



**Universitat de les
Illes Balears**

**TESIS DOCTORAL
2015**

**EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR Y RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS EN *Staphylococcus*
spp. EN CENTROS SANITARIOS DE MALLORCA
DURANTE LOS ÚLTIMOS 15 AÑOS (1999-2013)**

Enrique Ruiz de Gopegui Bordes



**Universitat de les
Illes Balears**

**TESIS DOCTORAL
2015**

Programa de Doctorado en Microbiología

**EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR Y RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS EN *Staphylococcus*
spp. EN CENTROS SANITARIOS DE MALLORCA
DURANTE LOS ÚLTIMOS 15 AÑOS (1999-2013)**

Enrique Ruiz de Gopegui Bordes

Director: Antonio Oliver Palomo

Director: José Luis Pérez Sáenz

Doctor por la Universitat de les Illes Balears

ÍNDICE

ÍNDICE

I. AGRADECIMIENTOS.....	3
II. LISTA DE PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS.....	9
III. ABREVIATURAS	13
1. RESUMEN.....	17
2. INTRODUCCIÓN.....	25
2.1 Generalidades de <i>Staphylococcus aureus</i>	25
2.1.1 Taxonomía.....	25
2.1.2 Características microbiológicas.....	25
2.1.3 Hábitat natural	27
2.1.4 Importancia clínica.....	30
2.2 Genoma de <i>S. aureus</i>	31
2.2.1 Características y componentes del genoma de <i>S. aureus</i>	31
2.2.2 Plásmidos	33
2.2.3 Transposones.....	34
2.2.4 Secuencias de inserción.....	35
2.2.5 Bacteriófagos.....	35
2.2.6 Casete cromosómico estafilocócico	35
2.3 Factores de virulencia de <i>S. aureus</i>	36
2.3.1 Componentes de la pared celular	36
2.3.2 Enzimas	40
2.3.3 Toxinas	41
2.4 Resistencia antibiótica de <i>S. aureus</i>	42
2.4.1 Resistencia a la penicilina	44
Mecanismo de acción de los β -lactámicos.....	44
Mecanismo de resistencia a la penicilina	44
Regulación de la expresión del gen <i>blaZ</i>	44
2.4.2 Resistencia a la meticilina	46
Mecanismo de acción de la meticilina	46

Mecanismo de resistencia a la meticilina	46
Regulación de la expresión del gen <i>mecA</i>	47
Estructura del casete cromosómico estafilocócico <i>mec</i>	49
Tipos de SCC <i>mec</i> actualmente descritos	51
Origen del SCC <i>mec</i>	53
2.4.3 Resistencia a los glucopéptidos	54
2.4.4 Resistencia a las oxazolidinonas	56
Síntesis protéica bacteriana	56
Mecanismo de acción de las oxazolidinonas	58
Mecanismos de resistencia a las oxazolidinonas.....	58
2.4.5 Resistencia a los macrólidos y lincosamidas	62
Mecanismo de acción de los macrólidos y lincosamidas	62
Mecanismos de resistencia a los macrólidos y lincosamidas	62
2.4.6 Resistencia a las quinolonas	63
2.4.7 Resistencia a los aminoglucósidos	64
Mecanismo de acción de los aminoglucósidos	64
Mecanismos de resistencia a los aminoglucósidos.....	64
2.4.8 Resistencia a las tetraciclinas	65
Mecanismo de acción de las tetraciclinas	65
Mecanismos de resistencia a las tetraciclinas	66
2.4.9 Resistencia a las sulfamidas y a la trimetoprima	66
2.4.10 Resistencia a otros antimicrobianos.....	68
2.5 Aspectos epidemiológicos de <i>S. aureus</i> resistente a la meticilina.....	69
2.5.1 Reseña histórica general de la resistencia a la penicilina.....	69
2.5.2 Reseña histórica general de la resistencia a la meticilina.....	70
2.5.3 Epidemiología de SARM en España	72
2.5.4 Evolución de los clones epidémicos de SARM hospitalarios.....	73
2.5.5 Clones de SARM en España.....	76
2.6 Métodos de tipificación de SARM.....	77
2.6.1 Introducción	77
2.6.2 Tipado de bacteriófagos (fagotipia).....	78
2.6.3 Electroforesis en gel de campo pulsado	78
2.6.4 <i>Multilocus sequence typing</i>	79
2.6.5 Tipado del <i>locus spa</i>	80
2.6.6 Tipado del casete SCC <i>mec</i>	81
2.6.7 <i>rep</i> -PCR. DiversiLab®.....	81
2.6.8 Tipado de la secuencia <i>dru</i>	81
2.6.9 MLVA	82
2.6.10 <i>Microarrays</i> y secuenciación completa del genoma	82

2.7	SARM comunitario.....	82
2.7.1	Definición de SARM comunitario.....	82
2.7.2	Historia del SARM comunitario y clones circulantes.....	85
2.7.3	SARM comunitario en España.....	88
2.7.4	Origen del SARM comunitario.....	89
2.7.5	Factores de virulencia de SARM comunitario.....	90
	Leucocidina de Panton-Valentine (LPV).....	90
	Elemento móvil catabólico de la arginina (ACME).....	91
	Modulinas solubles en fenol (PSMs).....	92
2.7.6	Factores de riesgo para la infección por SARM comunitario.....	93
2.8	SARM en centros geriátricos.....	93
2.8.1	Importancia de la infección por SARM en pacientes geriátricos.....	93
2.8.2	Colonización por SARM en las residencias geriátricas.....	94
2.8.3	Infección por SARM en las residencias geriátricas.....	96
3.	OBJETIVOS.....	101
4.	METODOLOGÍA.....	107
4.1	Cepas, plásmidos y cebadores.....	107
4.2	Características de los centros sanitarios.....	110
4.3	Diseño de los estudios epidemiológicos.....	113
4.3.1	Epidemiología molecular de SARM en el HUSD-HUSE.....	113
4.3.2	Estudio de prevalencia de SARM en la Residencia Bonanova.....	114
4.3.3	Estudio de caracterización de un plásmido de multirresistencia.....	117
4.3.4	Epidemiología molecular de <i>S. hominis</i> resistente a la linezolidina.....	117
4.4	Procedimientos de identificación.....	118
4.4.1	Identificación de los aislados de <i>S. aureus</i>	118
4.4.2	Identificación de los aislados de <i>S. hominis</i>	118
4.5	Métodos de sensibilidad antimicrobiana.....	118
4.5.1	Aislados de SARM del HUSD-HUSE.....	118
4.5.2	Aislados de SARM de la residencia geriátrica.....	120
4.5.3	Aislados de SARM resistentes a la linezolidina.....	120
4.5.4	Aislados de <i>S. hominis</i> resistentes a la linezolidina.....	120
4.6	Análisis de la clonalidad.....	121
4.6.1	Electroforesis en campo pulsado.....	121

4.6.2	<i>Multilocus sequence typing</i> (MLST)	121
4.7	Técnicas de amplificación genética por PCR.....	123
4.7.1	Extracción del ADN	123
4.7.2	Amplificación y detección del ADN.....	123
4.7.3	PCR del casete cromosómico <i>SCCmec</i> (tipos I-IV)	123
4.7.4	PCR del casete cromosómico <i>SCCmec</i> tipo V	125
4.7.5	PCR para el subtipado del <i>SCCmec</i> tipo IV	125
4.7.6	PCR de la LPV	126
4.7.7	PCR del ACME	126
4.7.8	PCR del gen <i>cfr</i>	126
4.7.9	PCR del gen <i>fexA</i>	127
4.7.10	PCR de los genes de resistencia a la tetraciclina	127
4.7.11	PCR del gen <i>ant(4)-Ia</i>	128
4.7.12	PCR del gen <i>dfrK</i>	128
4.7.13	PCR del gen <i>vga(C)</i>	128
4.8	Estudio de las mutaciones en el gen ARNr 23S	129
4.8.1	Amplificación del dominio V del gen ARNr 23S	129
4.8.2	Secuenciación del dominio V del gen ARNr 23S	129
4.9	Caracterización del plásmido de multirresistencia	130
4.9.1	Conjugación del plásmido	130
4.9.2	Extracción del ADN plasmídico	133
4.9.3	Determinación del tamaño del plásmido	134
4.9.4	Clonación del plásmido	135
4.10	Consideraciones éticas	140
4.11	Análisis estadístico	141

5. RESULTADOS 145

PARTE 1. ESTUDIO DE EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE LOS AISLADOS DE SARM DETECTADOS EN EL HOSPITAL UNIVERSITARIO SON DURETA-SON ESPASES DURANTE 15 AÑOS (JUNIO 1999-FEBRERO 2013)..... 145

5.1	Prevalencia de SARM respecto al total de <i>S. aureus</i> en el HUSD-HUSE	145
5.2	Características de los pacientes con SARM atendidos en el HUSD-HUSE	145

5.3	Epidemiología molecular de los aislados de SARM del HUSD-HUSE	149
5.4	Epidemiología molecular de SARM en cinco hospitales de Mallorca	156
5.4.1	Población de estudio	156
5.4.2	Epidemiología molecular de los SARM en cinco hospitales de Mallorca	158
5.5	Tipado del SCC <i>mec</i>	159
5.6	Subtipado del SCC <i>mec</i> tipo IV	161
5.7	Detección de los genes codificantes de la LPV y del ACME	162
5.8	Patrones de resistencia antibiótica de las cepas de SARM del HUSD-HUSE .	165

PARTE 2: ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DE COLONIZACIÓN E INFECCIÓN POR *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A LA METICILINA EN UNA RESIDENCIA GERIÁTRICA DE MALLORCA..... 175

5.9	Residentes participantes y características poblacionales.....	175
5.10	Estudio de prevalencia de la colonización por <i>S. aureus</i>	176
5.11	Factores de riesgo de la colonización por SARM	177
5.12	Estudio de epidemiología molecular	178
5.12.1	Electroforesis en campo pulsado y MLST.....	178
5.12.2	Tipado del SCC <i>mec</i>	180
5.12.3	Subtipado del SCC <i>mec</i> tipo IV	181
5.13	Detección de la leucocidina de Pantón-Valentine.....	182
5.14	Estudio de sensibilidad antimicrobiana	183
5.15	Estudio de seguimiento longitudinal.....	184
5.15.1	Seguimiento a los 8 meses	184
5.15.2	Seguimiento a los 12 meses	186
5.15.3	Seguimiento a los 18 meses	187
5.16	Epidemiología molecular de SARM en el estudio de seguimiento	189
5.17	Persistencia del estado de portador nasal de SARM.....	190

PARTE 3. CARACTERIZACIÓN DE UN NUEVO PLÁSMIDO DE MULTIRRESISTENCIA QUE CONTIENE LOS GENES *cfr*, *tet(L)*, *ant(4')-Ia* Y

<i>dfpK</i>, EN DOS AISLADOS DE SARM Y EN UN AISLADO DE <i>Staphylococcus epidermidis</i>	193
5.18 Historia clínica de dos pacientes con SARM resistentes a la linezolida	193
5.19 Estudios de sensibilidad	195
5.19.1 Cepas iniciales de SARM sensibles a la linezolida	195
5.19.2 Cepas de SARM y <i>S. epidermidis</i> resistentes a la linezolida.....	196
5.20 Relación clonal de los aislados de SARM resistentes a la linezolida	198
5.21 Estudio del mecanismo de resistencia a la linezolida	198
5.22 Estudios de conjugación.....	199
5.23 Determinación del tamaño del plásmido	201
5.24 Detección de los restantes genes de resistencia transferidos	201
5.25 Caracterización molecular del entorno genético de los cuatro genes de resistencia en el plásmido pERGB.....	202
PARTE 4. ESTUDIO DE EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR Y CARACTERIZACIÓN DEL MECANISMO DE RESISTENCIA DE UN BROTE DE <i>Staphylococcus hominis</i> RESISTENTE A LA LINEZOLIDA	207
5.26 Características de los pacientes con <i>S. hominis</i> resistente a la linezolida	207
5.27 Identificación de especie y estudio de sensibilidad.....	209
5.28 Mecanismo de resistencia a la linezolida	209
5.29 Estudio de epidemiología molecular	211
6. DISCUSIÓN	215
6.1 Epidemiología molecular de SARM en Mallorca	215
6.2 Epidemiología de SARM en las residencias geriátricas.....	224
6.3 Resistencia a la linezolida en estafilococos	234
7. CONCLUSIONES	247

8.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	251
9.	ANEXO 1: SOLUCIONES Y REACTIVOS.....	321
9.1	Electroforesis en campo pulsado	321
9.1.1	Soluciones de trabajo	321
9.1.2	Reactivos, material e instrumental	322
9.1.3	Protocolo de trabajo	324
9.2	Mezclas de reacción para PCR.....	331
10.	ANEXO 2: ARTÍCULOS PUBLICADOS	337

AGRADECIMIENTOS

I. AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer brevemente a las siguientes personas sin cuya ayuda esta tesis no hubiera sido posible:

- Al Dr. José L. Pérez, Jefe del Servicio de Microbiología del Hospital Universitari Son Espases (HUSE) y codirector de la presente tesis: por todas las facilidades que me brindó para que pudiera realizar las distintas partes experimentales de la tesis, por la continua labor de estímulo y apoyo a lo largo de muchos años para que escribiera el manuscrito, y por toda su gran colaboración ofrecida en su corrección.
- Al Dr. Antonio Oliver, Facultativo adjunto del Servicio de Microbiología, responsable del área de Epidemiología Molecular del HUSE y codirector de la presente tesis: por toda su gran colaboración ofrecida en la corrección de esta tesis, así como por haberme iniciado en muchas de las técnicas moleculares utilizadas en estos trabajos. Por haberme facilitado el acceso a algunas de las cepas de SARM empleadas como controles y, especialmente, por toda su paciencia y apoyo en los diversos experimentos (conjugación, clonación y secuenciación) relacionados con la cepa de SARM portadora del pERGB; ya que muchos de éstos no salieron a la primera.
- A los Dres. Antonio Ramírez, José Gil y Núria Borrell, Facultativos adjuntos del Servicio de Microbiología del HUSE: por haber colaborado en su día a día en el aislamiento de las cepas de SARM que he utilizado para los estudios de epidemiología molecular.
- A la Dra. Margarita Isabel (Mabel) Galmés, ex-residente de Microbiología del Hospital Universitari Son Dureta: por haber realizado el estudio inicial de epidemiología molecular de 1999-2000, dirigido por la Dra. María Ángeles Domínguez del Hospital Universitari de Bellvitge, y que fue pionero en estos estudios en Mallorca.

