


Figura 38. Distribución de valores de CMI mostrados por los aislados SARM, para los antibióticos Tigeciclina, Linezolid, Daptomicina, Vancomicina

Tomando como referencia los puntos de corte en los valores de CMI dados por EUCAST, a partir de los cuales se define la resistencia para los antibióticos específicos en la infección por SARM (Linezolid: > 4 µg/ml; Daptomicina: > 2 µg/ml; Vancomicina: > 2 µg/ml; Tigeciclina: > 1 µg/ml)

(http://www.eucast.org/mic_distributions/), se declara la ausencia de cepas resistentes a Linezolid, Tigeciclina, Vancomicina y Daptomicina, en Extremadura. Sin embargo, se registra un porcentaje de cepas SARM con sensibilidad disminuida a Vancomicina (CMI>1µg/ml) significativo, con el 42,4% de los aislados.

4.3 FAGOTIPOS SARM

La fagotipia realizada en la muestra de los 100 aislados SARM a genotipar, nos reporta los fenotipos y las proporciones mostradas en la Tabla 24 y Fig. 39.

Fagotipo	nº aislados
	%
NO TIPABLE	56
I	2
III	23
V	1
81	3
III / 81	2
MIXTO	13
Total	100

Tabla 24. Fagotipos obtenidos

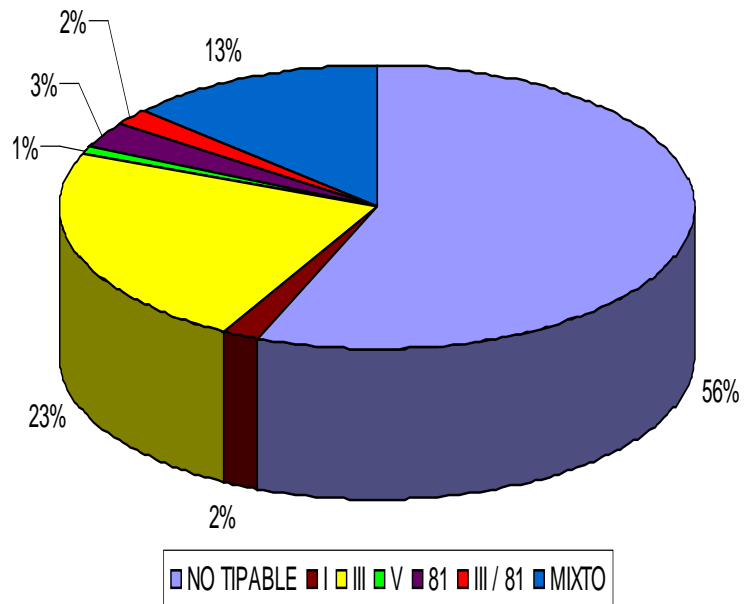


Figura 39. Proporciones observadas para cada uno de los fagotipos

Los resultados de la fagotipia reportan la presencia de 6 fagotipos diferentes, entre los que el tipo III y el Mixto, son los preponderantes con el 23% y el 13% respectivamente. Sin embargo, más de la mitad de los aislados SARM no se pueden fagotipar (“no tipables”).

4.4 ESTUDIO MOLECULAR

4.4.1 PATRONES Y GRUPOS GENOTÍPICOS DE SARM POR MÉTODO DIVERSILAB/rep-PCR

Una vez llevado a cabo, por método rep-PCR/Sistema Diversilab, el genotipado de las 100 cepas, y una vez validados los electroferogramas obtenidos con cada uno de los aislados y el dendograma aportado por el software DiversiLab version 3.4 (Fig. 42), y aplicados los criterios de grado de relación descritos en el apartado 3.5.1.3, obtenemos 18 patrones o clones diferentes (Tablas 25 y 26), con los siguientes puntos a destacar:

Grupo Diversilab	<i>Patrón Diversilab</i>	nº de aislados = %	nº de aislados = %
1	<i>1</i>	38	49
	<i>2</i>	8	
	<i>3</i>	2	
	<i>4</i>	1	
2	<i>5</i>	8	13
	<i>6</i>	5	
∅	<i>7</i>	1	1
∅	<i>8</i>	4	4
3	<i>9</i>	4	5
	<i>10</i>	1	
∅	<i>11</i>	2	2
∅	<i>12</i>	1	1
4	<i>13</i>	2	4
	<i>14</i>	2	
∅	<i>15</i>	3	3
∅	<i>16</i>	15	15
∅	<i>17</i>	2	2
∅	<i>18</i>	1	1

Tabla 25. Resultados obtenidos para el genotipaje de SARM mediante rep PCR/Diversilab. Se indica el nº de aislados que se clasifican en cada patrón (como el nº total de aislados genotipados es 100, la frecuencia por cada patrón es igual al porcentaje). Se muestran los cuatro grupos genotípicos obtenidos, los patrones que contienen, y el nº de aislados que se clasifican en cada uno de ellos. ∅: sin grupo asignado

- En el patrón P1 se clasifican el 38% de las cepas. P2, P3 y P4, junto con P1, constituyen el grupo (G) 1, donde se incluyen el 49% de los aislados (Fig. 40 y 41).
- El P5 y P6 forman el G2, con el 13% de los aislados.
- Existen otros dos grupos, el G3 y G4 con el 5 y el 4% de los aislados respectivamente.
- Los demás patrones no constituyen grupos con ningún otro, y son minoritarios (entre 1 y 4% de los aislados), excepto P10 con el 15% de los aislados.
- Existen tres cepas que constituyen por si solas un patrón y que no se incluyen en ningún grupo.

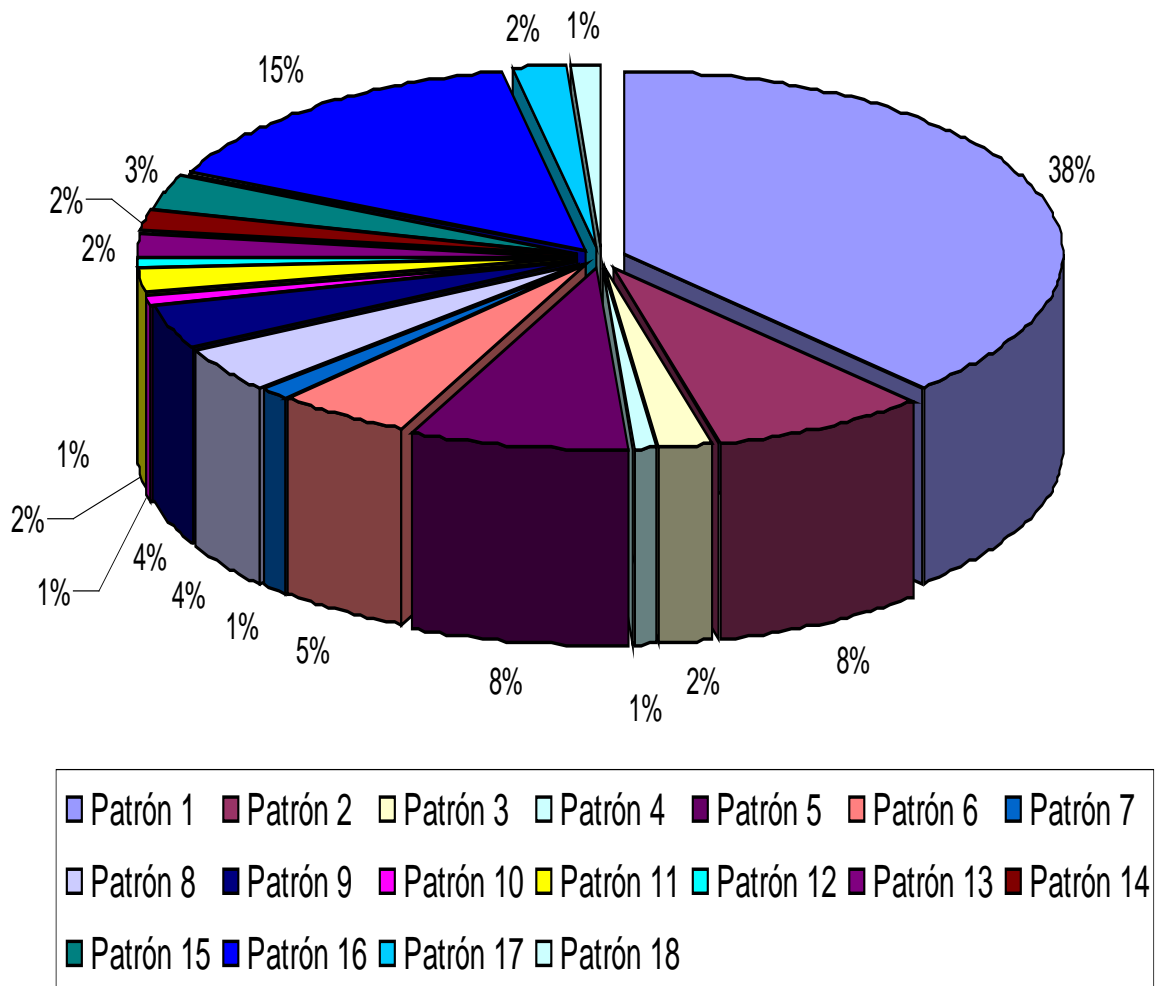


Figura 40. Distribución de frecuencias para los patrones genotípicos definidos por repPCR/DiversiLab

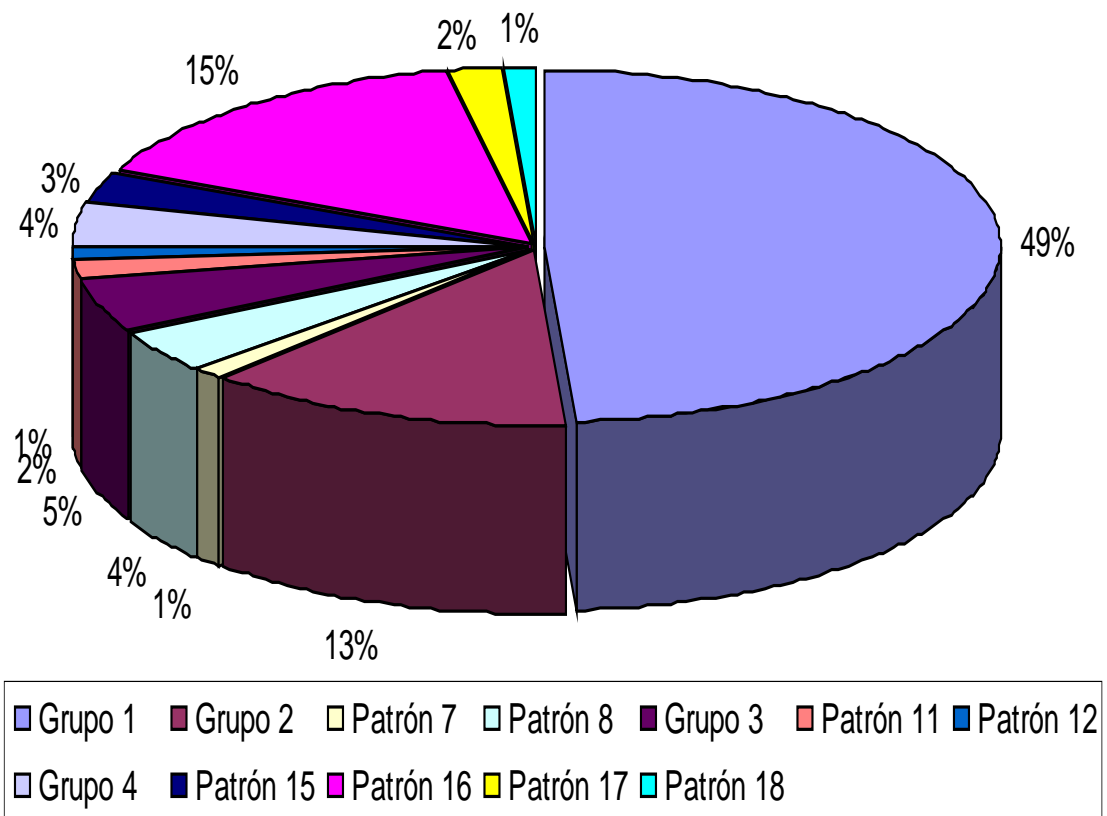


Figura 41. Distribución de frecuencias para los grupos genotípicos y los patrones genotípicos que no forman grupo con ningún otro patrón

Group	Pattern	Key	Sample ID	Location	Outbreak	Diagnosis						
1	1	11	8834635	HSPA	DICIEMBRE	I						
		12	8834878	HSPA	JUNIO	C						
		13	8834891	HIC	MARZO	I						
		15	8834792	HM	SEPTIEMBRE	I						
		18	8834768	HLLZ	SEPTIEMBRE	I						
		17	8834727	HIC	OCTUBRE	I						
		18	8834710	HSPA	NOVIEMBRE	C						
		19	8834730	HM	NOVIEMBRE	C						
		20	8834800	HIC	SEPTIEMBRE	C						
		21	8834721	HVP	OCTUBRE	C						
		22	8834873	HSPA	JUNIO	I						
		23	8834741	HDBV	NOVIEMBRE	I						
		25	8834735	HLLZ	NOVIEMBRE	I						
		26	8834761	HLLZ	NOVIEMBRE	C						
		27	8834749	HSPA	NOVIEMBRE	I						
		30	8834717	HDBV	OCTUBRE	I						
		33	8834788	HM	MAYO	C						
		34	8834848	HLLZ	DICIEMBRE	I						
		35	8834726	HIC	OCTUBRE	I						
		38	8834864	HDBV	DICIEMBRE	I						
		37	8834849	HCANM	DICIEMBRE	C						
		39	8834769	HIC	MARZO	C						
		41	8815424	HLLZ	ENERO	I						
		42	8834856	HDBV	JULIO	I						
		43	8834848	HCC	JULIO	C						
		48	8834923	HIC	ABRIL	I						
		49	8834936	HDBV	ABRIL	I						
		60	8834924	HIC	ABRIL	I						
		61	8834785	HM	MAYO	I						
		62	8834983	HSPA	FEBRERO	C						
		63	8834857	HDBV	JUNIO	C						
		64	8834823	HVP	AGOSTO	I						
		65	8834824	HVP	AGOSTO	C						
		68	8834940	HLLZ	ABRIL	I						
		67	8834896rep	HLLZ	MAYO	I						
		69	8815439	HM	FEBRERO	C						
		81	8834897	HIC	MAYO	C						
		74	8834843	HSPA	JULIO	I						
		2	2	14	8834748	HSPA	NOVIEMBRE	C				
				44	8834834	HDBV	JULIO	C				
				45	8834830	HSPA	SEPTIEMBRE	I				
				46	8834827	HDBV	AGOSTO	I				
				47	8834816	HSPA	AGOSTO	I				
				68	8834882	HIC	JUNIO	C				
				80	8834858rep	HDBV	JUNIO	I				
				73	8834938	HLLZ	ABRIL	I				
				4	4	24	8834811	HDBV	SEPTIEMBRE	I		
						38	8834868	HDBV	DICIEMBRE	C		
		3	3	40	8834844	HM	MAYO	C				
		2	6	1	8815445	HSPA	FEBRERO	I				
				2	8815413	HVP	ENERO	I				
				6	8815440	HM	FEBRERO	C				
				6	8834973	HDBV	FEBRERO	I				
				28	8834776	HSPA	MARZO	I				
				29	8834861	HVP	MARZO	I				
				31	8834862	HVP	MARZO	I				
				32	8815408	HSPA	ENERO	C				
				8	8	3	8834888	HSPA	FEBRERO	C		
						4	8815433	HCANM	FEBRERO	C		
						7	8834971	HDBV	FEBRERO	I		
						9	8815438	HM	ENERO	I		
						10	8815423	HLLZ	ENERO	I		
						8	8815398	HIC	ENERO	C		
						8	8	62	8834779	HSPA	ABRIL	C
								63	8834826	HVP	AGOSTO	C
				64	8834782			HSPA	ABRIL	I		
				65	8834912			HVP	ABRIL	C		
				9	9	66	8834733	HM	DICIEMBRE	C		
						67	8815384rep	HIC	ENERO	I		
						68	8834828	HDBV	AGOSTO	I		
						69	8834801	HIC	SEPTIEMBRE	I		
						71	8834838	HDBV	JULIO	I		
						11	11	70	8834933	HIC	ABRIL	I
72	8834826							HIC	HIC	I		
75	8834804							HCANM	MAYO	C		
14	14			78	8834771	HLLZ	MARZO	I				
				78	8834977rep	HLLZ	FEBRERO	I				
13	13			77	8834878	HSPA	JUNIO	I				
				79	8834761	HCC	MARZO	C				
				80	8834877	HSPA	JUNIO	I				
16	16			81	8815418	HCANM	ENERO	I				
			82	8834838	HIC	JULIO	I					
			18	18	83	8834788	HLLZ	MARZO	C			
					84	8834828	HDBV	AGOSTO	I			
					85	8834744	HIC	NOVIEMBRE	I			
					88	8834748	HSPA	NOVIEMBRE	C			
					87	8834888	HIC	FEBRERO	I			
					88	8834842	HSPA	JULIO	I			
					89	8834709	HSPA	NOVIEMBRE	C			
					90	8834890	HIC	MARZO	I			
			91	8815397	HIC	ENERO	I					
			92	8815171	HSPA	ENERO	I					
93	8815416		HCC	ENERO	C							
94	8834888		HSPA	JUNIO	I							
95	8834993		HIC	MARZO	I							
96	8834831rep		HIC	ABRIL	I							
99	8834848rep		HM	ABRIL	I							
17	17		98	8834881	HIC	JUNIO	I					
			97	8834890	HDBV	MAYO	I					
18	100		8815410	HSPA	ENERO	I						

Tabla 26. Distribución genotípica de aislados SARM, obtenida mediante sistema rep-PCR/Diversilab. *Group*: Grupo genotípico; *Pattern*: Patrón genotípico, *Key*: nº de orden del aislado; *Sample ID*: nº identificativo del aislado; *Location*: Área de procedencia; *Outbreak*: mes de aislamiento; *Diagnosis*: origen intrahospitalario (I) o extrahospitalario (C)

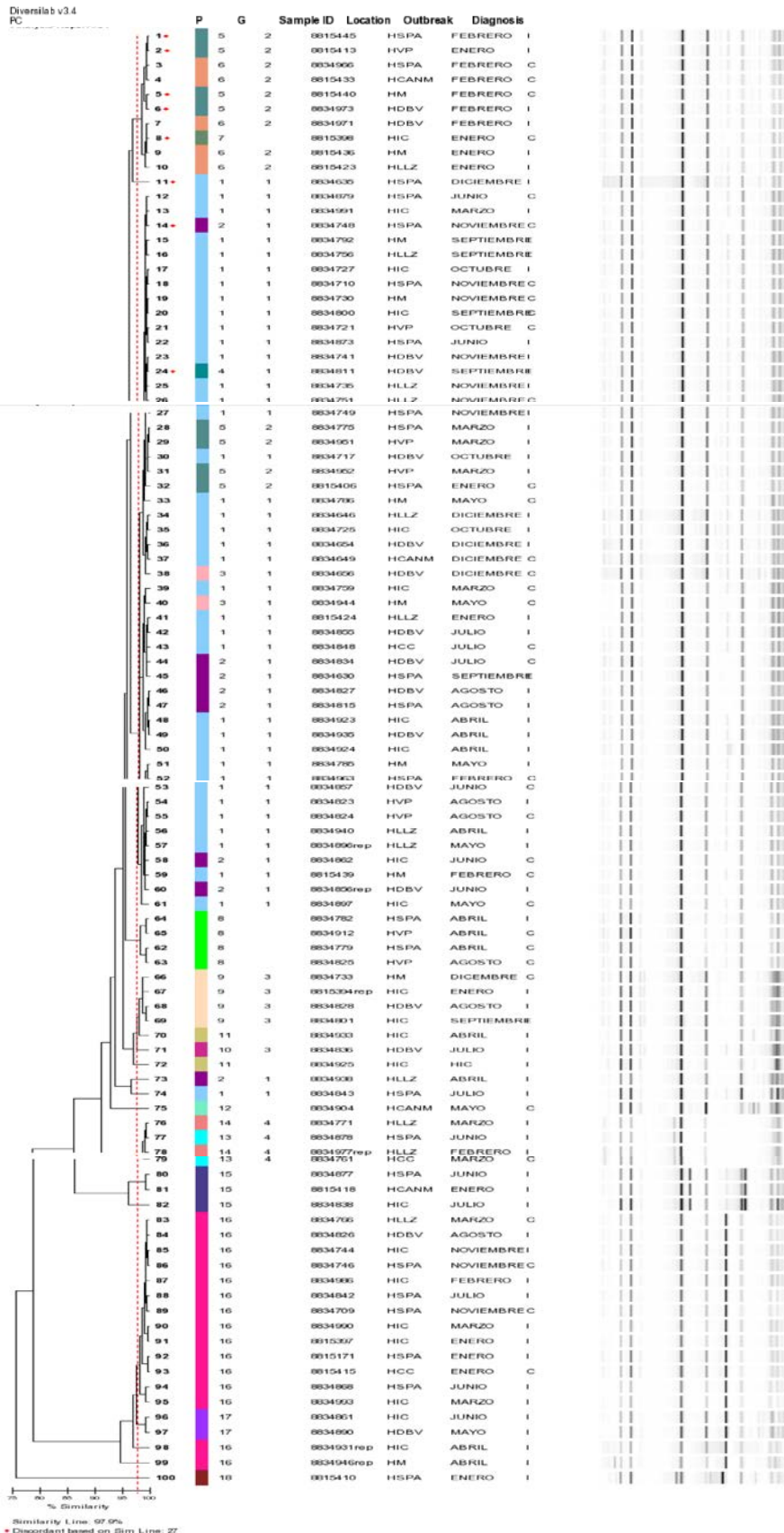


Figura 42. Dendrograma creado por *DiversiLab 3.4*. Muestra el grado de relación genotípica entre aislados SARM. *P*: patrón genotípico (cada uno representado por un color). *G*: grupo genotípico. *Sample ID*: n° identificativo del aislado; *Location*: AAM de procedencia; *Outbreak*: mes aislamiento; *Diagnosis*: origen intra (I) o extrahospitalario (C). En el extremo de la derecha se sitúan las imágenes virtuales de los geles correspondientes a cada muestra

4.4.2 GENOTIPAJE DE SARM MEDIANTE *Spa Typing*, Y CLASIFICACIÓN EN GRUPOS CLONALES CCBURP y eBURST

4.4.2.1 GENOTIPOS SARM OBTENIDOS POR SPA TYPING

El genotipaje de la muestra representativa de 100 SARM mediante *Spa typing*, nos reporta 17 spa-tipos diferentes, con proporciones muy diversas. Así obtenemos un spa-tipo predominante, el t067, que representa casi la mitad de los aislados (47%). Obtenemos un segundo spa-tipo, el t002, que representa el 22% de los casos. A partir de aquí, los 15 spa-tipos restantes representan frecuencias muy bajas que oscilan del 1% al 8% (Tabla 27 y Fig. 43).

Spa Tipo	nº SARM %
t002	22
t008	4
t032	3
t045	1
t067	47
t109	2
t127	1
t1346	1
t1399	8
t148	3
t2226	2
t535	1
t6472	1
t6475	1
t7284	1
t818	1
t012	1
Total	100

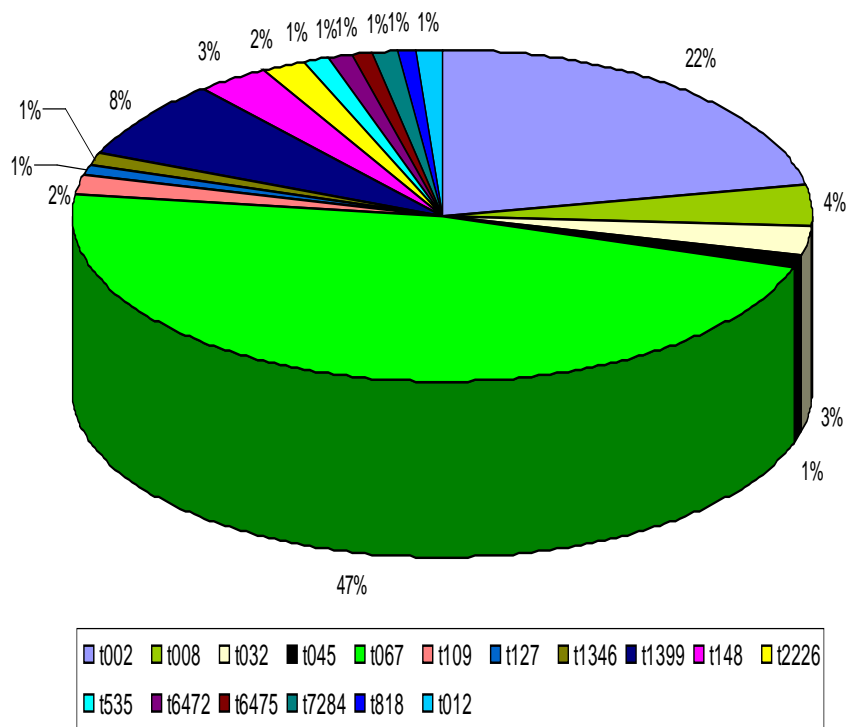


Figura 43. Resultados obtenidos para el genotipaje de SARM mediante *Spa Typing*

Tabla 27. Resultados obtenidos para el genotipaje de SARM mediante *Spa typing*

4.4.2.2 DEFINICIÓN DE GRUPOS CLONALES CCBURP

La herramienta BURP del *StaphType Software*, agrupa los spa-tipos similares en los siguientes clusters CC-BURP (entre paréntesis se muestra el n° de aislados pertenecientes a cada grupo clonal BURP o spa-tipo):

- **CC067** (72) → t067 (47), t002 (22), t2226 (2), t6475 (1)
- **CC1399** (11) → t045 (1), t1399 (8), t6472 (1), t818 (1)
- **CC3** (4) → t148 (3), t1346 (1)

Los demás spa-tipos son clasificados por el algoritmo BURP como:

- **EXCLUDED** (2) → t7284 (1), t535 (1)
- **SINGLETON** (11) → t109 (2), t032 (3), t127 (1), t008 (4), t012 (1)

Observamos la existencia de un grupo clonal mayoritario, el CC067, con el 72% de los aislados, que engloba los dos spa-tipos predominantes: t067 y el t002. Aparte, existen otros dos clusters: el CC1399 y el CC3, con el 11% y el 4% de los aislados, respectivamente. Dos spa-tipos quedaron fuera del análisis BURP, siendo clasificados como EXCLUDED. 11 aislados, repartidos en 5 spa-tipos que no presentan suficiente similitud con ningún otro spa-tipo como para formar un grupo clonal, quedan clasificados como SINGLETON.

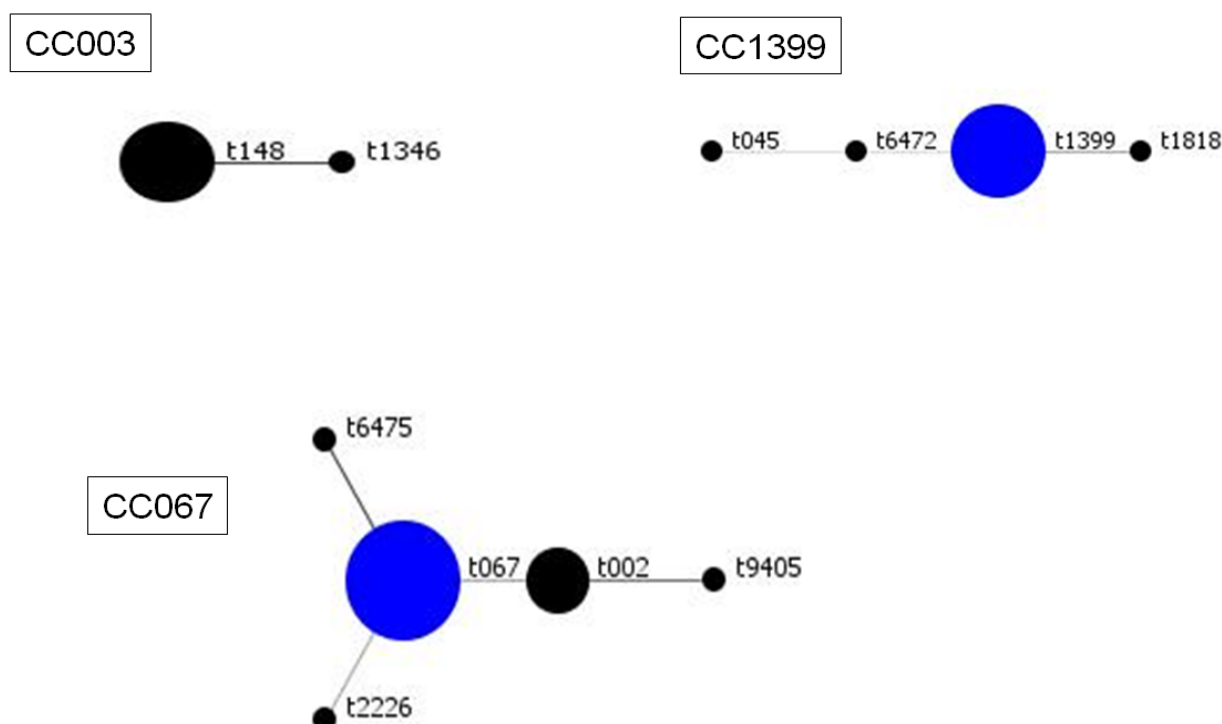


Figura 44. Relación evolutiva entre los spa-tipos que componen cada CC-BURP.

El *StaphType Software* dispone de una herramienta que representa de manera sencilla la relación evolutiva entre los spa-tipos de un mismo grupo clonal CCBURP. Aplicada a nuestros tres diferentes tipos de cluster, obtenemos la representación mostrada en la Fig. 44. En ésta se observa como los spa-tipos t148, t1399, t067, son los genotipos fundadores o ancestrales de los clusters CC3, CC1399 y CC067, respectivamente.

4.4.2.3 ASIGNACIÓN DE GRUPO CLONAL EBURST

La asignación automática de eBURST para cada spa-tipo, realizada a través de *StaphType Software*, refleja una estrecha relación filogenética entre la gran mayoría de los aislados genotipados, pues los spa-tipos de los cluster CC067 y CC1399, además de los dos aislados t109, son clasificados en el grupo clonal CC5 de eBURST, lo que representa un 85% del total. El resto se asocian a grupos clonales minoritarios, concretamente el CC22 (con los spa-tipos t032; 3%), el CC8 (constituido por los t008; 3%) y el CC30 (el aislado t012; 1%) (Tabla 28).

4.4.3 GENOTIPAJE DE SARM POR MLST

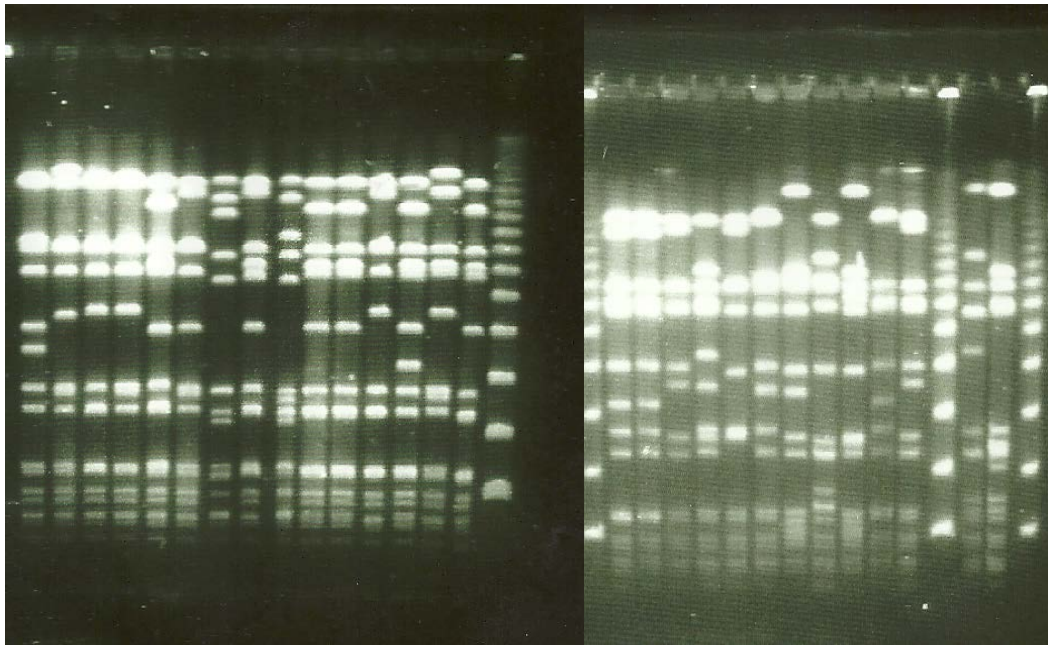
Se le realiza genotipaje mediante técnica MLST a un aislado representante del cluster CC3; y a dos representantes del cluster CC1399, de spa-tipos diferentes, uno de t1399 y otro de t148. Al tercer cluster CC067 le asignamos directamente los tipos de secuencia ST125 o ST5, debido a la enorme cantidad de trabajos publicados que asocian este cluster predominante a este tipos de secuencias (*Argudín y col., 2011; Argudín y col., 2009*). El aislado perteneciente a CC3 da el tipo ST72, mientras que los aislados del CC1399, tanto el t1399 como el t148, se corresponden con el tipo ST146.

Spa Tipo	nº de aislados y %	CC-BURP (% aislados)	MLST	eBURST (% aislados)
t067	47	CC067 (72)	ST125, ST5	CC5 (85)
t002	22			
t2226	2			
t6475	1			
t045	1	CC1399 (11)	ST146	
t1399	8			
t6472	1			
T1818	1			
t148	3	CC3 (4)	ST72	??
t1346	1			
t7284	1	EXCLUDED (2)		??
t535	1			
t109	2	SINGLETON (11)		CC5 (85)
t032	3			CC22 (3)
t127	1			??
t008	4			CC8 (4)
t012	1			CC30 (1)

Tabla 28. Concordancia de la clasificación entre spa typing, CC-BURP, MLST y eBURST

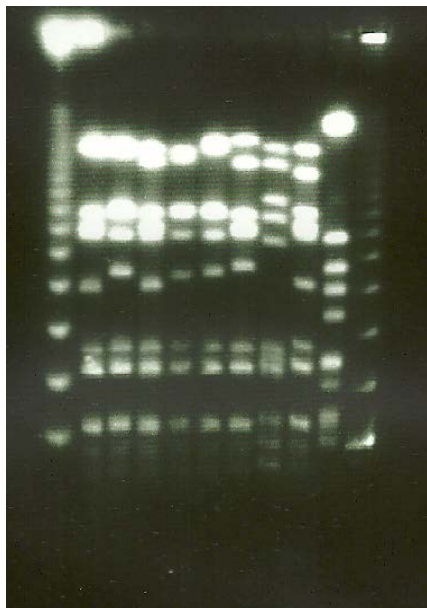
4.4.4 GENOTIPAJE DE SARM MEDIANTE ELECTROFORESIS EN CAMPO PULSADO (PFGE)

El análisis informático de los perfiles de macrorrestricción obtenidos mediante PFGE tras digestión con la enzima Sma I de los 100 aislados de SARM, reveló la existencia de 27 patrones, y por tanto la existencia de 27 genotipos diferentes. Más de la mitad de los aislados, un 54%, se agruparon en sólo 3 genotipos: E8a (25%), E7b (17%) y E7a (12%). El 46% restante se distribuye en 24 genotipos distintos. De éstos, 8 genotipos se corresponden con un patrón de bandas con nombre asignado y descritos en estudios previos: E8b (8%), E10 (6%), E20 (4%), E13 (3%), A1 (1%), E16 (1%), E19 (1%), E17 (1%); mientras que obtenemos hasta 16 patrones con perfiles esporádicos y representados únicamente por un aislado, con la excepción de 3 patrones que se repiten en más de un aislado. Estos últimos reciben el nombre de “esporádico” seguidos de un número según el orden de aparición. Así observamos el Esporádico 1 (3% de los aislados), Esporádico 2 (3% de los aislados) y Esporádico 3 (2% de los aislados) (Fig.