- A las Dras. Eva Alcoceba y Aina Mena, del HUSE, y María Cruz Pérez, del Hospital Son Llàtzer, todas ellas microbiólogas: por haber colaborado en la tipificación, mediante electroforesis en campos pulsados, de las cepas de SARM detectadas en 2003-2004 en los hospitales mallorquines.
- Al Dr. Miquel Pujol, Facultativo del Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Universitari de Bellvitge: por ser la persona que, en gran medida, diseñó el estudio multicéntrico de SARM en residencias geriátricas del que formó parte el trabajo aquí presentado.
- A los Dres. Catalina Andreu y Enrique Campos, médicos de la Residencia de Pensionistas Bonanova: por permitirme realizar este estudio en los residentes, ofreciéndome todas las facilidades logísticas y por haber cumplimentado los formularios del estudio de los factores de riesgo de colonización por SARM. A Catalina Galmés y al personal de enfermería de esta Residencia, por su paciente y constante ayuda en la recogida de muestras a lo largo de tiempo de seguimiento longitudinal. A la Dra. Maria Alorda: por haberme ayudado en la siembra de todos los exudados recogidos a los residentes geriátricos, a la lectura de los cultivos y a la realización y lectura de los antibiogramas.
- Al Dr. Carlos Juan, microbiólogo de la Unidad de Investigación del HUSE: por haberme ayudado con la clonación del plásmido pERGB, su representación esquemática para el artículo y su registro en GenBank; y también por haberme ayudado en la preparación de muchos de los reactivos que he utilizado en estos trabajos. A la Dra. Laura Zamorano, microbióloga de la Unidad de Investigación del HUSE: por haberme ayudado en varias ocasiones con la extracción del ADN plasmídico del pERGB.
- A la Dra. M^a Dolores (Mariló) Macià, Facultativa adjunta del Servicio de Microbiología del HUSE, por haberme enseñado a realizar la purificación de los productos de PCR para su posterior secuenciación.

- A la Dra. M^a Paz Díaz, microbióloga del Hospital Son Llàtzer, y a la Dra. Antònia Socías, facultativa del Servicio de Medicina Intensiva de dicho hospital: por haberme ofrecido los parámetros clínicos de los primeros pacientes con *S. hominis* resistentes a la linezolida.
- A la Dra. Carmen Vidal y a Carmen Santos, de la Unidad de Secuenciación del HUSE: que realizaron las técnicas de secuenciación necesarias para muchos experimentos que forman parte de esta tesis.
- A los investigadores en el área del SARM que nos han facilitado cepas patrón que han sido necesarias para llevar a cabo estos estudios: Dra. Herminia de Lencastre (Instituto de Tecnología Química e Biológica, Oeiras, Portugal); Dr. Alexander Tomasz (Rockefeller University, Nueva York); Dra. María Ángeles Domínguez (Hospital de Bellvitge, Hospitalet); Dra. Emilia Cercenado (Hospital Gregorio Marañón, Madrid); y Dra. Carmen Betriu (Hospital Clínico San Carlos, Madrid).
- A la Red de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI), de la Subdirección de Redes de Investigación Cooperativa (RETICs), Instituto de Salud Carlos III (referencias C03/013, C03/14 y RD06/0008), en la que me integré desde su inicio, y que me ha permitido financiar parcialmente estos estudios, completar mi formación como microbiólogo y crecer como investigador en el área de las infecciones.
- A la Dra. Estrella Rojo, Facultativa adjunta del Servicio de Microbiología del HUSE, por su ayuda en la realización de la foto de las colonias de *Staphylococcus aureus*, utilizada para la portada de esta tesis.
- Asimismo, quería agradecer a la Dra. Macià y al Dr. Jordi Reina, también Facultativo adjunto del Servicio de Microbiología del HUSE, por su enorme motivación y “caña” para que pusiera en orden mis investigaciones y les diera la forma de la presente tesis doctoral. Me parece importante resaltar que el tiempo y esfuerzo de los distintos experimentos ha sido más llevadero por las pastillas de

chocolate negro y los helados que he tomado con la Dra. Macià y el Dr. Pérez. Se trata de pequeñas cosas que hacen más entrañable la vida y que contribuyen a que las investigaciones lleguen a buen puerto.

- A todos los que fueron mis compañeros durante mi formación como microbiólogo desde 1999 y luego como facultativo del Servicio de Microbiología de los hospitales Son Dureta y Son Espases: personal facultativo, residentes, técnicos de laboratorio y administrativos. La lista sería muy larga de nombrar. Muchos de ellos me han ayudado en mis experimentos y han hecho que mi jornada laboral y el tiempo que he pasado como investigador haya sido más agradable.

**LISTA DE
PUBLICACIONES
DERIVADAS DE LA
TESIS**

II. LISTA DE PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

- **Ruiz de Gopegui E, Oliver A, Galmés MI, Hidalgo O, Pérez JL.** Consolidación de un clon multirresistente de *Staphylococcus aureus* no relacionado con el clon Ibérico en un hospital de Mallorca. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2005; 23: 140-144.
- **Alcoceba E, Mena A, Pérez MC, Ruiz de Gopegui E, Padilla E, Gil J, Ramírez A, Gallegos MC, Serra A, Pérez JL, Oliver A.** Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Majorcan hospitals: high prevalence of the epidemic clone EMRSA-15. *Clin Microbiol Infect.* 2007; 13: 599-605.
- **Manzur A, Gavaldà L, Ruiz de Gopegui E, Mariscal D, Domínguez MA, Pérez JL, Segura F, Pujol M; Group of the Spanish Network for Research in Infectious Diseases.** Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and factors associated with colonization among residents in community long-term-care facilities in Spain. *Clin Microbiol Infect.* 2008; 14: 867-872.
- **Ruiz de Gopegui E, Oliver A, Herrero J, Pérez JL.** Neumonía nosocomial por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina de origen comunitario productor de leucocidina de Panton-Valentine. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2008; 26: 533-534.
- **Manzur A, Domínguez MA, Ruiz de Gopegui E, Mariscal D, Gavaldà L, Segura F, Pérez JL, Pujol M; Spanish Network for Research in Infectious Diseases.** Natural history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonisation among residents in community long term care facilities in Spain. *J Hosp Infect.* 2010; 76: 215-219.
- **Ruiz de Gopegui E, Marinescu CI, Díaz P, Socías A, Garau M, Ayestarán JI, Pareja A, Gallegos MC, Pérez JL, Oliver A.** Diseminación nosocomial de *Staphylococcus hominis* resistente al linezolid en dos hospitales de Mallorca. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011; 29: 339-344.

- **Manzur A, Ruiz de Gopegui E, Domínguez MA, Mariscal D, Gavalda L, Pérez JL, Segura F, Pujol M; the Spanish Network for Research in Infectious Diseases.** Clinical significance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in residents in community long-term-care facilities in Spain. *Epidemiol Infect.* 2012; 140: 400-406.
- **Ruiz de Gopegui E, Juan C, Zamorano L, Pérez JL, Oliver A.** Transferable multidrug resistance plasmid carrying *cfr* associated with *tet(L)*, *ant(4')-Ia*, and *dfxK* genes from a clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST125 strain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56: 2139-2142.

ABREVIATURAS

III. ABREVIATURAS

ACME:	Elemento móvil catabólico de la arginina.
ACS:	Asociado a los cuidados sanitarios.
BAS:	Aspirado bronquial.
BHI:	<i>Brain Heart Infusion</i> (caldo cerebro corazón).
CC:	Complejo clonal.
CDC:	<i>Centers for Disease Control and Prevention.</i>
CLSI:	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute.</i>
CMI:	Concentración mínima inhibitoria.
CNM:	Centro Nacional de Microbiología.
dNTPs:	Desoxinucleósidos 5'-trifosfato.
EARS-NET:	<i>European Antimicrobial Resistance Surveillance Network.</i>
ECN:	Estafilococos coagulasa negativa.
ECP:	Electroforesis en gel de campo pulsado.
EE.UU.:	Estados Unidos.
EGM:	Elementos genéticos móviles.
EMRSA:	<i>Epidemic methicillin-resistant Staphylococcus aureus.</i>
EPOC:	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica.
EUCAST:	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.</i>
HG:	Hospital General.
HJM:	Hospital Joan March.
HM:	Hospital de Manacor.
HSLL:	Hospital Son Llätzer.

HUSD:	Hospital Universitari Son Dureta.
HUSE:	Hospital Universitari Son Espases.
IAM:	Infarto agudo de miocardio.
IS:	Secuencia de inserción.
kb:	Kilobases.
LB:	Luria-Bertani.
LCR:	Líquido cefalorraquídeo.
LPV:	Leucocidina de Panton-Valentine.
MLS _B :	Macrólidos, lincosamidas, estreptograminas tipo B.
MLST:	<i>Multilocus sequence typing</i> .
MRSA:	<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i> .
pb:	Pares de bases.
PBP:	Proteínas fijadoras de penicilina.
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa.
REIPI:	Red de Investigación de Patología Infecciosa.
SARM:	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina.
SASM:	<i>Staphylococcus aureus</i> sensible a la meticilina.
SCC _{mec} :	Casete cromosómico estafilocócico del gen <i>mec</i> .
SF:	Suero fisiológico.
ST:	Secuencia tipo.
UCI:	Unidad de Cuidados Intensivos.
UFC:	Unidades formadoras de colonias.

RESUMEN

1. RESUMEN

Introducción

Las primeras cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina (SARM) se detectaron en el Reino Unido en 1960. Posteriormente, se diseminaron por todo el mundo. Al principio, el SARM era un patógeno típicamente nosocomial; pero, progresivamente, se fue extendiendo a pacientes no ingresados, la mayoría de ellos relacionados con el sistema sanitario, como es el caso de los residentes en geriátricos. A partir del año 2000, se detectaron cepas de SARM comunitario, con características clínicas y microbiológicas peculiares, como la presencia de los genes codificantes de la leucocidina de Pantón-Valentine (LPV). Uno de los antimicrobianos alternativos para tratar el SARM es la linezolid, pero también se han detectado cepas de SARM y de otras especies estafilocócicas resistentes a este antimicrobiano.

Objetivos

Estudiar la relación clonal de los aislados de SARM detectados en el Hospital Universitari Son Dureta-Son Espases, hospital de referencia de las Islas Baleares, durante cuatro períodos: 1999-2000, 2002-2004, 2008 y 2012-2013.

Comparar la relación clonal de los aislados de SARM del hospital de referencia con los de otros hospitales de Mallorca. Determinar la frecuencia de LPV.

Estudiar la prevalencia de la colonización por SARM en exudados nasales y de úlcera de los residentes en el mayor centro geriátrico de Mallorca. Determinar los factores de riesgo de esta colonización y evaluar su evolución temporal.

Estudiar la epidemiología molecular y el mecanismo de resistencia a la linezolid en cepas de SARM, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus hominis*, resistentes a este antimicrobiano detectadas en dos hospitales de Mallorca.

Metodología

Se documentaron todos los pacientes con SARM detectado en muestras clínicas en los cuatro períodos de estudio. La relación clonal se determinó mediante electroforesis en campo pulsado y *multilocus sequence typing*. Se realizaron diversos ensayos de PCR para la detección de los genes de LPV, tipificación del casete cromosómico estafilocócico *mec* (SCC*mec*) y subtipificación del SCC*mec* tipo IV.

En el estudio de prevalencia de SARM en geriátricos, se recogieron muestras de exudado nasal y de úlcera durante los meses de octubre y noviembre de 2005. Para determinar los factores de riesgo de colonización, se cumplimentó un formulario estandarizado con los datos clínicos de cada participante. Se realizó el seguimiento clínico y de la colonización a los 8, 12 y 18 meses, tanto en los pacientes colonizados por SARM (casos), como en un grupo de residentes no colonizados (controles).

En los aislados de SARM, *S. epidermidis* y *S. hominis* resistentes a la linezolida, se realizaron diversos ensayos de PCR y de transferencia del plásmido. Se procedió a la caracterización del plásmido de multirresistencia (pERGB) tras la clonación de los distintos fragmentos en pUCP24.

Resultados y conclusiones

La situación epidemiológica de SARM en nuestro hospital se caracterizó por la presencia endémica de 3 clones mayoritarios en 1999-2004 (ST125-IVc, ST228-I y ST22-IVh). Los clones ST125-IVc y ST228-I predominaban también en muchos hospitales españoles, mientras que el ST22-IVh (EMRSA-15), prevalente en el Reino Unido, era prácticamente inexistente en el territorio peninsular español. Estos tres clones fueron también los predominantes en otros hospitales de Mallorca. En 2008, un 7% de las cepas de SARM del hospital de referencia fueron productoras de LPV.

La prevalencia de SARM en exudados nasales de los residentes en geriátricos fue del 8%, relativamente baja y generalmente transitoria. Los factores de riesgo asociados con la colonización fueron el ingreso hospitalario previo, la enfermedad vascular, la diabetes, la presencia de úlceras de decúbito y el tratamiento antibiótico previo. La gran mayoría de residentes colonizados no desarrollaron una infección subsiguiente por SARM. Se detectó la presencia de dos clones distintos, también encontrados en el hospital de referencia.

Por primera vez, se describe un plásmido de multirresistencia conjugativo portador de los genes *cfr*, *ant(4')-Ia*, *tet(L)* y *dfcK* en *S. aureus* y *S. epidermidis* que determina la resistencia a la linezolida y a otros antibióticos. Todas las cepas de *S. hominis* resistentes a la linezolida pertenecían al mismo clon y presentaban la mutación G2576T en el gen ARNr 23S.

RESUM

Introducció

Les primeres soques de *Staphylococcus aureus* resistents a la meticil·lina (SARM) es detectaren al Regne Unit l'any 1960. Posteriorment, es disseminaren per tot el món. Al començament, el SARM era un patogen típicament nosocomial; però, progressivament, es va estendre a malalts no ingressats, la majoria d'ells relacionats amb el sistema sanitari, com ara els residents a geriàtrics. A partir de l'any 2000, es detectaren soques de SARM comunitari, amb característiques clíniques i microbiològiques peculiars, com la presència de gens codificants de la leucocidina de Pantón-Valentine (LPV). Un dels antimicrobians alternatius per tractar el SARM és la linezolidina, encara que també s'han detectat soques, tant de SARM com d'altres espècies estafilocòcciques, resistents a aquest antimicrobià.

Objectius

Estudiar la relació clonal dels aïllats de SARM detectats a l'Hospital Universitari Son Dureta-Son Espases, hospital de referència de les Illes Balears, durant quatre períodes: 1999-2000, 2002-2004, 2008 i 2012-2013.

Comparar la relació clonal dels aïllats de SARM de l'hospital de referència amb els d'altres hospitals de Mallorca. Determinar la freqüència de LPV.

Estudiar la prevalença de la colonització per SARM en exsudats nasals i d'úlcers dels residents al centre geriàtric més gran de Mallorca. Determinar els factors de risc d'aquesta colonització i avaluar-ne l'evolució temporal.

Estudiar l'epidemiologia molecular i el mecanisme de resistència a la linezolidina en soques de SARM, *Staphylococcus epidermidis* i *Staphylococcus hominis*, resistents a aquest antimicrobià detectades a dos hospitals de Mallorca.

Metodologia

Es documentaren tots els malalts amb SARM detectat en mostres clíniques durant els quatre períodes d'estudi. La relació clonal es determinà mitjançant electroforesi en camp polsant i *multilocus sequence typing*. Es dugueren a terme diferents assajos de PCR per a la detecció dels gens de LPV, tipificació del casset cromosòmic estafilocòccic *mec* (SCC*mec*) i subtipificació de l'SCC*mec* tipus IV.

A l'estudi de prevalença de SARM en geriàtrics, es recolliren mostres d'exsudats nasals i d'úlcers durant els mesos d'octubre i novembre de 2005. Per

determinar els factors de risc de colonització, s'emplenà un formulari estandarditzat amb les dades clíniques de cada participant. Es va fer el seguiment clínic i de la colonització als 8, 12 i 18 mesos, tant en els malalts colonitzats per SARM (casos), com en un grup de residents no colonitzats (controls).

En els aïllats de SARM, *S. epidermidis* i *S. hominis* resistents a la linezolida, s'efectuaren diversos assajos de PCR i de transferència del plasmidi. Es procedí a la caracterització del plasmidi de multiresistència (pERGB) després de la clonació dels diferents fragments en pUCP24.

Resultats i conclusions

La situació epidemiològica de SARM al nostre hospital es caracteritza per la presència endèmica de 3 clons majoritaris en 1999-2004 (ST125-IVc, ST228-I i ST22-IVh). Els clons ST125-IVc i ST228-I predominaven també en molts hospitals espanyols mentre que el ST22-IVh (EMRSA-15), prevalent al Regne Unit, era pràcticament inexistent en el territori peninsular espanyol. Aquests tres clons van ser els més freqüents en els altres hospitals de Mallorca. L'any 2008, un 7% de les soques de SARM de l'hospital de referència foren productores de LPV.

La prevalença de SARM en exsudats nasals dels residents geriàtrics fou del 8%, relativament baixa i generalment transitòria. Els factors de risc associats amb la colonització foren l'ingrés hospitalari previ, la malaltia vascular, la diabetis, la presència d'úlceres de decúbit i el tractament antibiòtic previ. La gran majoria dels residents colonitzats no desenvoluparen una infecció subsegüent per SARM. Es detectà la presència de dos clons diferents, trobats també a l'hospital de referència.

Per primera vegada, es descriu un plasmidi de multiresistència conjugatiu portador dels gens *cfr*, *ant(4['])-Ia*, *tet(L)* i *dfrK* en *S. aureus* i *S. epidermidis* que determina la resistència a la linezolida i a altres antimicrobians. Totes les soques de *S. hominis* resistents a la linezolida pertanyien al mateix clon i presentaven la mutació G2576T al gen ARNr 23S.

ABSTRACT

Introduction

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains were first detected in the United Kingdom in the sixties of the past century, and then spread all over the world. At the beginning, MRSA behaved as a typical nosocomial pathogen but progressively was detected outside the hospital, mostly in health-care associated infected patients. Since year 2000, community-acquired MRSA strains showing a particular clinical and microbiological profile emerged; most of these strains typically contain two genes encoding the Panton-Valentine leucocidin toxin (PVL). Linezolid is a useful alternative for treating patients with MRSA and other staphylococcal infections but resistance to this antimicrobial has recently arisen.

Objectives

To study the clonal relatedness of MRSA isolates detected at the Hospital Universitari Son Dureta-Son Espases, the reference hospital of the Balearic Islands, along four periods: 1999-2000, 2002-2004, 2008, and 2012-2013; to compare the clonal relatedness of these MRSA isolates with those from other Majorcan hospitals; to determine the frequency of PVL gene detection in the MRSA strains.

To study the prevalence of MRSA colonization (nasal and ulcer swabs) in the residents admitted at the major geriatric center of Majorca. To determine the risk factors for colonization, and to evaluate its evolution in over time.

To study the molecular epidemiology and the mechanisms of resistance in linezolid-resistant MRSA, *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus hominis* strains detected at two Majorcan hospitals.

Methodology

All MRSA strains isolated from clinical samples during the four study periods were studied. Clonal relatedness was determined by pulsed-field gel electrophoresis and multilocus sequence typing. Several PCR assays were carried out for detection of PVL genes, typing of staphylococcal chromosomal cassette *mec* (SCC*mec*), and subtyping of SCC*mec* type IV isolates.

Regarding the prevalence of MRSA carriage in geriatric patients, nasal and ulcer swabs were collected from the study participants in October-November 2005. In order to determine the risk factors for MRSA colonization, a standardized questionnaire

with clinical data from each resident was completed. Two cohorts of residents (MRSA carriers and non-carriers) were followed up to 18 months, with nasal cultures performed every six months.

PCR detection of several genes and plasmid transfer assays were done in MRSA, *S. epidermidis* and *S. hominis* linezolid-resistant isolates to decipher the determinants of this resistance. The multidrug resistance plasmid (pERGB) was characterized after cloning different gene fragments in pUCP24.

Results and conclusions

The epidemiologic profile of MRSA strains from our hospital was characterized for the endemic presence of 3 major clones during 1999-2004 (ST125-IVc, ST228-I and ST22-IVh). The ST125-IVc and ST228-I clones were also predominant in many Spanish hospitals at that time, whereas the ST22-IVh (EMRSA-15), the most prevalent in British hospitals, was almost nonexistent in centers of the Iberian Peninsula in that period. These three clones were also predominant in the others Majorcan hospitals. In 2008, 7% of MRSA isolates from the reference hospital were PVL-producers.

MRSA carriage in participants living in the geriatric facility was 8%, relatively lower in comparison with other studies, and generally intermittent. Previous hospital admission, vascular disease, diabetes mellitus, presence of decubitus ulcers and previous antibiotic treatment were the risk factors for MRSA colonization. Most of the residents carrying MRSA at any time did not develop subsequent MRSA infections. MRSA isolates belonged to two different clones, both found also in the reference hospital.

A multidrug resistance conjugative plasmid was described for the first time carrying *cfr*, *ant(4')-Ia*, *tet(L)* and *dfrK* genes driving resistance to linezolid and other antimicrobials in *S. aureus* and *S. epidermidis* strains. All the linezolid-resistant *S. hominis* strains belonged to the same clone and presented the G2576T mutation at the 23S rRNA gene.

INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Generalidades de *Staphylococcus aureus*

2.1.1 Taxonomía

Staphylococcus aureus pertenece al género *Staphylococcus*, dentro de familia *Staphylococcaceae*, que incluye además otros cuatro géneros menos conocidos: *Jeotgalicoccus*, *Macrococcus*, *Nosocomiicoccus* y *Salinicoccus*. El género *Gemella*, que formaba parte de esta familia, se ha reclasificado en la familia *Bacillales XI. Incertae Sedis* (Becker, 2011; Euzéby, 2015).

Hasta hace algunos años, el género *Staphylococcus* estuvo agrupado junto con el género *Micrococcus* dentro de la familia *Micrococcaceae* (Schleifer, 1986). Sin embargo, posteriormente se describieron diferencias sustanciales entre ambos géneros, como en el contenido de guanina-citosina (G + C), que es del 30-39% en los estafilococos y del 63-73% en los micrococos, en la estructura de la pared celular (los estafilococos poseen ácidos teicoicos unidos al peptidoglucano, mientras que los micrococos no) y en la diferente composición de citocromos y menaquinona de su cadena respiratoria. Por ello, actualmente están separados en dos familias diferentes: *Staphylococcaceae* y *Micrococcaceae*. La familia *Staphylococcaceae*, junto con las familias *Bacillaceae*, *Listeriaceae* y otras familias más infrecuentes están incluidas en el orden *Bacillales* dentro de la clase *Bacilli* (Becker, 2011; Euzéby, 2015).

El género *Staphylococcus* agrupa en abril de 2015 a 51 especies distintas (en la página web <http://www.bacterio.net/s/staphylococcus.html> se muestra una lista actualizada con los nombres de las especies bacterianas publicadas). A su vez, *S. aureus* está dividido en dos subespecies, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* y *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* (Euzéby, 2015).

2.1.2 Características microbiológicas

Las especies del género *Staphylococcus* son cocos grampositivos de 0,5 a 1,5 μm de diámetro, que suelen agruparse formando racimos irregulares debido a la tendencia a dividirse en más de un plano. Menos frecuentemente, aparecen solos, en parejas, tétradas, o cadenas cortas (Becker, 2011). El término *Staphylococcus*

(derivado del griego *staphylé*, que significa “racimo de uvas”) proviene del cirujano escocés Sir Alexander Ogston quien, en 1881, observó microscópicamente unas bacterias que estaban agrupadas en forma de racimo en el pus de un absceso cutáneo humano (Ogston, 1883). En 1884, Rosenbach fue capaz de cultivar los estafilococos, describiendo dos tipos de colonias que denominó *Staphylococcus pyogenes aureus* (amarillas) y *Staphylococcus albus* (blancas) (Rosenbach, 1884).