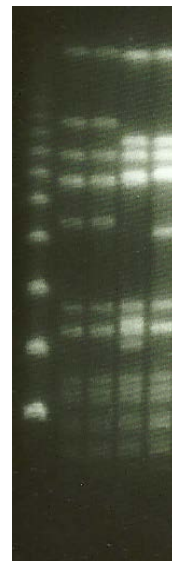


1: esporádico; *2*: E20; *3 y 4*: **E7b**; *5*: **E10**; *6 y 8*: E8a; *7*: E17; *9*: esporádico; *10, 11, 13 y 15*: E10; *12*: **E8b**; *14*: E16; *16*: Ladder

1: Ladder; *2-9*: esporádicos; *10*: esporádico; *11 y 12*: esporádicos; *13*: Ladder; *14*: esporádico; *15*: A1; *16*: Ladder; *17*: **E8a**; *18*: **E7**



1: Ladder; *2*: **E7a**; *3*: **E7b**; *4*: **E8a**; *5*: **E8b**; *6*: **E20**; *7*: esporádico; *8*: esporádico; *9*: **E10**; *10*: E13; *11*: Ladder



1: Ladder; *2 y 3*: esporádico; *4*: A1; *5*: E19

Figura 46. Geles de agarosa CMBA 1% en Buffer TBE 0.5X. Electroforesis PFGE de fragmentos de macrorrestricción con SmaI. Se muestran cada uno de los patrones de bandas o pulsotipos distintos, obtenidos en los 100 aislados clínicos de SARM (nº de pocillo en cursiva, seguido del nombre del pulsotipo; en negrita los pulsotipos más representativos)

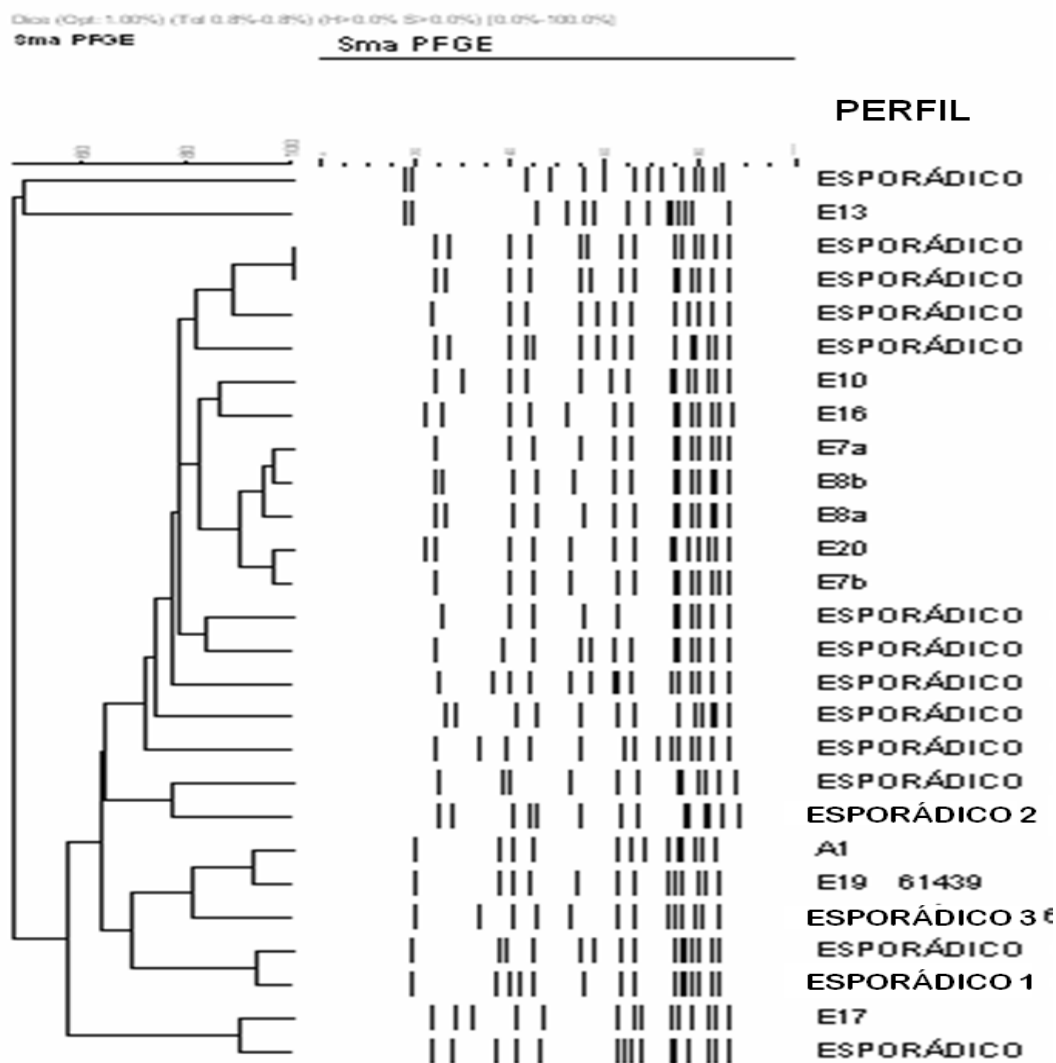
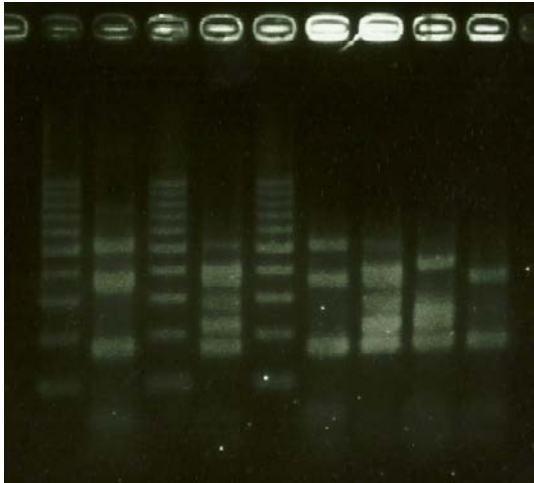


Figura 47. Dendrograma que muestra la relación grupal entre los diferentes pulsotipos descritos y una representación del patrón de bandas correspondiente a cada pulsotipo

4.4.5 TIPOS ESTRUCTURALES SCCmec

Una vez disponemos de los distintos pulsotipos (Fig. 48), se escoge un representante de cada patrón para identificar el tipo de cassette SCCmec. En los resultados se observa un claro predominio del cassette SCCmec tipo IVc, que es portado por 21 de los 27 pulsotipos descritos (77%). Existe representación de los cassette tipo I con 2 pulsotipos, y los tipos II, IVa y IVh, con sólo un pulsotipo cada uno (Fig. 49 y Tabla 29). El “esporádico 2” presenta un patrón de bandas no interpretable, siendo descrito como “no tipable”

A



B

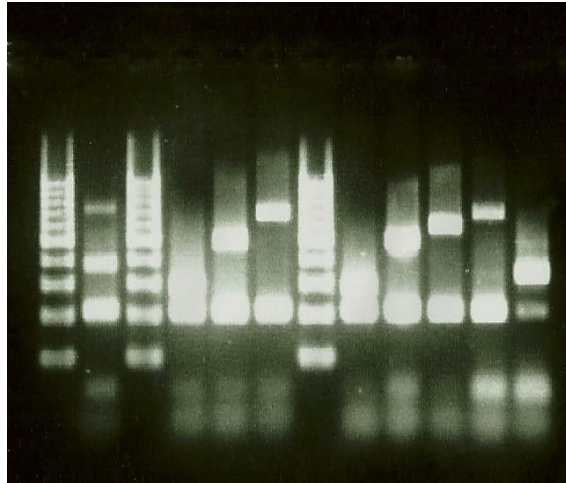


Figura 48. Geles de agarosa 2% en buffer TAE 1X. Electroforesis de productos de PCR múltiple para detección de tipos SCCmec. **A:** PCR múltiple para detección de SCCmec tipos I, II, III y IV (1: ladder; 2: tipo I; 3: ladder; 4: tipo II; 5: ladder; 6: control tipo I; 7: control tipo II; 8: control tipo III; 9: control tipo IV). **B:** PCR múltiple para subtipaje del cassette SCCmec IV (1: ladder; 2: no tipable; 3: ladder; 4: subtipo IVa; 5: subtipo IVc; 6: subtipo IVh; 7: ladder; 8: control subtipo IVa; 9: control subtipo IVc; 10: control subtipo IVd; 11: control subtipo 4h; 12: control tipo V)

Tipo SCCmec	Nº aislados	Pulsotipos
NO TIPABLE	1	esporádico 2
I	2	E17, esporádico
II	1	esporádico
IVa	1	esporádico
IVc	21	esporádicos 1 y 3, A1, E10, E16, E20, E7a, E7b, E8a, E8b, E19, y 10 patrones esporádicos distintos
IVh	1	E13
Total	27	

Tabla 29. Asociación entre tipo de SCCmec y genotipos SARM descritos por PFGE

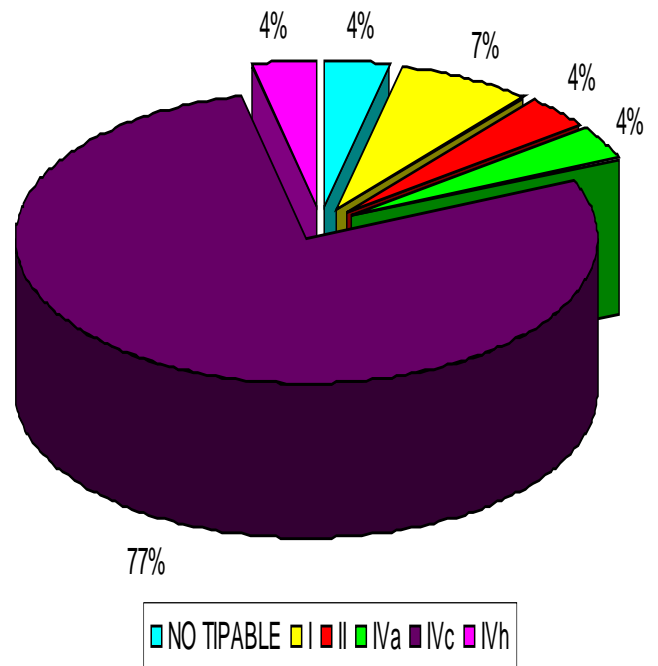


Figura 49. Distribución de los tipos de cassette SCCmec en los 27 pulsotipos distintos

4.4.6 ASOCIACIÓN ENTRE GENOTIPOS OBTENIDOS MEDIANTE DIFERENTES MÉTODOS DE TIPAJE

Pulsotipo	spa-tipo (n° aislados)	CC-BURP	MLST	eBURST	SCCMEC				
E8a	t002 (13)	CC067	ST125, ST5	CC5	IVc				
	t067 (10)								
	t045 (1)	CC1399	ST146						
	t1399 (1)								
E7b	t067 (9)	CC067	ST125, ST5						
	t2226 (2)								
	t6475 (1)	CC1399	ST146						
	t1399 (5)								
E7a	t067 (11)	CC067	ST125, ST5						
	t1399 (1)	CC1399	ST146						
E8b	t067 (7)	CC067	ST125, ST5						
	t6472 (1)	CC1399	ST146						
E10	t002 (4)	CC067	ST125, ST5	CC5					
	t067 (1)								
	t535 (1)	EXCLUDED		Sin correspondencia					
E20	t067 (4)	CC067	ST125, ST5	CC5	NO TIPABLE				
E16	t067 (1)								
Esporádico	t067 (1)								
Esporádico	t067 (1)								
Esporádico	t067 (1)								
Esporádico	t067 (1)								
Esporádico	t067 (1)								
Esporádico	t002 (1)								
Esporádico	t067 (1)								
Esporádico 2	t002 (3)								
Esporádico	t1818 (1)					CC1399	ST146		IVc
Esporádico	t109 (1)					SINGLETON			I
E17	t109 (1)								
Esporádico 1	t148 (3)	CC3	ST72	Sin correspondencia	IVc				
Esporádico	t148 (1)								
Esporádico	t7284 (1)	EXCLUDED		Sin correspondencia					
Esporádico 3	t008 (2)	SINGLETON		CC8					
A1	t008 (1)								
E19	t008 (1)								
E13	t032 (3)			CC22		IVH			
Esporádico	t012 (1)			CC30		II			
Esporádico	t127 (1)			Sin correspondencia		IVA			

Tabla 30. Asociación entre los resultados obtenidos por los métodos PFGE, spa typing, MLST, agrupación clonal CC-BURP y asignación eBURST. Los pulsotipos mayoritarios E8a, E8b, E7a y E7b, incluyen una gran variabilidad de tipos MLST y spa-tipos (incluso diferentes grupos clonales CC-BURP)

Grupo/s de Diversilab	Patrón/es de Diversilab	Pulsotipo (nº aislados)	Total aislados	
1	1	E20 (2)	38	
		E7a (10)		
		E7b (10)		
		E8a (5)		
		E8b (6)		
		Esporádico (1)		
		Esporádico (1)		
		Esporádico (1)		
		Esporádico (1)		
	2	2	E10 (3)	8
			E17 (1)	
			E8a (2)	
			E8b (1)	
			Esporádico (1)	
3	3	E10 (1)	2	
		E16 (1)		
4	4	E10 (1)	1	
2	5	E20 (1)	8	
		E7a (1)		
		E7b (5)		
		Esporádico (1)		
	6	6	E7a (1)	5
			E8a (3)	
			Esporádico (1)	
	7	7	E10	1
	8	8	E7b (2)	4
			E8a (2)	
3	9	Esporádico (1)	4	
		Esporádico 1 (3)		
	10	10	Esporádico (1)	1
	11	11	E13 (2)	2
12	12	E13 (1)	1	
4	13	A1 (1)	2	
		E19 (1)		
	14	14	Esporádico 3 (2)	2
15	15	Esporádico 2 (2)	3	
		E8a (1)		
16	16	E20 (1)	15	
		E8a (11)		
		E8b (1)		
		Esporádico (1)		
17	17	E8a (1)	2	
		Esporádico (1)		
18	18	Esporádico (1)	1	

Tabla 31. Asociación entre genotipos obtenidos por Diversilab y los obtenidos por PFGE. Se observa gran discordancia entre los resultados de ambos métodos

Grupo/s de Diversilab	Patrón/es Diversilab	spa-tipo (nº aislados)	CC-BURP	Total aislados
1	1	t067 (29)	CC067	38
		t1399 (7)	CC1399	
		t7284 (1)	EXCLUDED	
		t1818 (1)	CC1399	
	2	t535 (1)	EXCLUDED	8
		t067 (3)	CC067	
		t109 (2)	SINGLETON	
	3	t002 (2)	CC067	2
		t067 (1)	CC067	
	4	t002 (1)	CC067	1
t002 (1)		CC067	1	
2	5	t067 (6)	CC067	8
		t2226 (1)		
		t6475(1)		
	6	t1399 (1)	CC1399	5
		t002 (1)	CC067	
		t067 (3)	CC067	
7	t067 (1)	CC067	1	
	8	t067 (3)	CC067	4
		t2226 (1)		
3	9	t1346 (1)	CC3	4
		t127 (1)	SINGLETON	
		t148 (2)	CC3	
	10	t148 (1)	CC3	1
11	t032 (2)	SINGLETON	2	
	12	t032 (1)	SINGLETON	1
		t032 (1)	SINGLETON	1
4	13	t008 (2)	SINGLETON	2
	14	t008 (2)	SINGLETON	2
15	15	t002 (3)	CC067	3
	16	t002 (12)	CC067	15
		t067 (1)		
		t045 (1)	CC1399	
		t6472 (1)		
	17	t002 (2)	CC067	2
	18	t012 (1)	SINGLETON	1

Tabla 32. Asociación entre genotipos obtenidos por Diversilab y los obtenidos por *spa typing*. Los spa-tipos mayoritarios t002 y t067, se distribuyen en múltiples y distintos patrones de Diversilab.

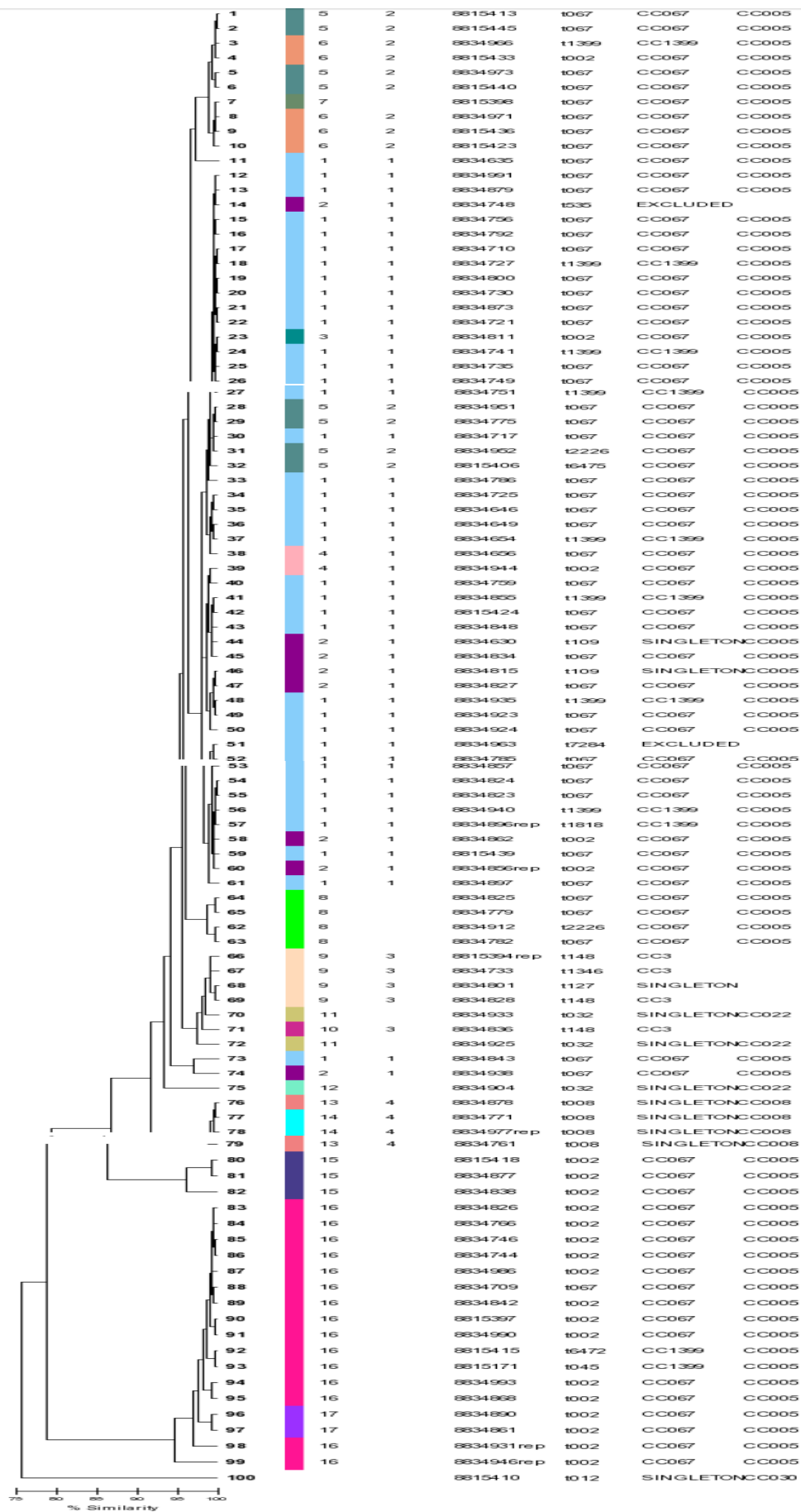


Figura 50. Asociación entre los resultados obtenidos con genotipaje por Diversilab, spa typing, CCBURP y eBURST. La figura muestra el dendrograma obtenido con *DiversiLab 3.4*. Columnas de izq. a derecha: n° de orden, patrón Diversilab (cada uno representado por un color), grupo Diversilab, n° identificativo del aislado, spa-tipo, CCBURP, eBURST

4.4.7 PODER DE CONCORDANCIA Y DISCRIMINACIÓN DE LOS MÉTODOS DE GENOTIPIFICACIÓN DE SARM.

Se calculan los valores de IS de los cuatro métodos de genotipaje ensayados. PFGE es el que mayor poder de discriminación presenta, seguido del rep-PCR/Diversilab, y el *spa-typing*. El CC-BURP presenta un valor de IS bastante bajo con respecto a los otros tres métodos (Tabla 33).

Método de genotipaje	Nº de cepas analizadas	Nº de tipos	Nº de cepas clasificadas en el tipo mayoritario	IS (IC 95%)
<i>DIV</i>	100	18	38	0,819 (0,757-0,881)
<i>spa typing</i>	100	17	47	0,726 (0,650-0,803)
<i>PFGE</i>	100	27	25	0,887 (0,850-0,923)
<i>CC-BURP</i>	100	5	72	0,460 (0,347-0,573)

Tabla 33. Poder de discriminación de cada método de genotipaje. IS: Índice de Diversidad de Simpson. IC: Intervalo de confianza. DIV: rep-PCR/Diversilab

En el análisis cuantitativo de concordancia, reflejado a través del Índice Ajustado de Rand (IR), se observa que el mayor valor se obtiene para las técnicas de *spa typing* y CC-BURP, seguido del obtenido entre el *spa typing* y rep-PCR/Diversilab. Por el contrario, estos métodos de *spa-typing* y rep-PCR/Diversilab, obtienen valores bastante discretos en su concordancia con la técnica de referencia, el PFGE (Tabla 34).

Método	Índice de Rand			
	PFGE	<i>spa typing</i>	CC-BURP	DIV
PFGE				
<i>spa typing</i>	0,136			
CC-BURP	0,094	0,486		
DIV	0,151	0,321	0,071	

Tabla 34. Concordancia entre los métodos de tipaje usando el coeficiente de Rand.

Los coeficientes obtenidos para el IW, que reflejan el poder de predecir, con los resultados de un método, los obtenidos en otro, son todos bastante bajos, con excepción del *spa typing* con respecto al CCBURP (lógico, pues este último no es más que una

agrupación clonal del primero). Así, los valores mostrados en la Tabla 35, reflejan que la capacidad de predecir los resultados de PFGE con las técnicas spa typing o rep-PCR/Diversilab, es prácticamente nula.

Método	Índice de Wallace (IC 95%)			
	PFGE	spa typing	CC-BURP	DIV
PFGE		0,269 (0,156-0,381)	0,477 (0,234-0,720)	0,206 (0,087-0,324)
spa typing	0,091 (0,033-0,149)		1,000 (1,000-1,000)	0,255 (0,098-0,411)
CC-BURP	0,052 (0,000-0,111)	0,321 (0,201-0,441)		0,042 (0,000-0,130)
DIV	0,119 (0,047-0,192)	0,435 (0,241-0,629)	0,224 (0,000-0,509)	

Tabla 35. Concordancia entre los métodos de tipaje usando el coeficiente de Wallace.

4.5 VARIABILIDAD GENÉTICA

4.5.1 VARIABILIDAD GENÉTICA DE SARM ENTRE LAS DIFERENTES AAM.

Los resultados de la distribución de los diferentes pulsotipos y su frecuencia, obtenida en cada una de las AAM, se resume en las Tablas 36 y 37, y se esquematiza geográficamente en los mapas de las Fig. 51 y 52..

ÁREA	PULSOTIPO (nº aislados)
HIC	E8a(7), E7a(2), E7b(2), E13(2), E10(2), ESP2(1), ESP1(1), ESP(1), ESP(1), ESP(1), ESP(1), ESP(1)
HSPA	E8a(8), E7b(3), E20(3), E8b (2), A1(1), E10(1), E17(1), ESP(1), ESP(1), ESP(1), ESP(1), ESP(1)
HDBV	E8a(6), E7b(5), E10(2), E7a(1), E16(1), ESP1(1), ESP(1)
HLLZ	E8b(3), E7a(3), E7b(2), ESP3(2), ESP2(1), ESP(1)
HM	E7a(4), E7b(1), E8a(1), E10(1), E20(1), ESP1(1), ESP(1)
HVP	E7b(3), E8a(2), E7a(2), E8b(1)
HCANM	E8a(1), E7b(1), E13(1), ESP2(1)
HCC	E8b(2), E19(1)

Tabla 36. Perfiles genotípicos (pulsotipos) SARM y número de aislados, obtenidos en cada una de las AAM. En negrita los pulsotipos mayoritarios

			pulsotipos minoritarios ($\leq 3\%$)	pulsotipos mayoritarios ($>3\%$)						Total	
				E20	E10	E7a	E7b	E8a	E8b		
AAM	<i>HCANM</i>	nº aislados	2	0	0	0	1	1	0	4	
		% del Área	50	0	0	0	25	25	0	100	
	<i>HCC</i>	nº aislados	1	0	0	0	0	0	0	2	3
		% del Área	33	0	0	0	0	0	0	67	100
	<i>HDBV</i>	nº aislados	3	0	2	1	5	6	0	0	17
		% del Área	18	0	12	6	29	35	0	0	100
	<i>HLLZ</i>	nº aislados	4	0	0	3	2	0	0	3	12
		% del Área	33	0	0	25	17	0	0	25	100
	<i>HVP</i>	nº aislados	0	0	0	2	3	2	1	0	8
		% del Área	0	0	0	25	38	25	13	0	100
	<i>HM</i>	nº aislados	2	1	1	4	1	1	0	0	10
		% del Área	20	10	10	40	10	10	0	0	100
	<i>HSPA</i>	nº aislados	7	3	1	0	3	8	2	0	24
		% del Área	29	13	4	0	13	33	8	0	100
	<i>HIC</i>	nº aislados	9	0	2	2	2	7	0	0	22
		% del Área	41	0	9	9	9	32	0	0	100
	Total	nº aislados	28	4	6	12	17	25	8	0	100
		% del Área	28	4	6	12	17	25	8	0	100

Tabla 37. Tabla de contingencia que muestra la distribución de los pulsotipos mayoritarios y minoritarios en las diferentes AAM. Para cada una se indica el número de aislados obtenido de cada pulsotipo, y el porcentaje que representa éste con respecto al total de aislados SARM obtenido en el AAM.