Los estafilococos son microorganismos inmóviles, no formadores de esporas, habitualmente anaerobios facultativos, con la excepción de las especies *Staphylococcus saccharolyticus* y *S. aureus* subsp. *anaerobius*, las cuales únicamente crecen en condiciones anaerobias. La gran mayoría de las especies de estafilococos son catalasa positiva, con las excepciones de *S. saccharolyticus*, *S. aureus* subsp. *anaerobius* y, muy esporádicamente, algunos aislados de *S. aureus* subsp. *aureus* (Hidalgo-García, 2011). La inmensa mayoría de las especies de estafilococos son oxidasa negativa, a excepción de *Staphylococcus fleurettii*, *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus sciuri* y *Staphylococcus vitulinus* (Becker, 2011).

Las colonias de *S. aureus* son habitualmente grandes (entre 1 y 3 mm de diámetro), lisas, cremosas, opacas y convexas. En medios de agar sangre, suelen producir un halo de β -hemólisis (figura 1).



Figura 1. Crecimiento en una placa de agar sangre de *S. aureus*.

La denominación de “*aureus*” (que en latín significa “dorado”) se debe a que la mayoría de las colonias suelen ser pigmentadas, de un color amarillo dorado, debido a la presencia de carotenoides durante el crecimiento que protegen al microorganismo

frente a los oxidantes producidos por el sistema inmune (Liu, 2005). *Staphylococcus aureus* es capaz de crecer a altas concentraciones de cloruro sódico (hasta el 15%) y en un intervalo amplio de temperatura (entre 15 y 45°C). Casi todas las cepas de *S. aureus* producen las enzimas coagulasa, el factor de afinidad por el fibrinógeno (o *clumping factor*) y la nucleasa termoestable (DNasa), y son fermentadoras del manitol, lo que permiten diferenciarlos del resto de especies de estafilococos (Becker, 2011).

2.1.3 Hábitat natural

Staphylococcus aureus es un microorganismo ubicuo, con predilección por la piel, glándulas cutáneas y membranas mucosas de mamíferos (Becker, 2011). En el ser humano, *S. aureus* coloniza la piel y las mucosas de distintas localizaciones del cuerpo humano. El lugar más frecuente de colonización de *S. aureus* se encuentra en la parte anterior de las fosas nasales, seguidas del área perineal-ingles, de la orofaringe y de las axilas (Mermel, 2011). Esta bacteria puede aislarse, además, en otros sitios como en la piel, especialmente de las manos, y en la vagina (Wertheim, 2005).

Cuando se ha analizado de forma longitudinal el estado de portador nasal en personas sanas, se han descrito tres patrones distintos de colonización nasal: portadores persistentes (20%, rango 10-35%, en los que se detecta la misma cepa de *S. aureus* a lo largo del tiempo), portadores intermitentes (30%, rango 20-75%) y no portadores (50%, rango 5-50%) (Williams, 1963; Wertheim, 2005). Esta amplia variación en la tasa de portadores nasales de *S. aureus* informada en los diferentes estudios se debe a múltiples factores, como la población estudiada, el modo de recogida de la muestra, las técnicas microbiológicas empleadas, el número de muestras recogidas y la duración del seguimiento (VandenBergh, 1999).

La distinción entre portadores persistentes e intermitentes es importante, ya que los portadores persistentes tienen una mayor carga bacteriana de *S. aureus* (Nouwen, 2004; Stone, 2008; Verhoeven, 2012), un mayor número de cultivos positivos de diferentes muestras anatómicas, una mayor dispersión de *S. aureus* al medio (lo que incrementa el riesgo de transmisión cruzada) (Verhoeven, 2014) y un mayor riesgo de desarrollar infección por esta bacteria (Nouwen, 2006). No obstante, los criterios para establecer el estado de portador (el número de cultivos positivos o negativos necesarios y el intervalo entre ellos) son muy heterogéneos en los distintos estudios y no están estandarizados. La caracterización de portador nasal persistente

requiere habitualmente la recogida de, al menos, cinco exudados nasales separados por un intervalo de una semana (Verhoeven, 2014). Una única determinación transversal del estado de portador no puede distinguir si un portador es intermitente o persistente, aunque puede ser adecuada en la práctica clínica para la prevención de la infección por *S. aureus* (Wertheim, 2005).

En un estudio realizado en voluntarios sanos que recibieron una inoculación intranasal artificial de *S. aureus*, se observó que los portadores transitorios y los no portadores tenían una cinética similar en la eliminación de *S. aureus* tras la administración de mupirocina, a diferencia de los portadores persistentes. Además, el título de anticuerpos antiestafilocócicos en suero era inferior en los portadores transitorios y no portadores que en los portadores persistentes. Asimismo, los portadores transitorios tenían una menor cantidad de unidades formadoras de colonias (UFC) de *S. aureus* en las fosas nasales que los portadores persistentes. Por ello, se ha propuesto la existencia de dos únicos tipos de portadores nasales de *S. aureus*: los portadores persistentes y el resto (van Belkum, 2009).

La prevalencia de portadores nasales de *S. aureus* en la población general de Estados Unidos (EE.UU.) descendió ligeramente del 32,3% en el período 2001-2002 al 28,7% en 2003-2004 (Gorwitz, 2008). Algunos estudios posteriores han mostrado que desde 2005 a 2012 ha continuado la disminución de la tasa de portadores nasales de *S. aureus*, probablemente debido a una mejor higiene individual y a una mayor calidad de vida (Verhoeven, 2014).

En Europa, en un estudio en el que participaron nueve países, realizado en más de 32.000 personas, con una edad igual o superior a los 4 años, que acudieron a un centro de salud, sin patología infecciosa, entre noviembre de 2010 y agosto 2011, la prevalencia de portadores nasales de *S. aureus* oscilaba entre el 29,8% de Suecia y el 14,1% de Hungría, con una media del 21,6%. Se recuperó *S. aureus* resistente a la metilicina (SARM) en el 1,3% de los exudados nasales con crecimiento de *S. aureus*, con una prevalencia que oscilaba entre el 0,0% de Suecia y el 2,1% de Bélgica. Respecto a España, en 3.990 personas del área urbana de Barcelona, la prevalencia de *S. aureus* nasal en dicho estudio fue del 19,3%; mientras que, la prevalencia de portadores nasales de SARM fue del 1,3% en relación al total de *S. aureus* nasales y del 0,3% en la población general estudiada (den Heijer, 2013).

En otro estudio realizado en 278 voluntarios sanos de La Rioja durante 2009 sin factores de riesgo ni contacto con animales, la tasa de portadores nasales de *S. aureus* fue del 19,1%, de los cuales uno (0,4%) fue portador de SARM (Lozano,

2011b), porcentajes casi idénticos al trabajo anterior. Curiosamente, en otro estudio del mismo grupo, 28 de 67 (41,8%) muestras nasales recogidas entre 2009-2011 en dueños sanos de perros de La Rioja fueron positivas para *S. aureus*, de los que un aislado (1,5%) fue SARM (Gómez-Sanz, 2013).

Los grupos con un mayor riesgo de colonización por *S. aureus* son los pacientes con enfermedades cutáneas crónicas, diabéticos, pacientes en hemodiálisis o diálisis peritoneal, usuarios de drogas parenterales, pacientes con enfermedad hepática terminal, pacientes con infección por el VIH y personal sanitario (Kluytmans, 1997; Wertheim, 2005). También, como se ha mencionado antes, los cuidadores de animales (Gómez-Sanz, 2013).

La colonización nasal por *S. aureus* puede verse como un resultado de fuerzas de atracción y de repulsión (Wertheim, 2005). Se han descrito varios estadios para que una persona se convierta en un portador nasal de *S. aureus*: 1) colonización inicial de *S. aureus* en las manos, 2) llegada de los estafilococos a la nariz, principalmente a través de prácticas poco higiénicas como “hurgarse la nariz” (Wertheim, 2006), 3) adherencia de *S. aureus* a las células epiteliales queratinizadas de la nariz (en los portadores persistentes) o a la mucosa (en portadores transitorios), 4) escape a la acción del sistema inmune, y 5) replicación en las fosas nasales (Wertheim, 2005).

Respecto a la asociación entre la colonización nasal por *S. aureus* con la infección por el mismo microorganismo, ya en 1931 Danbolt observó la relación entre ser portador nasal de *S. aureus* con el desarrollo de forunculosis (Solberg, 1965). En múltiples estudios posteriores realizados en pacientes con infecciones por *S. aureus*, tanto contraídas en la comunidad como nosocomiales, se ha constatado que la mayoría de los pacientes infectados por *S. aureus* estaban también colonizados en las fosas nasales por este microorganismo. Además, el clon de *S. aureus* causante de la infección suele ser el mismo que el de la colonización nasal (Corbella, 1997; von Eiff, 2001). El riesgo de desarrollar una infección estafilocócica en portadores nasales es mayor en ciertas poblaciones, como en pacientes quirúrgicos, pacientes en hemodiálisis o diálisis peritoneal, pacientes con cirrosis hepática y en pacientes con infección por el VIH (Kluytmans, 1997).

Debido a que *S. aureus* se encuentra en la piel y en la nasofaringe, la diseminación de este microorganismo es frecuente, siendo uno de los principales factores responsables de las infecciones contraídas en el hospital, especialmente en el caso de las cepas de SARM. Se han descrito tres mecanismos principales de transmisión de *S. aureus* en el ambiente sanitario: a través de las manos

contaminadas del personal sanitario (lo más frecuente), mediante el contacto directo con un paciente colonizado o infectado, o a través de objetos contaminados (ropa, sábanas, etc.). Los estafilococos son sensibles a las temperaturas elevadas, así como a los desinfectantes y antisépticos; sin embargo, pueden sobrevivir en las superficies secas hasta una semana (Kluytmans, 1997).

2.1.4 Importancia clínica

Staphylococcus aureus es uno de los patógenos humanos más importantes, responsable de una amplia variedad de procesos infecciosos, tanto nosocomiales como adquiridos en la comunidad, algunos de los cuales con una mortalidad elevada. La infección suele comenzar con la colonización previa de *S. aureus*, principalmente en las fosas nasales. Una vez rota la barrera natural de la piel, las bacterias pueden diseminarse hacia sitios más profundos, bien por contigüidad o bien por vía hematológica.

Las infecciones estafilocócicas suelen dividirse en tres grupos principales: lesiones superficiales (principalmente las infecciones de piel y partes blandas, como abscesos o forúnculos), las infecciones invasivas y las enfermedades causadas por toxinas. En presencia de un cuerpo extraño (como una astilla, catéter, anastomosis, válvula o prótesis articular), se requiere una menor cantidad de estafilococos para producir enfermedad. Igualmente, los pacientes con alteraciones congénitas asociadas a defectos de la quimiotaxis, como el síndrome de Wiskott-Aldrich o la enfermedad granulomatosa crónica, son más susceptibles a las infecciones estafilocócicas (Que, 2012).

Según los datos del estudio EPINE (Estudio de Prevalencia de las Infecciones Nosocomiales en los hospitales Españoles) del año 2013, *S. aureus* constituye el segundo microorganismo responsable de las infecciones comunitarias, por detrás de *Escherichia coli*, mientras que, respecto a las infecciones nosocomiales, es el tercer microorganismo en frecuencia, por debajo de *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (EPINE-EPPS, 2013).

Staphylococcus aureus es el principal causante de infecciones de piel y de partes blandas (Moet, 2007). Las infecciones cutáneas se clasifican según la estructura anatómica involucrada: impétigo (epidermis), foliculitis (dermis superficial), forúnculos, ántrax o carbunco, hidrosadenitis supurada, mastitis (dermis profunda), erisipela, celulitis y fascitis (tejido celular subcutáneo). Asimismo, este microorganismo

constituye la causa más frecuente de osteomielitis (Prieto-Pérez, 2014) y de artritis séptica (Gómez Rodríguez, 2001).

En cuanto a las bacteriemias, *S. aureus* constituye la segunda causa en nuestro medio de bacteriemia comunitaria, tras *E. coli* (EPINE, 2011). En la bacteriemia nosocomial, suele ocupar el tercer lugar respecto a los microorganismos más frecuentemente aislados, tras *Staphylococcus epidermidis* y *E. coli* (Rodríguez-Baño, 2010; EPINE, 2011). Si la bacteriemia es adquirida en el hospital, habitualmente proviene de un catéter vascular contaminado; mientras que si el origen es comunitario, el foco inicial suele estar en la piel o en el aparato respiratorio. La bacteriemia puede derivar en una infección metastásica, como artritis, osteomielitis y endocarditis, esta última con una elevada mortalidad.

Staphylococcus aureus es el responsable del 13-19% de las neumonías nosocomiales en nuestro medio (EPINE, 2011; Giannella, 2012) siendo, junto con *P. aeruginosa*, los dos principales patógenos responsables de las neumonías asociadas a ventilación mecánica (Álvarez-Lerma, 2007). La neumonía suele ser resultado de la aspiración de secreciones orales, pero también de la diseminación hematógena a partir de un foco alejado. Se puede complicar con empiema pleural.

Las enfermedades causadas por toxinas difieren de las anteriores en que están causadas por la producción extracelular de una toxina que actúa como superantígeno, con una alta capacidad de estimular las células inmunes. Las tres principales enfermedades relacionadas con la producción de toxinas de *S. aureus* son la intoxicación alimentaria estafilocócica, el síndrome de la piel escaldada estafilocócica y el síndrome del *shock* tóxico estafilocócico.

2.2 Genoma de *S. aureus*

2.2.1 Características y componentes del genoma de *S. aureus*

Los primeros genomas de *S. aureus* en secuenciarse en su totalidad se obtuvieron en el año 2001 (Kuroda, 2001). En los últimos años hay un número creciente de secuencias completas de esta especie depositadas en GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) y muchas más cepas han sido parcialmente secuenciadas (Stefani, 2012).

El genoma de *S. aureus* se compone de un cromosoma único circular de unos 2,8 millones de pares de bases (pb). El contenido de guanina más citosina (G + C) es aproximadamente del 33% (Becker, 2011). El cromosoma codifica unas 2.700 secuencias codificantes de proteínas, además de ARNs estructurales y reguladores. Aproximadamente, un 38% de las secuencias codificantes de proteínas no tienen función asignada, mientras que otro 10% tiene una adscripción provisional (Holden, 2008).

En la **figura 2** se muestra esquematizado el genoma de una cepa de *S. aureus*. El genoma bacteriano de *S. aureus* se compone de los genes *core*, los genes *core* variables y elementos genéticos móviles (EGM) (Lindsay, 2006).

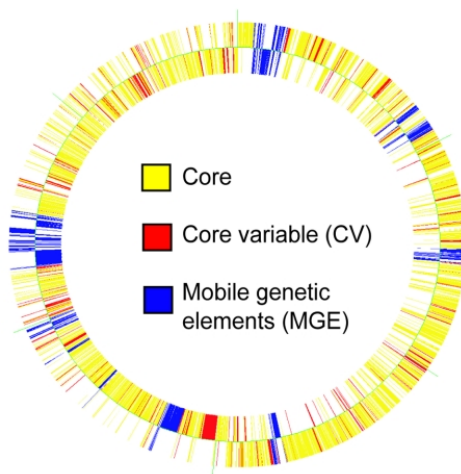


Figura 2. Esquema del genoma de una cepa de SARM. Se indican con un color distinto los genes *core*, *core* variables y los EGMs. El círculo externo representa los genes situados en la cadena codificante en sentido directo (*forward*), mientras que el círculo interno representa la cadena complementaria (*reverse*) (Lindsay, 2006).

Los genes *core* en *S. aureus* se encuentran en todas las cepas, representan el 75% de su genoma y están altamente conservados (>97%). El genoma *core* contiene todos los genes vitales para la supervivencia celular, como los que están involucrados en el metabolismo bacteriano (los denominados genes *housekeeping*), la síntesis del ADN y ARN y la replicación (Lindsay, 2008; Stefani, 2012).

El segundo componente del genoma está formado por los genes *core* variables, de los que se han descrito más de 700 genes distintos. Se encuentran distribuidos de forma variable a lo largo del genoma y representan el 10-12% del

mismo. Entre los genes *core* variables con función conocida, la mayoría codifican proteínas de superficie o estructurales que interactúan con el huésped (Lindsay, 2006).

Las variaciones sutiles en la secuencia de algunos de estos genes *core* y *core* variables (producidas por mutaciones puntuales o, menos frecuentemente, por recombinación), se emplean para realizar el tipado molecular de los aislados de *S. aureus* mediante el *multilocus sequence typing* (MLST). El MLST consiste en realizar la secuenciación de un fragmento de siete genes *core/core* variables. Posteriormente, tras introducir las siete secuencias en una página *web*, se obtiene la secuencia tipo (ST) de la cepa (Enright, 2000). El MLST también sirve para establecer la relación genética de los diferentes aislados de *S. aureus*. Los aislados que comparten, al menos, cinco de los siete alelos secuenciados se agrupan formando un mismo complejo clonal (CC) (Enright, 2002). La terminología actual para definir una línea genética se basa en los CC obtenidos en el MLST (Stefani, 2012).

Por último, el tercer componente del genoma de *S. aureus* son los EGMs, que constituyen un 10-20% de su genoma. Los EGMs son fragmentos de ADN que pueden replicarse por sí mismos, o bien, tienen mecanismos específicos para insertarse en cromosomas o plásmidos que se replican. Muchos de ellos codifican genes de virulencia o de resistencia antibiótica (Lindsay, 2008; Malachowa, 2010). El principal sistema de transferencia de los EGMs en *S. aureus* es mediante transducción, seguida de la conjugación, siendo la transformación mucho menos frecuente (Lindsay, 2014). La mayoría de EGMs sólo pueden transferirse a su propia línea genética o a un número restringido de líneas (Stefani, 2012; Lindsay, 2014). *Staphylococcus aureus* contiene numerosos tipos de EGMs, entre ellos plásmidos, transposones, secuencias de inserción (IS), bacteriófagos, islas de patogenicidad y casetes cromosómicos. En los siguientes apartados se describen brevemente los principales EGMs de *S. aureus*.

2.2.2 Plásmidos

Los plásmidos son fragmentos circulares de ADN bacteriano que se replican independientemente del cromosoma. Se clasifican en tres grupos. Clase I: plásmidos pequeños (3-5 kb), multicopia (15-50 por célula), que habitualmente codifican un único determinante de resistencia antibiótica. Clase II: plásmidos de tamaño intermedio (15-30 kb), con pocas copias (4-6 por célula). Clase III: plásmidos grandes (40-60 kb), codifican múltiples determinantes de resistencia antibiótica y se transfieren mediante conjugación (Malachowa, 2010).

Aproximadamente, la mitad de las cepas secuenciadas de *S. aureus* no tienen plásmidos libres, mientras que otras cepas tienen hasta tres plásmidos. Muchos de los plásmidos secuenciados son únicos, lo que sugiere una amplia variedad de plásmidos en esta especie (Lindsay, 2008).

Algunos plásmidos se transfieren de una bacteria donante a otra receptora por conjugación, mediante la producción de *pili* que comunican ambas bacterias; mientras que otros plásmidos se transfieren por transducción, a través de un bacteriófago (virus) que infecta otras bacterias. Una vez que los plásmidos entran en la bacteria huésped, pueden quedar libres, o integrarse en el cromosoma bacteriano, o bien integrarse en otros elementos genéticos transferibles, como en un plásmido conjugativo de mayor tamaño (Berg, 1998).

La mayoría de los plásmidos llevan genes de resistencia antibiótica, lo que proporciona a la bacteria hospedadora ventajas bajo condiciones de presión antibiótica. Se han descrito resistencias antibióticas codificadas mediante plásmidos para muchos antibióticos y desinfectantes, como a penicilina, tetraciclina, eritromicina, aminoglucósidos, trimetoprima, ácido fusídico, vancomicina, cloranfenicol, mupirocina, metales pesados y a compuestos clorados de amonio cuaternario. Algunos plásmidos de gran tamaño suponen una carga para la bacteria, con lo que presumiblemente se pierden cuando la presión antibiótica desaparece (Lindsay, 2008).

2.2.3 Transposones

Los transposones son fragmentos de ADN, de tamaño moderado, que codifican su propia transposasa. Las transposasas son enzimas que posibilitan la replicación del ADN del transposón y su integración en otro fragmento de ADN. La transferencia horizontal de transposones en *S. aureus* ocurre mediante conjugación o transducción, habitualmente a otro EGM (Lindsay, 2008).

Muchos transposones de *S. aureus* codifican genes de resistencia antibiótica. Los transposones más pequeños suelen detectarse en múltiples copias insertadas en el genoma (Malachowa, 2010). En este grupo se encuentra el transposón Tn554, que codifica la resistencia a macrólidos, lincosamidas, estreptogramina B (MLS_B) y a la espectinomicina (Bastos, 1998). Por el contrario, los transposones más grandes (>18 kb) están presentes en una única copia y codifican resistencia antibiótica, como a la tetraciclina (de Vries, 2009) o a la trimetoprima (Kadlec, 2009a).

2.2.4 Secuencias de inserción

Las secuencias de inserción (IS) son transposones que únicamente codifican la transposasa. La distribución de las IS se correlaciona con la línea genética, con lo que se transferirían muy infrecuentemente entre cepas de *S. aureus* de diferentes líneas.

La inserción de las IS en el genoma puede causar cambios en la expresión de algunos genes, bien sea inactivándolos, o por el contrario, activándolos mediante promotores llevados en las IS. Por tanto, las IS pueden afectar la transcripción y traducción de importantes proteínas. Las IS frecuentemente se encuentran en parejas, situadas cada una en un extremo de un fragmento de ADN no relacionado, constituyendo un transposón compuesto (Lindsay, 2008; Malachowa, 2010).

2.2.5 Bacteriófagos

Los bacteriófagos (fagos) o virus bacterianos se clasifican en tres grupos: líticos, templados y crónicos. Los fagos líticos lisan completamente a la bacteria durante la liberación de la progenie, mientras que los fagos crónicos se liberan de la bacteria al medio extracelular sin matarla. Los fagos templados forman el grupo más numeroso y, aunque tienen la capacidad de lisar a la bacteria durante la infección, habitualmente se integran en el genoma estafilocócico en forma de profago. La distribución de los profagos varía considerablemente entre las diferentes líneas genéticas, lo que indicaría barreras de restricción (Malachowa, 2010).

Muchos bacteriófagos juegan un importante papel en la patogenicidad al expresar algún factor de virulencia transportado por el profago. Entre ellos se encuentran la leucocidina de Pantón-Valentine (LPV, codificada por el operón *luk-PV*), la estafiloquinasa (codificada por el gen *sak*), la enterotoxina A (codificada por el gen *sea*) y la toxina exfoliativa A (codificada por el gen *eta*) (Lindsay, 2008).

2.2.6 Casete cromosómico estafilocócico

Los casetes cromosómicos estafilocócicos (SCC) son fragmentos relativamente grandes de ADN (3-60 kb) que siempre se insertan en el gen *orfX* del cromosoma estafilocócico (Ito, 1999). Codifican los genes *ccr* (recombinasa del casete

cromosómico) que catalizan la escisión e integración del casete en el cromosoma (Katayama, 2000).

Los SCC pueden codificar determinantes de resistencia antibiótica o factores de virulencia. Se clasifican en dos grupos: los que contienen el gen *mecA* (o el gen *mecC*) y codifican la resistencia a la meticilina (SCC*mec*), y los que no contienen el gen *mecA* ni el gen *mecC* (no SCC*mec*) (Malachowa, 2010). Los diferentes tipos de SCC*mec* se explicarán más adelante, en el apartado de resistencia a la meticilina.

2.3 Factores de virulencia de *S. aureus*

En la patogenia intervienen algunos componentes de la pared celular, las enzimas y las toxinas producidas por algunas cepas de *S. aureus*. En la **tabla 1** de la página siguiente se muestran algunos de los factores de virulencia de esta especie.

2.3.1 Componentes de la pared celular

En la **figura 3** se muestra esquematizados los principales componentes de la pared celular de las bacterias grampositivas.

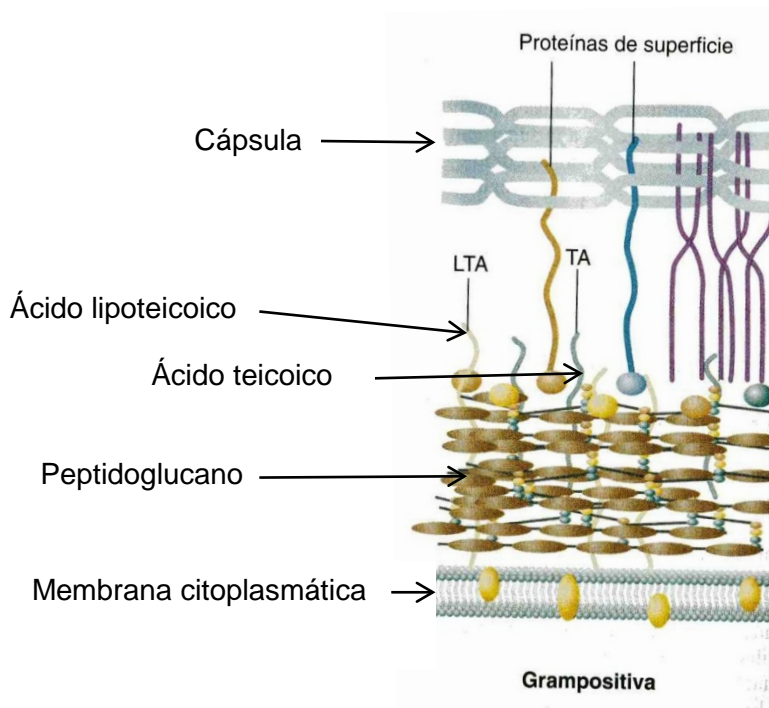


Figura 3. Estructura de la pared celular de *S. aureus* (Que, 2012).