Fig. 51A

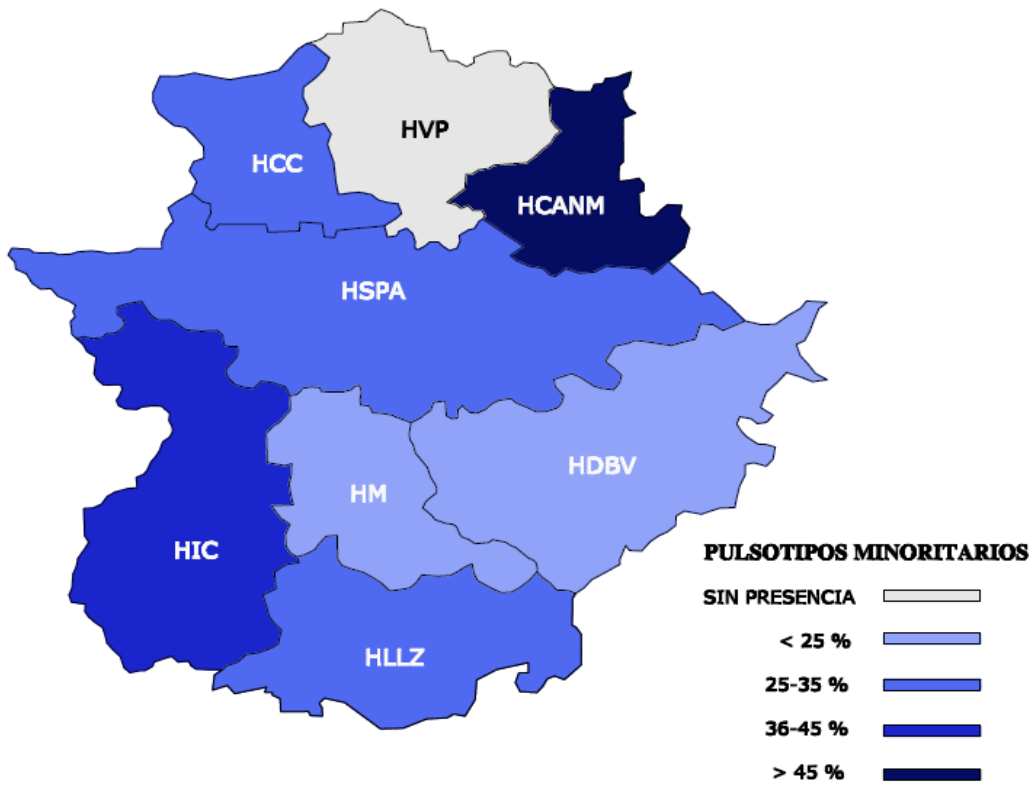


Fig. 51B

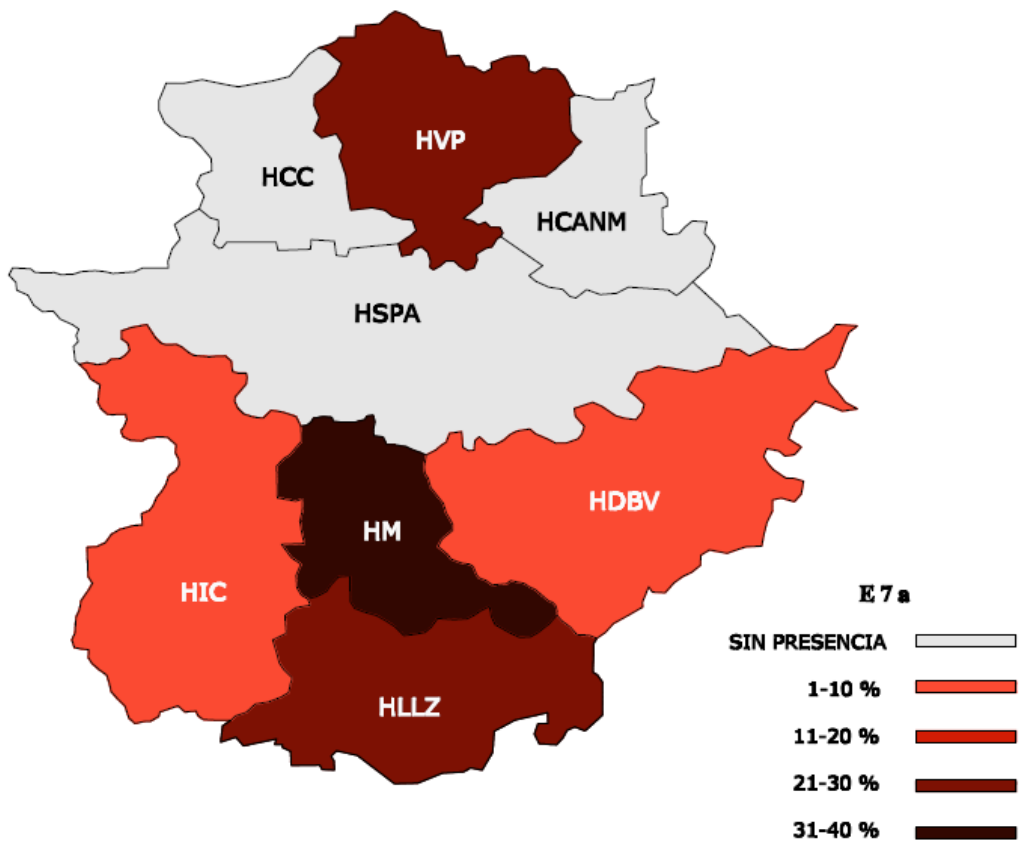


Fig. 51C

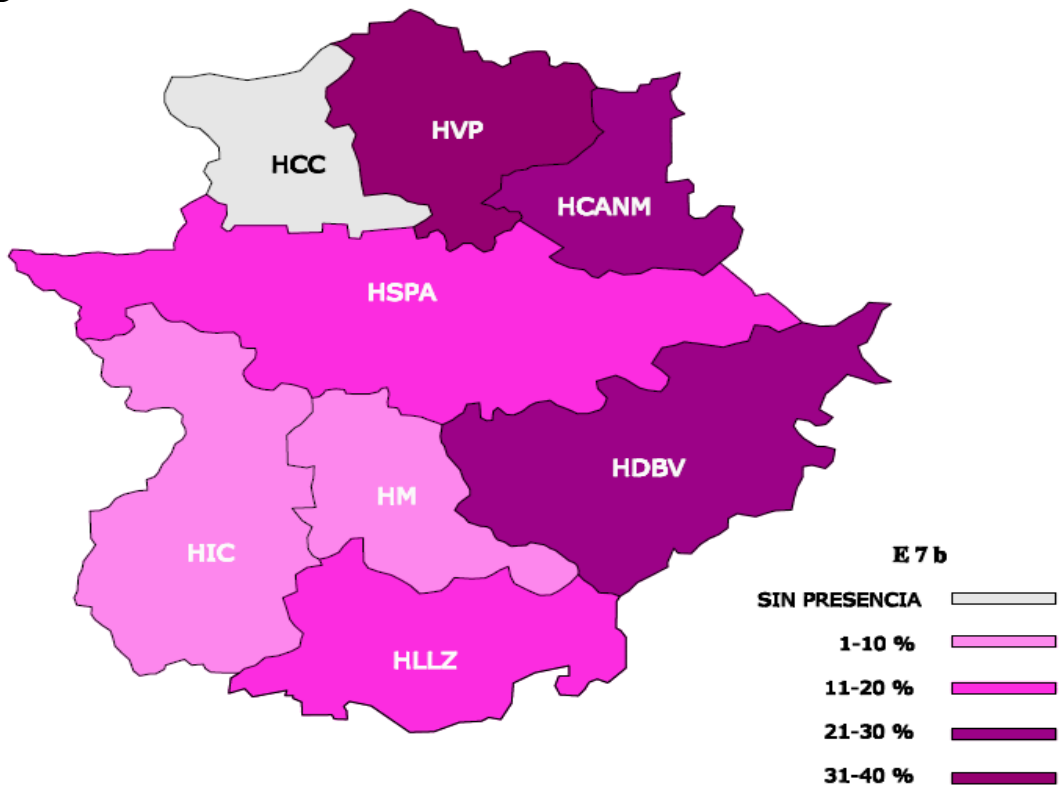


Fig. 51D

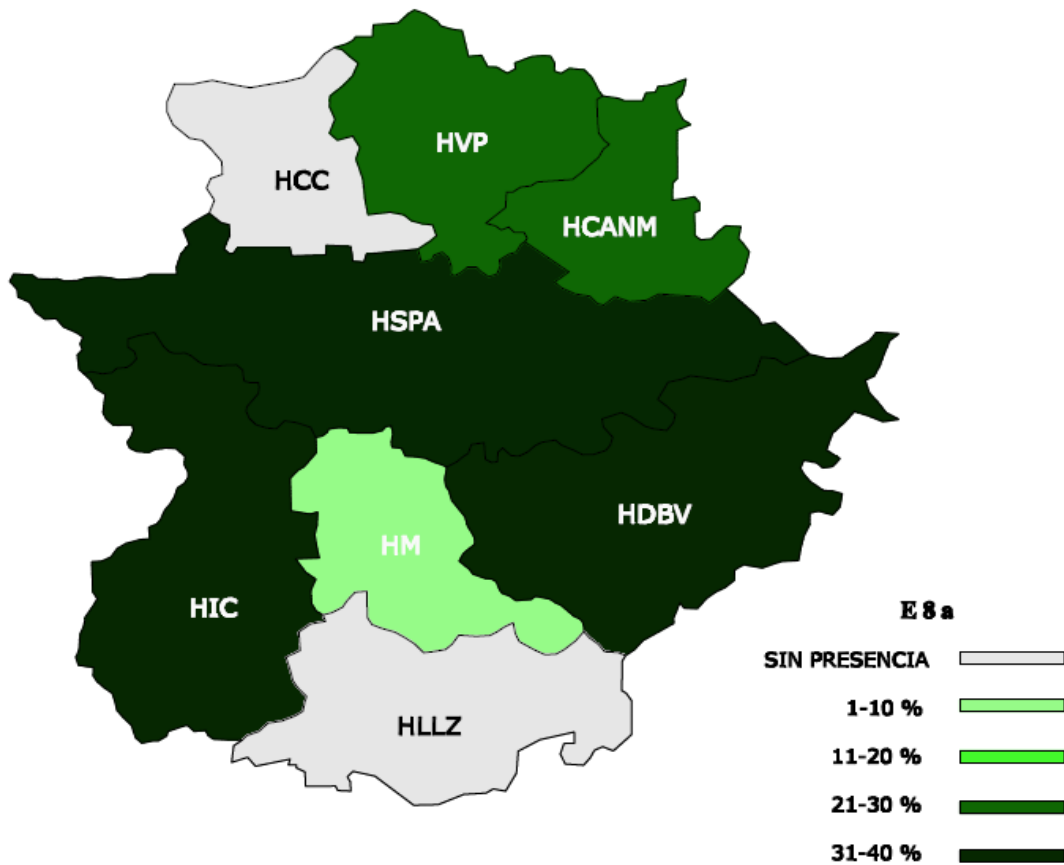


Fig. 51E

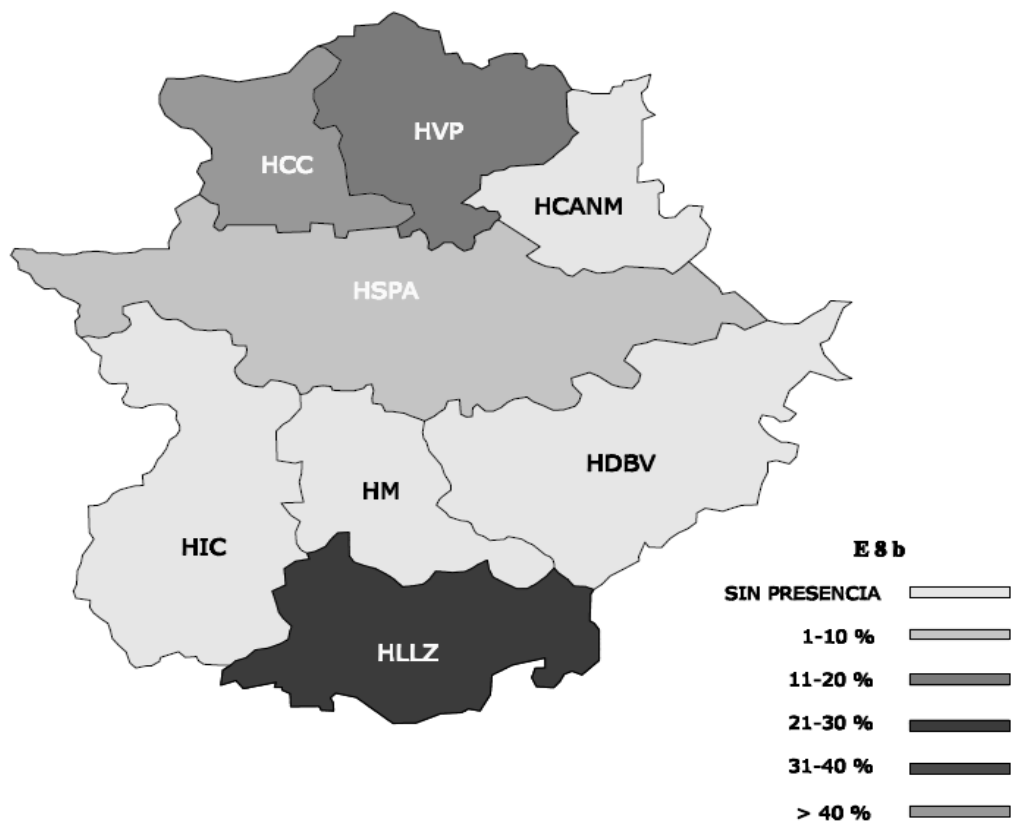


Fig. 51F

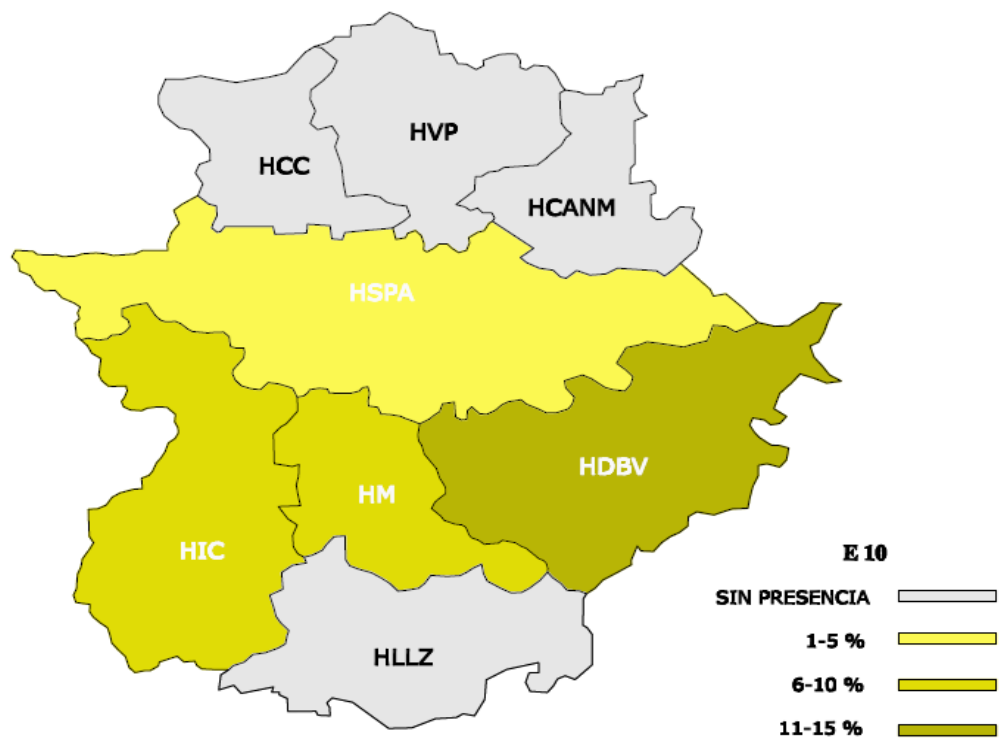


Fig. 51G

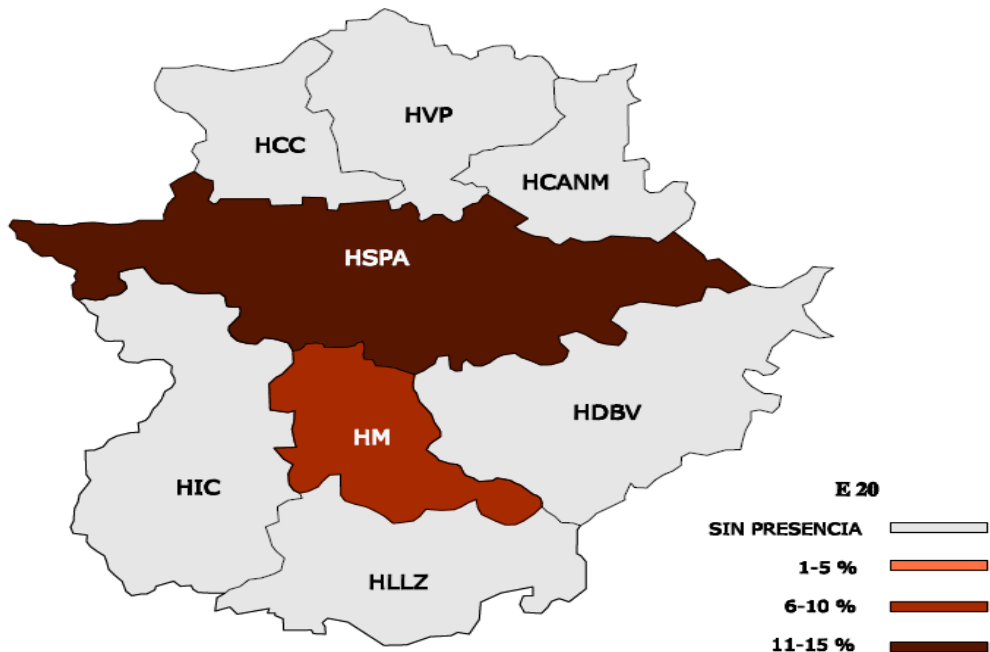


Figura 51. Mapas indicadores de los porcentajes de incidencia de cada pulsotipo mayoritario (**B**: E7a; **C**: E7b; **D**: E8a; **E**: E8b; **F**: E10; **G**: E20) y el conjunto de pulsotipos minoritarios (**A**), en cada AAM, con respecto al total de aislados de SARM en el AAM en concreto.

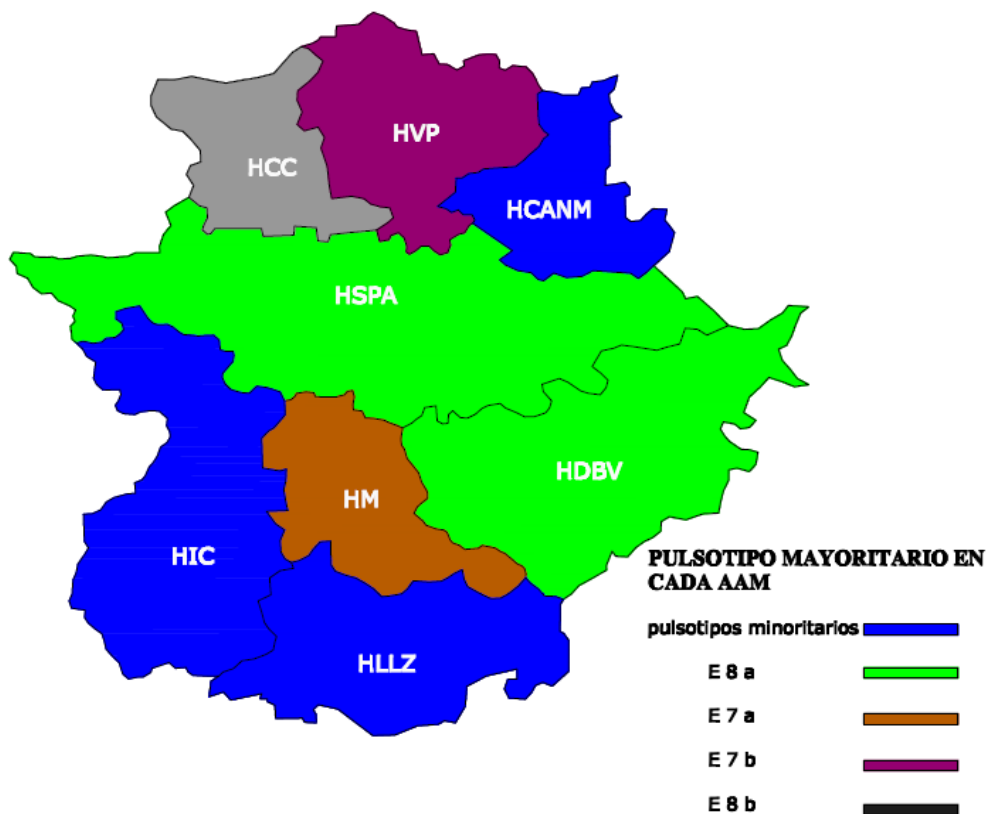


Figura 52. Pulsotipo predominante en cada AAM.

Según el estadístico Exacto de Fisher existen diferencias significativas ($p=0.001$) para la distinta distribución de genotipos existente entre las diferentes AAM; aunque al realizar el estudio post-hoc de comparación por pares entre las diferentes AAM por el método *False Discovery Rate* (FDR) (Benjamini y col., 1995), no se obtienen diferencias significativas entre ninguna de estas AAM. Sin embargo, la realización de esta comparación por pares con el estadístico Exacto de Fisher (menos ajustado que el FDR), demuestra algunas tendencias que conviene destacar:

- El perfil de genotipos obtenido en el área HIC es distinto de manera significativa a los obtenidos en el área HLLZ y HCC ($p=0.014$). En el área HIC existe un claro predominio del genotipo E8a (32%), perfil que no se encuentra en las áreas HLLZ y HCC. Por el contrario, es el perfil E8b en HCC (67%), y E8b (25%) y E7a (25%) en HLLZ, los genotipos predominantes.
- El perfil de genotipos obtenido en el área HSPA es distinto de manera significativa al obtenido en el área HVP ($p=0.005$). En el área HSPA el genotipo predominante de manera clara es el E8a (33%), mientras que en HVP es el tipo E7b el mayoritario (38%).
- El perfil de genotipos obtenido en el área HLLZ es distinto de manera significativa al obtenido en el área HDBV ($p=0.004$). En ésta última los tipos E8a y E7b son los predominantes, con un 35 y 29% de los aislados respectivamente; mientras que en HLLZ estos genotipos se sitúan por detrás de E7a y E8b que son los mayoritarios, englobando cada uno al 25% de los aislados.
- El perfil de genotipos obtenido en el área HCC es distinto de manera significativa al obtenido en el área HDBV ($p=0.018$). En el área HCC, el perfil dominante es claramente el E8b (67%), genotipo del que por el contrario no se ha clasificado ningún aislado en el área HDBV.

No se encuentran diferencias significativas entre los perfiles genotípicos de SARM obtenidos en las provincias de Cáceres y Badajoz ($p=0.215$).

4.5.2 VARIABILIDAD GENÉTICA TEMPORAL DE SARM

La Tabla 38 muestra la ocurrencia de los diferentes pulsotipos de SARM a lo largo del año 2010.

			perfiles minoritarios ($\leq 3\%$)	pulsotipos mayoritarios						Total
				E20	E10	E7a	E7b	E8a	E8b	
BLOQUE ESTACIONAL	1	nº aislados	13	2	1	4	5	8	1	32
		% del bloque	41	6	3	13	16	25	3	100
	2	nº aislados	9	1	3	4	4	7	1	28
		% del bloque	32	4	11	14	14	25	4	100
	3	nº aislados	6	0	1	2	2	6	3	20
		% del bloque	30	0	5	10	10	30	15	100
	4	nº aislados	4	1	1	2	6	4	3	20
		% del bloque	20	5	5	10	30	20	15	100
	Total	nº aislados	32	4	6	12	17	25	8	100
		% del bloque	32	4	6	12	17	25	8	100

Tabla 38. Perfiles genotípicos (pulsotipos) SARM y número de aislados, obtenidos en cada uno de los bloques estacionales: 1 (Enero, Febrero y Marzo), 2 (Abril, Mayo y Junio), 3 (Julio, Agosto y Septiembre), y 4 (Octubre, Noviembre y Diciembre).

Según el estadístico Exacto de Fisher ($p=0.793$), no se obtienen diferencias significativas en la ocurrencia de los pulsotipos mayoritarios y minoritarios de SARM, en los diferentes bloques estacionales, y por tanto, a lo largo del año de estudio.

4.5.3 RELACIÓN EXISTENTE ENTRE LOS PATRONES DE RESISTENCIA ANTIBIÓTICA Y LOS PERFILES GENOTÍPICOS

Dentro del conjunto de los 100 aislados SARM elegidos para genotipar, se obtuvieron unos ratios de sensibilidad para los antibióticos no específicos para la infección por SARM, que se resume en las Tablas 39 y 40. En la Fig. 53 podemos observar una representación de los perfiles de sensibilidad para estos mismos antibióticos, de los aislados pertenecientes a los pulsotipos mayoritarios.

Pulsotipo	n° total	GNT		TBM			LVF			ERT		CLN		QN	FOS		NTR	FUS		RIF		SXT	MUP	
		S	R	S	R	I	S	R	I	S	R	S	R	S	S	R	S	S	R	S	R	S	S	R
		%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
E8a	25	100	0	16	84	0	0	60	40	44	56	76	24	100	92	8	100	100	0	100	0	100	100	0
E7b	17	100	0	12	88	0	0	94	6	12	88	88	12	100	88	12	100	100	0	100	0	100	94	6
E7a	12	100	0	8	92	0	0	100	0	33	67	58	42	100	75	25	100	100	0	100	0	100	100	0
E8b	8	88	13	25	63	13	0	100	0	25	75	50	50	100	88	13	100	88	13	88	13	100	100	0
E10	6	100	0	17	83	0	0	50	50	33	67	83	17	100	100	0	100	100	0	100	0	100	83	17
E20	4	75	25	25	75	0	0	75	25	0	100	75	25	100	50	50	100	100	0	100	0	100	50	50
ESP 1	3	100	0	0	100	0	0	33	67	67	33	100	0	100	67	33	100	100	0	100	0	100	100	0
ESP 2	3	100	0	33	67	0	0	67	33	33	67	33	67	100	100	0	100	100	0	100	0	100	100	0
E13	3	100	0	100	0	0	0	100	0	100	0	100	0	100	100	0	100	100	0	100	0	100	100	0
ESP 3	2	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	100	100	100	0	100	100	0	100	0	100	100	0

Tabla 39. Porcentajes de sensibilidad y resistencia obtenidos para cada pulsotipo (con más de un aislado) en los antibióticos no específicos para la infección por SARM. GNT: Gentamicina, TBM: Tobramicina, LVF: Levofloxacino, ERT: Eritromicina, CLN: Clindamicina, QN: Quinupristina-Dalfopristina, FOS: Fosfomicina, NTR: Nitrofurantoina, FUS: Ácido Fusídico, RIF: Rifampicina, SXT: Trimetoprim-Sulfametoxazol, MUP: Mupirocina. En rojo, los porcentajes de resistencia y sensibilidad significativos.

Las pruebas de Chi-cuadrado de Pearson, determinan que existen diferencias significativas para los ratios de sensibilidad y resistencia entre los diferentes genotipos, solo en los antibióticos Gentamicina ($p=0.002$), Levofloxacino ($p=0.001$) y Mupirocina ($p=0.003$); aunque al realizar el estudio post-hoc de comparación por pares de genotipos por el método FDR, no se obtienen diferencias significativas entre ningún pulsotipo para estos tres antibióticos. Sin embargo, la realización de esta comparación por pares con el estadístico Exacto de Fisher (menos ajustado que el FDR), demuestra algunas tendencias a destacar en:

- Levofloxacino: el perfil con mayor número de aislados, E8a, y los perfiles ESP1 y E10, presentan un aumento del porcentaje de sensibilidad (40, 67, y 50% de aislados con sensibilidad intermedia, respectivamente) significativo con respecto a los perfiles E7b y E7a (E8a-E7b, $p=0.016$; E8a-E7a, $p=0.015$; ESP1-E7b= 0.029 ; ESP1-E7a, $p=0.029$; E10-E7b= 0.040 ; E10-E7a= 0.025).
- Mupirocina: el aumento del porcentaje de resistencia que presenta el genotipo E20 con respecto al obtenido en el resto de genotipos, resulta significativo con respecto al ratio de resistencia mostrado por E8a ($p=0.015$) y E7a ($p=0.050$).

Las diferencias entre los ratios de sensibilidad y resistencia entre los diferentes pulsotipos, resultan no significativas para el resto de antibióticos no específicos para SARM: Tobramicina (p=0.622), Eritromicina (p=0.150), Clindamicina (p=0.208), Fosfomicina (p=0.257), Ác.Fusídico (p=0.993), Rifampicina (p=0.993). Recordar que para Nitrofurantoina, Quinupristina/Dalfopristina y Trimetoprim-Sulfametoxazol, no se obtuvieron cepas resistentes.

Pulsotipo	nºtotal	GNT	TBM	LVF	ERT	CLN	QN	FOS	NTR	FUS	RIF	SXT	MUP
A1	1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
ESP	1	S	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ESP	1	S	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ESP	1	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
E19	1	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ESP	1	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
ESP	1	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
ESP	1	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S
ESP	1	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ESP	1	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
ESP	1	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
E16	1	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
ESP	1	S	R	I	R	S	S	S	S	S	S	S	S
ESP	1	R	R	I	R	S	S	S	S	S	S	S	R
ESP	1	S	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S
ESP	1	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	R
E17	1	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	R

Tabla 40. Porcentajes de sensibilidad y resistencia obtenidos en pulsotipos representados por un único aislado, para los antibióticos no específicos para la infección por SARM. Los colores representan diferentes patrones de resistencia antibiótica.

Dentro del conjunto de pulsotipos representados por un único aislado, obtenemos perfiles de sensibilidad muy variables (Tabla 40). Así encontramos desde genotipos sensibles a la gran mayoría de la batería de antibióticos no específicos para SARM, como los perfiles A1 (sólo resistente a Mupirocina) o E19 (sólo resistente a Tobramicina y Levofloxacino), hasta genotipos resistentes a gran parte de estos antibióticos, como E17 (resistente a Gentamicina, Tobramicina, Levofloxacino, Eritromicina, Clindamicina, Fosfomicina y Mupirocina).

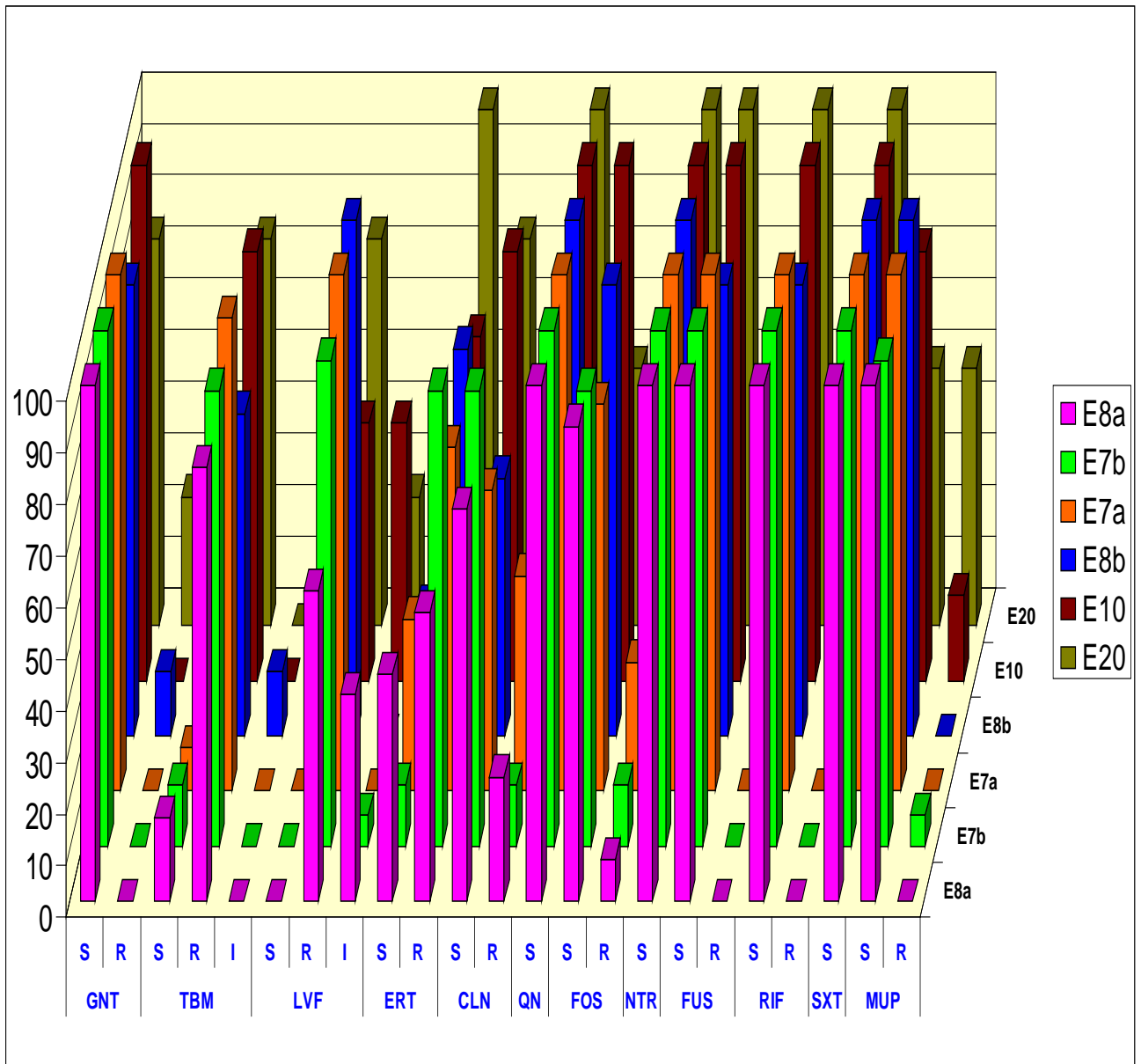


Figura 53. Porcentajes de sensibilidad y resistencia obtenidos para los perfiles mayoritarios, en los antibióticos no específicos para la infección por SARM.

Realizada la determinación para cada uno de los aislados SARM genotipados, de su CMI en relación a los antibióticos específicos para la infección por SARM (Vancomicina, Tigeciclina, Linezolid, Daptomicina) por el método E-test, se obtienen los resultados mostrados en las Tablas 41 y 42.

		TIGECICLINA	DAPTOMICINA	VANCOMICINA	LINEZOLID
ESP 3	N	2	2	2	2
	Mínimo	0,125	0,064	1,0	0,380
	Máximo	0,125	0,094	1,0	0,500
	Mediana	0,125	0,079	1,0	0,440
	Media	0,125	0,079	1,0	0,440
E10	N	6	6	6	6
	Mínimo	0,094	0,094	1,0	0,750
	Máximo	0,190	0,190	1,5	2,000
	Mediana	0,125	0,125	1,0	0,875
	Media	0,142	0,136	1,2	1,042
ESP 2	N	3	3	3	3
	Mínimo	0,125	0,125	1,0	0,750
	Máximo	0,250	0,190	1,5	1,500
	Mediana	0,125	0,125	1,0	1,000
	Media	0,167	0,147	1,2	1,083
E13	N	3	3	3	3
	Mínimo	0,190	0,094	0,8	0,750
	Máximo	0,190	0,094	1,0	1,000
	Mediana	0,190	0,094	1,0	1,000
	Media	0,190	0,094	0,9	0,917
E20	N	4	4	4	4
	Mínimo	0,190	0,064	1,5	0,500
	Máximo	0,190	0,250	2,0	0,750
	Mediana	0,190	0,142	1,5	0,625
	Media	0,190	0,150	1,6	0,625
E7a	N	12	12	12	12
	Mínimo	0,094	0,125	0,8	0,380
	Máximo	0,250	0,380	2,0	2,000
	Mediana	0,190	0,125	1,5	1,500
	Media	0,196	0,157	1,4	1,386
E7b	N	17	17	17	17
	Mínimo	0,125	0,064	0,8	0,750
	Máximo	0,380	0,250	2,0	2,000
	Mediana	0,250	0,125	1,5	1,500
	Media	0,263	0,153	1,4	1,426
E8a	N	25	25	25	25
	Mínimo	0,064	0,094	1,0	0,500
	Máximo	0,380	0,190	1,5	2,000
	Mediana	0,190	0,125	1,5	1,000
	Media	0,205	0,123	1,3	1,120
E8b	N	8	8	8	8
	Mínimo	0,125	0,094	1,5	0,750
	Máximo	0,380	0,250	2,0	2,000
	Mediana	0,220	0,190	1,5	1,500
	Media	0,236	0,177	1,6	1,469
ESP 1	N	3	3	3	3
	Mínimo	0,190	0,125	1,5	1,000
	Máximo	0,250	0,190	1,5	2,000
	Mediana	0,250	0,125	1,5	1,500
	Media	0,230	0,147	1,5	1,500

Tabla 41. Valores de parámetros estadísticos para cada uno de los genotipos representados por más de un aislado, en relación a la CMI (en µg/ml) obtenida por E-test para los antibióticos específicos para infección SARM. En rojo, las medias y medianas de CMI significativas.

	CMI (ug / ml)			
	TIGECICLINA	DAPTOMICINA	VANCOMICINA	LINEZOLID
A1	0,125	0,125	1	0,75
E16	0,25	0,19	1,5	2
E17	0,25	0,19	1,5	2
ESP	0,25	0,25	1,5	1,5
ESP	0,25	0,094	1	0,75
ESP	0,25	0,125	1,5	1,5
ESP	0,25	0,25	1,5	2
ESP	0,19	0,125	1,5	1
ESP	0,19	0,094	1	0,75
ESP	0,19	0,125	1,5	0,75
ESP	0,125	0,125	1	0,75
ESP	0,19	0,125	1	0,5
ESP	0,125	0,125	0,38	0,5
E19	0,125	0,125	1	0,38
ESP	0,25	0,125	1	2
ESP	0,25	0,094	1	0,75
ESP	0,19	0,125	1	0,5

Tabla 42. Valores de CMI para los antibióticos específicos para la infección por SARM, obtenidos para los pulsotipos representados por un único aislado.

Para valorar las diferencias entre las CMIs para vancomicina y tigeciclina existentes entre los diferentes perfiles genotípicos, se utilizó la prueba ANOVA, la cual confirma que esas diferencias son estadísticamente significativas (vancomicina, $p=0.004$; tigeciclina, $p=0.010$). Posteriormente se realizan pruebas post-hoc de Tukey, con las que se llevan a cabo comparaciones por pares de las CMIs de genotipos distintos, obteniéndose los siguientes resultados relevantes:

- Ningún genotipo mayoritario presenta una CMI para ninguno de los antibióticos específicos para SARM, significativamente más elevada con respecto a todos y cada uno de los otros genotipos mayoritarios
- El valor medio de la CMI para tigeciclina de los aislados del pulsotipo E7b ($0.263 \mu\text{g/ml}$), es significativamente más elevada que la presentada por los del pulsotipo E10 ($0.142 \mu\text{g/ml}$) ($p=0.008$)
- La media de la CMI para vancomicina de los aislados del pulsotipo E8b es mayor ($1.63 \mu\text{g/ml}$) de manera significativa, que la presentada por los pulsotipos E8a ($1.26 \mu\text{g/ml}$, $p=0.018$) y E10 ($1.17 \mu\text{g/ml}$, $p=0.030$).

Al calcular dentro de cada genotipo mayoritario, la proporción de aislados con CMI a vancomicina superior a $1 \mu\text{g/ml}$ (Tabla 43), y realizar un test Exacto de Fisher para comprobar si existen diferencias entre los diferentes pulsotipos mayoritarios en su

porcentaje de aislados con $CMI_{VANCOMICINA} > 1 \mu\text{g/ml}$, obtenemos que esas diferencias son significativas ($p=0.002$); aunque al realizar el estudio post-hoc de comparación por pares de genotipos por el método FDR, no se obtienen diferencias significativas entre ningún pulsotipo para los porcentajes de aislados con $CMI_{VANCOMICINA} > 1\mu\text{g/ml}$. Sin embargo, la realización de esta comparación por pares con el estadístico Exacto de Fisher, si encuentra significativa la diferencia del porcentaje de aislados con $CMI_{VANCOMICINA} > 1 \mu\text{g/ml}$ en el perfil E8b (100%) con respecto a los mostrados por E10 (33.3%; $p=0.015$), y el E8a (52%; $p=0.030$).

		CMI (ug/ml) Vancomicina	
		<1	>1
E10	nº (%)	4 (66,7)	2 (33,3)
	% total	4,0	2,0
E7a	nº (%)	2 (16,7)	10 (83,3)
	% total	2,0	10,0
E7b	nº (%)	4 (23,5)	13 (76,5)
	% total	4,0	13,0
E8a	nº (%)	12 (48)	13 (52)
	% total	12	13
E8b	nº (%)	0 (0)	8 (100)
	% total	0	8
E20	nº (%)	0 (0)	4 (100)
	% total	0	4
Perfiles minoritarios	nº (%)	17(60,7)	11 (39,3)
	% total	17	11
TOTAL	nº (%)	39 (39)	61 (61)
	% total	39	61

Tabla 43. Porcentaje de aislados con CMI a Vancomicina superior e inferior a $1\mu\text{g/ml}$, en cada uno de los genotipos mayoritarios.

Para valorar las diferencias entre las CMIs para Linezolid y Daptomicina existentes entre los diferente perfiles genotípicos mayoritarios, se utilizó la prueba Kruskal-Wallis, la cual determina que esas diferencias no son estadísticamente significativas para Daptomicina ($p=0.96$), aunque si lo son para Linezolid ($p=0.34$). Así, para este último, las comparaciones por pares realizadas por FDR, determinan que la CMI media para el pulsotipo E20 es significativamente menor ($0.63 \mu\text{g/ml}$) que la obtenida para los perfiles E7a ($1.39 \mu\text{g/ml}$, $p=0.05$), E7b ($1.43\mu\text{g/ml}$, $p=0.038$), y E8b ($1.47 \mu\text{g/ml}$, $p=0.038$).