Tabla 1. Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus*.

Factores de virulencia	Efectos biológicos
Componentes estructurales	
Biopelícula	Adherencia a los cuerpos extraños; inhibición de la fagocitosis
Cápsula	Inhibición de la fagocitosis
Proteína A	Inhibición de la eliminación mediada por anticuerpos al unirse a los receptores Fc de las IgG
Cna	Unión al colágeno
FnBPA y FnBPB	Unión a la fibronectina
ClfA y ClfB	Unión al fibrinógeno
Ácido teicoico	Adherencia al epitelio nasal
Ácido lipoteicoico	Protección frente a los péptidos catiónicos producidos por plaquetas
Peptidoglucano	Estabilidad osmótica; estimulación de la producción de pirógeno endógeno; quimiotaxis de los leucocitos; inhibición de la fagocitosis
Enzimas	
Coagulasa	Conversión del fibrinógeno en fibrina estimulando la coagulación
Catalasa	Conversión del peróxido de hidrógeno tóxico en agua y oxígeno
SspA (serina proteasa)	Degradación o activación de proteínas estafilocócicas externas Degradación de inmunoglobulinas y péptidos antimicrobianos Degradación de tejidos
SspB ó estafopaina B (cisteína proteasa)	
SspC (inhibidor cisteína proteinasa)	
ScpA ó estafopaina A (cisteína proteasa)	
ScpB (inhibidor cisteína proteasa)	
Aureolisina (metaloproteasa)	
Lipasa (butiril esterasa)	Hidrólisis de los lípidos
Nucleasa	Hidrólisis del ADN
Hialuronidasa	Hidrólisis del ácido hialurónico en el tejido conectivo, facilitando la diseminación de <i>S. aureus</i> en tejido
Toxinas	
Citotoxinas	Tóxicas para muchas células (leucocitos, eritrocitos, plaquetas)
Toxinas exfoliativas	Proteasas de serina que rompen los puentes intercelulares de la epidermis
Enterotoxinas	Estimulan la liberación de mediadores de la inflamación por los mastocitos, lo que aumenta el peristaltismo intestinal y la pérdida de líquidos
Toxina 1 del síndrome del shock tóxico	Estimula la proliferación de linfocitos T y la liberación de citocinas, produciendo shock tóxico

(Fuentes: [Que, 2012](#); [Murray, 2013](#)).

Biopelícula

Una biopelícula (*biofilm*) se puede definir como una comunidad de células (bacterias) unidas a un sustrato, en la interfase, o bien unidas entre sí, que están recubiertas de una matriz polimérica extracelular, y que exhiben un fenotipo alterado en relación a su crecimiento, expresión de los genes y producción de proteínas. Las bacterias que quedan atrapadas en las biopelículas están en fase latente, con lo que son fenotípicamente tolerantes a la acción de los antibióticos. *Staphylococcus aureus* forma con bastante frecuencia biopelículas sobre la superficie de tejidos y dispositivos médicos (Archer, 2011).

Cápsula

Todos los aislados de *S. aureus* producen una cápsula polisacárida que inhibe la fagocitosis de los leucocitos polimorfonucleares. El análisis de la expresión del polisacárido capsular ha mostrado que si bien algunas cepas de *S. aureus* no expresan el polisacárido capsular *in vitro*, esta expresión sí se detecta *in vivo* (Nissen, 2015). Clásicamente se han definido 11 serotipos capsulares en dicha especie (Sompolinsky, 1985), pero posteriormente se ha observado que todas las cepas clínicas de *S. aureus* se agrupan en dos únicos serotipos capsulares: el polisacárido capsular tipo 5 (CP5) y el polisacárido capsular tipo 8 (CP8) (Murphy, 2011).

Adhesinas de superficie

Staphylococcus aureus posee varias adhesinas de superficie que confieren adherencia a diversas proteínas de la matriz de los mamíferos. Se agrupan bajo las siglas en inglés MSCRAMM (*m*icrobial *s*urface *c*omponents *r*ecognizing *a*dhesive *m*atrix *m*olecules, componentes de la superficie microbiana que reconocen moléculas de adherencia a la matriz). La mayoría de las adhesinas se encuentran unidas al peptidoglucano de la pared celular de forma covalente. Las principales adhesinas son: la proteína A (Spa), la proteína de unión al colágeno (Cna), la proteína de unión a la fibronectina A (FnBPA), la proteína de unión a la fibronectina B (FnBPB), y los factores de aglutinación A (ClfA, *clumping factor*) y B (ClfB).

La proteína A es una proteína de la pared celular de *S. aureus*, que se une al dominio Fc de las inmunoglobulinas de clase IgG, a las plaquetas y al factor von Willebrand. La unión de la proteína A al dominio Fc de las IgG dificulta la opsonización y fagocitosis mediada por las inmunoglobulinas, mientras que la unión de la proteína A con las plaquetas activa la agregación plaquetaria (O'Brien, 2002). Por otra parte, se ha observado que el receptor TNFR1 (receptor del factor de necrosis tumoral alfa 1), que se encuentra ampliamente distribuido a lo largo del epitelio respiratorio, es también un receptor de la proteína A, por lo que esta proteína jugaría un papel importante en la patogenia de la neumonía estafilocócica (Gómez, 2004).

Ácidos teicoicos

Son polímeros de polirribitol-fosfato que están unidos al peptidoglucano mediante enlaces cruzados con residuos de ácido N-acetilmurámico. Están implicados en la adherencia de *S. aureus* al epitelio nasal (Weidenmaier, 2004).

Ácidos lipoteicoicos

Son polímeros de poliglicerol-fosfato que están unidos a la membrana citoplasmática en un residuo de diacilglicerol. Protegen a los microorganismos frente al ataque de los péptidos antimicrobianos catiónicos producidos por las plaquetas.

Peptidoglucano

Es un constituyente tanto de las bacterias grampositivas como de las gramnegativas, si bien las bacterias gramnegativas poseen un peptidoglucano bastante más delgado (1-2 capas) que las grampositivas (≥ 10 capas).

El peptidoglucano es una malla rígida formada por cadenas de unidades disacáridas repetidas compuestas de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico, unidas mediante un enlace glucosídico β -1,4. El componente N-acetilmuramato está unido a una raíz pentapéptido altamente conservada (L-alanina-D-isoglutamina-L-lisina-D-alanina-D-alanina).

Las cadenas de disacárido-péptido presentan enlaces cruzados con puentes peptídicos entre la amina libre de la L-lisina de la posición 3 y la D-alanina situada en la posición 4 de la cadena adyacente. En *S. aureus*, estos puentes interpeptídicos están formados por cinco residuos de L-glicina (Plata, 2009; Que, 2012) (figura 4).

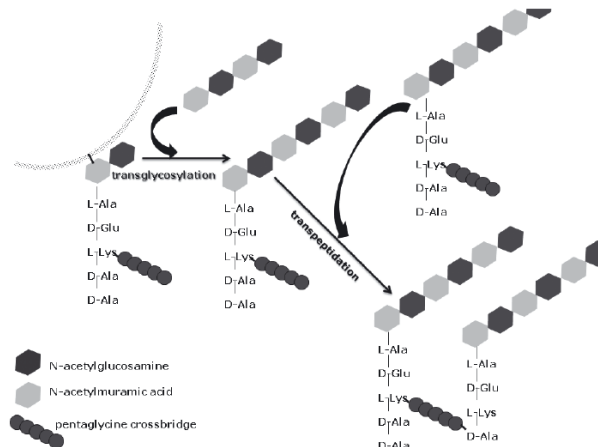


Figura 4. Esquema de la biosíntesis del peptidoglucano (Plata, 2009).

El peptidoglucano es el principal soporte de anclaje de las MSCRAMM, y además, desencadena la liberación de citocinas y la respuesta inflamatoria. La síntesis del peptidoglucano se desarrolla en varias fases. El paso final de la biosíntesis consiste en la incorporación al peptidoglucano de las unidades disacárido-péptido recién sintetizadas. Este proceso tiene lugar en la parte externa de la membrana citoplasmática. Está regulado por las proteínas fijadoras de penicilina (PBPs, *penicillin-binding proteins*), que catalizan las reacciones de transglucosilación y transpeptidación (figura 4). *Staphylococcus aureus* posee cuatro tipos de proteínas fijadoras de penicilina: PBP1, PBP2, PBP3 y PBP4 (Plata, 2009).

2.3.2 Enzimas

Coagulasa

La coagulasa se une con la protrombina formándose la estafilotrombina, que es responsable a su vez de la conversión del fibrinógeno en fibrina insoluble, produciendo la coagulación del suero. Su papel en la patogenia de las infecciones estafilocócicas no está claro (Fournier, 2008).

Catalasa

Todos los estafilococos producen catalasa, que cataliza la conversión del peróxido de hidrógeno tóxico en agua y oxígeno. El peróxido de hidrógeno se acumula durante el metabolismo bacteriano o después de la fagocitosis.

Proteasas

Staphylococcus aureus puede secretar varias proteasas extracelulares: la SspA (serina proteasa), SspB o estafopaina B (cisteína proteasa), SspC (inhibidor cisteína proteinasa), ScpA o estafopaina A (cisteína proteasa), ScpB (inhibidor cisteína proteasa) y Aur (aureolisina, una metaloproteasa). Todas ellas pueden contribuir a la virulencia. El papel de las proteasas en la virulencia estafilocócica es complejo, algunas de ellas se han relacionado con la degradación de inmunoglobulinas y de tejidos del huésped.

Otras enzimas

Staphylococcus aureus produce otras enzimas como la lipasa (butiril esterasa), la nucleasa y la hialuronidasa. Las dos primeras hidrolizan respectivamente los lípidos y el ADN, proporcionando nutrientes a la bacteria. La hialuronidasa hidroliza el ácido hialurónico (mucopolisacárido que se encuentra en la matriz acelar del tejido conectivo), facilitando la diseminación de los estafilococos en los tejidos.

2.3.3 Toxinas

Citotoxinas

Staphylococcus aureus produce cinco toxinas citolíticas que dañan la membrana: α -hemolisina o toxina α (Hla), β -hemolisina (Hlb), δ -hemolisina (Hld), γ -hemolisina (Hlag) y leucocidina de **Panton-Valentine** (LPV). Estas enzimas pueden inducir la lisis de los eritrocitos y de otras células como leucocitos polimorfonucleares, monocitos o plaquetas. La lisis de los neutrófilos da lugar a la liberación de las enzimas lisosomales que posteriormente dañan los tejidos circundantes (Que, 2012).

Toxinas exfoliativas

Se asocian al síndrome de la piel escaldada estafilocócica. Se han identificado dos toxinas exfoliativas (ETA y ETB) que rompen los desmosomas del estrato granuloso de la epidermis.

Enterotoxinas

Las enterotoxinas causan intoxicaciones alimentarias. Se han caracterizado más de 20 enterotoxinas estafilocócicas distintas (SEA a SEIV), de las que la enterotoxina A es la más frecuente. La toxinfeción alimentaria estafilocócica es el resultado de la ingesta de enterotoxinas estafilocócicas preformadas en algún alimento, produciendo un cuadro de gastroenteritis con vómitos y diarrea de inicio temprano.

Toxina 1 del síndrome del *shock* tóxico estafilocócico (TSST-1)

La TSST-1 es un superantígeno que estimula la liberación de citosinas y provoca extravasación de células endoteliales. Los aislados de *S. aureus* productores de esta toxina pueden colonizar los tampones (*shock* tóxico menstrual), las heridas quirúrgicas (*shock* tóxico quirúrgico), el pulmón (*shock* tóxico asociado a gripe), la piel y mucosas (síndrome descamativo recalcitrante), los diafragmas anticonceptivos y los catéteres de diálisis peritoneal.

2.4 Resistencia antibiótica de *S. aureus*

Staphylococcus aureus ha desarrollado resistencia a todas las clases de antibióticos disponibles en la clínica. En la **tabla 2** de la página siguiente se han resumido los principales mecanismos de resistencia en *S. aureus* junto con los genes responsables.

Tabla 2. Principales mecanismos de resistencia antibiótica en *S. aureus*.

Antimicrobiano	Genes de resistencia	Mecanismo de resistencia
β-lactámicos	<i>blaZ</i>	Producción de β-lactamasa
	<i>mecA, mecC</i>	Producción de PBP2a
Glucopéptidos	<i>vanA</i>	Síntesis de peptidoglucano modificado
	Mutaciones cromosómicas en diversos genes	Engrosamiento de la pared celular
Oxazolidinonas	Mutaciones en el gen ARNr 23S	Alteración del centro peptidil transferasa del ribosoma
	Mutaciones en las proteínas ribosómicas L3, L4	Alteración del centro peptidil transferasa del ribosoma
	<i>cfr</i>	Metilación del ARNr 23S
Macrólidos, lincosamidas	<i>erm(A), erm(B), erm(C), erm(T)</i>	Metilación del ARNr 23S
	<i>msr(A)</i>	Bombas de expulsión activa
	<i>lnu(A)</i>	Producción de una enzima inactivante de lincosamidas
Quinolonas	<i>gyrA / gyrB</i> <i>grlA</i>	Mutaciones en los genes de la ADN-girasa y de la topoisomerasa IV
	<i>norA</i>	Bombas de expulsión activas
Aminoglucósidos	<i>aac(6)-Ie aph(2)</i> <i>ant(4)-Ia</i> <i>aph(3)-IIIa</i> <i>ant(6)-Ia</i>	Producción de enzimas modificantes de aminoglucósidos
Tetraciclinas	<i>tet(K), tet(L)</i>	Bombas de expulsión activas
	<i>tet(M), tet(O)</i>	Proteínas de protección ribosómica
Sulfamidas	<i>sulA</i>	Hiperproducción de ácido <i>p</i> -aminobenzóico
Trimetoprima	<i>dfrA</i>	Alteraciones de la dihidrofolato reductasa (DHFR)
	<i>dfrS1, drfD, dfrG, dfrK</i>	Adquisición de variantes de la DHFR
Rifampicina	<i>rpoB</i>	Producción de una ARN polimerasa alterada
Mupirocina	<i>ileS</i>	Producción de isoleucil-ARNt sintetasa alterada
	<i>mupA</i>	Producción de isoleucil-ARNt sintetasa completamente diferente
Ácido fusídico	<i>fusA, rplF</i>	Alteraciones del factor de elongación G
	<i>fusB, fusC</i>	Disminución de la permeabilidad de la membrana

2.4.1 Resistencia a la penicilina

Mecanismo de acción de los β -lactámicos

Los β -lactámicos son análogos estructurales de la D-alanil-D-alanina (**figura 5**), componente de la cadena lateral del péptido del peptidoglucano y sustrato natural de las PBPs. Los β -lactámicos se unen covalentemente a las PBPs de la pared celular, provocando su inactivación. Sin PBPs funcionales, se interrumpe la síntesis del peptidoglucano, produciéndose la muerte de la bacteria (Yao, 2011).

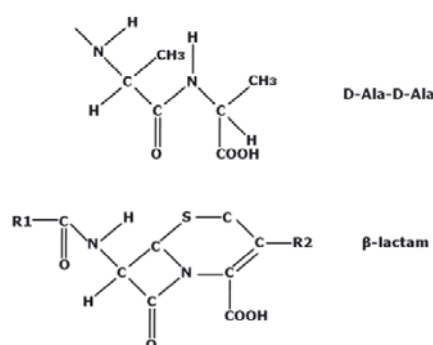


Figura 5. Estructuras de D-alanil-D-alanina y de un β -lactámico (Plata, 2009).

Mecanismo de resistencia a la penicilina

La resistencia a la penicilina en estafilococos se debe a la producción de β -lactamasa (penicilinasas), enzima que hidroliza la penicilina convirtiéndola en ácido peniciloico (inactivo). La β -lactamasa está codificada por el gen *blaZ*, que habitualmente se encuentra en un plásmido o en un transposón, en los que puede haber genes de resistencia a otros grupos antibióticos.

La gran mayoría de los aislados de *S. aureus* (80-90%) son productores de β -lactamasa (Jones, 2009b). Estas cepas son resistentes a la penicilina y a las aminopenicilinas (ampicilina, amoxicilina), pero son sensibles a las combinaciones de penicilina con inhibidores de la β -lactamasa (como la amoxicilina-ácido clavulánico) y también son sensibles a las penicilinas isoxazólicas (metecilina, cloxacilina, oxacilina).

Regulación de la expresión del gen *blaZ*

La β -lactamasa es una enzima principalmente extracelular, que se sintetiza cuando los estafilococos se exponen a los β -lactámicos. La expresión del gen *blaZ*

está bajo el control de dos genes regulatorios adyacentes localizados en un operón, el gen antirrepresor *blaR1* y el gen represor *blaI*, que producen respectivamente las proteínas BlaR1 y BlaI. En la **figura 6** se muestra de forma esquemática la regulación de la inducción de β -lactamasa tras la administración de penicilina. Este mecanismo se resume a continuación (Lowy, 2003; Pinho, 2008):

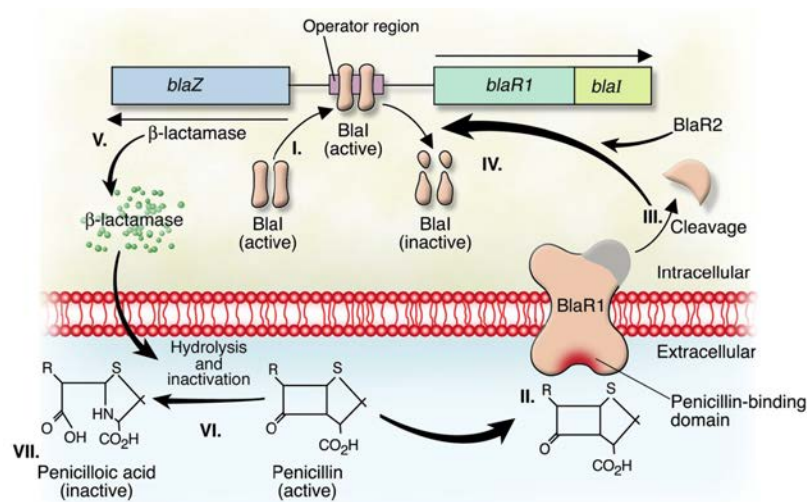


Figura 6. Esquema de la inducción de la síntesis de β -lactamasa (Lowy, 2003).

- En ausencia de un β -lactámico, la proteína represora BlaI se encuentra unida, en forma de dímero, en la región operadora situada entre los genes *blaZ* (codificante de la β -lactamasa) y el operón *blaR1-blaI*. La unión de la proteína BlaI a la región operadora reprime la transcripción a ARN tanto del gen *blaZ* como del operón *blaR1-blaI*. La β -lactamasa se expresa a bajos niveles.
- Tras la administración de penicilina, ésta se une al dominio sensor (extracelular) de la proteína de transmembrana BlaR1.
- Esta unión provoca la activación autocatalítica del dominio intracelular de BlaR1 (una metaloproteasa de cinc), escindiéndose.
- La proteína BlaR1 escindida lisa a la proteína BlaI que está unida a la región operadora, inactivándola.
- La región operadora queda libre, sin la proteína represora BlaI. Ello permite la transcripción de los genes *blaZ*, *blaR1* y *blaI*, por lo que se produce una gran cantidad de β -lactamasa.
- La β -lactamasa es exportada al medio extracelular, donde puede hidrolizar a los β -lactámicos sensibles, inactivándolos.

2.4.2 Resistencia a la meticilina

Mecanismo de acción de la meticilina

La meticilina, oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina, flucloxacilina (floxacilina) y nafcilina pertenecen al grupo de las penicilinas semisintéticas resistentes a las β -lactamasas. Poseen un grupo isoxazolil unido al grupo carbonilo de la cadena lateral del núcleo de penicilina, por lo que se le conocen como penicilinas isoxazólicas.

Estos compuestos se unen al dominio transpeptidasa (TP) de la PBP2 natural de los estafilococos, impidiendo la actividad transglucosidasa (TG) de la PBP2, por lo que inhiben la síntesis del peptidoglucano (Yao, 2011). En la parte izquierda de la **figura 7** se muestra esquematizado este mecanismo de acción.

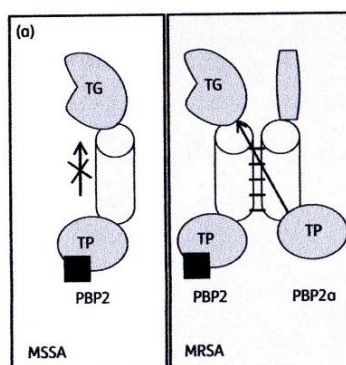


Figura 7. Modelo del mecanismo de acción de la meticilina (representada mediante un cuadrado negro) en SASM y SARM (Alm, 2014).

Mecanismo de resistencia a la meticilina

La resistencia a la meticilina y a las demás penicilinas isoxazólicas está mediada por la presencia del gen *mecA* (o *mecC*), de 2,1 kb, localizado en el cromosoma. Los genes *mecA* y *mecC* codifican una proteína fijadora de penicilina nueva, llamada PBP2a (Chambers, 1985) o PBP-2' (Song, 1987), de 78 kDa, con muy baja afinidad por los β -lactámicos. Las proteínas PBP2a se hacen cargo del ensamblaje de la pared celular en presencia de concentraciones antibióticas que inactivan las cuatro PBPs nativas.

No obstante, a pesar de que la producción de PBP2a confiere resistencia intrínseca a todos los β -lactámicos actualmente comercializados en España (año 2015), la PBP2a requiere de diversos precursores de la pared celular producidos por numerosos genes accesorios (de Lencastre, 1994).

Otro elemento de fragilidad de la PBP2a es el hecho que solamente dispone de un dominio TP, careciendo del dominio TG. Por tanto, para el ensamblaje adecuado del peptidoglucano, el dominio TP de la PBP2a se tiene que dimerizar (mediante cargas electrostáticas) con el dominio TG de las PBP2 estafilocócicas normales (Pinho, 2008; Alm, 2014). Este mecanismo se encuentra esquematizado en la parte derecha de la **figura 7**.

En los últimos años se han desarrollado algunos compuestos nuevos de β -lactámicos pertenecientes a las clases de las cefalosporinas (ceftarolina, ceftopibrole) y las carbapenemas que, además de bloquear las PBP normales estafilocócicas, también son capaces de bloquear la PBP2a de las cepas de SARM (Guignard, 2005).

En 2011, se describió un nuevo gen homólogo al gen *mecA* en aislados de SARM procedentes del Reino Unido, Dinamarca e Irlanda (García-Álvarez, 2011; Shore, 2011). Esta nueva variante del *mecA* tenía un 70% de homología con el gen *mecA*, por lo que fue inicialmente denominada *mecA*_{LGA251} (García-Álvarez, 2011) y posteriormente, tras una reunión de consenso, gen *mecC* (Ito, 2012). El gen *mecC* codifica una PBP con un 63% de homología en la secuencia de aminoácidos con la PBP2a (García-Álvarez, 2011). Este gen *mecC*, además de en humanos, se ha recuperado también en diferentes especies animales como rumiantes, jabalíes, gamos y roedores (Porrero, 2014).

Los genes *mecA* y *mecC* forman parte del casete cromosómico estafilocócico *mec* (SCC*mec*), que se explica más adelante.

Regulación de la expresión del gen *mecA*

La expresión del gen *mecA* está regulada por los genes *mecR1* (codificante la proteína transductora MecR1) y *mecI* (codificante la proteína represora MecI), que forman parte de un operón (García-Castellanos, 2004). La expresión del gen *mecA* también puede estar regulada por las proteínas BlaI y BlaRI, que controlan la expresión de la β -lactamasa.

El proceso de regulación del gen *mecA* se muestra esquematizado en la **figura 8** y se resume a continuación (García-Castellanos, 2004).

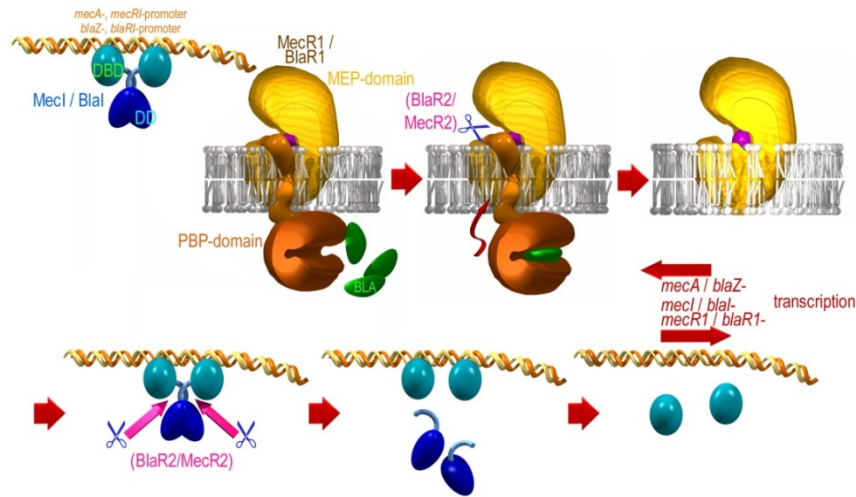


Figura 8. Modelo propuesto de la regulación del gen *mecA* (García-Castellanos, 2004).