4.5.4 ASOCIACIÓN ENTRE GENOTIPOS Y TIPO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS EN LAS QUE SE AISLAN.

Se realiza un estudio estadístico que informe acerca de si el aislamiento de alguno de los genotipos SARM mayoritarios descritos, se pueda relacionar de manera significativa con algún tipo de muestra biológica concreta, y por lo tanto, podamos asociar ese pulstotipo con una aivez particular de éste hacia algún lugar concreto de infección.

		TIPO MUESTRA				Total
		EXUDADO	HEMOCULTIVO	ORINA	RESPIRATORIA	
perfiles minoritarios	nº (%)	8 (28,6)	10 (35,7)	5 (17,9)	5 (17,9)	28 (100)
E10	nº (%)	3 (50%)	2 (33,3)	1 (16,7)	0 (0)	6 (100)
E7a	nº (%)	3 (25)	1 (8,3)	2 (16,7)	6 (50)	12 (100)
E7b	nº (%)	7 (41,2)	4 (23,5)	3 (17,6)	3 (17,6)	17 (100)
E8a	nº (%)	7 (28)	3 (12)	4 (16)	11 (44)	25 (100)
E8b	nº (%)	2 (25)	3 (37,5)	2 (25)	1 (12,5)	8 (100)
E20	nº (%)	1 (25)	0 (0)	2 (50)	1 (25)	4 (100)
Total	nº (%)	31 (31)	23 (23)	19 (19)	27 (27)	100 (100)

Tabla 44. Resultados extraídos de la tabla de contingencia que relaciona los cuatro tipos de muestras biológicas más frecuentes (exudados, hemocultivos, orina y muestras respiratorias) con los seis genotipos SARM mayoritarios

Los pulstotipos E10 y E7b se aíslan mayoritariamente en muestras de exudados; E8b y E20 lo hacen en hemocultivos y orina, respectivamente; y las muestras respiratorias es el tipo de muestra donde más frecuentemente se aíslan los SARM con genotipo E7a y E8a. A pesar de todo esto, no existen diferencias significativas entre los diferentes pulstotipos y el tipo de muestra en la cual se aíslan, según los resultados obtenidos en las comparaciones por pares de pulstotipos, realizadas con el estadístico Exacto de Fisher. Por tanto, no se puede asociar ninguno de los genotipos más frecuentes a un lugar concreto de infección, ni a un tipo concreto de muestra biológica en la que aislarlo.

4.5.5 DISTRIBUCIÓN DE GENOTIPOS SARM SEGÚN EL ENTORNO DE AISLAMIENTO (INTRAHOSPITALARIO O EXTRAHOSPITALARIO).

Se realiza un estudio estadístico que informe acerca de si la ocurrencia de alguno de los genotipos SARM mayoritarios descritos, se pueda asociar de manera significativa con el ambiente intrahospitalario o extrahospitalario.

		ADQUISICION		Total
		Extrahospitalario	Intrahospitalario	
perfiles minoritarios	n° (%)	6 (21,4)	22 (78,6)	28
E10	n° (%)	4 (66,7)	2 (33,3)	6
E7a	n° (%)	5 (41,7)	7 (58,3)	12
E7b	n° (%)	7 (41,2)	10 (58,8)	17
E8a	n° (%)	7 (28)	18 (72)	25
E8b	n° (%)	3 (37,5)	5 (62,5)	8
E20	n° (%)	3 (75)	1 (25)	4
Total	n° (%)	35 (35)	65 (65)	100

Tabla 45. Resultados extraídos de la tabla de contingencia que relaciona el entorno con los seis genotipos SARM mayoritarios.

Se observa que existe una mayoría de genotipos donde los aislados de origen intrahospitalario son más frecuentes. Estos son E7a, E7b, E8a, E8b, y el conjunto de pulsotipos minoritarios, genotipos que además son los cuatro más numerosos. Por el contrario, solo en dos genotipos, E10 y E20, son mayoría los aislados de origen extrahospitalario. A pesar de todo esto, no existen diferencias significativas entre los tipos de genotipo SARM y el porcentaje de aislados Extrahospitalario e Intrahospitalario, según los resultados obtenidos en las comparaciones por pares de pulsotipos, realizadas con el estadístico Exacto de Fisher. Por lo tanto no podemos asociar ningún pulsotipo en concreto con los caracteres intrahospitalarios o extrahospitalarios de la infección que provocan.

4.6 CARACTERÍSTICAS DE LOS AISLADOS SARM PROCEDENTES DE HEMOCULTIVOS.

4.6.1 CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS

Durante el año 2010, se aíslan en Extremadura 29 SARM procedentes de muestras de hemocultivo, hecho que representa el 9.4% con respecto a global de SARM aislados en todo tipo de muestras biológicas (n= 309) (ver apartado 4.1, Fig. 32)

El mayor número de bacteriemias por SARM durante el año 2010 en Extremadura, se dió durante los meses de Marzo, Abril y Mayo (Bloque 2), con el 34.5% de los casos. Por el contrario, con el 13.8%, los meses de Octubre, Noviembre y Diciembre (Bloque 4), es el periodo donde la ocurrencia de bacteriemias por SARM fue menor (Tabla 46).

BLOQUES ESTACIONALES	nº	AISLADOS SARM PROCEDENTES DE HC	
		% *	% **
1	8	27,6	2,6
2	10	34,5	3,3
3	7	24,1	2,3
4	4	13,8	1,3

Tabla 46. Distribución de aislados SARM procedentes de hemocultivos según el bloque estacional.

% *: porcentaje con respecto al total de aislados de hemocultivo. % **: porcentaje con respecto al total de aislados SARM. HC: hemocultivo.

El AAM donde mayor número de aislamientos SARM de hemocultivos se contabiliza es en HSPA, con un total de 8 aislados, representando el 27.6% de todas las bacteriemias por SARM dadas en Extremadura en el año 2010. Sin embargo, es el AAM de HCANM, donde se registra el mayor porcentaje de SARM procedentes de hemocultivo con respecto al resto de tipo de muestras biológicas, con un 33.3% (3 de un total de 9 aislados) (Tabla 47).

La bacteriemia por SARM presenta una incidencia superior en varones que en mujeres, con un 58.3% frente a un 41.7%, respectivamente.

		AISLADOS SARM PROCEDENTES DE HC	
AAM	nº	% *	% **
HCANM	3	10,3	33,3
HDBV	5	17,2	9,4
HLLZ	4	13,8	10,5
HVP	4	13,8	14,8
HM	1	3,4	3,4
HSPA	8	27,6	12,1
HIC	4	13,8	5,9
HCC	0	0	0

Tabla 47. Distribución de aislados SARM procedentes de hemocultivos según el AAM. % *: porcentaje con respecto al total de aislados de hemocultivo. % **: porcentaje que representan los aislados de hemocultivo con respecto a aquellos procedentes de otras muestras biológicas, dentro del AAM. HC: hemocultivo.

El carácter intrahospitalario de la infección sanguínea por SARM, resulta claramente dominante sobre la adquisición extrahospitalaria (85.7% frente al 14.3%).

Correlacionando con la tendencia ya observada en el análisis con el total de aislados, la incidencia de la bacteriemia por SARM es claramente predominante en el grupo de edad a partir de los 64 años, con el 85.7% de los casos. Con respecto al resto de muestras biológicas, también es en este grupo donde los hemocultivos representan un mayor porcentaje (10.8%) (Tabla 48).

		AISLADOS SARM PROCEDENTES DE HC	
GRUPO DE EDAD	nº	% *	% **
0-2 años	1	3,6	100,0
3-10 años	0	0,0	0,0
11-18 años	0	0,0	0,0
19-39 años	1	3,6	6,3
40-64 años	2	7,1	5,0
> 64 años	24	85,7	10,8

Tabla 48. Distribución de aislados SARM procedentes de hemocultivos según el Grupo de Edad. % *: porcentaje con respecto al total de aislados de hemocultivo. % **: porcentaje que representan los aislados de hemocultivo con respecto al resto de muestras biológicas, dentro del Grupo de Edad. HC: hemocultivo

4.6.2 SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA

Los resultados sobre los ratios de resistencia y sensibilidad a los antibióticos no específicos para una infección por SARM, mostrados por los aislados procedentes de muestras de hemocultivo, se indican en la Tabla 49.

ANTIBIÓTICOS NO ESPECÍFICOS PARA SARM	AISLADOS SARM PROCEDENTES DE HC nº (%)		
	S	I	R
GENTAMICINA	29 (100)	0 (0)	0 (0)
TOBRAMICINA	12 (41,4)	0 (0)	17 (58,6)
LEVOFLOXACINO	0 (0)	10 (34,5)	19 (65,5)
ERITROMICINA	14 (48,3)	0 (0)	15 (51,7)
CLINDAMICINA	24 (82,8)	0 (0)	5 (17,2)
QUINUPRISTINA / DALFOPRISTINA	29 (100)	0 (0)	0 (0)
FOSFOMICINA	28 (96,6)	0 (0)	1 (3,4)
NITROFURANTOÍNA	28 (96,6)	1 (3,4)	0 (0)
ÁC. FUSÍDICO	29 (100)	0 (0)	0 (0)
RIFAMPICINA	29 (100)	0 (0)	0 (0)
TRIMETOPRIM / SULFAMETOXAZOL	29 (100)	0 (0)	0 (0)
MUPIROCINA	28 (96,6)	0 (0)	1 (3,4)

Tabla 49. Patrones de sensibilidad de los aislados SARM responsables de bacteriemias, con respecto a los antibióticos no específicos para infección por SARM. HC: hemocultivo.

Todos los aislados SARM productores de bacteriemia en Extremadura, son sensibles a Gentamicina, Quinupristina / Dalfopristina, Ác. Fusídico, Rifampicina y Trimetoprim / Sulfametoxazol. Además, la gran mayoría (salvo un único aislado como excepción) son sensibles también a Fosfomicina, Nitrofurantoína y Mupirocina. Paralelamente a lo reflejado para la totalidad de aislados SARM, los responsables de bacteriemias también presentan los mayores ratios de resistencia para los antibióticos Tobramicina (58,6%), Levofloxacino (65,5%) y Eritromicina (51,7%).

La distribución de los valores de CMI para los antibióticos específicos para la infección por SARM, en el grupo de SARM procedentes de hemocultivos, se refleja en la Fig. 54 y Tabla 50.

	CMI (ug/ml)	AISLADOS SARM PROCEDENTES DE HC (%)	Mediana	Media
Tigeciclina	0,094	3,4	0,19	0,186
	0,125	24,1		
	0,19	31		
	0,25	34,5		
	0,38	6,9		
Daptomicina	0,064	6,9	0,125	0,146
	0,094	31		
	0,125	31		
	0,19	20,7		
	0,25	10,3		
Vancomicina	0,5	3,4	1	1,176
	0,75	10,3		
	1	34,5		
	1,5	48,3		
	2	3,4		
Linezolid	0,38	6,9	0,75	0,96
	0,5	3,4		
	0,75	24,1		
	1	41,4		
	1,5	10,3		
	2	13,8		

Tabla 50. Distribución de los valores de CMI para los antibióticos específicos para la infección por SARM, en el grupo de aislados procedentes de hemocultivos

La distribuciones de CMIs para Vancomicina, Tigeciclina, Daptomicina y Linezolid, de los aislados de hemocultivos, presentan algunas diferencias con respecto a las que obtenemos si tenemos en cuenta todos los aislados SARM (independientemente del tipo de muestra). Estas diferencias se confirman estadísticamente significativas en los casos de Tigeciclina, Daptomicina, y Linezolid (Chi-cuadrado de Pearson: $p= 0.002$; $p= 0.000$; $p= 0.000$; respectivamente). En el caso de Tigeciclina, esas diferencias se centran en que existe un mayor número de aislados para valores más altos de CMI (0.25 y 0.38 $\mu\text{g/ml}$), en el conjunto de aislados de hemocultivos, que en el conjunto del total (Fig. 54A). De la misma manera ocurre para Linezolid, donde se observa un mayor número de aislados para valores altos de CMI (1 y 2 $\mu\text{g/ml}$) en el conjunto de SARM productores de bacteriemias, que en el conjunto total (Fig. 54B). Por el contrario, en Daptomicina, la diferencia estriba en mayor número de aislados para valores más bajos de CMI (0.047, 0.064 y 0.094 $\mu\text{g/ml}$), en el conjunto de aislados de hemocultivos, que en el conjunto del total (Fig. 54D).

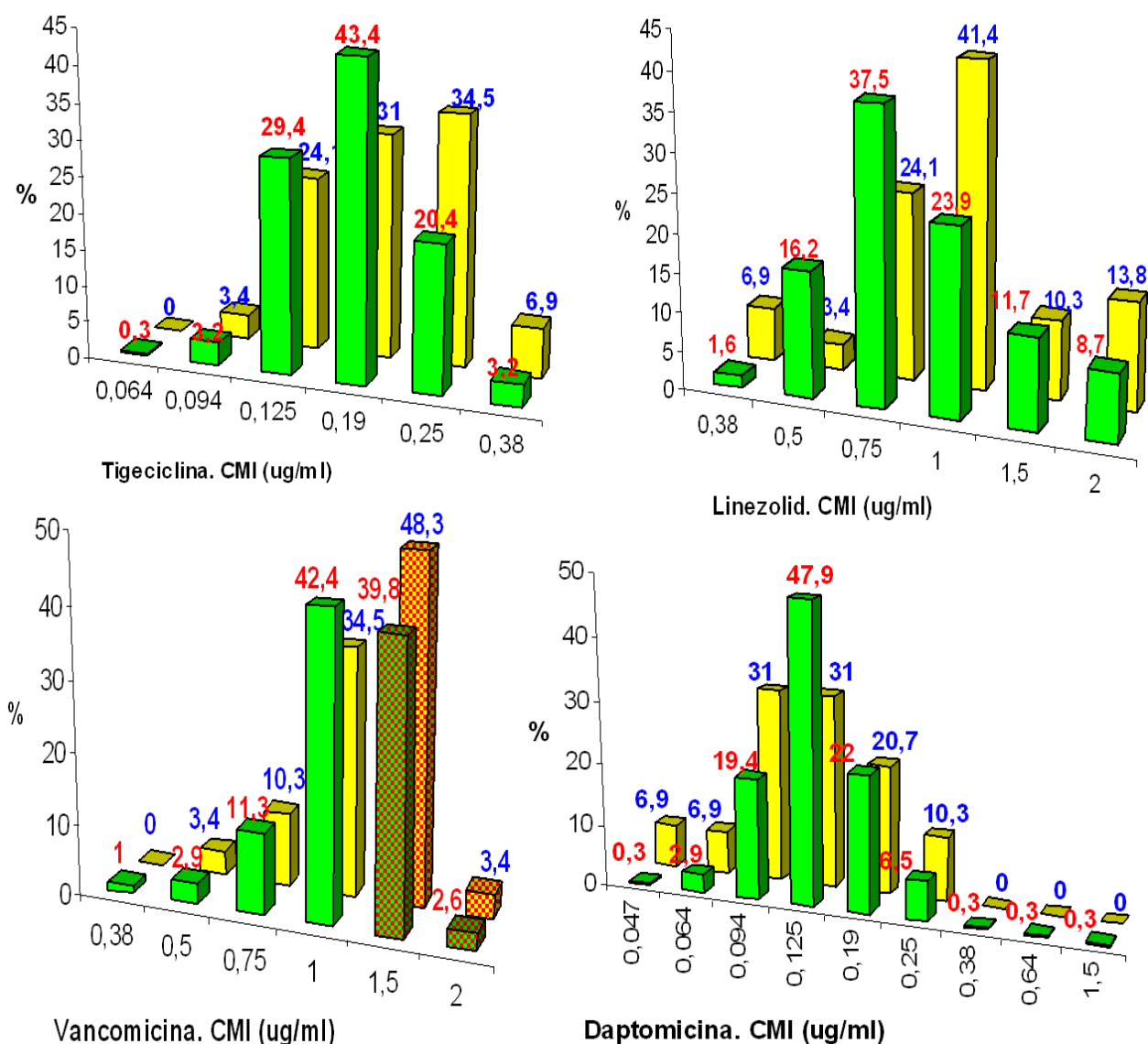


Figura 54. Distribución de los valores de CMI obtenidos para los antibióticos específicos para infección por SARM, en los aislados SARM procedentes de hemocultivos (barras amarillas y porcentajes en azul) frente al conjunto total de aislados (barras verdes y porcentajes en rojo). En la figura de vancomicina el arlequinada rojo corresponde a aquellas CMIs >1 µg/ml, para las que se han descrito fracasos terapéuticos.

Para vancomicina, a pesar de que las diferencias de CMIs entre los dos conjuntos resultan no significativas, destaca el aumento del porcentaje de aislados con CMI > 1 µg/ml, que se observa en el conjunto de SARM procedentes de hemocultivos. Éste es de 51,7%, frente al 42,4% que se obtenía con el conjunto total de aislados (Fig. 54C).

A través del ensayo de Macrométodo (MET), no se obtiene ninguna cepa SARM procedente de hemocultivo con resistencia heterogénea a vancomicina (h-VISA). La CMI > 8 mg/l obtenida para la cepa patrón Mu3 (*Staphylococcus aureus* ATCC 700698) valida la técnica utilizada.

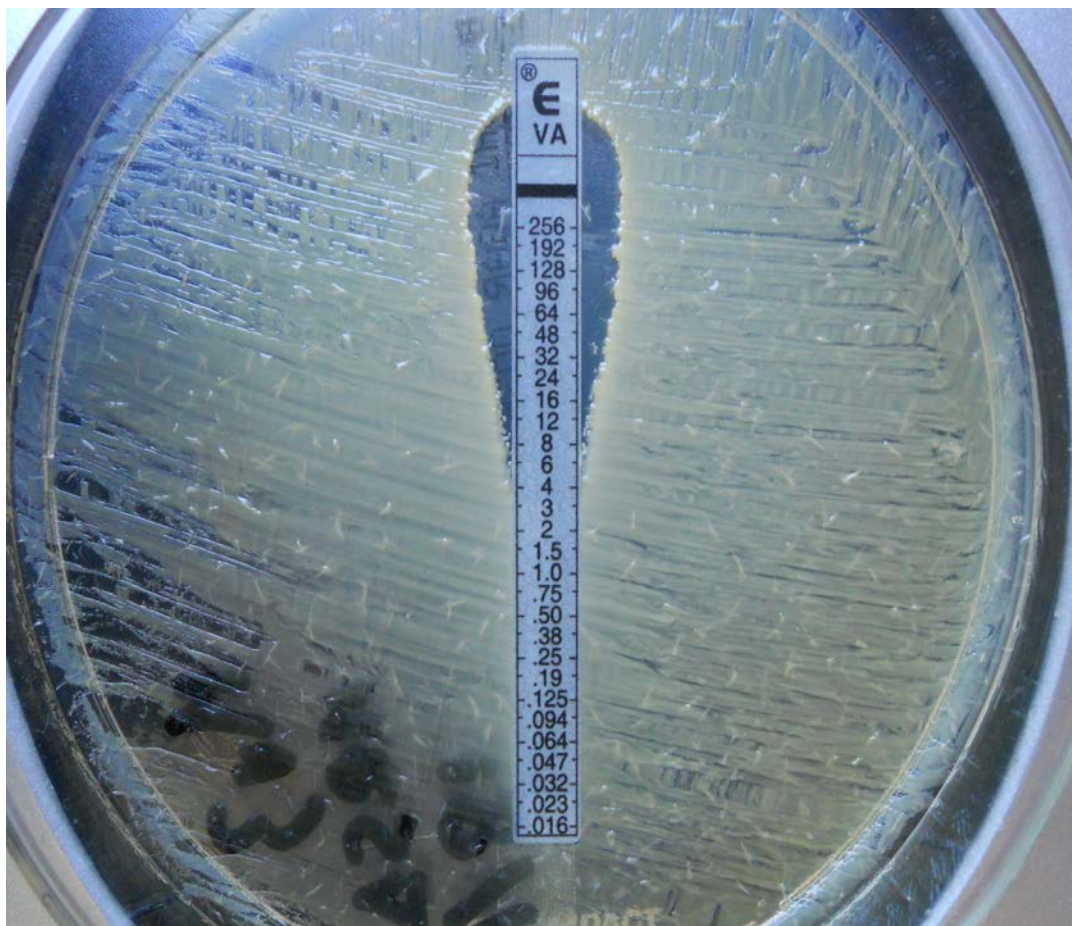


Figura 55. Resultado positivo (CMI > 8 mg/l) obtenido en el ensayo de Macrométodo para la cepa h-VISA Mu3

4.6.3 DISTRIBUCIÓN GENOTÍPICA Y FAGOTÍPICA

En el conjunto de SARM aislados de muestras de hemocultivo, los genotipos obtenidos y las frecuencias relativas, son prácticamente idénticos a los encontrados en el conjunto total de aislados. Tal es así, que E7b, E8a y E8b, son los pulsotipos mayoritarios. Por extensión, el ST125 y el cassette IVc serían los genotipos mayoritarios, por los métodos MLST y SCCmec, respectivamente. El grupo 1 del método rep-PCR/Diversilab (formado por los aislados correspondientes a los patrones 1 y 2), es el más frecuente. t067 y t002 son los spa-tipos más representativos. Además CC067 y CC005, determinados por CCBURP y eBURST respectivamente, son con diferencia los grupos clonales predominantes (Tabla 51).

	GENOTIPO (nº aislados)
PFGE	E7b (4), E8a (3), E8b (3), E10 (2), E13 (2), ESP1 (2), ESP3 (1), ESP2 (1), E7a (1), ESP (1), ESP (1), ESP (1), ESP (1)
PATRÓN rep-PCR/DIVERSILAB	1 (6), 2 (3), 5 (3), 9 (2), 16 (2), 17 (2), 8 (1), 11 (1), 12 (1), 14 (1), 15 (1)
Spa type	t067 (8), t002 (6), t032 (2), t148 (2), t008 (1), t1399 (1), t2226 (1), t535 (1), t818 (1)
CC BURP	CC067 (15), SINGLETON (3), CC1399 (2), CC3 (2), EXCLUDED (1)
eBURST	CC005 (17), CC022(2), CC008 (1)

Tabla 51. Resumen de genotipos representados y su frecuencia, en el conjunto de aislados SARM procedentes de muestras de hemocultivo

En el análisis de los resultados en el fenotipaje por fagotipia de los SARM productores de bacteremias, el 60.9% de los aislados quedan como no tipables. El primer fagotipo que se describe como mayoritario es el III, con el 17.4% de los casos. Con menor ratio se encuentran los fagotipos 81 y Mixto con el 8.7% de los aislados. Minoritario es el tipo I, solo con el 4.3% de los SARM procedentes de hemocultivos.

4.7 CARACTERÍSTICAS DEL SARM PRODUCTOR DE INFECCIONES EXTRAHOSPITALARIAS EN EXTREMADURA

4.7.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS

Además de la descripción que se lleva a cabo en el apartado 4.1.3 sobre la distribución de la infección extrahospitalaria frente a la intrahospitalaria de SARM en las distintas AAM de Extremadura, en este punto además señalamos algunas diferencias entre ambos grupos de aislados con respecto a algunas características demográficas tales como la edad (Tabla 52), el sexo (Fig. 55) o el tipo de muestra de aislamiento (Fig. 56).

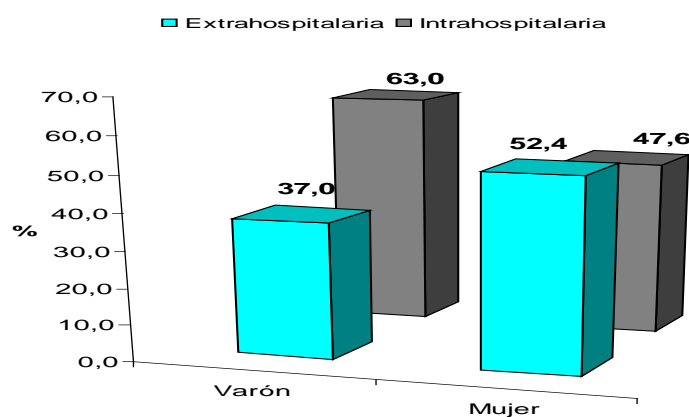


Figura 56. Porcentajes de SARM de adquisición intrahospitalaria y extrahospitalaria en cada sexo.

La frecuencia de aislados SARM causante de infección extrahospitalaria resulta mayor de manera estadísticamente significativa ($p=0.025$ – Exacto de Fisher), que la encontrada en varones. No en vano, la incidencia de la infección intrahospitalaria en varones prácticamente dobla a la extrahospitalaria, mientras que esta última es ligeramente predominante en las mujeres.

TIPO DE MUESTRA	ADQUISICIÓN (%)		nº aislados
	Extrahospitalario	Intrahospitalario	
0-2 años	66,7	33,3	3
3-10 años	66,7	33,3	3
11-18 años	75,0	25,0	4
19-39 años	57,1	42,9	38
40-65 años	44,7	55,3	38
>65 años	42,5	57,5	193

Tabla 52. Porcentajes de SARM de adquisición intrahospitalaria y extrahospitalaria en cada grupo de edad.

A pesar de observar en la Tabla 52 que el SARM extrahospitalario es predominante en la infancia, adolescencia y adultos hasta 40 años, el bajo número de aislados descritos en estas edades, con respecto al enorme número de casos descritos en mayores de 65 años (donde la infección intrahospitalaria es mayoritaria), hace que las diferencias encontradas entre los grupos de edad resulten no significativas ($p=0,573$ – Exacto de Fisher).

Dentro de los cuatro tipos de muestra más relevantes, se encuentra que existe una mayor frecuencia de SARM de carácter intrahospitalario frente al extrahospitalario dentro del conjunto de aislados procedentes de hemocultivos y muestras respiratorias, de manera estadísticamente significativa, ($p=0,000$ y $p=0,007$ – Exacto de Fisher).

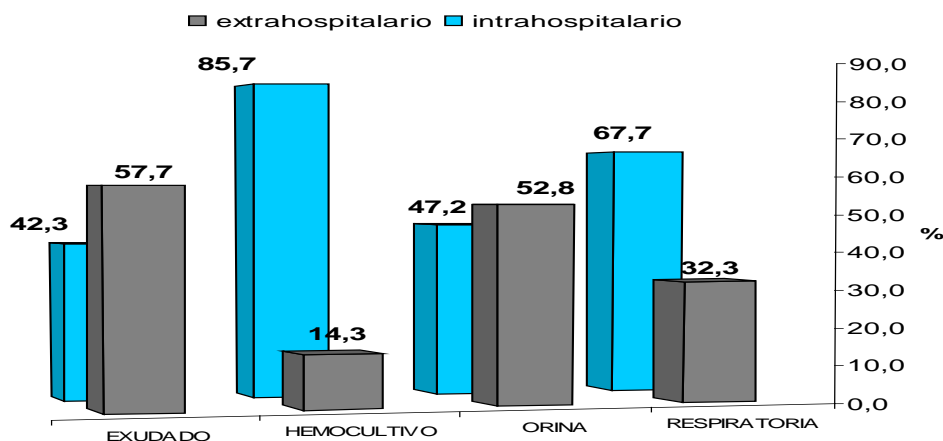


Figura 57. Porcentajes de SARM de adquisición intrahospitalaria y extrahospitalaria en cada tipo de muestra SARM.

4.7.2 SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA

La comparativa de resultados de ratios de resistencia para los antibióticos no específicos para infección por SARM, de los aislados de carácter extrahospitalario, en relación a los obtenidos para los catalogados como intrahospitalarios, se muestran en la Fig. 57. Se observa como para todos los antibióticos, los porcentajes de resistencia son muy similares entre los dos tipos de SARM. Tal es así, que para ninguno de estos antibióticos se encuentran diferencias estadísticamente significativas de los porcentajes de resistencia antibiótica, del conjunto de aislados extrahospitalarios frente al de intrahospitalarios (Gentamicina, $p= 0.580$; Tobramicina, $p= 0.281$; Levofloxacina, $p= 0.343$; Eritromicina, $p= 0.269$; Clindamicina, $p= 0.768$; Fosfomicina, $p= 0.540$; Nitrofurantoina, $p=1.000$; Ac. Fusídico, $p= 0.200$; Rifampicina, $p= 0.773$; Trimetoprim/Sulfametoxazol, $p= 0.328$; Mupirocina, $p= 1.000$. Los valores de significación corresponden a la prueba Exacta de Fisher).

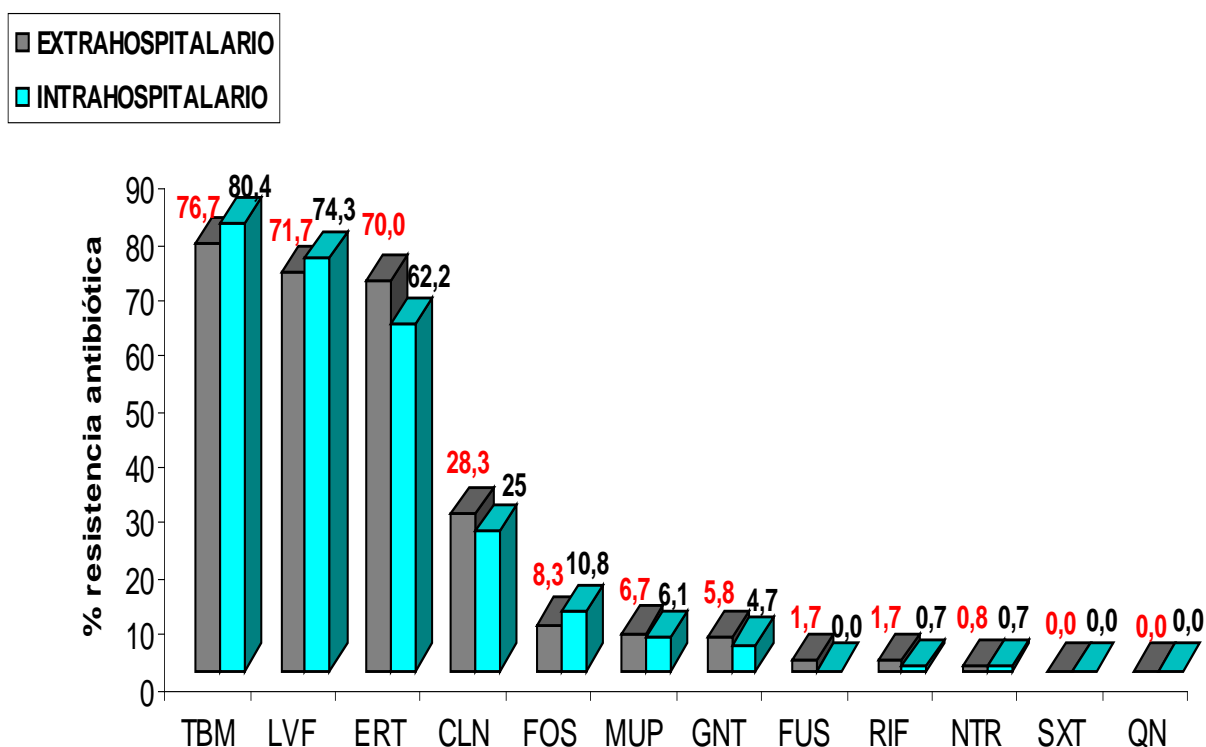


Figura 58. Comparativa de ratios de resistencia en los antibióticos no específicos para infección por SARM, entre los aislados de carácter extrahospitalario con respecto a los intrahospitalarios. GNT: Gentamicina, TBM: Tobramicina, LVF: Levofloxacino, ERT: Eritromicina, CLN: Clindamicina, QN: Quinupristina-Dalfopristina, FOS: Fosfomicina, NTR: Nitrofurantoina, FUS: Ácido Fusídico, RIF: Rifampicina, SXT: Trimetoprim-Sulfametoxazol, MUP: Mupirocina.

Al evaluar las medias de las CMI de los antibióticos específicos para la infección por SARM en el conjunto de aislados de adquisición extrahospitalaria, y compararlas con las obtenidas en el conjunto de carácter intrahospitalario, no se obtienen diferencias estadísticamente significativas para ningún antimicrobiano (Tigeciclina, $p= 0.289$; Vancomicina, $p= 0.199$; Linezolid, $p= 0.073$; Daptomicina, $p= 0.368$. Los valores de significación corresponden a la prueba T de Student)

		CMI (ug/ml)			
		Tigeciclina	Vancomicina	Linezolid	Daptomicina
Extrahospitalario	Media	0,18	1,18	0,92	0,15
	Mediana	0,19	1	0,75	0,125
	N	120	120	120	120
Intrahospitalario	Media	0,19	1,20	1,03	0,14
	Mediana	0,19	1	1	0,125
	N	148	148	148	148

Tabla 53. Comparativa de estadísticos de la CMI para antibióticos específicos para la infección por SARM, entre el grupo de aislados extrahospitalarios e intrahospitalarios.

Al centrarse en los SARM que presentan una CMI para vancomicina superior a 1 $\mu\text{g/ml}$, obtenemos que el 55.5% son de carácter intrahospitalario, mientras que el 44.4% son de origen extrahospitalario. Esta diferencia, que apunta a una mayor sensibilidad a vancomicina para los aislados extrahospitalarios, no se confirma estadísticamente significativa ($p= 0.699$ – test Exacto de Fisher). Entre los aislados de procedencia extrahospitalaria, el 44.1% presentan CMI a vancomicina superior a 1 $\mu\text{g/ml}$, ratio muy similar al obtenido en el conjunto de SARM intrahospitalarios, con un 44.6%.

4.7.3 DESCRIPCIÓN GENOTÍPICA

Para el genotipo más frecuente, el pulsotipo E8a, se encuentran diferencias significativas ($p=0.043$ – Exacto de Fisher) entre las frecuencias observadas en el grupo de aislados extrahospitalarios y el grupo de intrahospitalarios. Por lo tanto, el genotipo E8a es más frecuente entre los SARM de origen intrahospitalario que entre los de procedencia extrahospitalaria. Esto mismo ocurre para el grupo heterogéneo de los perfiles minoritarios (Fig. 58). Estos genotipos de baja frecuencia, son significativamente más comunes ($p=0.004$ – Exacto de Fisher) entre los aislados de origen intrahospitalario, que en el conjunto de los aislados extrahospitalarios. En la Tabla 54, podemos comprobar como para el conjunto de SARM extrahospitalarios, solo

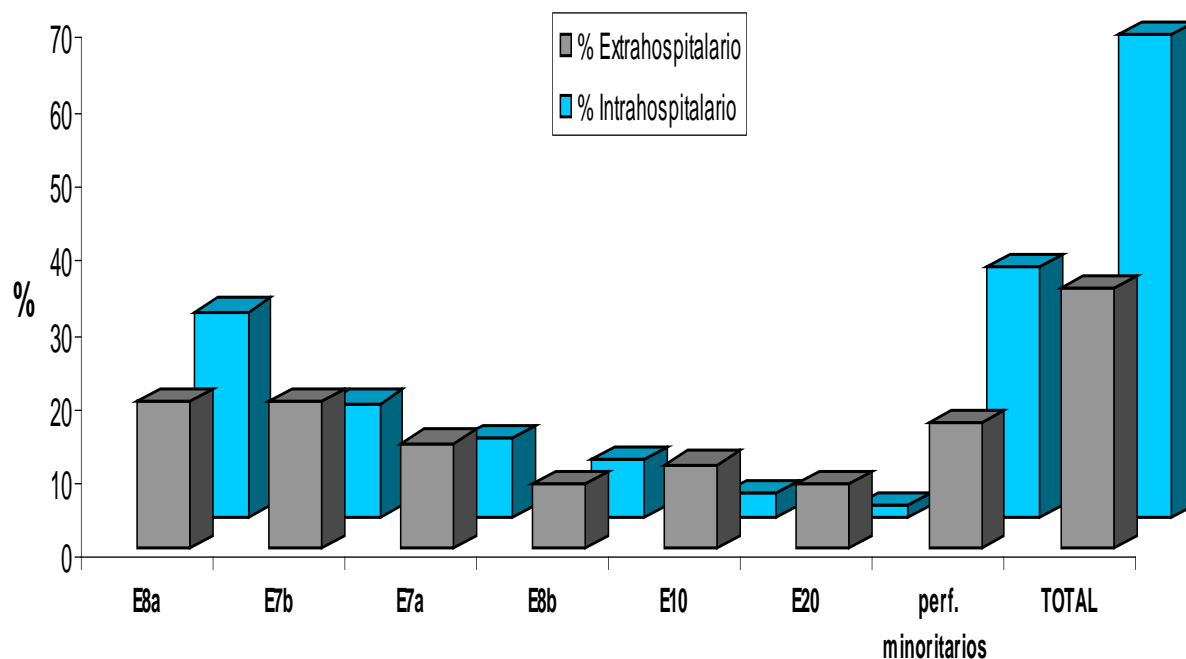


Figura 59. Proporciones en las que se presenta cada pulsotipo mayoritario en el conjunto de aislados extrahospitalarios y en el de intrahospitalarios

4.8 HALLAZGO Y DE DESCRIPCIÓN DE SARM ASOCIADO A LA COMUNIDAD (CO-SARM)

Entre los 100 aislados que han sido genotipados, únicamente uno presenta por el método PFGE un perfil de bandas propio de *A1*, pulsotipo asociado directamente en la bibliografía científica a las cepas de CO-SARM. En el resto de métodos de tipaje molecular, resulta pertenecer al patrón *I3* y grupo *4* por el sistema rep-PCR/Diversilab, y al spa-tipo *t008* por el método Spa typing. Este spa-tipo no se ubica en ningún complejo clonal, siendo descrito como *SINGLETON*, aunque con el algoritmo eBURST sí se integra en el complejo clonal *CC008*. Usando el servidor web *Ridom spa Server* se predice que la secuencia que obtendríamos por MLST sería la ST8. Mediante el método de Fagotipaje, la cepa *A1* resulta del fenotipo *III*.

La cepa en cuestión se aisló en el mes de Junio, a partir de una muestra de exudado, perteneciente a un paciente varón de 80 años, en el AAM de Cáceres, donde se le otorgó una procedencia de carácter Intrahospitalario. Muestra un patrón de sensibilidad al conjunto de antibióticos no específicos para la infección por SARM, muy susceptible, con una única resistencia a Mupirocina. Como el resto de los 309 SARM en los que se comprobó la sensibilidad a Daptomicina, Linezolid, Tigeciclina y

Vancomicina, resulta sensible a los cuatro antibióticos específicos para la infección por SARM. Su CMI para Vancomicina es de 1 µg/ml.

Al proceder a la prueba de PCR para valorar la capacidad de la cepa para producir LPV, se obtiene un resultado positivo. Sin embargo, en la determinación de la secuencia ACME, también por PCR, no existe amplificación, por lo que concluimos que es una cepa CO-SARM no USA-300.

A

Antibióticos no específicos frente a SARM	Aislado CO-SARM
TOBRAMICINA	S
LEVOFLOXACINO	S
ERITROMICINA	S
CLINDAMICINA	S
FOSEFOMICINA	S
MUPIROCINA	R
GENTAMICINA	S
RIFAMPICINA	S
AC.FUSÍDICO	S
NITROFURANTOINA	S
SXT	S
QUINUPRISTINA	S

B

Antibióticos específicos frente a SARM	Aislado CO-SARM CMI (µg/ml)
TIGECICLINA	0,125
DAPTOMICINA	0,125
VANCOMICINA	1
LINEZOLID	0,75

C

Método de genotipaje	Aislado CO-SARM
PFGE	A1
SCCmcc	IVc
SPA type	t008
CCBURP	SINGLETON
eBURST	CC008
Patrón DIVERSILAB	13
Grupo DIVERSILAB	4

D

	Aislado CO-SARM
PVL	POS
ACME	NEG

Tabla 55. Resumen de las características epidemiológicas y microbiológicas de la única cepa CO-SARM obtenida en el estudio.

5. DISCUSIÓN

La resistencia a antimicrobianos de algunos de los patógenos bacterianos más prevalentes en clínica humana es un problema de salud pública que se está agudizando en los últimos años, siendo España uno de los países europeos más afectados. La vigilancia epidemiológica es necesaria para su control, ya que el conocimiento detallado de este problema debe ser el primer paso para la toma de decisiones que ayuden a su contención. *Staphylococcus aureus*, y particularmente SARM, es uno de los principales patógenos bacterianos nosocomiales implicados en infecciones sistémicas potencialmente mortales. La presencia de SARM genera un problema terapéutico de gran importancia en todo el mundo, y su incidencia está aumentando en muchos países a pesar de la implementación de programas de control. Hasta la fecha, no se han publicado estudios ni dato alguno acerca de la prevalencia de SARM en la Comunidad Autónoma de Extremadura, ratios de resistencia antibiótica, ni tampoco información sobre la epidemiología o clones circulantes. Si bien es cierto que disponemos de la información obtenida por estudios multicéntricos previos realizados a nivel nacional, creemos importante conocer la situación específica del SARM en nuestra región, conocer si existen características exclusivas o especiales a tener en cuenta en los programas de control, de manera que éstos resulten más eficaces.

En el conjunto de los 309 aislados SARM que se recogen en el estudio, la distribución de éstos en función del AAM de origen, salvo puntuales excepciones, responde a lo esperado. Las dos áreas que atienden a una mayor población, Badajoz y Cáceres, son las que aportan mayor número de aislados, el 22 y el 23.3%, respectivamente. Las áreas de Coria y Navalmoral de la Mata, son las áreas con menor población, y de manera correspondiente a lo esperado, las que menor número de aislados reportan, solo el 4.2 y el 2.9% de los aislados, respectivamente. Sin embargo, en contra de lo esperado, las áreas de Don Benito-Villanueva y Llerena, con tamaños de población inferiores al área de Mérida, remiten más aislados que esta área.

De acuerdo a los resultados publicados en el último estudio multicéntrico realizado por el Grupo Español para el Estudio de Estafilococos (*Cuevas y col., 2008*), esperábamos obtener un elevado ratio de prevalencia de SARM en Extremadura, pues este estudio cifra en un 34.7% el ratio de SARM con respecto al total de *Staphylococcus aureus*, para el área geográfica constituida por Extremadura y Castilla-León. Esto significa un porcentaje muy por encima del atribuido por el mismo estudio para todo el país, un 29.2%. Sin embargo, nuestro estudio muestra una prevalencia de SARM para Extremadura del 20.1%. Entendemos que esta discrepancia podría deberse a la suma de

dos factores: a) elevada prevalencia de SARM en la Comunidad de Castilla-León (no existen estudios al respecto), siendo así la principal responsable del ratio tan alto asignado al área geográfica Castilla-León / Extremadura; b) la distancia temporal de cuatro años entre la muestra de nuestro estudio, año 2010, y la del estudio multicéntrico, año 2006, durante la cual habría descendido la incidencia de SARM. Esta última reflexión se apoya en los datos ofrecidos por este último estudio multicéntrico, en relación a una cierta estabilización en España de la prevalencia de SARM, ya que del año 1996 al 2002, se pasó del 17.9% al 31.2% respectivamente, sin embargo en el año 2006, se quedó en un 29.2% (Cercenado y col., 2010) (Fig. 59); y por los resultados del último estudio publicado por la Agencia Europea de Vigilancia de Resistencia Antimicrobiana (EARS, 2010), que con casi 2000 aislados testados, sitúa la prevalencia de SARM en España en un 25.3%, confirmando el estancamiento (26% en el año 2009, y 27% en el año 2008), y situándose lejos de los porcentajes de SARM mostrados por países próximos como Italia o Grecia, con un 36.5 y 39.2% respectivamente.

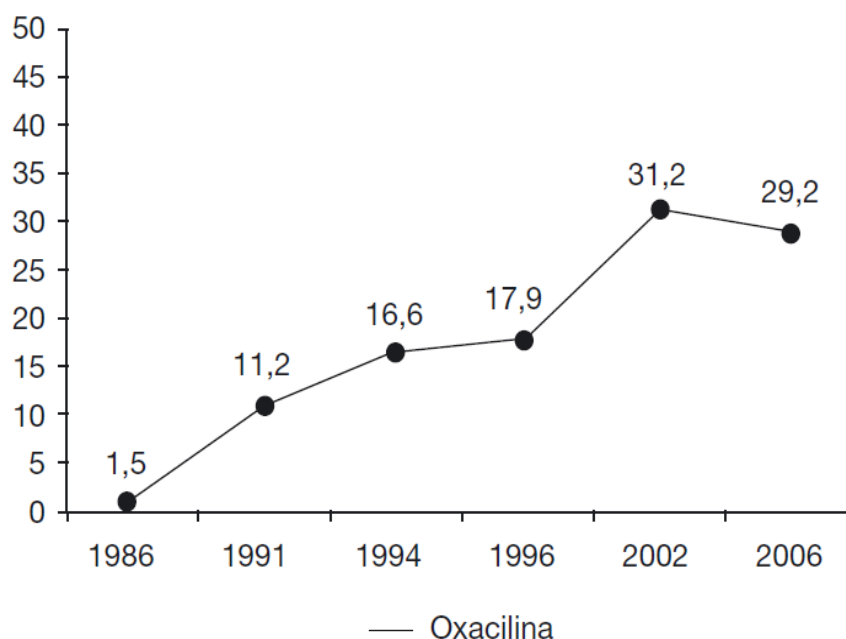


Figura 60. Evolución de la prevalencia de SARM (porcentaje de SARM con respecto a *S.aureus* total) en España desde 1986 hasta 2006 (Cercenado y col., 2010).

Sin embargo, estos ratios contrastan con las bajas tasas de SARM observadas en la mayoría de los países del norte de Europa (Dinamarca, 1.5%, Noruega, 0.6% o Suecia, 0.5%). Probablemente, esto significa que existe un gran margen para la

reducción de las tasas de SARM en los hospitales españoles, incluidos los extremeños, y que hay que seguir haciendo esfuerzos en el control de la infección por SARM.

Por tanto, con un 20.1% de prevalencia de SARM en Extremadura, esta región se sitúa por debajo del ratio atribuido a toda España, ya sea el 29.2% dado en el 2006 por el Grupo Español para el Estudio de Estafilococos, o el 25.3% dado por EARS en el 2010. De las 8 AAM en las que se divide Extremadura, cuatro de ellas se sitúan por encima del ratio medio regional: son las áreas de Navalmoral de la Mata, Badajoz, Coria y Don Benito-Villanueva. Ésta última es la que presenta una mayor prevalencia, con un 35%, muy por encima del porcentaje del área de Coria, que con un 26% es la segunda con mayor prevalencia. Por debajo del 20.1% para toda Extremadura, se encuentran las áreas de Cáceres, Llerena, Mérida y Plasencia, siendo esta última la que ostenta el menor ratio, con solo el 11%.

Cuando nos centramos en las diferentes incidencias que SARM muestra en las AAM, observamos unas tendencias diferentes a las encontradas en las prevalencias. Así, las áreas de Cáceres y Llerena, que mostraban una prevalencia relativamente baja, muestran una incidencia, relativa al resto de AAM, bastante elevada, de 3.7 y 3.6 SARM/10.000 habitantes, respectivamente. Algo similar ocurre en el área de Plasencia, donde obteniendo una prevalencia solo del 11%, encontramos una incidencia de 2.4 SARM/10.000 habitantes, aunque sin llegar a ser ésta de las más altas. La situación que se da en estas áreas, es que, respecto a su población, se aísla una gran cantidad de *Staphylococcus aureus*, entre ello, una gran cantidad de SARM, sin embargo la proporción de éste último con respecto al número total de *Staphylococcus aureus* es baja. Al contrario ocurre en las áreas de Badajoz y Navalmoral, donde tenemos prevalencias relativamente altas, pero incidencias relativamente bajas (del 1.7 y 1.6 SARM/10.000 habitantes). La situación que se da en estas áreas, es que se aísla una baja cantidad de *Staphylococcus aureus*, entre ello, una pequeña cantidad de SARM, sin embargo la proporción de éste último resulta importante con respecto al número total de *Staphylococcus aureus*. Las áreas de Mérida, Coria y Don Benito-Villanueva, presentan valores de prevalencia e incidencias acordes, siendo la situación de esta última la más preocupante, con la incidencia situada en el valor más alto obtenido (3.7 SARM/10.000 habitantes) y la prevalencia más elevada de todas las áreas, con un 35%.

El aislamiento de SARM en los diferentes meses del año, resulta en todas las AAM, sin excepción, bastante dispar. De esto concluimos que la aparición de SARM no sigue un ritmo homogéneo, por el contrario es de carácter errático e intermitente. A ello

se asocia la naturaleza epidémica que con frecuencia adquieren las infecciones por este patógeno, lo que implica importantes variaciones temporales en su prevalencia.

Las características demográficas de la infección por SARM en Extremadura, indican que más del 75% de las infecciones tienen lugar en pacientes con edad superior a 65 años, mientras que solo el 3.4% de las infecciones por SARM se dan en pacientes con edad inferior a 18 años. Estos datos ponen en relevancia la importancia de la concurrencia en el paciente de enfermedades de base y demás factores de riesgo relacionados con la adquisición de SARM, elementos que de manera clara presentan mayor incidencia en personas de edad avanzada. La incidencia de la infección en el varón resulta un 13% superior a la de la mujer, aunque sin llegar a ser significativa.

El tipo de muestra de la que procede el aislado SARM, nos da una idea de la patología asociada. Así, siendo el exudado el tipo de muestra claramente predominante en nuestro estudio (44% de los casos), podemos deducir que las infecciones de piel y partes blandas son las de mayor ocurrencia (infecciones de herida quirúrgica, úlceras cutáneas, implantes o prótesis...), siendo por otra parte muy comunes en los cuadros de patología nosocomial. Es importante destacar que el SARM aislado de muestra respiratoria (esputos, broncoaspirados, aspirados traqueales...) y causa de un cuadro clínico grave, como es la infección respiratoria por SARM, representa hasta el 21%, situándose como el segundo tipo de muestra más frecuente. El SARM aislado de hemocultivo, y causa del otro cuadro clínico grave, la bacteriemia, representa poco más del 9% de los aislados. Estas proporciones resultan similares a los presentados en el último estudio multicéntrico publicado por el Grupo Español para el Estudio de los Estafilococos (*Cuevas y col., 2008*), donde igualmente el tipo de muestra más común eran los exudados, aunque con un porcentaje más alto, el 52%, a costa de un menor porcentaje para las muestras del tracto respiratorio, que con un 13%, es el segundo tipo de muestra más frecuente, pero inferior al obtenido en nuestro estudio. La proporción de hemocultivos resulta idéntica (8%), y no se hizo referencia a la ocurrencia de urocultivos positivos por SARM, que en nuestro trabajo resulta el tercer tipo de muestra más frecuente con casi el 12%.

Las frecuencias de los halos de inhibición que muestran nuestros aislados SARM en antibiograma disco-placa de cefoxitina, se representan en un histograma que presenta dos importantes diferencias con respecto a último dado por EUCAST, del año 2012 (<http://mic.eucast.org/Eucast2/regShow.jsp?Id=27088>): a) el porcentaje de aislados que no muestran ni siquiera halo de inhibición (se les asigna el diámetro de 6 y 7 mm, en el

estudio de EUCAST y en el nuestro, respectivamente) es mucho mayor en la distribución de EUCAST, con un 39.6%, que en nuestro estudio, con un 4.5%. b) el centro de gravedad de la distribución en el estudio de EUCAST se encuentra entre los 11 y 14 mm, intervalo en el que se encuentra el 30% de los casos, siendo la moda de la distribución (exceptuado los 6 mm), 13 mm; en nuestra distribución el centro de gravedad es más alto, situándose entre los 15 y 17 mm (36% de los aislados), siendo la moda los 17 mm.

Al comparar los datos publicados en estudios multicéntricos realizados desde 1994 en España (*Cuevas y col., 2008; Picazo y col., 2011a*), que analizan la resistencia a distintos antimicrobianos de las cepas SARM, con los ratios de resistencia obtenidos en nuestro estudio, comprobamos que estos se muestran muy similares para los antimicrobianos que más efectividad han perdido frente a SARM: Tobramicina (79%), Quinolonas (representadas en nuestro estudio por Levofloxacino, con tasas de resistencia inferiores a las que muestra Ciprofloxacino, pero igualmente elevadas con el 73% de los casos) y Eritromicina (64%). Así, el patrón de multirresistencia (resistencia a 3 ó más antibióticos) más frecuente que obtenemos, es el que incluye a Tobramicina, Levofloxacino, y Eritromicina, representando el 44% de las muestras (136 aislados); seguido del patrón que incluye Tobramicina, Eritromicina y Clindamicina, con el 20% de los casos (63 aislados). Según los estudios multicéntricos a los que antes hacíamos referencia, se ha producido a lo largo de los últimos años una recuperación de la efectividad de Clindamicina sobre SARM, que en España ha pasado de un 100% de resistencia en 1994 a un 15% en 2010. Nuestro estudio confirma este fenómeno también en Extremadura, donde el ratio de resistencia, sin llegar a ser tan bajo como para España, si resulta significativo con solo 27% de los aislados. Un caso similar es el de la Rifampicina, que mostraba porcentajes de resistencia en España del 36% en 1994, para ir descendiendo progresivamente hasta el 2.2% en 2006 ó el 6.4% en 2010. Con nuestro estudio, se confirma la instauración del bajo ratio de resistencia a Rifampicina en Extremadura, con solo el 1% de los aislados. También, de manera similar, los ratios de resistencia a Gentamicina han ido descendiendo, pasando de un 92.7% en 1994 al 20% en 2006. El descenso se ve agudizado en nuestro estudio, quedando en Extremadura solo un 5% de resistencia (Tabla 56).

No hemos incluido en nuestro estudio el ensayo de sensibilidad para cloranfenicol, antibiótico que se muestra muy efectivo en la lucha frente a SARM. Por el contrario, aportamos información acerca de tres antibióticos que muestran tasas de

resistencia prácticamente anecdóticas, como Ac. Fusídico y Nitrofurantoina, o indetectables, como en el caso de Quinupristina-Dalfopristina o Trimetoprim-Sulfametoxazol. También Fosfomicina resulta una buena opción terapéutica frente a SARM, con solo un 10% de resistencia (Tabla 56).

Antimicrobiano	Porcentaje de resistencia por años (CMI ₉₀ mg/l)						
	Cuevas y col., 2008				Picazo y col., 2011a		2010 (Extremadura) (n=309)
	1994 (n=41)	1996 (n=46)	2002 (n=134)	2006 (n=135)	2008 (n=201)	2010 (n=187)	
Eritromicina	100 (>128)	82,6 (>4)	67,9 (>4)	66,7 (>4)	70,6 (>4)	55,6 (>4)	63,8 (8)
Clindamicina	100 (>128)	82,6 (>2)	51,5 (>2)	39,3 (>2)	29,4 (>2)	15 (>2)	26,5 (>8)
Gentamicina	92,7 (>128)	81,8 (>8)	42,5 (>8)	20,0 (>8)	ND	ND	5,2 (>0,5)
Tobramicina	ND	ND	ND	72,6 (>8)	ND	ND	79,3 (>16)
Rifampicina	35,6 (128)	34,8 (>2)	5,2 (≤1)	2,2 (≤1)	1,5 (≤1)	6,4 (≤1)	1,0 (>0,5)
SXT (Cotrimoxazol)	0 (0,5)	6,6 (≤2)	5,2 (≤1)	2,2 (≤1)	ND	ND	0 (10)
Cloranfenicol	2,5 (8)	4,4 (8)	6,0 (8)	8,1 (8)	ND	ND	ND
Ciprofloxacino	100 (64)	95,7 (>2)	93,3 (>2)	93,3 (>2)	92,5 (>2)	96,3 (>2)	ND
Levofloxacino	ND	ND	ND	ND	ND	ND	72,5 (8)
Mupirocina	ND	ND	17,9 (512)	19,3 (256)	ND	ND	7,4 (2)
QD	ND	ND	0 (0,12)	0 (≤1)	2,5 (1)	0,5 (1)	0 (1)
Fosfomicina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	9,7 (32)
Nitrofurantoina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,6 (16)
Ác. Fusídico	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,6 (0,5)

Tabla 56. Evolución en España de la resistencia de SARM a antimicrobianos de 1994 a 2010 (Cuevas y col., 2008; Picazo y col., 2010) y comparación con los resultados de nuestro estudio en Extremadura en 2010. ND: no disponible. QD: Quinupristina/Dalfopristina. SXT: Trimetoprim/Sulfametoxazol. n: n° de aislados incluidos en el estudio.

La multiresistencia mostrada por las cepas SARM, ha limitado en el tiempo las opciones terapéuticas para el tratamiento de las infecciones causadas por este patógeno, lo que obligó en la década de los noventa, a buscar nuevas opciones terapéuticas. Entre ellas se encuentran Daptomicina y Tigeciclina, antibióticos de los cuales hasta la fecha, no se han descrito casos de aislados SARM resistentes en España (Picazo y col., 2011a; García-Rodríguez y col., 2009). Así, como se esperaba, la tasa de resistencia en nuestro estudio para Daptomicina y Tigeciclina es nula. Sobre Linezolid, otro antimicrobiano que apareció como nueva estrategia antimicrobiana frente a SARM, existe una preocupación creciente por el incremento de cepas SARM resistentes a Linezolid. Éstas se han descrito en Estados Unidos (Tsiodras y col., 2001), en Europa (Hentschke y col.,

2008), y recientemente en España (Cuevas y col., 2008; Sánchez-García y col., 2010). La recombinación homóloga entre cepas con genes mutantes y cepas salvajes bajo la presión selectiva del Linezolid, junto a un uso cada vez más habitual de este antimicrobiano (sobre todo en terapias a largo plazo por sus ventajas farmacocinéticas y especialmente por su disponibilidad de administración por vía oral) provocan una situación favorable a que la resistencia a Linezolid pueda extenderse, incluyendo a SARM. Por ello, aunque en nuestro estudio y por lo tanto en nuestra región, no hemos hallado aislado alguno de SARM resistente a Linezolid, entendemos que es necesario estar alerta, sobre todo ante la insistencia de publicaciones que hacen referencia a la descripción en España de cocos gram positivos, como *Staphylococcus aureus* (sensible a meticilina) (Quiles-Melero y col., 2012), *Enterococcus* (Gómez-Gil y col., 2009) o cepas de Estafilococos coagulasa negativos (Fajardo y col., 2012) (éstas en Extremadura), resistentes a Linezolid.

Otra de las consecuencias de la multiresistencia antibiótica de las cepas SARM, ha sido el incremento en el consumo de glucopéptidos, lo que ha traído como consecuencia la aparición de cepas con sensibilidad disminuida a vancomicina (CMI 1-2 µg/ml). El porcentaje de estas cepas obtenido en nuestro estudio es del 42.4%, resultado preocupante, pues sostiene que cerca de la mitad de las cepas SARM productoras de infección en Extremadura son susceptibles de asociarse a fracaso terapéutico al tratarse con vancomicina. De ellas, solo 8 cepas (6%) presentan una CMI de 2 µg/ml, similar porcentaje (4.4%, de 135 aislados) que el observado en España en el estudio multicéntrico de 2006 (Cuevas y col., 2008). El resto presentan una CMI de 1.5 µg/ml. En cualquier caso, ante estos resultados, es necesario alertar a los responsables clínicos de la región sobre la importancia del valor de CMI para vancomicina en SARM. Si éste presenta una CMI > 1 µg/ml, se debe desestimar el tratamiento antibacteriano con vancomicina, tanto por el fracaso terapéutico que puede acarrear, como para evitar potenciar la reducción de la susceptibilidad del patógeno a este antibiótico. Por el contrario, no hemos encontrado en nuestro estudio ninguna cepa VRSA (≥ 16 µg/ml) o VISA (CMI ≥ 4 µg/ml), coincidiendo con lo descrito hasta ahora para el resto del país. Pero igualmente debemos permanecer alerta, pues en Europa se han descrito cepas SARM con resistencia intermedia, en Francia (Ploy y col., 1998), Alemania (Bierbaum y col., 1999), Reino Unido (Howe y col., 1998) y Polonia (Krzyszton y col., 2002). Tampoco se han obtenido cepas h-VISA en el conjunto de aislados SARM procedentes de hemocultivo. En una revisión de estudios

epidemiológicos acerca de la prevalencia de h-VISA en cepas SARM llevada a cabo por *Liu y col. (2003)*, se indican ratios entre 0-8%. Concretamente, tres estudios con un tamaño de muestra entre 30 y 300 cepas, reportan, como es nuestro caso, la ausencia de cepas h-VISA (*Franchi y col., 1999; Schmitz y col., 1999; Wootton y col., 2001*). El estudio con mayor tamaño de muestra realizado hasta la fecha, con casi 3400 cepas SARM, reporta un ratio de h-VISA del 1.75% (*Kim y col., 2000*). Más recientemente se ha reportado una tasa del 5.8% de cepas h-VISA entre 187 SARM causantes de bacteremia coleccionados entre 41 hospitales españoles, entre los que se encuentran tres extremeños, aunque no se detalla a que hospitales pertenecen las cepas descritas como h-VISA (*Picazo y col., 2011b*). Así pues, con la precaución que exige el desconocimiento de este último dato y el limitado número de cepas de nuestro estudio, podemos concluir que es evidente que el fenómeno h-VISA en nuestra región es inexistente, o en el peor de los casos sería muy incipiente, por debajo incluso de ratio reportado a nivel nacional.

Los resultados del fagotipaje de SARM obtenidos en este estudio, junto a los referidos por otros trabajos, evidencian tres características a destacar:

- a) La enorme proporción de cepas clasificadas como “no tipables”. Nuestro valor del 56% es muy similar al obtenido por *Vindel y col. (2006)* en su estudio multicéntrico a nivel nacional, o igual al obtenido por *Kareiviene y col. (2006)*. De esto podemos concluir que se trata de una técnica con un discreto poder de discriminación, que solo debemos utilizar como método screening inicial o como primera aproximación, para cualquier estudio de vigilancia epidemiológica.
- b) Obtenemos como fagogrupo predominante el número III (23%), hecho que correlaciona con el último estudio nacional multicéntrico, donde representaba el 20% (*Vindel y col., 2006*), y que se repite en otros estudios similares realizados en Europa (*Cristino y col., 1999; Wisniewska y col., 2012*). Un estudio multicéntrico sobre susceptibilidad antibiótica de *Staphylococcus aureus* realizado en Israel, reporta que el 96% de los aislados sensibles a los fagos del grupo III eran SARM (*Samra y col., 2001*).
- c) Ausencia de lisis por fagos del grupo II. Estudios de vigilancia epidemiológica, que incluían aislados tanto SASM como SARM, determinan que el fago grupo II resulta exclusivo de las cepas sensibles a meticilina (*Cristino y col., 1999; Kareiviene y col., 2006*).

Comparando los resultados de genotipaje SARM que obtenemos por la técnica de referencia, PFGE, con los reportados por el último estudio multicéntrico realizado en España (*Vindel y col., 2009*), observamos que se identifica un menor número de patrones diferentes (27 vs. 36), de los cuales, casi la mitad (13 pulsotipos) son perfiles esporádicos representados por un único aislado, ratio algo menor que el obtenido por el grupo de *Vindel y col.*, donde de los 36 pulsotipos, 23 eran perfiles esporádicos. El resultado que si comparten ambos estudios, es el claro predominio de los pulsotipos E7 y E8 dentro de la población SARM: 62% en Extremadura, 52% en el estudio multicéntrico nacional (*Vindel y col. 2009*). Dentro de los subtipos de estos pulsotipos, también de manera clara, obtenemos que el perfil E8a es el mayoritario en Extremadura con el 25% de los aislados. Resaltar la presencia de tres pulsotipos, con unos perfiles de bandas no definidos hasta la fecha, que en conjunto representan el 7% de los aislados, y que se han denominado Esporádico 1 (3 aislados), Esporádico 2 y Esporádico 3 (con 2 aislados cada uno). Además, debemos destacar la importante progresión que a juzgar por estudios previos y nuestros propio resultados, está teniendo el genotipo E20, que fue descrito en España por primera vez en cepas SARM del año 2006, con un 1.7% de los aislados (*Vindel y col., 2009*) y en nuestro estudio aparece como sexto pulsotipo más frecuente, con el 4% de las cepas. En concordancia con lo descrito hasta la fecha, no hay rastro en Extremadura del pulsotipo E1 o clon Ibérico, y que fuera predominante en la población SARM de España a principios de la década de los 90, pero cuya incidencia fue cayendo rápidamente hasta no encontrarse representado en el último estudio multicéntrico nacional de 2006 (*Vindel y col. 2009*).

Si nos centramos en los resultados de *spa-typing*, se observa un importante menor número de tipos de SARM (17 spa-tipos), que el obtenido por *Vindel y col.* para toda España (32 spa-tipos). En este último se obtuvieron hasta 21 tipos representados por un único aislado, mientras que en nuestro estudio esto solo ocurre con 9 tipos. Sin embargo, ambos coincidimos en que el tipo predominante es el t067 (47% vs. 49%), seguido del t002 (22% vs. 15%). La elevada frecuencia del t067 en Extremadura y en España, contrasta con la relativa baja frecuencia de este spa-tipo en otros países Europeos (Suiza, Dinamarca, Finlandia, Alemania u Holanda) (<http://spa.ridom.de>) (*Faria y col., 2005; Fenner y col., 2008; Vainio y col., 2008; Nulens y col., 2009*). Caso similar es el de t002, que encontrándose en una tasa global mundial de 5.79%, en España se encuentra en valores de 14.8% (*Vindel y col., 2009*), y en Extremadura más altos todavía, con el 22%. La elevada frecuencia del t067 y t002 en los hospitales de

nuestro medio, junto al hecho de tratarse de spa-tipos que engloban diferentes pulsotipos mayoritarios, limita la utilidad del *spa typing* a investigaciones epidemiológicas locales, siendo necesario recurrir a PFGE para conseguir una óptima diferenciación de los clones SARM predominantes. A esto se suma la obtención en nuestro estudio de un spa-tipo relativamente frecuente en nuestra población SARM, sin embargo no descrito en los estudios multicéntricos de España. Es el t1399 que con el 8% de los aislados se sitúa como el tipo más frecuente en Extremadura después de t067 y t002. De hecho, da nombre a la segunda agrupación clonal BURP más frecuente (el CC1399, con el 11% de los aislados), después del CC067, que como en el estudio multicéntrico de España, es el grupo clonal predominante con el 72% de los casos. También coincidimos en que los genotipos ST125, descritos por MLST, continúan siendo los responsables de la mayor parte de las infecciones por SARM, siendo este porcentaje para Extremadura más elevada incluso que en España (72% vs. 59%, respectivamente) (*Vindel y col., 2009*), aunque este genotipo no sea el predominante en el resto de Europa, siendo superado por clones como ST228, ST45 o ST80, según el área geográfica (*Perez-Roth y col., 2004; Fossum y col., 2006; Krziwanek y col., 2008*). Algunos autores relacionan a ST125 con la propagación de las cepas SARM sensibles a gentamicina (*Blanc y col.; 2001*), por lo que el menor porcentaje de resistencia obtenido en Extremadura (5%) con respecto al obtenido por *Vindel y col. (2009)* (20%), podría estar asociado directamente con la mayor prevalencia de ST125 encontrada en nuestro medio.

En la descripción de los tipos SCCmec, llama la atención que la mayor parte de los representantes de cada uno de los pulsotipos pertenezcan al subtipo IVc (21 de los 27 pulsotipos), cuando a nivel nacional es el IVa el cassette claramente mayoritario con el 70% de los aislados (*Vindel y col., 2009*). En cualquier caso, este dato debe ser analizado con precaución, pues nosotros solo hemos descrito el SCCmec de un representante de cada pulsotipo, y no de toda la muestra de SARM como si hizo el grupo de *Vindel y col. (2009)*.

El sistema ideal de genotipaje para la caracterización de SARM debería ser un método fácil y rápido de realizar, con suficiente poder de discriminación, elevada reproducibilidad, y todo ello por supuesto, a un bajo coste. Además, sería positivo que los resultados obtenidos por este método, en diferentes hospitales o laboratorios de referencia, fueran comparables. El método de referencia actualmente para el genotipaje de SARM, el PFGE, no cumple con todas estas cualidades, pues aunque cuenta con el

mayor poder discriminación, resulta lenta, laboriosa, y con dificultades para comparar los resultados obtenidos por centros distintos. Sin embargo, la tecnología de genotipaje basada en el sistema rep-PCR (rep-PCR/Diversilab), es descrita en la bibliografía como una técnica fácil y rápida, y con suficiente poder de discriminación y buena reproducibilidad, con especies microbianas de interés nosocomial, como *S. marcescens*, *A. baumannii* o *P. aeruginosa*. Así en este estudio, evaluamos si las virtudes del sistema rep-PCR/Diversilab, ya mostradas para otros microorganismos, pudieran hacerse extensibles a SARM. Para ello, las mismas 100 cepas SARM (escogidas por muestreo aleatorio simple no estratificado de la población anual de SARM aislada en Extremadura en el año 2010), genotipadas por *PFGE* y *spa typing*, son analizadas también por rep-PCR/Diversilab.

Al acometer la concordancia entre los diferentes métodos ensayados, valorada cuantitativamente mediante el cálculo del Índice de Rand (IR), realizamos la siguiente reflexión: si el método CC-BURP es una agrupación clonal de *spa*-tipos que se muestran similares, el valor IR obtenido entre *spa typing* y CC-BURP (0.486), debemos tomarlo como indicador de buena concordancia. Por idéntico motivo, el Índice de Wallace (IW) de *spa typing* con respecto a CC-BURP es el valor máximo (1.000). Una vez realizada la aclaración, decir que se observa una discreta concordancia entre el método rep-PCR/Diversilab y la agrupación CC-BURP. Solo el 51% de los aislados SARM pertenecientes al grupo clonal mayoritario, CC067, son clasificados en el Grupo 1 de Diversilab, el 18% en el Grupo 2, y el resto se encuentra representado en hasta 5 Patrones Diversilab diferentes. Por el contrario, sí se observa una concordancia perfecta entre el CC3 y el Grupo 3 de Diversilab, al igual que encontramos que todos los aislados t008 son clasificados como Grupo 4 por Diversilab. Estos dos casos de concordancia representan un escaso porcentaje de aislados genotipados, de ahí que el valor de Índice de Rand (determinación cuantitativa de concordancia), entre los métodos *spa-typing* y Diversilab sea solo de 0.321. Aunque este valor quede lejos del 0.48 marcado por BURP y *spa typing*, resulta el más alto de los obtenidos en el estudio dos a dos de la concordancia entre *PFGE*, Diversilab y *spa typing*. Aún así, el valor discreto de IR entre Diversilab y *spa typing*, se ve apoyado por un valor de IW de 0.435, que denota que la capacidad de predecir los resultados del *spa typing* con los obtenidos por la tecnología Diversilab es bastante limitada.

Al evaluar la concordancia entre Diversilab y la técnica de referencia para la tipificación de SARM, *PFGE*, encontramos que ésta es incluso inferior a la observada

entre Diversilab y *spa typing*. Ninguno de los tres pulsotipos predominantes, E8a, E7b y E7a, se encuentran asociados a ningún Patrón Diversilab, ni siquiera en un 60% de los aislados. El patrón de Diversilab al que más asociado se encuentra E8a es el 16, pero este solo contiene 11 de los 25 aislados E8a descritos. El resto son clasificados hasta en 7 patrones diferentes (P1, P2, P6, P8, P15, P16 y P17). La mayor parte de los aislados E7b son clasificados en el P1 por Diversilab (10 de 17 aislados), sin embargo, un grupo de 5 aislados son genotipados como P5 (que ni siquiera pertenece al Grupo 1) y otros dos son clasificados como P8. La prueba más clara de esta falta de concordancia es que dentro del Patrón Diversilab predominante, el P1 (38 aislados), existen aislados pertenecientes a 10 pulsotipos diferentes. Si evaluamos los pulsotipos representados por más de dos aislados (9 pulsotipos), vemos que solo existe un patrón Diversilab que contenga todos los aislados de uno de ellos (los tres aislados tipados como Esporádico 1, son clasificados como P9 por Diversilab); el resto de estos pulsotipos tienen repartidos por varios patrones Diversilab a sus aislados. Esta clara falta de concordancia se ve ratificada con un IR entre Diversilab y PFGE únicamente de 0.151, coincidiendo así con los hallazgos de *Babouee y col. (2011)* (IR = 0.083) y *Witt y col. (2009)*, que describían (en el último caso solo cualitativamente) una discordancia entre los resultados obtenidos por ambos métodos. En estudio recientes (*Tenover y col., 2009*; *Church y col., 2011*) se señalaba a Diversilab como un buen método de screening inicial en un brote de SARM o incluso en estudios epidemiológicos reducidos. Sin embargo, ante la concurrencia en el mismo Patrón Diversilab de aislados pertenecientes a los pulsotipos predominantes E8a, E7b y E7a (ejemplo: en el P1 encontramos numerosos aislados de cada uno de estos tres pulsotipos mayoritarios, o el P8 está formado por dos aislados de E7b y otros dos de E8a), nuestro grupo desaconseja utilizar en nuestro medio este sistema para el tipaje molecular de SARM, incluso para el screening inicial de un brote hospitalario.

A pesar de la clara discordancia que existe entre los resultados obtenidos por PFGE y Diversilab, ambos muestran un poder de discriminación similar. Si observamos los valores de IS de los métodos ensayados, PFGE obtiene el mayor (0.887), con lo que sigue siendo la técnica más discriminatoria. Sin embargo, sobre Diversilab, con un IS de 0.819, cercano al de PFGE y superior al de *spa typing* (0.726), podemos decir que sin llegar a ser tan buena como la del método de referencia, presenta una capacidad discriminatoria notable. Estos resultados se asemejan a los aportados por *Witt y col. (2009)*, con un IS de 0.905 para PFGE y de 0.860 para Diversilab. De hecho, ante la no

disponibilidad de PFGE, y ante los resultados de nuestro estudio, recomendaríamos utilizar Diversilab para el genotipaje de SARM, por delante de *spa typing*, no solo por demostrar mayor poder discriminativo, sino porque a juzgar por los valores de IR e IW obtenidos, Diversilab presenta mayor concordancia y mayor poder predictivo de los tipos por PFGE, que la técnica *spa typing*. En esta reflexión discrepamos con dos trabajos publicados previamente, que reportan un poder de discriminación casi idéntico para *spa typing* y PFGE (Cookson y col. 2007; Babouee y col. 2011), y que incluso concluyen que cepas SARM que comparten el mismo patrón Diversilab y PFGE, podrían ser distinguidos por *spa typing* (Church y col., 2011).

Un ejemplo claro de que PFGE es la técnica más discriminativa, es el caso del t008. Sus 4 aislados son clasificados por Diversilab en el mismo Grupo, sin embargo PFGE los diferencia en tres pulsotipos distintos: Esporádico 3 (2 aislados), A1 (1 aislado) y E19 (1 aislado).

Nosotros confirmamos que el genotipaje con Diversilab es rápido y relativamente fácil de realizar desde un punto de vista técnico, como ya concluían los estudios previos (Ross y col., 2005; Shutt y col., 2005; Tenover y col., 2009; Witt y col., 2009). Así, mientras con PFGE se requieren de 3 a 5 días para la obtención de resultados, Diversilab los proporciona en un único día. Gracias a su formato tipo kit comercial y al apoyo de un software informático incluido en una página web, Diversilab proporciona resultados estandarizables entre laboratorios, además de generar informes útiles y de clara comprensión. Sin embargo, creemos que el primer paso de la técnica, la extracción de ADN, es bastante laborioso y largo, y que podría ser sustituido por una técnica automática, que aunque debiera ser validada con respecto a la posterior amplificación con el kit comercial, aceleraría todavía más la obtención de los resultados. La utilización de un solo microlitro de producto amplificado para cargar en el pocillo del chip, consideramos que es positiva desde el punto de vista del aprovechamiento de los reactivos de PCR, pero implica ser muy meticuloso a la hora de realizar la carga, de lo contrario se cae en errores de pipeteo que incrementan los tiempos y costes. Además entendemos que la falta actualmente de una nomenclatura universal con respecto a los clones SARM definidos (como ocurre con *PFGE* y *spa typing*) que facilite la comprensión de resultados interlaboratorios, es el gran inconveniente del sistema Diversilab. Así, creemos que los laboratorios que en el futuro opten por este método para genotipar SARM, deberían consensuar una nomenclatura estándar para los clones mayoritarios.

En un estudio reciente (*Church y col., 2011*) donde se comparan los costes, velocidad y pericia técnica necesaria por el usuario, entre *spa typing* y Diversilab en el tipaje de SARM, se concluye que los costes anuales de ambos métodos son muy similares, aunque los requerimientos técnicos de *spa typing* son menores que los de Diversilab, hecho que suscribimos en este estudio.

En conclusión, con respecto al sistema rep-PCR/Diversilab para el tipaje molecular de SARM, diremos que es un método rápido y fácil técnicamente, pero a la vista de nuestro estudio, sus resultados no concuerdan con los de PFGE en relación a los clones SARM mayoritarios en Extremadura y España, clasificando en el mismo Patrón Diversilab a aislados pertenecientes a distintos pulsotipos predominantes en nuestra población SARM, a pesar de demostrar un respetable poder de discriminación. Por ello, se decidió llevar a cabo los estudios de variabilidad genética de SARM con respecto a las diferentes características recogidas (resistencia antibiótica, época del año, tipo de muestra biológica, entorno de aislamiento, AAM, etc.), con la distribución y clasificación genotípica obtenida mediante PFGE.

Los resultados en relación a la variabilidad genética de SARM entre las diferentes áreas AAM, denotan claramente una distribución enormemente heterogénea de este microorganismo en la región de Extremadura. De ahí, que no se haya conseguido asociar, de manera estadísticamente significativa, ningún pulsotipo a un AAM concreto. Ni siquiera en las comparaciones por pares con respecto a un determinado pulsotipo mayoritario entre dos AAM, encontramos ninguna diferencia estadísticamente significativa. Solo desde un punto de vista descriptivo, podemos comentar que el pulsotipo más abundante en Extremadura, E8a, es el predominante en las dos AAM que mayor población atienden (mayor cantidad de aislados SARM aportados al estudio), Cáceres y Badajoz, además de en AAM de Don Benito-Villanueva. Llama la atención, la situación epidemiológica de las AAM de Llerena y Mérida. Geográficamente se encuentran rodeadas por las AAM donde el E8a es claramente el clon dominante, sin embargo en Mérida éste solo representa un 10% de los aislados (a mucha distancia del E7a, que representa el 40%), y en Llerena ni siquiera se ha descrito su presencia. Esto es más chocante cuando existe un flujo constante de pacientes desde los centros hospitalarios de estas AAM con su hospital de referencia en Badajoz (Hospital Infanta Cristina) y viceversa. En Llerena predominan los pulsotipos minoritarios, al igual que en el AAM de Navalmoral de la Mata, aunque ambas áreas se encuentran geográficamente en polos opuestos, por lo que el flujo de pacientes

hospitalizados entre ambas áreas no parece la razón de dicha similitud. Los otros dos pulsotipos mayoritarios, el E7b y E8b, tienen cada uno también su área donde son predominantes: Plasencia y Coria, respectivamente. Aclarar que los resultados epidemiológicos en las áreas de Coria y Navalmoral de la Mata sobre su pulsotipo SARM predominante, deben ser interpretados con prudencia, pues cuentan con un tamaño de muestra pequeño (3 y 4 aislados respectivamente). El hecho de que existan 5 situaciones distintas de predominancia de un pulsotipo SARM en 8 AAM diferentes, indica, no solo la gran heterogeneidad con la que SARM se distribuye en Extremadura, sino que además refleja que los centros hospitalarios de cada AAM son más estancos de lo que en principio puedan parecer, dificultando así la difusión hacia otras áreas del pulsotipo que en esa zona sea el predominante. La excepción a esto serían las áreas de Cáceres, Badajoz y Don Benito-Villanueva, entre las que el pulsotipo E8a difunde abiertamente. Hasta la fecha no ha sido publicado ningún estudio acerca de la variabilidad clonal de SARM en alguna comarca, provincia o Comunidad Autónoma española.

Otro objetivo de nuestro estudio fue comprobar si existían resistencias antibióticas que pudieran asociarse específicamente a uno o varios genotipos determinados, objetivo que no hemos encontrado reflejado en ningún trabajo publicado hasta la fecha. Una vez analizados los resultados estadísticos, no encontramos diferencias significativas entre los ratios de resistencia mostrados por los diferentes genotipos, para ninguno de los antibióticos no específicos para SARM (utilizando el método estadístico FDR). Sin embargo, con los valores obtenidos por Exacto de Fisher (método menos ajustado que el anterior) podemos determinar que los genotipos E8a y E10 se inclinan hacia ratios de resistencia mayores para Levofloxacino en comparación a los mostrados por otros pulsotipos mayoritarios. De manera análoga ocurre para el pulsotipo E20 con Mupirocina. Para Gentamicina, Tobramicina, Eritromicina, Clindamicina, Fosfomicina, Ac. Fusídico y Rifampicina, no podríamos en ningún caso aventurar la sensibilidad de SARM a estos antibióticos en función del genotipo. En relación a los antibióticos específicos para SARM, si bien ninguno de los cuatro (Vancomicina, Tigeciclina, Daptomicina y Linezolid) presentan resistencias, desde el punto de vista de la vigilancia de la susceptibilidad antimicrobiana (aumento de las CMI) y en extensión, desde un punto de vista terapéutico, consideramos que puede resultar provechoso conocer posibles asociaciones entre un genotipo específico y una CMI elevada o una sensibilidad reducida a alguno de estos antibióticos, utilizados

habitualmente en el tratamiento de infecciones hospitalarias (causantes de brotes) o comunitarias graves causadas por SARM. Así, con excepción de Daptomicina, para los otros tres, Vancomicina, Tigeciclina y Linezolid, encontramos diferencias significativas entre el valor medio de CMI obtenido en los diferentes genotipos mayoritarios. Se obtuvo que el genotipo E7b, predominante en el AAM de Plasencia, presenta una CMI significativamente elevada para Tigeciclina; que E8b, mayoritario en el AAM de Coria, presenta una CMI significativamente elevada para Vancomicina; o que E20, presenta una CMI significativamente baja para Linezolid. Señalar que ningún genotipo mayoritario presenta una CMI para ninguno de los antibióticos específicos para SARM, significativamente más elevada con respecto a todos y cada uno de los otros genotipos mayoritarios, por lo que consideramos que la información obtenida no es suficiente para instaurar prioridades en la antibioterapia frente a SARM en un determinado hospital o AAM, más allá de la indicación terapéutica atribuida a cada antibiótico según el cuadro clínico (vancomicina en bacteremias, linezolid en neumonías, tigeciclina en infecciones de piel y tejidos blandos, o daptomicina en bacteriemias y endocarditis). Sin embargo, conocer que los aislados de un determinado pulsotipo tienden a mostrar CMIs más altas hacia uno de estos antibióticos, resulta importante en la vigilancia de la susceptibilidad antibiótica de SARM para evitar futuras resistencias. En la misma línea se sitúa el razonamiento sobre el hecho de que el genotipo E8b presente un ratio de aislados SARM con CMIs a Vancomicina superior a $1 \mu\text{g/ml}$ significativamente elevado. En este caso, el 100% de los aislados E8b tienen una $\text{CMI}_{\text{VANCOMICINA}} > 1 \mu\text{g/ml}$. Si nos basamos en el hecho de que ésta se asocia a fracaso terapéutico, nosotros no recomendamos el tratamiento de un brote SARM causado por este pulsotipo, con Vancomicina. Una misma conclusión podríamos sacar para el pulsotipo E20, también con un 100% de aislados con $\text{CMI}_{\text{VANCOMICINA}} > 1 \mu\text{g/ml}$. Sin embargo el bajo número de aislados descritos (solo 4), hacen que esta característica la consideremos solo como una clara tendencia, que habría que confirmar con un tamaño de muestra mayor.

Queremos resaltar la presencia en Extremadura de dos genotipos SARM, E17 y un perfil ESP, que si bien son muy infrecuentes (solo se ha descrito un aislado de cada uno), destaca la importante multiresistencia antibiótica que muestran. Son resistentes a Gentamicina, Tobramicina, Levofloxacino, Eritromicina, Clindamicina, Fosfomicina, y Mupirocina; además de presentar sensibilidad disminuida a Vancomicina ($\text{CMI} = 1.5 \mu\text{g/ml}$) y la CMI a Linezolid máxima registrada en la población SARM estudiada ($2 \mu\text{g/ml}$). Ambos aislados presentan un perfil de bandas por PFGE muy similar, con las

diferencias mínimas como para clasificarlos como pulsotipos diferentes, pero ambos presentan un perfil de resistencia antibiótica idéntico, y han sido aislados en el mismo AAM, en Cáceres. Posiblemente este aislado ESP proceda de una derivación filogenética de E17. Si bien no existen trabajos previos que asocien directamente E17 con multiresistencia, y el número de aislados descritos en nuestro estudio es mínimo, será necesario tenerlo presente ante cualquier brote SARM que se dé en el AAM de Cáceres.

Las diferencias mostradas por los diferentes genotipos SARM mayoritarios en cuanto al tipo de muestra en el que se aíslan, a parte de no resultar significativas, son muy discretas desde un punto de vista solo descriptivo, por lo que concluimos que no existe ninguna apetencia especial de ningún genotipo SARM con respecto a algún tejido u órgano en concreto.

Dejando al margen los clones CO-SARM y en lo que se refiere a las cepas productoras de infecciones asociadas al cuidado sanitario, no existe en la bibliografía ningún trabajo que señale una asociación significativa de un genotipo SARM determinado, con el ambiente extrahospitalario e intrahospitalario. El análisis estadístico de nuestros datos revela que no se observa ningún genotipo SARM en Extremadura, relacionado significativamente con el entorno extrahospitalario o intrahospitalario, por lo que no podemos predecir el genotipo causante de un brote, según este se produzca en uno u otro ambiente.

La distribución geográfica en Extremadura de las bacteriemias causadas por SARM, demuestra que no existe en ningún AAM una proporción estadísticamente significativa de SARM procedente de hemocultivo con respecto al resto de muestras, mayor con respecto al resto, aunque si se observan algunas tendencias. Así, podemos destacar que el AAM de Cáceres es el área que mayor número de cepas SARM aisladas de hemocultivo ha aportado, aunque ese número representa solo el 12% de todos los SARM aislados en esa área, porcentaje similar al que se obtiene para el resto de AAM. En el lado contrario se encuentra el AAM de Mérida, que destaca por el bajo número de cepas SARM aisladas de hemocultivos (solo se ha reportado una en todo el año 2010), aún siendo la tercera área con mayor población de la región. Ya sorprendió la baja tasa de incidencia y prevalencia de SARM en este AAM, pero esta situación es más favorable aún ante el bajo ratio, apenas un 3.4%, de SARM aislados de hemocultivo. Destacar la situación tan dispar que en cuanto a la proporción de SARM procedentes de hemocultivo con respecto al resto de muestras, se da en las dos AAM más pequeñas y

con menos aislados aportados: Navalморal de la Mata y Coria. Mientras en esta última no se ha dado ningún caso de bacteriemia por SARM dentro de los 13 aislados coleccionados, en Navalморal, que solo ha reportado 9 aislados SARM, tres de ellos proceden de hemocultivo, siendo así el AAM donde el porcentaje que representan los hemocultivos con respecto al resto de muestras es mayor.

Si comparamos los ratios de resistencia a los antibióticos no específicos para SARM, de los aislados de hemocultivos, con respecto a los obtenidos en el conjunto de aislados (independientemente del tipo de muestra del que proceden), observamos que los primeros son siempre algo inferiores en todos los antibióticos. Así, antibióticos como Gentamicina, Mupirocina o Fosfomicina, que para el conjunto de aislados ya mostraban ratios de resistencia muy bajos (7-9%), entre los SARM causantes de bacteriemia la resistencia es prácticamente inexistente (0-3%). Creemos que el hecho de que en los protocolos terapéuticos se utilicen los antibióticos específicos para SARM (Daptomicina, Linezolid, Tigeciclina o Vancomicina) para el tratamiento de una bacteriemia por SARM, reduce el contacto de estos aislados con antibióticos no específicos, lo que induce menos resistencias a éstos. Por otra parte, para los antibióticos específicos para SARM, lejos de encontrar resistencias, si observamos un aumento de la CMI media en el conjunto de aislados SARM procedentes de hemocultivos, con respecto al conjunto total de aislados (para los casos de Linezolid y Tigeciclina estas diferencias se confirman estadísticamente significativas, aunque no para Vancomicina), con excepción de Daptomicina, donde la CMI media disminuye en el conjunto de aislados de hemocultivos. En esta línea, se reporta un porcentaje de aislados con Sensibilidad Reducida a Vancomicina un 9% más en el conjunto de aislados procedentes de hemocultivos que en el conjunto total de aislados. Estos resultados ponen de manifiesto el uso especialmente frecuente en nuestro medio hospitalario de Vancomicina, Tigeciclina y Linezolid, en el tratamiento de bacteriemias causadas por SARM. La proporción de cepas SARM procedentes de hemocultivos con Sensibilidad Reducida a Vancomicina obtenida en nuestro estudio (51%), aunque inferior a la última reportada en España con un 66% (*Rojas y col., 2012*), la consideramos preocupantemente alta. Esto, junto a la obtención de una CMI media de Daptomicina inferior en el grupo SARM de hemocultivos con respecto al conjunto total de aislados, habla a favor de utilizar Daptomicina con preferencia a Vancomicina en una bacteriemia por SARM en nuestro medio. Esta afirmación se ve reforzada por el hecho de que Daptomicina tiene actividad probada en estos cuadros clínicos (*Bamberger y*

col., 2007) y es más coste-efectiva que la segunda en el tratamiento de una bacteriemia por SARM (*Rubio-Terrés y col., 2012*). Varios trabajos publicados recientemente, demuestran que una elevada CMI a Vancomicina (aunque todavía sensible) se asocia con un incremento de la mortalidad en los cuadros de bacteremia (*Wi y col., 2012; Jacob y col., 2012; Soriano y col., 2008*). Guías y consensos recientes posicionan a Daptomicina como la alternativa ideal en estas situaciones, indicando su utilización en la bacteriemia por SARM, con una CMI a Vancomicina > 1 mg/l, así como en pacientes donde la disfunción renal desaconseje la utilización de vancomicina. La evidencia de peor pronóstico en la bacteriemia por SARM cuando el tratamiento empírico es inadecuado, lleva a la recomendación de Daptomicina como primera elección en pacientes críticos con sospecha de infección bacteriémica por grampositivos con disfunción renal y/o en hospitales, donde la prevalencia de SARM con CMI a Vancomicina > 1 mg/l sea elevada (*Llinares y col., 2012*).

Aunque ya hemos señalado previamente que los resultados estadísticos no nos permiten asociar ningún pulsotipo/s específicamente a ningún tipo de muestra (entre ellas hemocultivos), observamos que las áreas con los mayores porcentajes de aislamientos procedentes de hemocultivos son Plasencia y Navalmoral, áreas donde el perfil genotípico predominante es el grupo de pulsotipos minoritarios. Sin embargo, el otro AAM donde este grupo de pulsotipos es el predominante es Badajoz, donde el porcentaje que representan los aislados de hemocultivos con respecto al resto de muestras es el más bajo, después del mostrado por el AAM de Mérida. Así pues, a la vista de estos datos, no parece que ningún genotipo SARM esté asociado con una mayor probabilidad de causar bacteriemia.

La epidemiología molecular de los SARM aislados en hemocultivos es similar a la que se obtiene para todo el conjunto de aislados, independientemente del tipo de muestra del que proceden. Así el perfil típico de un SARM causante de bacteremia en Extremadura es un tipo t067 o t002, del complejo CC067, del grupo clonal CC005, con un cassette tipo SCCmecIVa y un perfil ST125 por el método MLST. Estos resultados son idénticos a los reportados recientemente por estudios de vigilancia epidemiológica del SARM causante de bacteremias realizados en otras Comunidades Autónomas (*Velasco y col., 2012; Gasch y col., 2011*). Los trabajos publicados sobre epidemiología molecular de SARM productor de bacteriemias en Norteamérica y Asia, muestran un predominio de los aislados SCCmecII (*Kwon y col., 2011; Ponce de León y col., 2010; Moise y col., 2009; Chua y col., 2008*), el cual se muestra de manera testimonial en

nuestros resultados, y en los de los trabajos anteriormente mencionados. La clasificación en pulsotipos de los SARM productores de bacteremias también sigue la misma distribución que para todo el conjunto de aislados, con la salvedad de que E7b supera a E8a como el pulsotipo más frecuente, y que E7a, que es uno de los pulsotipos mayoritarios en la muestra general, no se describe en el conjunto de SARM aislados en hemocultivos. Curiosamente, éste es el pulsotipo mayoritario en el AAM de Mérida, en donde como ya indicamos previamente, sorprende el bajo número de SARM aislado de hemocultivos. Así, a raíz de los resultados estadísticos no podemos indicar ningún pulsotipo que de manera específica se relacione con su aislamiento en sangre, pero si podemos decir que uno de los pulsotipos mayoritarios, E7a, sería una rara causa de bacteremia.

Según el criterio utilizado en este estudio para la clasificación de los aislados como extrahospitalarios, y según los datos recogidos, la infección por SARM de carácter extrahospitalaria en Extremadura alcanza el 44.8%, frente a el 55.2% de la infección con carácter intrahospitalaria. Este resultado no sorprende, pues a tenor de las conclusiones de estudios precedentes realizados en nuestro país, la incidencia de la infección por SARM asociada a cuidados sanitarios fuera del hospital no ha hecho más que aumentar en la última década, erigiéndose en uno de los aspectos más preocupantes de la infección estafilocócica. En el año 2002, la presencia de cepas SARM en este medio en España se cifró en un 17.8% (*Cuevas y col., 2004*). Ya en el año 2003, un estudio multicéntrico realizado en 64 hospitales españoles, mostró que más del 27% de los aislamientos de SARM se produjeron en pacientes no ingresados, pero que habían tenido un contacto reciente con la atención sanitaria (*Rodríguez-Baño y col., 2009*). Si damos un salto hasta el año 2008, el estudio EPINE de ese año refleja proporciones similares entre la infección comunitaria y nosocomial debida a SARM, con el 45 y el 55% de los casos, respectivamente. Esto se confirma en estudio EPINE del año 2009, con el 46% de infecciones comunitarias. Y en el siguiente año, 2010, por primera vez, las infecciones extrahospitalarias son mayoría sobre las intrahospitalarias, con el 51% de los casos (*EPINE 2008, EPINE 2009, EPINE 2010*). La probable razón del continuo aumento en los últimos años de la prevalencia del SARM extrahospitalario, sea el continuo desarrollo de estructuras asistenciales alternativas a la hospitalización en nuestros servicios públicos de salud (hospitales de día, hospitalización domiciliaria, centros de larga y media estancia, residencias geriátricas y sociosanitarias). El hospital es cada vez menos un compartimento estanco diferenciado del resto del entramado

sanitario. Si bien es cierto que el hospital sigue siendo el lugar de máximo riesgo para la adquisición de bacterias resistentes, esto ya no es exclusivo de estos centros. Los pacientes pueden salir del hospital colonizados por estos microorganismos y transmitirlos a otros pacientes atendidos en esas estructuras alternativas.

De acuerdo a los resultados obtenidos, el aislamiento en Extremadura de un SARM causante de una infección catalogada como extrahospitalaria, con una mayor probabilidad se haría en una muestra de exudado u orina correspondiente a una mujer joven (1-39 años). En esto coincidimos con aquellos estudios que realizan la misma definición de SARM extrahospitalario que nosotros (infecciones detectadas en la comunidad pero que presentan factores de riesgo hospitalarios) (*Larsen y col., 2009; Böcher y col., 2008*), aunque a diferencia de lo publicado por *Larsen y col. (2009)*, nuestra mayor frecuencia de SARM extrahospitalario en la población joven no llega a ser significativa.

Si atendemos a la proporción del SARM extrahospitalario e intrahospitalario por AAM, observamos una gran heterogeneidad en las proporciones. Hay AAM, como Mérida, Cáceres o Plasencia, que reproducen las proporciones obtenidas para la región, con porcentajes parejos para los aislados extrahospitalarios e intrahospitalarios. Pero encontramos áreas donde el predominio de los aislados de origen intrahospitalario es claro, como Badajoz o Llerena, frente a otras en las que predomina claramente el SARM extrahospitalario, como Navalmoral o Coria. Entendemos que la constante derivación de pacientes que requieren intervenciones quirúrgicas importantes o con patologías graves, desde los hospitales comarcales de Navalmoral y Coria, hacia los hospitales de referencia de las áreas de Badajoz y Cáceres, sería un factor causal importante de la baja o nula incidencia del SARM intrahospitalario en las AAM más pequeñas de Extremadura.

La susceptibilidad antibiótica de los aislados SARM productores de infecciones extrahospitalarias en Extremadura, no se diferencia de la mostrada por aquellos aislados en el ambiente intrahospitalario, tanto en lo que se refiere a los antibióticos específicos como a los no específicos frente a SARM. Solo destacar el hallazgo en el conjunto de SARM extrahospitalarios de dos aislados resistentes a Ác. Fusídico, cuando entre los SARM catalogados como intrahospitalarios no se reporta ninguno. De acuerdo a lo publicado en trabajos previos (*Mitra y col. 2009; Sule y col. 2007; Shah y col., 2003*), el frecuente empleo de Ác. Fusídico para el tratamiento tópico u oral de infecciones de piel como impétigo, eczemas o foliculitis (de las más frecuentes reportadas para el

SARM extrahospitalario) puede ser una explicación para la aparición de resistencias a Ác. Fusídico entre los SARM extrahospitalarios asociado a cuidados sanitarios.

Al igual que con la resistencia antibiótica, tampoco en relación al tipaje molecular se han encontrado diferencias significativas entre los SARM extrahospitalarios e intrahospitalarios. Sin embargo, desde un punto de vista descriptivo, si podemos señalar que se describe un gran número de perfiles esporádicos y minoritarios en la población SARM intrahospitalaria, que no encontramos en la extrahospitalaria. Y observamos que en las áreas donde el conjunto de pulsotipos minoritarios es el mayoritario (AAM de Badajoz y Llerena), es precisamente donde obtenemos un mayor predominio de la infección intrahospitalaria.

Este estudio pone de manifiesto que la incidencia de las cepas CO-SARM, es decir, un SARM aislado en la comunidad sin relación alguna con los cuidados sanitarios, es en Extremadura un fenómeno ya existente, pero todavía muy infrecuente. Así de los 100 aislados SARM genotipados en este trabajo, solo uno presenta un perfil de bandas en PFGE que coincide con alguno de los tipos descritos en la bibliografía como cepa CO-SARM, concretamente el pulsotipo A1. Desde el punto de vista molecular, esta cepa pertenece al perfil ST8 (t008-IVc-CC8), predominante en España por encima de los otros dos tipos descritos en nuestro país, el ST5 y el ST80 (*Rolo y col., 2012; Cercenado y col., 2008a*). Como en todos los casos en los que se ha descrito CO-SARM en España, nuestra cepa muestra gran susceptibilidad antibiótica, siendo resistente solo a Mupirocina. Sin embargo no es productora de PVL, a diferencia de las cepas CO-SARM reportadas hasta ahora en el país (*Cercenado y col., 2008a; Manzur y col., 2008; Broseta 2006*). La gran mayoría de los aislados ST8 tienen todas las características del clon USA300, sugiriendo que este clon fue importado de Estados Unidos y comenzó a establecerse y propagarse con éxito en Europa. Sin embargo, la gran mayoría de los aislados ST8 relacionados con USA300, carecen de alguna de sus características moleculares típicas, y muestran otras en su lugar, por ejemplo la presencia del SCCmecV, o la ausencia de PVL como es nuestro caso. Se han descrito al menos seis tipos de SCCmec y 9 spa-tipos diferentes asociados a ST8, lo que indica que diferentes subclones existen en la estructura poblacional de ST8. Así pues, la diversidad genética que se describe dentro de ST8 es enorme, teniendo muchas de sus variantes un origen totalmente desconocido. Éstas pueden haber derivado del clon epidémico USA300 importado de Norteamérica y evolucionado rápidamente en Europa, y con el

fin de adaptarse a diferentes y variadas presiones selectivas, han adquirido o perdido factores de virulencia como PVL o genes de resistencia antibiótica (*Rolo y col., 2012*).

A pesar de mostrarse la infección CO-SARM en Extremadura como un fenómeno todavía testimonial, recomendamos mantener la alerta ante aislamientos de SARM en muestras procedentes de la comunidad, pertenecientes a pacientes que no cumplan ninguno de los factores de riesgo que permiten asociar la cepa a cuidados sanitarios (ACS-SARM). Diferentes estudios han señalado la diseminación de cepas CO-SARM en la comunidad, llegando a ser alguna de ellas la más prevalente entre las que causan infecciones por *Staphylococcus aureus* en determinadas áreas geográficas de Estados Unidos (*Mishaan y col., 2005*). Otro aspecto preocupante es la posible diseminación de estas cepas desde la comunidad hacia el hospital, que pueden causar brotes en pacientes ingresados en unidades clínicas de alto riesgo. El probable incremento en la incidencia de infecciones por SARM fuera del ambiente hospitalario tiene importantes implicaciones, tanto para las posibles estrategias de salud pública para el control de estas infecciones, como para el diagnóstico y tratamiento de las mismas. Futuros estudios que determinen la prevalencia y factores asociados a la colonización con CO-SARM serán muy útiles para definir estrategias de prevención de la transmisión de estos clones en la comunidad.

6. CONCLUSIONES

Las conclusiones de la presente Tesis Doctoral son:

1. Características demográficas de la infección por SARM en la Comunidad Autónoma de Extremadura:
 - a. La prevalencia de SARM en Extremadura durante el año 2010 (20.2%) es moderadamente inferior a la reportada para toda España.
 - b. Las AAM con mayor incidencia de SARM son Cáceres y Don Benito-Villanueva, siendo ésta última además la que reporta una mayor prevalencia con respecto al aislamiento de *Staphylococcus aureus* total. Coria es el AAM con menor incidencia y Plasencia la que reporta una menor prevalencia.
 - c. Más de tres cuartas partes de las infecciones por SARM tienen lugar en pacientes con edad superior a 65 años. El exudado es el tipo de muestra más común, seguido de la muestra respiratoria, orina y hemocultivo en este orden.
2. Sensibilidad antibiótica de SARM en Extremadura:
 - a. El patrón de multiresistencia antibiótica más frecuente es el que incluye a Tobramicina, Levofloxacino y Eritromicina. Se evidencia la recuperación de la sensibilidad de SARM a Rifampicina y Gentamicina. Fosfomicina, Ac.Fusídico, y Nitrofurantoína mantienen ratios de resistencia muy bajos. No se encuentran cepas SARM resistentes a SXT o Quinupristina/Dalfopristina.
 - b. Se declara la ausencia de cepas resistentes a Daptomicina, Tigeciclina y Linezolid.
 - c. No se describen cepas VRSA o VISA. En el conjunto de SARM procedentes de hemocultivos, tampoco se obtienen cepas h-VISA. Sin embargo, cerca de la mitad de los aislados son cepas con Sensibilidad Disminuida a Vancomicina, susceptibles de asociarse a fracaso terapéutico.
3. Clonalidad de SARM en Extremadura:
 - a. Existe una gran variabilidad genética en Extremadura, que se evidencia en la existencia de diferentes genotipos, según los diferentes métodos estudiados, distribuidos de forma heterogénea en todas las áreas.
 - b. El sistema rep-PCR Diversilab separa la muestra en 18 patrones (P), con dos mayoritarios, P1 y P16. P2, P3 y P4, junto con P1, constituyen el grupo mayoritario 1, donde se incluyen la mitad de los aislados.

- c. Los spa-tipos mayoritarios en Extremadura son t067 y t002, que a su vez forman un único grupo clonal llamado CC-067 (72%). Éste último, junto al CC-1399, pertenece al cluster CC-5.
 - d. Los grupos clonales CC-067 y CC-1399 se corresponden con los tipos de secuencias ST125/ST5 y ST146 respectivamente.
 - e. El cassette SCCmec IVc es el claro predominante (77%)
 - f. PFGE revela la existencia de 27 patrones, agrupando más de la mitad de los casos en 4 pulsotipos predominantes: E8a, E7a, E7b y E8b.
 - g. El fagogrupo III es el predominante, seguido del Mixto.
4. Comparación de métodos para genotipaje de SARM:
- a. El sistema rep-PCR/Diversilab se confirma como un método más rápido y técnicamente menos complejo que la técnica PFGE. Su formato en kit comercial y el apoyo en un software informático, le permiten adaptarse mejor que PFGE al trabajo rutinario de un laboratorio hospitalario.
 - b. PFGE se demuestra como el método con mayor poder de discriminación, tomándose sus resultados como referencia. Aunque la capacidad de discriminación de Diversilab es cercana a la de PFGE y superior a la de *spa typing*, su discordancia con respecto a PFGE es importante. El principal motivo es que Diversilab no discrimina entre los 3 pulsotipos SARM predominantes en nuestro medio (E7a, E8a y E7b), por lo que recomendamos utilizar PGFE para el estudio de nuestros brotes hospitalarios, aún tratándose de realizar sólo un cribado inicial.
5. La distribución de los pulsotipos mayoritarios de SARM es muy heterogénea en la región, sin que se haya conseguido asociar de manera significativa, ningún pulsotipo a un AAM concreto. Aunque de manera descriptiva, se observa que hasta 4 pulsotipos distintos llegan a ser el más frecuente en al menos un AAM: E8b en AAM de Coria, E8a en AAM de Don Benito-Villanueva, Cáceres y Badajoz, E7b en AAM de Plasencia y E7a en AAM de Mérida.
6. No existen diferencias significativas entre los ratios de resistencia mostrados por los clones mayoritarios, para ninguno de los antibióticos ensayados. Tampoco se observa una asociación significativa entre la Sensibilidad Disminuida a Vancomicina y alguno de los pulsotipos. Así, el conocimiento del pulsotipo causante de un brote infeccioso, no es suficiente para instaurar prioridades en la antibioterapia frente a SARM en un determinado hospital o

AAM. Sin embargo, de manera descriptiva, se observa que todos los aislados E8b tienen Sensibilidad Disminuida a Vancomicina.

7. Ningún genotipo SARM se relaciona específicamente con un tipo de muestra en concreto ni se asocia de manera significativa con el entorno extrahospitalario o intrahospitalario. Sin embargo, destaca la baja frecuencia de E8a y el conjunto de pulsotipos minoritarios en el ámbito extrahospitalario. En cualquier caso, no podemos predecir el genotipo causante de un brote según éste se produzca en uno u otro ambiente.
8. Características del SARM aislado de hemocultivo:
 - a. La mayor incidencia del aislamiento de SARM en hemocultivo se da en el AAM de Cáceres. La mayor prevalencia con respecto al aislamiento en otro tipo de muestras, se da en las AAM de Plasencia y Navalморal.
 - b. Existe un aumento significativo de la CMI media a Linezolid y Tigeciclina en el conjunto de SARM aislados de hemocultivos, con respecto al conjunto total de aislados.
 - c. Las características genotípicas de un SARM causante de bacteremia en Extremadura son análogas a las reportadas para el conjunto total de aislados.
9. Situación de la infección extrahospitalaria por SARM en Extremadura:
 - a. La proporción del SARM extrahospitalario en Extremadura es del 44%, con una incidencia muy variable según el AAM.
 - b. La susceptibilidad antibiótica de los aislados SARM productores de infecciones extrahospitalarias, no se diferencia de la mostrada por los asociados al ambiente intrahospitalario.
 - c. No se encuentran diferencias significativas en la distribución clonal entre los SARM intrahospitalarios y los extrahospitalarios, aunque se describe un gran número de pulsotipos minoritarios y esporádicos en la población SARM intrahospitalaria, que no se encuentra en la extrahospitalaria.
 - d. La incidencia de cepas CO-SARM es un fenómeno existente en Extremadura, pero muy incipiente. Solo se describe un aislado de pulsotipo A1, perteneciente al perfil ST8 (t008-IVc-CC8), de gran susceptibilidad antibiótica, sin secuencia ACME (no cepa USA-300) y no productor de PVL.

7. BIBLIOGRAFÍA

Aguilar L., Giménez MJ., Barberán J. 2009. Heterorresistencia y tolerancia a glucopéptidos en aislados grampositivos en el hospital: ¿fenómenos “invisibles para el clínico con posible traducción clínica?”. *Rev. Esp. Quimioter.* 22(4):173-179.

Al Saadi MM., Al Zamil FA., Bokhary NA., Al Shamsan LA., Al Alola SA., y col. 2009. Acute septic arthritis in children. *Pediatr. Int.* 51(3):377-380.

Ammerlaan HS., Kluytmans JA., Wertheim HF., Nouwen JL., Bonten MJ. 2009. Eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage: a systematic review. *Clin. Infect. Dis.* 48(7):922-930.

Andriessse GI., Elberts S., Vrolijk A., Verhulst C., Kluytmans JA. 2011. Evaluation of a fourth-generation latex agglutination test for the identification of *Staphylococcus aureus*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 30:259-264

Andriessse GI., Elberts S., Vrolijk A., Verhulst C., Kluytmans JA. 2011. Evaluation of a fourth-generation latex agglutination test for the identification of *Staphylococcus aureus*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 30(2):259-264

Appelbaum PC. 2007. Reduced glycopeptide susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Int. J. Antimicrob. Agents.* 30(5):398-408.

Archer GL. 1998. *Staphylococcus aureus*: a well-armed pathogen. *Clin. Infect. Dis.* 26:1179-1181.

Argudín MA., Mendoza MC., Vázquez F., Guerra B., Rodicio MR. 2011. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* bloodstream isolates from geriatric patients attending a long-term care Spanish hospital. *J. Med. Microbiol.* 60(Pt 2):172-179.

Argudín MA., Mendoza MC., Méndez FJ., Martín MC., Guerra B., y col. 2009 Clonal complexes and diversity of exotoxin gene profiles in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates from patients in a Spanish hospital. *J. Clin. Microbiol.* 47(7):2097-2105.

Asensio A. 2006. Eficacia de las medidas de control para evitar la transmisión de SARM en las instituciones sanitarias. Una visión actual. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 24(3):147-148

Baba T., Takeuchi F., Kuroda M., Yuzawa H., Aoki K., y col. 2002. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet.* 359(9320):1819-1827.

Babouee B., Frei R., Schultheiss E., Widmer AF., Goldenberger D. 2011. Comparison of the Diversilab repetitive element PCR system with spa typing and pulsed-field gel electrophoresis for clonal characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 49 (4). 1549-1555.

Bamberger DM. 2007. Bacteremia and endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the potential role of daptomycin. *Ther. Clin. Risk. Manag.* 3(4):675-684.

- Bassetti M., Treçarichi EM., Mesini A., Spanu T., Giacobbe DR., y col.** 2011. Risk factors and mortality of healthcare-associated and community-acquired *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *Clin. Microbiol. Infect.* Sep 19. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03679.x
- Ben-David D., Novikov I., Mermel LA.** 2009. Are there differences in hospital cost between patients with nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream infection and those with methicillin-susceptible *S. aureus* bloodstream infection. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 30(5):453-460.
- Benjamini Y., Hochberg Y.** 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Soc. Series B. Stat. Methodol.* 57. 289:300.
- Berger-Bachi B.** 1998. Role of fem factors in methicillin resistance. *Drug Resist. Updat.* 1(5):325-335.
- Berger-Bachi B.** 1999. Genetic basis of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Cell. Mol. Life Sci.* 56:764-770.
- Bhakdi S., Tranum-Jensen J.** 1991. Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Rev.* 55(4):733-751.
- Biedenbach DJ., Moet GJ., Jones RN.** 2004. Occurrence and antimicrobial resistance pattern comparisons among bloodstream infection isolates from the SENTRY antimicrobial surveillance program (1997-2002). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 50(1):59-69
- Bierbaum G., Fuchs K., Lenz W., Szekat C., Sahl H-G.** 1999. Presence of *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin in Germany. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 18:691-6.
- Billeter M., Zervos MJ., Chen AY., Dalovisio JR., Kurukularatne C.** 2008. Dalvabancin: a novel once-weekly lipoglycopeptide antibiotic. *Clin. Infect. Dis.* 46:577-583.
- Blair JE., Williams RE.** 1961. Phage typing of staphylococci. *Bull. World Health Organ.* 24:771-784
- Blanc DS., Francioli P., Le Coustumier A., Gazagne L., Lecaillon E., y col.** 2001. Reemergence of gentamicin-susceptible strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in France: a phylogenetic approach. *J. Clin. Microbiol.* 39(6):2287-2290.
- Blot S, Depuydt P, Vandewoude K, De Bacquer D.** 2007. Measuring the impact of multidrug resistance in nosocomial infection. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 20(4):391-6.
- Böcher S., Gervelmeyer A., Monnet DL., Mølbak K., Skov RL** 2008. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: risk factors associated with community-onset infections in Denmark. *Clin. Microbiol. Infect.* 14(10):942-948
- Bohach GA., Fast DJ., Nelson RD., Schlievert PM.** 1990. Staphylococcal and streptococcal pyrogenic toxins involved in toxic shock syndrome and related illnesses. *Crit. Rev. Microbiol.* 17(4):251-272.
- Bokarewa MI., Jin T., Tarkowski A.** 2006. *Staphylococcus aureus*: staphylokinase. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 38(4):504-509.

- Bone RC.** 1994. Gram-positive organisms and sepsis. *Arch. Intern. Med.* 154(1):26-34.
- Boucher H., Miller LG., Razonable RR.** 2010. Serious infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin. Infect. Dis.* 51(S2):S183-S197.
- Boyce JM., Pittet D.** 2002. Guideline for Hand Hygiene in Health-Care Settings: recommendations of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee and the HICPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task Force. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 23(12 Suppl):S3-40.
- Broseta A., Chaves F., Rojo P., Otero JR.** 2006. Emergencia de un clon de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina de origen comunitario en la población pediátrica del sur de Madrid. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 24(1):31-35.
- Burton PR., Tobin MD., Hopper JL.** 2005. Key concepts in genetic epidemiology. *Lancet.* 366:941-951.
- Byrne ME., Rouch DA., Skurray RA.** 1989. Nucleotide sequence analysis of IS256 from the *Staphylococcus aureus* gentamicin-tobramycin-kanamycin-resistance transposon Tn4001. *Gene.* 81(2):361-367.
- Carle FG., Olson MV.** 1984. Separation of chromosomal DNA molecules from yeast by orthogonal-field-alternation gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* 14:5647-5664.
- Carrigo JA., Silva-Costa C., Melo-Cristino J., Pinto FR., De Lencastre R., y col.** 2006. Illustration of a common Framework for relating multiple typing methods by application to macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes*. *J. Clin. Microbiol.* 44:2524-2532.
- Cepeda JA., Whitehouse T., Cooper B., Hails J., Jones K., y col.** 2005. Isolation of patients in single rooms or cohorts to reduce spread of MRSA in intensive-care units:prospective two-centre study. *Lancet.* 365(9456):295-304.
- Cercenado E.** 2010. Actualización en las resistencias de las bacterias grampositivas. *Med Clin (Barc).* 135(S3):10-15.
- Cercenado E., Cantón R.** 2009. Diagnóstico microbiológico de las infecciones osteoarticulares. *Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* 34.
- Cercenado E., Cuevas. O., Marín M., Bouza E., Trincado P., y col.** 2008b. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Madrid, Spain: transcontinental importation and polyclonal emergente of Panton-Valentine leukocidin-positive isolates. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 61(2):143-149.
- Cercenado E., Ruiz de Gopegui E.** 2008a. *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina de origen comunitario. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 26(S13):19-24.
- Chambers HF.** 1983. *Staphylococcus aureus* endocarditis: clinical manifestations in addicts and nonaddicts. *Medicine (Baltimore).* 62(3):170-177.
- Chambers HF.** 1997. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev.* 10(4):781-791.

Chant C., Smith OM., Marshall JC., Friedrich JO. 2011. Relationship of catheter-associated urinary tract infection to mortality and length of stay in critically ill patients: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Crit. Care Med.* 39(5):1167-73.

Cheung AL., Fischetti VA. 1990. The role of fibrinogen in staphylococcal adherence to catheters in vitro. *J. Infect. Dis.* 161(6):1177-1186

Chongtrakool P., Ito T., Ma XX., Kondo Y., Trakulsomboon S., y col. 2006. Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in 11 asian countries: a proposal for a new nomenclature for SCCmec elements. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50(3):1001-1012.

Christie GE., Matthews AM., King DG., Lane KD., Olivarez NP., y col. 2010. The complete genomes of *Staphylococcus aureus* bacteriophages 80 and 80 α - implications for the specificity of SaPI mobilization. *Virology.* 407(2):381-390.

Chu G., Vollrath D., Davis RW. 1986. Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. *Science.* 234(4783):1582-1585.

Chua T., Moore CL., Perri MB., Donabedian SM., Masch W., y col. 2008. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream isolates in urban Detroit. *J. Clin. Microbiol.* 46(7):2345-2352

Chuang YC., Wang JT., Chen ML., Chen YC. 2010. Comparison of an automated repetitive-sequence-based PCR microbial typing system with pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *J. Clin. Microbiol.* 48. N°8. 2897-2901.

Church D.L., Chow B.L., Lloyd T., Gregson D.B. 2011. Comparison of automated repetitive-sequence-based polymerase chain reaction and spa typing versus pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 69(1):30-37

Clementino MM., de Filippis I., Nascimento CR., Branquinho R., Rocha CL., y col. 2001. PCR analyses of tRNA intergenic spacer, 16S-23S internal transcribed spacer, and randomly amplified polymorphic DNA reveal inter-and intraspecific relationships of *Enterobacter cloacae* strains. *Journal of Clinical Microbiology.* 39. 3865–3870.

Coleman DC., Sullivan DJ., Russell RJ., Arbuthnott JP., Carey BF., y col. 1989. Staphylococcus aureus bacteriophages mediating the simultaneous lysogenic conversion of β -lysin, staphylokinase and enterotoxin A: molecular mechanism of triple conversion. *J. Gen. Microbiol.* 135:1679-1697.

Cookson B.D., Robinson D.A., Monk A., Murchan S., Deplano A., y col. 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(6):1830-1837.

Courvalin P. 2006. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clin. Infect. Dis.* 42:S25-34.

Couto I., de Lencastre H., Severina E., Kloos W., Webster JA., y col. 1996. Ubiquitous presence of a mecA homologue in natural isolates of *Staphylococcus sciuri*. *Microb. Drug Resist.* 2(4):377-391.

Crisostomo MI., Westh H., Tomasz A., Chung M., Oliveira DC., y col. 2001. The evolution of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: similarity of genetic backgrounds in historically early methicillin-susceptible and resistant isolates and contemporary epidemic clones. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98(17):9865-9870.

Cristino JM., Fernandes ML., Garcia T., Serrano N., Salgado MJ. 1999. The diversity of *Staphylococcus aureus* strains isolated in a Lisbon hospital over a 4-year period. *Acta Med. Port.* 12(4-6):169-76.

Cuevas O., Cercenado E., Vindel A., Guinea J., Sánchez-Conde M., y col. 2004. Evolution of the antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. in Spain: five nationwide prevalence studies, 1986 to 2002. *Antimicrob Agents Chemother.* 48(11):4240-4245.

Cuevas O., Cercenado E., Bouza E., Castellares C., Trincado P., y col. 2007. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Spain: a multicentre prevalence. *Clin. Microbiol. Infect.* 13(3):250-256.

Cuevas O., Cercenado E., Goyanes MJ., Vindel A., Trincado P., y col. 2008. *Staphylococcus* spp. in Spain: present situation and evolution of antimicrobial resistance (1986-2006). *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2008 May;26(5):269-77.

Cui L., Iwamoto A., Lian JQ., Neoh H., Maruyama T., y col. 2006. Novel mechanism of antibiotic resistance originating in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50(2):428-438.

Deisenhofer J. 1981. Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from *Staphylococcus aureus* at 2.9- and 2.8-Å resolution. *Biochemistry.* 20(9):2361-2370.

Del Valle O., Trincado P., Martín MT., Gómez E., Cano A., y col. 1999. The prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* phagotype 95 in the Hospitales Vall d'Hebron of Barcelona. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 17(10):498-505.

Den Dunnen JT., van Ommen GJ. 1993. Methods for pulsed-field gel electrophoresis. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 38(1-2):161-177.

Denton M., Rajgopal A., Mooney L., Qureshi A., Kerr KG., y col. 2003. *Stenotrophomonas maltophilia* contamination of nebulizers used to deliver aerosolized therapy to inpatients with cystic fibrosis. *J. Hosp. Infect.* 55(3):180-183

Derbise A., de Cespedes G., el Solh N. 1997. Nucleotide sequence of the *Staphylococcus aureus* transposon, Tn5405, carrying aminoglycosides resistance genes. *J. Basic Microbiol.* 37(5):379-384.

Diep BA., Gill SR., Chang RF., Phan TH., Chen JH., y col. 2006. Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet.* 367(9512):731-739.

Dinges MM., Orwin PM., Schlievert PM. 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Rev.* 13(1):16-34.

Dobrindt U., Hochhut B., Hentschel U., Hacker J. 2004. Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 2(5):414-424.

Domínguez-Luzón MA., Rodríguez-Baño J. 2006. Infecciones por estafilococos. *Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. Panamericana, Madrid, España. pags. 253-262.

Donlan RM., Costerton JW. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15(2):167-193.

Drake TA., Pang M. 1988. *Staphylococcus aureus* induces tissue factor expression in cultured human cardiac valve endothelium. 157(4):749-756.

Drew RH., Perfect JR., Srinath L., Kurkimilis E., Dowzicky M., y col. 2000. Treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections with quinupristin-dalfopristin in patients intolerant of or failing prior therapy. *J. Antimicrob. Chemother.* 46:775-784.

Dubost JJ., Fis I., Soubrier M., Lopitiaux R., Ristori JM., y col. 1994. Septic arthritis in rheumatoid polyarthritis. 24 cases and review of the literature. *Rev. Rhum. Ed. Fr.* 61(3):153-165.

EARS (Antimicrobial Resistance Surveillance in Europe). 2010. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network.

Edwards AM., Massey RC., Clarke SR. 2012. Molecular mechanisms of *Staphylococcus aureus* nasopharyngeal colonization. *Mol. Oral Microbiol.* 27(1):1-10.

Enright MC., Day N., Davies CE., Peacock SJ., Spratt BG. 2000. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 38(3):1008-1015.

EPINE (Estudio de prevalencia de las infecciones nosocomiales). 21º estudio. 2010. Sociedad Española de Medicina Preventiva, Salud Pública e Higiene.

EPINE (Estudio de prevalencia de las infecciones nosocomiales). 20º estudio. 2009. Sociedad Española de Medicina Preventiva, Salud Pública e Higiene.

EPINE (Estudio de prevalencia de las infecciones nosocomiales). 19º estudio. 2008. Sociedad Española de Medicina Preventiva, Salud Pública e Higiene.

Erbaydar S, Akgün A, Eksik A, Erbaydar T, Bilge O, y col. 1995. Estimation of increased hospital stay due to nosocomial infections in surgical patients: comparison of matched groups. *J Hosp Infect.* 30(2):149-54.

Fajardo M., Hidalgo R., Rodríguez S., Gaona C., Sánchez RM., y col. 2012. Actividad de vancomicina, teicoplanina y linezolid en *Staphylococcus coagulasa* negativos resistentes a meticilina en aislados de hemocultivos pediátricos. *Rev. Esp. Quimioter.* 25(1):25-30.

- Faria NA., Oliveira DC., Westh H., Monnet DL., Larsen AR., y col.** 2005. Epidemiology of emerging methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Denmark: a nationwide study in a country with low prevalence of MRSA infection. *J. Clin. Microbiol.* 43(4):1836-1842.
- Fauci AS., Touchette NA., Folkers GK.** 2005. Emerging infectious diseases: a 10-year perspective from the national institute of allergy and infectious diseases. *Emerg. Infect. Dis.* 11(4):519-525.
- Fenner L., Widmer AF., Dangel M., Frei R.** 2008. Distribution of spa types among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates during a 6 year period at a low-prevalence University Hospital. *J. Med. Microbiol.* 57(5):612-616.
- Ferry T., Thomas D., Genestier AL., Bes M., Lina G., y col.** 2005. Comparative prevalence of superantigen genes in *Staphylococcus aureus* isolates causing sepsis with and without septic shock. *Clin. Infect. Dis.* 41(6):771-777.
- Filice GA., Nyman JA., Lexau C., Lees CH., Bockstedt LA., y col.** 2010. Excess costs and utilization associated with methicillin resistance for patients with *Staphylococcus aureus* infection. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 31(4):365-373.
- Fitzgerald JR., Sturdevant DE., Mackie SM., Gill SR., Musser JM.** 2001. Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus*: insights into the origin of methicillin-resistant strains and the toxic shock syndrome epidemic. *Proc Natl Acad Sci.* 98(15):8821-8826.
- Flock JL., Hienz SA., Heimdahl A., Schennings T.** 1996. Reconsideration of the role of fibronectin binding in endocarditis caused by *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 64(5):1876-1878.
- Fossum, A. E., and G. Bukholm.** 2006. Increased incidence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST80, novel ST125 and SCCmecIV in the south-eastern part of Norway during a 12-year period. *Clin. Microbiol. Infect.* 12:627-633
- Fowler VG., Miró JM., Hoen B., Cabell CH., Abrutyn E., y col.** 2005. *Staphylococcus aureus* endocarditis. *JAMA.* 293(24):3012-3021.
- Fowler VG., Olsen MK., Corey GR., Woods CW., Cabell CH., y col.** 2003. Clinical identifiers of complicated *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Arch. Intern. Med.* 163(17):2066-72.
- Franchi D., Climo MW., Wong AH., Edmond MB., Wenzel RP.** 1999. Seeking vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* among patients with vancomycin-resistant enterococci. *Clin. Infect. Dis.* 29(6):1566-1568.
- Francis JS., Doherty MC., Lopatin U., Johnston CP., Sinha G., y col.** 2005. Severe community-onset pneumonia in healthy adults caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the Panton-Valentine leukocidin genes. *Clin. Infect. Dis.* 40:100-107.
- Fridkin SK., Hageman JC., Morrison M., Sanza LT., Como-Sabetti K., y col.** 2005. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease in three communities. *N. Engl. J. Med.* 352(14):1436-44.

Friedman L., Alder JD., Silverman JA. 2006. Genetic changes that correlate with reduced susceptibility to daptomycin in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50(6):2137-2145.

Garcia BL., Ramyar KX., Tzekou A., Ricklin D., McWhorter WJ., y col. 2010. Molecular basis for complement recognition and inhibition determined by crystallographic studies of the staphylococcal complement inhibitor (SCIN) bound to C3c and C3b. *J. Mol. Biol.* 402(1):17-29.

García-Rodríguez J.A. 2009. Estudio multicéntrico de la actividad in vitro de Tigeciclina en aislados clínicos en 30 hospitales españoles. *Rev. Esp. Quimioter.* 22(2):76-82.

Gardella N., Picasso R., Predari SC., Lasala M., Foccoli M. 2005. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in Buenos Aires teaching hospitals: replacement of the multidrug resistant South American clone by another susceptible to rifampin, minocycline and trimethoprim-sulfamethoxazole. *Rev. Argent. Microbiol.* 37(3):156-160.

Garnacho-Montero J., Amaya-Villar R., Gomez-Grande ML., Jerez V., Lorente-Ramos L., y col. 2011. Papel de daptomicina en el tratamiento empírico y dirigido de infecciones por cocos grampositivos del paciente crítico. *Rev. Esp. Quimioter.* 24(1):13-24.

Gasch O., Ayats J., Domínguez M., Tubau F., Liñares J., y col. 2011. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) bloodstream infection : secular trends over 19 years at a university hospital. *Medicine (Baltimore).* 90(5):319-327.

Gastmeier P, Sohr D, Geffers C, Behnke M, Rüdén H. 2007. Risk factors for death due to nosocomial infection in intensive care unit patients: findings from the Krankenhaus Infektions Surveillance System. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 28(4):466-72

Geha DJ., Uhl JR., Gustafarro CA., Persing DH. 1994. Multiplex PCR for identification of methicillin-resistant staphylococci in the clinical laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 32(7):1768-1772.

Georgopapadakou NH., Dix BA., Mauriz YR. 1986. Possible physiological functions of penicillin-binding proteins in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29(2):333-336.

Giesbrecht P., Kersten T., Maidhof H., Wecke J. 1998. Staphylococcal cell wall: morphogenesis and fatal variations in the presence of penicillin. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62(4). 1371-1414.

Gill SR., Fouts DE., Archer GL., Mongodin EF., DeBoy RT., y col. 2005. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. *J. Bacteriol.* 187(7): 2426-2438.

Girón JA., Ramos C., Fernández C., Pérez R. 2002. Infección Nosocomial. *Medicine (Ed. española).* 8(72):3867-3874.

Goering RV., McDougal LK., Fosheim GE., Bonnstetter KK., Wolter DJ., y col. 2007. Epidemiologic distribution of the arginine catabolic mobile element among selected methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 45(6):1981-1984.

Goetghebeur M., Landry PA., Han D., Vicente C. 2007. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A public health issue with economic consequences. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* 18(1):27-34.

Gómez-Gil R., Romero-Gómez MP., García-Arias A., Ubeda MG., Busselo MS., y col. 2009. Nosocomial outbreak of linezolid-resistant *Enterococcus faecalis* infection in a tertiary care hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 65(2):175-9.

Gordon RJ., Lowy FD. 2008. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin. Infect. Dis.* 46(S5):S350-S359.

Gould IM., David MZ., Esposito S., Garau J., Lina G., y col. 2012. New insights into methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) pathogenesis, treatment and resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 39:96-104.

Gould IM., Reilly J., Bunyan D., Walker A. 2010. Costs of healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its control. *Clin. Microbiol. Infect.* 16(12):1721-1728.

Grisold AJ., Zarfel G., Strenger V., Feierl G., Leitner E. 2010. Use of automated repetitive-sequence-based PCR for rapid laboratory confirmation of nosocomial outbreaks. *J. Infect.* 60:44-51.

Grundmann, H., S. Hori, and G. Tanner. 2001. Determining confidence intervals when measuring genetic diversity and the discriminatory abilities of typing methods for microorganisms. *J. Clin. Microbiol.* 39:4190-4192.

Guay GG., Khan SA., Rothstein DM. 1993. The tet (K) gene of plasmid pT181 of *Staphylococcus aureus* encodes an efflux protein that contains 14 transmembrane helices. *Plasmid.* 30(2):163-166.

Gustafson J., Strässle A., Hächler H., Kayser FH., Berger-Bächli B. 1994. The femC locus of *Staphylococcus aureus* required for methicillin resistance includes the glutamine synthetase operon. *J. Bacteriol.* 176(5):1460-1467.

Gustafsson E., Haas PJ., Walse B., Hijnen M., Furebring C., y col. 2009. Identification of conformational epitopes for human IgG on chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus*. *BMC Immunol.* 11 March. 10:13.

Hacek DM., Suriano T., Noskin GA., Kruszynski J., Reisberg B., y col. 1999. Medical and economic benefit of a comprehensive infection control program that includes routine determination of microbial clonality. *Am. J. Clin. Pathol.* 111. 647-654.

Hackbarth CJ., Chambers HF. 1993. *blaI* and *blaR1* regulate β -lactamase and PBP 2a production in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37(5):1144-1149.

Hageman JC., Uyeki TM., Francis JS., Jernigan DB., Wheeler JG., y col. 2006. Severe community-acquired pneumonia due to *Staphylococcus aureus*, 2003-04 influenza season. *Emerg. Infect. Dis.* 12(6):894-899.

- Hamill RJ., Vann JM., Proctor RA.** 1986. Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by cultured bovine aortic endothelial cells: model for postadherence events in endovascular infections. *Infect. Immun.* 54(3):833-836
- Hunter, P. R., and M. A. Gaston.** 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 26:2465–2466.
- Harmsen D., Claus H., Witte W., Rothgänger J., Claus H.** 2003. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for *spa* repeat determination and database management. *J. Clin. Microbiol.* 41(12):5442-5448.
- Hassan M, Tuckman HP, Patrick RH, Kountz DS, Kohn JL.** 2010. Cost of hospital-acquired infection. *Hosp. Top.* 88(3):82-9.
- Hauck CR., Ohlsen K.** 2006. Sticky connections: extracellular matrix protein recognition and integrin-mediated cellular invasion by *Staphylococcus aureus*. *Curr. Opin. Microbiol.* 9(1):5-11.
- Healy M., Huong J., Bittner T., Lising M., Frye S., y col.** 2005. Microbial DNA typing by automated repetitive-sequence-based PCR. *J. Clin. Microbiol.* 43(1):199-207.
- Healy M., Reece K., Walton D., Huong J., Shah K., y col.** 2004. Identification to the species level and differentiation between strains of *Aspergillus* clinical isolates by automated repetitive-sequence-based PCR. *Journal of Clinical Microbiology.* 42. 4016–4024.
- Hentschke M., Saager B., Horstkotte MA., Scherpe S., Wolters M., y col.** 2008. Emergence of linezolid resistance in a methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strain. *Infection.* 36(1):85-7.
- Herwaldt LA.** 1999. Control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the hospital setting. *Am. J. Med.* 106(5A):11S-18S.
- Heumann D., Barras C., Severin A., Glauser MP., Tomasz A.** 1994. Gram-positive cell walls stimulate synthesis of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 by human monocytes. *Infect. Immun.* 62(7):2715-2721.
- Higgins PG., Dammhayn C., Hackel M., Seifert H.** 2010. Global spread of carbapenems-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* 65 (2). 233-238.
- Hill EE., Herijgers P., Claus P., Vanderschueren S., Herregods MC., y col.** 2007b. Infective endocarditis: changing epidemiology and predictors of 6-month mortality: a prospective cohort study. *Eur Heart J.* 28:196-203.
- Hill EE., Vanderschueren S., Verhaegen J., Herijgers P., Claus P., y col.** 2007a. Risk factors for infective endocarditis and outcome of patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Mayo Clin. Proc.* 82(10):1165-1169.
- Hiramatsu K., Aritaka N., Hanaki H., Kawasaki S., Hosoda Y., y col.** 1997. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet.* 350(9092):1670-3.

Hiramatsu K., Cui L., Kuroda M., Ito T. 2001. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 9(10):486-493.

Holden M., Fiel E., Lindsay JA., Peacock SJ., Day N., y col. 2004. Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101(26):9786-9791

Hooper DC. 2002. Fluoroquinolone resistance among gram-positive cocci. *Lancet Infect. Dis.* 2(9):530-538.

Howe RA., Bowker KE., Walsh TR., Feest TG., MacGowan AP. 1998. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet.* 351:602.

Huovinen P., Sundström L., Swedberg G., Sköld O. 1995. Trimethoprim and Sulfonamide resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39(2):279-289.

I**nternational Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC).** 2009. Classification of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) guidelines for reporting novel SCC*mec* elements. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53(12):4961-4967.

Ito T., Katayama Y., Asada K., Mori N., Tsutsumimoto K. 2001. Structural comparison of three types of Staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45(5):1323-1336.

Ito T., Katayama Y., Hiramatsu K. 1999. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43(6):1449-1458.

Ito T., Ma XX., Takeuchi F., Okuma K., Yuzawa H., y col. 2004. Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48(7):2637-2651.

Ito T., Okuma K., Ma XX., Yuzawa H., Hiramatsu K. 2003. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. *Drug Resist. Updat.* 6(1):41-52.

IWG-SCC (International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements). 2009. Classification of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*): guidelines for reporting novel SCC*mec* elements. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 53(12):4961-4967.

J**ackson MP., Iandolo JJ.** 1986. Cloning and expression of the exfoliative toxin B gene from *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 166(2):574-580.

Jacob JT., Diazgranados CA. 2012. High vancomycin minimum inhibitory concentration and clinical outcomes in adults with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: a meta-analysis. *Int. J. Infect. Dis.* S1201-9712(12) 1251-1259.

Jansen A., Türk M., Szekat C., Naget M., Clever I., y col. 2007. Role of insertion elements and *ycfG* in the development of decreased susceptibility to vancomycin in *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. Microbiol.* 297(4):205-215.

Jensen SO., Lyon BR. 2009. Genetics of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiol.* 4(5):565-582.

Johnson JR., Russo TA. 2005. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. *Int. J. Med. Microbiol.* 295:383-404

Jolly L., Wu S., van Heijenoort J., de Lencastre H., Mengin-Lecreulx D., y col. 1997. The *femR315* gene from *Staphylococcus aureus*, the interruption of which results in reduced methicillin resistance, encodes a phosphoglucosamine mutase. *J. Bacteriol.* 179(17):5321-5325.

Jurado R., Cantero P., Rivero A., Kindelán JM. 2002. Infecciones por estafilococos. *Medicine (Ed. española)*. 8(62):3305-3308

Kaatz GW., Lundstrom TS., Seo SM. 2006. Mechanisms of daptomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 28(4):280-287.

Kaneko J., Kamio Y. 2004. Bacterial two-component and hetero-heptameric pore-forming cytolytic toxins: structures, pore-forming mechanism, and organization of the genes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68(5):981-1003.

Kareiviene V., Pavilionis A., Sinkute G., Liegiūte S., Gailiene G. 2006. *Staphylococcus aureus* resistance to antibiotics and spread of phage types. *Medicina (Kaunas)*. 42(4):332-9.

Kato F., Kadomoto N., Iwamoto Y., Bunai K., Komatsuzawa H., y col. 2011. Regulatory mechanism for exfoliative toxin production in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 79(4): 1660-1670.

Kayser FH., Homberger F., Devaud M. 1981. Aminocyclitol-modifying enzymes specified by chromosomal genes in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 19(5):766-772.

Kilic A., Bedir O., Kocak N., Levent B., Eyigun CP. 2010. Analysis of an outbreak of *Salmonella enteritidis* by repetitive-sequence-based PCR and pulsed-field gel electrophoresis. *Intern. Medicine.* 49 (1). 31-36.

Kim MN., Pai CH., Woo JH., Ryu JS., Hiramatsu K. 2000. Vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in Korea. *J. Clin. Microbiol.* 38(10):3879-3881.

Kirkland KB., Briggs JP., Trivette SL., Wilkinson WE., Sexton DJ. 1999. The impact of surgical-site infections in the 1990s: attributable mortality, excess length of hospitalization, and extra costs. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 20(11):725-730.

Kloos W., Bannerman T. 1999. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington D.C. pags. 264-282.

Kluytmans J., van Belkum A., Verbrugh H. 1997. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin. Microbiol. Rev.* 10(3):505-520.

Kreienbuehl L., Charbonney E., Eggimann P. 2011. Community-acquired necrotizing pneumonia due to methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* secreting Panton-Valentine leukocidin: a review of case reports. *Ann Intensive Care*.1(1):52

Krzysztoń-Russjan J., Gniadkowski M., Polowniak-Pracka H., Haggmajer E., Hryniewicz W. 2002. The first *Staphylococcus aureus* isolates with reduced susceptibility to vancomycin in Poland. *J. Antimicrob. Chemother.* 50(6):1065-1069.

Krynski S., Galinski J., Szymanska-Malottke R., Samet A. 1966. Study of the antibiotype and lysotype of 1,090 strains of *Staphylococcus aureus* isolated in children living in a community. *Arch. Fr. Pediatr.* 23(10):1191-1196.

Krzywanek K., Luger C., Sammer B., Stumvoll S., Stammler M., y col. 2008. MRSA in Austria-an overview. *Clin. Microbiol. Infect.*14(3):250-259.

Kwon JC., Kim SH., Park SH., Choi SM., Lee DG., y col. 2011. Molecular epidemiologic analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from bacteremia and nasal colonization at 10 intensive care units: multicenter prospective study in Korea. *J. Korean. Med. Sci.* 26(5):604-611.

Lachica RV., Hoepfich PD., Genigeorgis C. 1972. Metachromatic agar-diffusion microslide technique for detecting staphylococcal nuclease in foods. *Appl. Microbiol.* 23(1):168-169.

Ladhani S., Joannou CL., Lochrie DP., Evans RW., Poston SM. 1999. Clinical, microbial, and biochemical aspects of the exfoliative toxins causing staphylococcal scalded-skin syndrome. *Clin. Microbiol. Rev.* 12(2):224-242.

Lan R., Reeves PR. 2000. Intraspecies variation in bacterial genomes: the need for a species genome concept. *Trends Microbiol.* 8(9):396-401.

Larsen AR., Stegger M., Böcher S., Sørnum M., Monnet DL., y col. 2009. Emergence and characterization of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in Denmark, 1999 to 2006. *J. Clin. Microbiol.* 47(1):73-78

Ligozzi M., Fontana R., Aldegheri M., Scalet G, Lo Cascio G. 2010. Comparative evaluation of an automated repetitive-sequence-based PCR instrument versus pulsed-field gel electrophoresis in the setting of a *Serratia marcescens* nosocomial infection outbreak. *J. Clin. Microbiol.* 48 (5). 1690-1695

Lina G., Bohach G., Nair S., Hiramatsu K., Jouvin-Marche E., y col. 2004. Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. *J. Infect. Dis.* 189:2334-2336

Lindsay JA., Holden MT. 2004. *Staphylococcus aureus*: superbug, super genome?. *Trends Microbiol.* 12(8):378-385.

Lissovoy G., Fraeman K., Hutchins V., Murphy D., Song D., y col. 2009. Surgical site infection: incidence and impact on hospital utilization and treatment costs. *Am. J. Infect. Control.* 37(5):387-397

Liu C., Chambers HF. 2003. *Staphylococcus aureus* with heterogeneous resistance to vancomycin: epidemiology, clinical significance, and critical assessment of diagnostic methods. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47(10):3040-3045.

Llinares P., Iribarren JA. 2012. Tratamiento con Daptomicina en pacientes con bacteremia. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 30 Supl. 1:17-25

Lowy F. 1998. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med.* 339(8):520-32.

Ludovice AM., Wu SW., de Lencastre H. 1998. Molecular cloning and DNA sequencing of the *Staphylococcus aureus* UDP-N-acetylmuramyl tripeptide synthetase (murE) gene, essential for the optimal expression of methicillin resistance. *Microb. Drug. Resist.* 4(2):85-90.

Luong TT., Ouyang S., Bush K., Lee C. 2002. Type 1 capsule genes of *Staphylococcus aureus* are carried in a staphylococcal cassette chromosome genetic element. *J. Bacteriol.* 184(13):3623-3629.

Lyon BR., May JW., Skurray RA. 1984. Tn4001: a gentamicin and kanamycin resistance transposon in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Gen. Genet.* 193(3):554-556.

Ma XX., Ito T., Tiensasitorn C., Jamklang M., Chongtrakool P., y col. 2002. Novel type of staphylococcal cassette chromosome mec identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46(4):1147-1152.

Maki H., McCallum N., Bischoff M., Wada A., Berger-Bachi B. 2004. *tcaA* inactivation increases glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48(6):1953-1959

Malachowa N., De Leo F. 2010. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cell. Mol. Life Sci.* 67:3057-3071.

Manzur A., Domínguez AM., Pujol M., González MP., Limón E., y col. 2008. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: an emerging threat in Spain. *Clin. Microbiol. Infect.* 14(4):377-380.

Maranan MC., Moreira B., Boyle-Vavra S., Daum RS. 1997. Antimicrobial resistance in staphylococci. Epidemiology, molecular mechanisms, and clinical relevance. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* 11(4):813-849.

Markova N., Haydoushka I., Michailova L., Ivanova R., Valcheva V., y col. 2008. Cell wall deficiency and its effect on methicillin heteroresistance in *Staphylococcus aureus*. *In. J. Antimicrob. Agents.* 31(3):255-260

Martínez JL., Baquero F. 2000. Mutation frequencies and antibiotic resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44(7):1771-1777.

Mathema B., Kurepina NE., Bifani PJ., Kreiswirth BN. 2006. Molecular epidemiology of tuberculosis: current insights. *Clin. Microbiol. Rev.* 19(4):658-685.

Meka VG., Pillai SK., Sakoulas G., Wennersten C., Venkataraman L., y col. 2004. Linezolid resistance in sequential *Staphylococcus aureus* isolates associated with a T2500A mutation in the 23S rRNA gene and loss of a single copy of rRNA. *J. Infect. Dis.* 190:311-317.

Mendes R., Moet G., Janecek M., Jones R. 2010. In vitro activity of telavancin against a contemporary worldwide collection of *Staphylococcus aureus* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54(6):2704-2706.

- Micek ST.** 2007. Alternatives to vancomycin for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Clin Infect. Dis.* 45:S184-S189.
- Millán A., Domínguez MA., Borraz C., González MP., Almirante B., y col.** 2009. Bacteriemias de presentación comunitaria y nosocomial por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en hospitales españoles. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 28(6):336-41.
- Miragaia M., de Lencastre H., Perdreau-Remington F., Chambers HF., Higashi J., y col.** 2009. Genetic diversity of arginine catabolic mobile element in *Staphylococcus epidermidis*. *PLoS One.* 4(11):e7722.
- Miró JM., Anguera I., Cabell C., Chen A., Stafford J., y col.** 2005. *Staphylococcus aureus* native valve infective endocarditis: report of 566 episodes from the international collaboration on endocarditis merged database. *Clin. Infect. Dis.* 41:507-514.
- Mishaam AM., Mason EO., Martínez-Aguilar G., Hammerman W., Propst JJ., y col.** 2005. Emergence of a predominant clone of community-acquired *Staphylococcus aureus* among children in Houston, Texas. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 24:201-206.
- Mitchell DH., Howden BP.** 2005. Diagnosis and management of *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *Intern. Med. J.* 35 Suppl 2:S17-24.
- Mitra A., Mohanraj M., Shah M.** 2009. High levels of fusidic acid-resistant *Staphylococcus aureus* despite restrictions on antibiotic use. *Clin Exp Dermatol.* 34(2):136-139.
- Mlynarczyk A., Mlynarczyk G., Jeliaszewicz J.** 1998. The genome of *Staphylococcus aureus*: a review. *Zentralbl Bacteriol.* 287(4):277-314.
- Moise PA., Smyth DS., Robinson DA., El-Fawal N., McCalla C., y col.** 2009. Genotypic and phenotypic relationships among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from three multicentre bacteraemia studies. *J. Antimicrob. Chemother.* 63(5):873-876.
- Mongkolrattanothai K., Boyle S., Murphy TV., Daum RS.** 2004. Novel non-mecA-containing staphylococcal chromosomal cassette composite island containing *pbp4* and *tagF* genes in a commensal staphylococcal species: a possible reservoir for antibiotic resistance islands in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48(5):1823-1836.
- Monnet DL., MacKenzie FM., Skov R., Jensen ET., Gould IM., y col.** 2005. Fighting MRSA in hospitals: time to restrict the broad use of specific antimicrobial classes?. *J. Hosp. Infect.* 61(3):267-268
- Morosini MI., Cercenado E., Ardanuy C., Torres C.** 2012. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos grampositivos. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 30(6):325-332
- Mortensen JE., Shryock TR., Kapral FA.** 1992. Modification of bactericidal fatty acids by an enzyme of *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.* 36:293-298.
- Moza B., Varma A., Buonpane A., Zhu P., Herfst C., y col.** 2007. Structural basis of T-cell specificity and activation by the bacterial superantigen TSST-1. *EMBO J.* 26:1187-1197.

Muder R., Brennen C., Rihs J., Wagener M., Obman A., y col. 2006. Isolation of *Staphylococcus aureus* from the urinary tract: association of isolation with symptomatic urinary tract infection and subsequent staphylococcal bacteremia. *Clin. Infect. Dis.* 42:46-50.

Murchan S., Kaufmann ME., Deplano A., de Ryck R., Struelens M., y col. 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 applications for tracing the spread of related strains. *J. Clin. Microbiol.* 41(4):1574-1585.

Murphy E. 1983. Inhibition of Tn554 transposition: deletion analysis. *Plasmid.* 10(3):260-269.

Musher DM., Lamm N., Darouiche RO., Young EJ., Hamill RJ., y col. 1994. The current spectrum of *Staphylococcus aureus* infection in a tertiary care hospital. *Medicine (Baltimore).* 73(4):186-208.

Mylonakis E., Calderwood SB. 2001. Infective endocarditis in adults. *N. Engl. J. Med.* 345(18):1318-1330.

Naber CK. 2009. *Staphylococcus aureus* bacteremia: epidemiology, pathophysiology, and management strategies. *Clin. Infect. Dis.* 48:231-237

Naimi TS., Le Dell K., Como-Sabetti K., Borchardt S., Boxrud D. 2003. Comparison of community-and health care-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infection. *JAMA.* 290(22): 2976-84

Niemeyer D., Pucci M., Thanassi J., Sharma V., Archer G. 1996. Role of mecA transcriptional regulation in the phenotypic expression of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 178(18):5464-5471.

Nimmo GR., Coombs GW. 2008. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Australia. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 31(5):401-410.

Novick RP. 2003. Mobile genetic elements and bacterial toxinoses: the superantigen-encoding pathogenicity islands of *Staphylococcus aureus*. *Plasmid.* 49(2):93-105.

Novick RP., Subedi A. 2007. The SaPIs: mobile pathogenicity islands of *Staphylococcus*. *Chem. Immunol. Allergy.* 93:42-57.

Nso AP., Baquero-Artigao F., García-Miguel MJ., de José MI., Aracil FJ., y col. 2008. Síndrome de escaldadura estafilocócica. *An Pediatr (Barc).* 68(2):124-127.

Nulens E., Stobberingh E., Smeets E., van Dessel H., Welling MA., y col. 2009. Genetic diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a tertiary hospital in The Netherlands between 2002 and 2006. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 28(6):631-639

Ogawa S., Yurberg E., Hatcher V., Levitt M., Lowy FD. 1985. Bacterial adherence to human endothelial cells in vitro. *Infect. Immun.* 50(1):218-224.

Olaechea PM., Insausti J., Blanco A., Luque P. 2010. Epidemiología e impacto de las infecciones nosocomiales. *Med. Intensiva.* 34(4):256-67

Olive D., Bean P. 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J. Clin. Microbiol.* 37(6):1661-1669.

Oliveira D., de Lencastre H. 2002. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 46(7):2155-2161.

Orwin P., Leung D., Donahue H., Novick RP., Schlievert P. 2001. Biochemical and biological properties of staphylococcal enterotoxin K. *Infect. Immun.* 69(1):360-366.

Pal N., Sharma B., Sharma R., Vyas L. 2010. Detection of inducible clindamycin resistance among Staphylococcal isolates from different clinical specimens in western India. *J. Postgrad. Med.* 56(3):182-5.

Pantosti A., Sanchini A., Monaco M. 2007. Mechanisms of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiol.* 2(3):323-334

Pantosti A., Venditti M. 2009. What is MRSA?. *Eur. Respir. J.* 34:1190-1196.

Parras F., Rodríguez M., Bouza E., Muñoz P., Cercenado E., y col. 1991. Epidemic outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a general hospital. Preliminary report. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 9(4):200-207.

Perez-Roth, E., F. Lorenzo-Diaz, N. Batista, A. Moreno, and S. Mendez- Alvarez. 2004. Tracking methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones during a 5-year period (1998 to 2002) in a Spanish hospital. *J. Clin. Microbiol.* 42:4649-4656.

Périchon B., Courvalin P. 2009. VanA-type vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53(11):4580-4587.

Perry JD., Jones AL., Gould FK. 1999. Glycopeptide tolerance in bacteria causing endocarditis. *J. Antimicrob. Chemother.* 44(1):121-124.

Pfaller MA. 1999. Molecular epidemiology in the care of patients. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 123(11):1007-1010.

Picazo JJ., Betriu C., Rodríguez-Avial I., Culebras E., López F. 2010. Actividad comparativa de la Daptomicina frente a *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina y frente a estafilococos coagulasa negativos. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 28(1):13-16.

Picazo JJ., Betriu C., Culebras E., Rodríguez-Avial I., Gómez M., y col. 2011a. *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina: sensibilidad a la daptomicina a lo largo de un periodo de 10 años (2001-2010). *Rev. Esp. Quimioter.* 24(2):107-111.

Picazo JJ., Betriu C., Rodríguez-Avial I., Culebras E., López-Fabal F., y col. 2011b. Comparative activities of daptomycin and several agents against staphylococcal blood isolates. Glycopeptide tolerance. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 70:373-379.

Piechowicz L., Garbacz K., Galinski J. 2008. *Staphylococcal aureus* of phage type 187 isolated from people occurred to be a genes carrier of enterotoxin C and toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1). *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 211(3-4):273-282.

Pirson M, Dramaix M, Struelens M, Riley TV, Leclercq P. 2005. Costs associated with hospital-acquired bacteraemia in a Belgian hospital. *J. Hosp. Infect.* 59(1):33-40.

Ploy MC., Grélaud C., Martin C., de Lumley L., Denis F. 1998. First clinical isolate of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a French hospital. *Lancet.*351:1212.

Ponce de León A., Camacho A., Macías AE., Landín C., Villanueva Walbey C., y col. 2010. Epidemiology and clinical characteristics of *Staphylococcus aureus* bloodstream infections in a tertiary-care center in Mexico City: 2003-2007. *Rev. Invest. Clin.* 62(6):553-559.

Prats G. 2005. Protocolos técnicos. *Microbiología Clínica.* Panamericana, Buenos Aires, Argentina. pags. 334-335.

Proctor RA., Peters G. 1998. Small colony variants in staphylococcal infections: diagnostic and therapeutic implications. *Clin. Infect. Dis.* 27:419-423

Proctor RA., van Langevelde P., Kristjansson M., Maslow JN., Arbeit RD. 1995. Persistent and relapsing infections associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis.* 20(1):95-102.

Prokesová L., Potuzníková B., Potempa J., Zikán J., Radl J., y col. 1992. Cleavage of human immunoglobulins by serine proteinase from *Staphylococcus aureus*. *Immunol. Lett.* 31(3):259-265.

Quiles-Melero I., García-Perea A., de Pablos M., Gómez-Gil R., Mingorance J. 2012. Resistance to linezolid in a methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* clinical isolate without previous exposure to oxazolidinones. *Int. J. Med. Microbiol.* 302(3):145-147.

Ratkai C., Peixe LV., Grosso F., Freitas AR., Antunes P. 2010. Successful application of the DiversiLab repetitive-sequence-based PCR typing system for confirmation of the circulation of a multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospital wards. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 67(2). 202-206.

Renushri, Avinandan S., Nagaraj, Krishnamurthy V. 2011. Inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from nursing and pharmacy students. *J. Lab. Physicians.* 3(2):89-92.

Roberts M., Sutcliffe J., Courvalin P., Jensen L., Rood J., y col. 1999. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrob. Agents Chemoter.* 43(12):2823-2830.

Roberts RR, Scott RD 2nd, Hota B, Kampe LM, Abbasi F, y col. 2010. Costs attributable to healthcare-acquired infection in hospitalized adults and a comparison of economic methods. *Med. Care.* 48(11):1026-35.

Rodríguez CA., Vesga O. 2005. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biomedica.* 25(4):575-87.

Rodríguez G., Mariano A., Gaspar MC., Sánchez P., Coello R. y col. 1997. Health personnel as a source of infection in a hospital outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 15(3):173-174.

Rodríguez-Baño J., Domínguez M., Millán A., Borraz C., González M., y col. 2009. Clinical and molecular epidemiology of community-acquired, healthcare-associated and nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Spain. *Clin Microbiol Infect.* 15(12):1111-1118

Rodríguez-Baño J., Pascual A. 2004. Microorganismos multirresistentes, ¿adquisición nosocomial o comunitaria?. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 22(9):505-506.

Rodríguez-Pardo D., Pigrau C. 2006. Infecciones por estafilococos. *Medicine.* 09:3257-3265

Rogers KL., Fey PD., Rupp ME. 2009. Coagulase-negative staphylococcal infections. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 23(1):73-98

Rojas L., Bunsow E., Muñoz P., Cercenado E., Rodríguez-Créixems M., y col. 2012. Vancomycin MICs do not predict the outcome of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream infections in correctly treated patients. *J. Antimicrob. Chemother.* 67(7):1760-1768

Rolo J., Miragaia M., Turlej-Rogacka A., Empel J., Bouchami O., y col. 2012. High Genetic Diversity among Community-Associated *Staphylococcus aureus* in Europe: Results from a Multicenter Study. *Plos One.* 7(4):e34768.

Romero-Vivas J., Rubio M, Fernandez C., Picazo JJ. 1995. Mortality associated with nosocomial bacteremia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin. Infect. Dis.* 21(6):1417-1423.

Ross TL., Merz WG., Farkosh M., Carrol KC. 2005. Comparison of an automated repetitive sequence-based PCR microbial typing system to pulsed-field gel electrophoresis for analysis of outbreaks of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 43(11):5642-5647.

Rouch DA., Byrne ME., Kong Y., Skurray RA. 1987. The *aac-A-aphD* gentamicin and kanamicin resistance determinant of Tn4001 from *Staphylococcus aureus*: expression and nucleotide sequence analysis. *J. Gen. Microbiol.* 133:3039-3052.

Rouch DA., Messerotti LJ., Loo LS., Jackson CA., Skurray RA. 1989. Trimethoprim resistance transposon Tn4003 from *Staphylococcus aureus* encodes genes for a dihydrofolate reductase and thymidylate synthetase flanked by three copies of IS257. *Mol. Microbiol.* 3(2):161-175.

Rubio-Terrés C., Rubio-Rodríguez D., Majos N., Grau S. 2012. Pharmacoeconomic analysis of the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with daptomycin or vancomycin. *Rev. Esp. Quimioter.* 25(4):283-92.

Sabrià-Leal M., Pedro-Botet Montoya ML. 1992. Epidemiología molecular. *Med. Clin. (Barc).* 99(4):137-139.

Sader HS., Jones RN., Rossi KL., Rybak MJ. 2009. Occurrence of vancomycin-tolerant and heterogeneous vancomycin-intermediate strains (hVISA) among *Staphylococcus aureus* causing bloodstream infections in nine USA hospitals. *J. Antimicrob. Chemother.* 64(5):1024-1028

Sakoulas G., Eliopoulos GM., Moellering RC Jr., Novick RP., Venkataraman L., y col. 2003. *Staphylococcus aureus* accessory gene regulador (*agr*) group II: is there a relationship to the development of intermediate-level glycopeptide resistance?. *J. Infect. Dis.* 187(6):929-938.

- Samra Z., Gadba R., Ofir O.** 2001. Antibiotic susceptibility and phage typing of methicillin-resistant and -sensitive *Staphylococcus aureus* clinical isolates at three periods during 1991-1997. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 20(6):425-7.
- Sánchez-García M., De la Torre MA., Morales G., Peláez B., Tolón MJ., y col.** 2010. Clinical outbreak of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* in an intensive care unit. *JAMA.* 303(22):2260-2264.
- Saravolatz LD., Stein GE., Johnson LB.** 2009. Telavancin: a novel lipoglycopeptide. *Clin. Infect. Dis.* 49:1908-1914.
- Saravolatz LD., Stein GE., Johnson LB.** 2011. Ceftaroline: a novel cephalosporin with activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin. Infect. Dis.* 52(9):1156-1163.
- Schmitz FJ., Jones ME., Hofmann B., Hansen B., Scheuring S., y col.** 1998. Characterization of *grlA*, *grlB*, *gyrA*, and *gyr B* mutations in 116 unrelated isolates of *Staphylococcus aureus* and effects of mutations on ciprofloxacin MIC. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42(5):1249-1252.
- Schmitz FJ., Krey A., Geisel R., Verhoef J., Heinz HP., Fluit AC.** 1999. Susceptibility of 302 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from 20 European university hospitals to vancomycin and alternative antistaphylococcal compounds. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 18(7):528-530.
- Schulgen G, Kropec A, Kappstein I, Daschner F, Schumacher M.** 2000. Estimation of extra hospital stay attributable to nosocomial infections: heterogeneity and timing of events. *J. Clin Epidemiol.* 53(4):409-17.
- Schumacher M, Wangler M, Wolkewitz M, Beyersmann J.** 2007. Attributable mortality due to nosocomial infections. A simple and useful application of multistate models. *Methods Inf. Med.* 46(5):595-600.
- Schwartz DC., Cantor CR.** 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell.* 37(1):67-75.
- Schwarz S., Kehrenberg C., Doublet B., Cloeckert A.** 2004. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiol. Rev.* 28(5):519-542
- Seifert H., Boullion B., Schulze A., Pulverer G.** 1994. Plasmid DNA profiles of *Acinetobacter baumannii*: clinical application in a complex endemic setting. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 15. 520–528.
- Severiano A., F. R. Pinto, M. Ramirez and J. Carriço.** 2011. Adjusted Wallace as a Measure of Congruence between Typing Methods. *J. Clin. Microbiol.* 49(11):3997-4000.
- Shah M., Mohanraj M.** 2003. High levels of fusidic acid-resistant *Staphylococcus aureus* in dermatology patients. *Br. J. Dermatol.* 148(5):1018-1020.
- Sharma V., Hackbarth C., Dickinson T., Archer G.** 1998. Interaction of native and mutant *mecl* repressors with sequences that regulate *mecA*, the gene encoding penicillin binding protein 2a in methicillin-resistant staphylococci. *J. Bacteriol.* 180(8):2160-2166.

- Shaw KJ., Rather PN., Hare RS., Miller GH.** 1993. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol. Rev.* 57(1):138-163.
- Shirliff ME., Mader JT.** 2002. Acute septic arthritis. *Clin. Microbiol. Rev.* 15(4):527-544.
- Shittu AO., Lin J.** 2006. Antimicrobial susceptibility patterns and characterization of clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in KwaZulu-Natal province, South Africa. *BMC Infect. Dis.* 6:125.
- Shivakumar AG., Dubnau D.** 1981. Characterization of a plasmid-specified ribosome methylase associated with macrolide resistance. *Nucleic Acids Res.* 9(11): 2549-2562.
- Shurland S., Zhan M., Bradham DD., Roghmann MC.** 2007. Comparison of mortality risk associated with bacteremia due to methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 28(3):273-279
- Shutt CK., Pounder J., Page S., Schaecher B., Woods G.** 2005. Clinical evaluation of the Diversilab microbial typing system using repetitive-sequence based PCR for characterization of *Staphylococcus aureus* strains. *J. Clin. Microbiol.* 43(3):1187-1192.
- Singh A., Goering RV., Simjee S., Foley SL., Zervos MJ.** 2006. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 19(3):512-530.
- Skold O.** 2001. Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Vet. Res.* 32:261-273.
- Soge OO., Beck N., White T., No D., Roberts M.** 2008. A novel transposon Tn6009 composed of a Tn916 element linked with a *Staphylococcus aureus mer* operon. *J. Antimicrob. Chemother.* 62:674-680.
- Soriano A., Marco F., Martínez JA., Pisos E., Almela M., y col.** 2008. Influence of vancomycin minimum inhibitory concentration on the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin. Infect. Dis.* 46(2):193-200.
- Speziale P., Pietrocola G., Rindi S., Provenzano M., Provenza G., y col.** 2009. Structural and functional role of *Staphylococcus aureus* surface components recognizing adhesive matrix molecules of the host. *Future Microbiol.* 4(10):1337-1352.
- Stapleton P., Taylor P.** 2002. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanisms and modulation. *Sci. Prog.* 85(Pt1):57-72.
- Stevens D., Ma Y., Salmi D., McIndoo E., Wallace R., y col.** 2007. Impact of antibiotics on expression of virulence-associated exotoxin genes in methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.* 195:202-211.
- Stojowska K., Kaluzewski S., Krawczyk B.** 2009. Usefulness of PCR melting profile method for genotyping analysis of *Klebsiella oxytoca* isolates from patients of a single hospital unit. *Pol. J. Microbiol.* 58(3):247-253.
- Stone PW., Braccia D., Larson E.** 2005. Systematic review of economic analyses of health care-associated infections. *Am. J. Infect. Control.* 33(9):501-9

Strommenger B., Kettlitz C., Weniger T., Harmsen D., Fiedrich AW., y col. 2006. Assignment of *Staphylococcus* isolates to groups by *spa* typing, SmaI macrorestriction analysis, and multilocus sequence typing. *J. Clin. Microbiol.* 44(7):2533-2540.

Strommenger B., Kettlitz C., Weniger T., Witte W. 2003. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 41(9):4089-4094.

Sule O., Brown NM., Willocks LJ., Day J., Shankar S. y col. 2007. Fusidic acid-resistant *Staphylococcus aureus* (FRSA) carriage in patients with atopic eczema and pattern of prior topical fusidic acid use. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 30(1):78-82.

Swanson SJ., Snider C., Braden CR., Boxrud D., Wünschmann A., y col. 2007. Multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium associated with pet rodents. *N. Engl. J. Med.* 356(1):21-28.

Tanaka M., Wang T., Onodera Y., Uchida Y., Sato K. 2000. Mechanism of quinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Chemother.* 6(3):131-139.

Tattevin P., Basuino L., Bauer D., Diep BA., Chambers HF. 2010. Ceftobiprole is superior to vancomycin, daptomycin, and linezolid for treatment of experimental endocarditis in rabbits caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54(2):610-613

Tennent JM., Young HK., Lyon BR., Amyes SG., Skurray RA. 1988. Trimethoprim resistance determinants encoding a dihydrofolate reductase in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *J. Med. Microbiol.* 26(1):67-73.

Tenover FC., Arbeit R., Goering R., Mickelsen P., Murray B., y col. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33(9):2233-2239.

Tenover FC., Biddle JW., Lancaster MV. 2001. Increasing resistance to vancomycin and other glycopeptide in *Staphylococcus aureus*. *Emerg. Infect. Dis.* 7(2):327-332.

Tenover FC., Gay E., Frye S., Eells S., Healy M. 2009. Comparison of typing results obtained for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates with the DiversiLab system and pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 47(8):2452-2457.

Tenover FC., McDougal L., Goering R., Killgore G., Projan S., y col. 2006. Characterization of a strain of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* widely disseminated in the United States. *J. Clin. Microbiol.* 44(1):108-118.

Tenover FC., Weigel L., Appelbaum P., McDougal L., Chaitram J., y col. 2004. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from a patient in Pennsylvania. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48(1):275-280.

Thakker M., Park J., Carey V., Lee JC. 1998. *Staphylococcus aureus* serotype 5 capsular polysaccharide is antiphagocytic and enhances bacterial virulence in a murine bacteremia model. *Infect. Immun.* 66(11):5183-5189.

Tillotson L., Jensen W., Moon-Mcdermott L., Dubin D. 1989. Characterization of a novel insertion of the macrolides-lincosamides-streptogramin B resistance transposon Tn554 in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33(4): 541-550.

Timmerman CP., Mattsson E., Martinez-Martinez L., de Graaf L., van Strijp J., y col. 1993. Induction of release of tumor necrosis factor from human monocytes by staphylococci and staphylococcal peptidoglycans. *Infect. Immun.* 61(10):4167-4172.

Traczewski MM., Katz B., Steenbergen J., Brown S. Inhibitory and bactericidal activities of daptomycin, vancomycin, and teicoplanin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates collected from 1985 to 2007. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53(5): 1735-1738.

Trilla A., Marco F., Moreno A., Prat A., Soriano E., y col. 1993. Clinical epidemiology of an outbreak of nosocomial infection caused by *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin and aminoglycosides: efficacy of control measures. *Med. Clin. (Barc).* 100(6):205-209.

Tsiodras S., Gold HS., Sakoulas G., Eliopoulos GM., Wennersten C., y col. 2001. Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *Lancet.* 358(9277):207-208.

Vainio A., Kardén-Lilja M., Ibrahim S., Kerttula AM., Salmenlinna S., y col. 2008. Clonality of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in Finland as defined by several molecular methods. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 27(7):545-555

Van Hal SJ., Paterson DL., Gosbell IB. 2011a. Emergence of daptomycin resistance following vancomycin-unresponsive *Staphylococcus aureus* bacteraemia in a daptomycin-naïve patient. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 30(5):603-610.

Van Hal SJ., Wehrhahn MC., Barbagiannakos T., Mercer J., Chen D., y col. 2011b. Performance of various testing methodologies for detection of heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in bloodstream isolates. *J Clin Microbiol.* 49(4):1489-94.

Van Wamel W., Rooijackers S., Ruyken M., van Kessel K., van Strijp J. 2006. The innate immune modulators staphylococcal complement inhibitor and chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* are located on β -hemolysin-converting bacteriophages. *J. Bacteriol.* 188(4):1310-1315.

Vaudaux P., Pittet D., Haerberli A., Lerch PG., Morgenthaler JJ., y col. 1993. Fibronectin is more active than fibrin or fibrinogen in promoting *Staphylococcus aureus* adherence to inserted intravascular catheters. *J. Infect. Dis.* 167(3):633-641.

Velasco C., López-Cortés LE., Caballero FJ., Lepe JA., de Cueto M. y col. 2012. Clinical and molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* causing bacteraemia in Southern Spain. *J. Hosp. Infect.* 81(4):257-263.

Versalovic J., Lupski JR. Molecular detection and genotyping of pathogens: more accurate and rapid answers. *Trends Microbiol.* 2002. 10 (Suppl.): S15–S21.

Vikram H., Havill N., Koeth L., Boyce J. 2005. Clinical progression of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* vertebral osteomyelitis associated with reduced susceptibility to daptomycin. *J. Clin. Microbiol.* 43(19):5384-5387.

Vindel A., Cuevas O., Cercenado E., Marcos C., Bautista V., y col. 2009. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Spain: molecular epidemiology and utility of different typing methods. *J. Clin. Microbiol.* 47(6):1620-1627.

Vindel A., Trincado P., Gómez E., Cabrera R., Boquete T., y col. 2006. Prevalence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Spanish hospitals between 1996 and 2002. *J. Clin. Microbiol.* 44(1):266-270.

Von Eiff C., Peters G., Heilmann C. 2002. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. *Lancet Infect. Dis.* 2(11):677-685.

Von Eiff C., Proctor RA., Peters G. 2001. Coagulase-negative staphylococci. Pathogens have major role in nosocomial infections. *Postgrad. Med.* 110(4):63-76.

Voss A., Mouton JW., van Elzakker EP., Hendrix RG., Goessens W., y col. 2007. A multi-center blinded study on the efficiency of phenotypic screening methods to detect glycopeptide intermediately susceptible *Staphylococcus aureus* (GISA) and heterogeneous GISA (h-GISA). *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 6:9.

Waldron D., Lindsay J. 2006. Sau1: a novel lineage-specific type I restriction-modification system that blocks horizontal gene transfer into *Staphylococcus aureus* and between *S.aureus* isolates of different lineages. *J. Bacteriol.* 188(15):5578-5585.

Weber JT. 2005. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin. Infect. Dis.* 41:S269-S272

Weigel L., Clewell D., Gill S., Clark N., McDougal L., y col. 2003. Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science.* 302(5650):1569-71

Weigel L., Donlan R., Shin DH., Jensen B., Clark N., y col. 2007. High-level vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with a polymicrobial biofilm. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51(1):231-238.

Werckenthin C., Schwarz S., Roberts M. 1996. Integration of pT181-like tetracycline resistance plasmids into large staphylococcal plasmids involves IS257. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40(11):2542-2544.

Wi YM., Kim JM., Joo EJ., Ha YE., Kang CI., y col. 2012. High vancomycin minimum inhibitory concentration is a predictor of mortality in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 40(2):108-113

Williams R., Rippon J. 1952. Bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*. *J. Hyg. (Lond).* 50(3):320-53

Wiśniewska K., Szewczyk A., Piechowicz L., Bronk M., Samet A., y col. 2012. The use of spa and phage typing for characterization of clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the University Clinical Center in Gdańsk, Poland. *Folia Microbiol. (Praha).* 57(3):243-9.

Wise MG., Healy M., Reece K., Smith R., Walton D., y col. 2007. Species identification and strain differentiation of clinical *Candida* isolates using the DiversiLab system of automated repetitive sequence-based PCR. *J. Med. Microbiol.* 56: 778-787.

Witt R., Kanhai V., van Leeuwen W. 2009. Comparison of the DiversiLab system, pulsed-field gel electrophoresis and multi-locus sequence typing for the characterization of epidemic referente MRSA strains. *J. Microbiol. Methods.* 77:130-133.

World Health Organization. 1983. Antimicrobial resistance. *Bull World Health Organ.* 61(3):383-394

Wootton M., Howe RA., Hillman R., Walsh TR., Bennett PM., y col. 2001. A modified population analysis profile (PAP) method to detect hetero-resistance to vancomycin in *Staphylococcus aureus* in a UK hospital. *J. Antimicrob. Chemother.* 47(4):399-403.

Wu S., de Lencastre H., Tomasz A. 2001. Recruitment of the *mecA* gene homologue of *Staphylococcus sciuri* into a resistance determinant and expresión of the resistant phenotype in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 183(8):2417-2424.

Yamaguchi T., Nishifuji K., Sasaki M., Fudaba Y., Aepfelbacher M., y col. 2002. Identification of the *Staphylococcus aureus etd* pathogenicity island which encodes a novel exfoliative toxin, ETD, and EDIN-B. *Infect. Immun.* 70(10):5835-5845.

Yan ZQ., Shen DX., Cao JR., Chen R., Wei X. 2010. Susceptibility patterns and molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains from three military hospitals in China. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 35 (3). 269-273.

Yao L., Bengualid V., Lowy FD., Gibbons J., Hatcher V., y col. 1995. Internalization of *Staphylococcus aureus* by endothelial cells induces cytokine gene expression. *Infect. Immun.* 63(5):1835-1839.

Yarwood J., McCormick J., Paustian M., Orwin P., Kapurt V. y col. 2002. Characterization and expression analysis of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island 3. *J. Biol. Chem.* 277(15):13138-13147.

Yusof A., Engelhardt A., Karlsson A., Bylund L., Vidh P., y col. 2008. Evaluation of a new Etest vancomycin-teicoplanin strip for detection of glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus* (GISA), in particular, heterogeneous GISA. *J. Clin. Microbiol.* 46:3042-3047.

Young H., Skurray R., Amyes GB. 1987. Plasmid-mediated trimethoprim-resistance in *Staphylococcus aureus*. *Biochem J.* 243:309-312.

Zhang K., McClure J., Elsayed S., Conly J. 2009. Novel staphylococcal cassette chromosome *mec* type, tentatively designated type VIII, harbouring class A *mec* and type 4 *ccr* gene complexes in a Canadian epidemic strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53(2):531-540.

Zhang K., McClure J., Elsayed S., Louie T., Conly J. 2005. Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome *mec* types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 43(10): 5026-5033.