- En ausencia de un β-lactámico, las proteínas represoras Mecl y Blal están unidas en forma de dímero a las dos regiones operadoras situadas entre los genes *mecA* y *mecR1* y entre los genes *blaZ* y *blaR1*. Esta unión reprime la transcripción a ARN de todos estos genes, por lo que el gen *mecA* se encuentra fuertemente reprimido. Cada uno de los dos monómeros de la proteína Mecl se compone de un dominio N-terminal que se une al ADN cromosómico (DBD: **DNA-binding domain**) y de un dominio C-terminal de dimerización (DD: **dimerization domain**) (parte superior izquierda de la **figura 8**).
- Tras la administración de un β-lactámico (esquematizado en la **figura 8** con un ovoide de color verde, “BLA”), éste se une al dominio sensor extracelular (“PBP-domain” de la **figura 8**, de color marrón) de la proteína de membrana MecR1.
- Esta unión desencadena la activación autocatalítica del dominio intracelular de MecR1 (“MEP-domain”, de color amarillo en la **figura 8**), con actividad metaloproteasa.
- El MecR1 activo, escindido, lisa el enlace de dimerización de la proteína Mecl, que se encuentra unida al gen *mecA* (corta las “proteínas azules” de la **figura 8**).
- Ello permite la desrepresión tanto del gen *mecA* como la del operón *mecl-mecR1*, con la consiguiente producción de PBP2a.

La proteína BlaR1 induce la transcripción de los genes *blaZ/mecA* en minutos, mientras que MecR1 induce la transcripción del gen *mecA* en horas, por lo que la regulación del gen *mecA* a través de las proteínas BlaR1-BlaI podría ser la preferida (Pinho, 2008).

Estructura del casete cromosómico estafilocócico *mec*

Los genes *mecA* y *mecC* se encuentran localizados dentro de una región cromosómica de mayor tamaño denominada casete cromosómico estafilocócico *mec* (SCC*mec*). El SCC*mec* es un fragmento de ADN exógeno móvil que está integrado en el cromosoma de algunas cepas de estafilococos (Ito, 1999; Tsubakishita, 2010). En el caso de las cepas de *S. aureus*, el SCC*mec* siempre se integra en un único sitio del cromosoma denominado *attBsc* (*bacterial chromosomal attachment site*), situado en el extremo 3' del gen *orfX*. El gen *orfX* está presente en todas las cepas de *S. aureus*. Se denomina así debido a que codifica un marco de lectura abierta (ORF) de función desconocida (Ito, 1999), si bien en los últimos años se ha publicado que *orfX* codifica una metiltransferasa del ARNr 23S (Shore, 2011). El *attBsc* contiene una secuencia de 15 pb a ambos lados de la unión SCC*mec*-cromosoma denominada secuencia del sitio de integración (ISS, *integration site sequence*), necesaria para la recombinación mediada por las *ccr* (recombinasas del casete cromosómico) (Ito, 2001).

Todos los diversos SCC*mec* se dividen en tres componentes: el complejo del gen *mec*, el complejo del gen *ccr* y las tres regiones J (inicialmente la abreviatura "J" se refería a *junkyard region*, basura; posteriormente, se propuso cambiarla por *joining region*, unión) (Ito, 2001; International Working Group on the Classification of *Staphylococcal Cassette Chromosome Elements* [IWG-SCC], 2009).

La composición de la gran mayoría de los SCC*mec* identificados hasta la fecha es: (*orfX*)-J3-*mec*-J2-*ccr*-J1. Las excepciones son los SCC*mec* tipo VII y SCC*mec* tipo IX, cuyo esquema para ambos sería: (*orfX*)-J3-*ccr*-J2-*mec*-J1 (Turlej, 2011).

Complejo del gen *mec*. Se compone de la secuencia de inserción IS431, del gen *mecA* y de sus dos genes reguladores *mecR1* y *mecI*, que pueden estar intactos o acortados. La IS431 codifica una transposasa, responsable de la incorporación de determinantes de resistencia para antisépticos y para algunos antibióticos al cromosoma y a plásmidos. En el complejo *mec* puede haber otras IS asociadas. Se han descrito en *S. aureus*, hasta abril del 2015, cuatro clases del complejo *mec* (tabla 3 y figuras 9-12) (Katayama, 2001; IWG-SCC, 2009; <http://www.sccmec.org>).

Tabla 3. Complejos del gen *mec* descritos en estafilococos.

Complejo gen <i>mec</i>	Estructura	Comentario	Tipos de SCC <i>mec</i>
Clase A	IS431- <i>mecA</i> - <i>mecR1</i> - <i>mecI</i>		II, III, VIII
Clase B	IS431- <i>mecA</i> - Δ <i>mecR1</i> -IS1272		I, IV, VI
Clase C1	IS431- <i>mecA</i> - Δ <i>mecR1</i> -IS431	Las dos IS431 en la misma dirección	VII, X
Clase C2	IS431- <i>mecA</i> - Δ <i>mecR1</i> -IS431	Las dos IS431 en dirección opuesta	V, IX
Clase E	<i>blaZ</i> - <i>mecC</i> - <i>mecR1</i> - <i>mecI</i>		XI

(Fuente: <http://www.sccmec.org>).

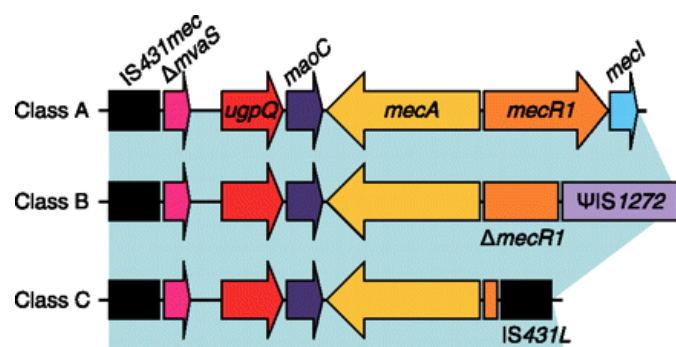


Figura 9. Estructura genética de las clases A-C del complejo del gen *mec* (Tsubakishita, 2010).

Complejo del gen *ccr*. Se compone de uno o dos genes *ccr* rodeados por ORFs (marcos de lectura abierta), algunos de función desconocida. El gen *ccr* codifica la recombinasa del casete cromosómico. Interviene en la escisión e integración del SCC*mec* en el cromosoma de *S. aureus*, por lo que es responsable de su movilidad.

Se han identificado en estafilococos tres genes *ccr* distintos, los genes *ccrA*, *ccrB* y *ccrC*. El gen *ccrA* se clasifica en 4 alotipos distintos (A1, A2, A3, A4) y el *ccrB* en 5 alotipos distintos (B1, B2, B3, B4, B6). En base a la combinación de un alotipo de *ccrA* y otro alotipo de *ccrB* se han designado para *S. aureus* seis tipos distintos del complejo *ccr*: tipo1, tipo 2, tipo 3, tipo 4, tipo 7 y tipo 8. Todas las variantes del *ccrC* se han asignado a un único alotipo, el tipo 5 (tabla 4) (<http://www.sccmec.org>).

Tabla 4. Complejos del gen *ccr* descritos en estafilococos.

Tipos de complejos del gen <i>ccr</i>	Genes <i>ccr</i>	Tipos de SCCmec
1	A1B1	I, IX
2	A2B2	II, IV
3	A3B3	III
4	A4B4	VI, VIII
5	C1	V, VII
7	A1B6	X
8	A1B3	XI

(Fuente: <http://www.sccmec.org>).

Regiones J. El resto del casete SCCmec se compone de las regiones J1, J2 y J3, localizadas entre y alrededor de los complejos *mec* y *ccr*. Pueden servir de anclaje para plásmidos y transposones que transportan otros genes de resistencia.

Tipos de SCCmec actualmente descritos

En *S. aureus*, se han detectado siete tipos del complejo *ccr* (1-5, 7, 8) y cinco clases del complejo *mec* (A, B, C1, C2, E). Diferentes combinaciones de ambos complejos generan los once tipos de SCCmec descritos (**tabla 5 y figuras 10-12**).

Tabla 5. Tipos actuales de SCCmec descritos.

Tipo SCCmec ^a	Complejo <i>ccr</i> (tipo)	Complejo <i>mec</i> (clase)	Año primer aislamiento
I	1 (A1B1)	B	1960
II	2 (A2B2)	A	1982
III	3 (A3 B3)	A	1985
IV	2 (A2B2)	B	1982
V	5 (C1)	C2	1999
VI	4 (A4B4)	B	1996
VII	5 (C1)	C1	2002
VIII	4 (A4B4)	A	2003
IX	1 (A1B1)	C2	2006
X	7 (A1B6)	C1	2006
XI	8 (A1B3)	E	2007

(Fuentes: Turlej, 2011; <http://www.sccmec.org>)

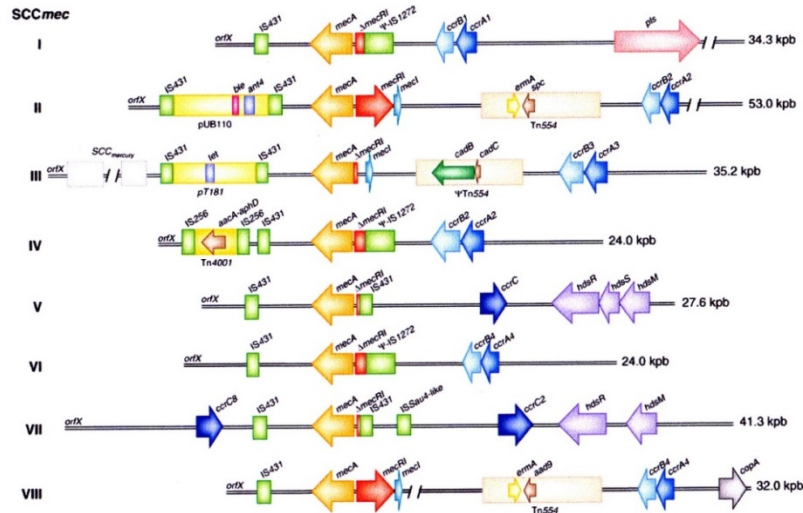


Figura 10. Estructura de SCCmec de los tipos I al VIII (Malachowa, 2010).

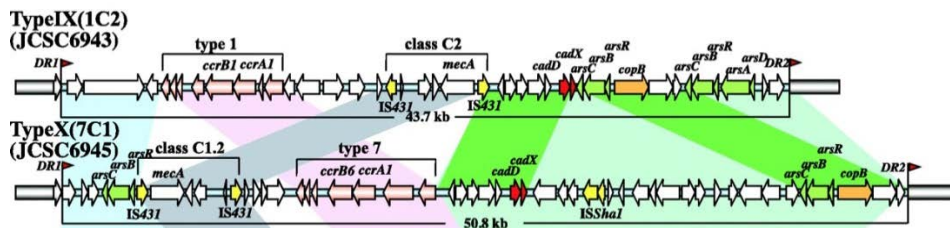


Figura 11. Estructura de SCCmec de los tipos IX y X (Li, 2011).

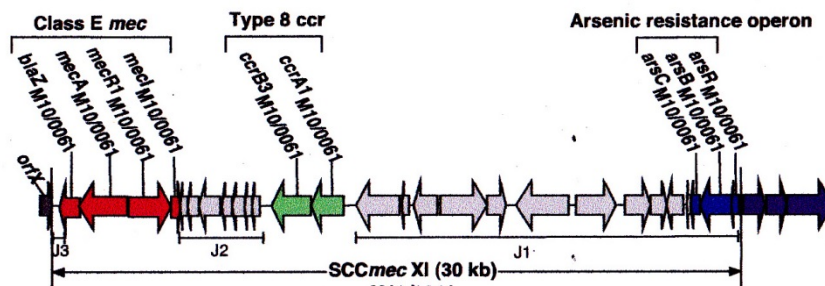


Figura 12. Estructura de SCCmec del tipo XI (Shore, 2011).

En 2009, con la necesidad de definir unas reglas de consenso para unificar la nomenclatura de los elementos SCCmec, se creó un organismo denominado *International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette*

Chromosome Elements (IWG-SCC). La nomenclatura actualizada de los diversos tipos de SCCmec figura en su página web (<http://www.sccmec.org>).

Algunos de los diferentes tipos de SCCmec han sido posteriormente clasificados en diversos subtipos, en base a polimorfismos o variaciones en la región J1. La nomenclatura en subtipos se emplea fundamentalmente para el SCCmec tipo IV, expresando los diferentes subtipos con letras minúsculas a la derecha del número romano que indica el tipo del casete (por ejemplo, IVa, IVc, IVh...) (Milheiriço, 2007a; IWG-SCC, 2009).

Origen del SCCmec

El origen del SCCmec continúa siendo desconocido, aunque probablemente se haya adquirido a partir de otras especies de estafilococos diferentes a *S. aureus*. Inicialmente se propuso que el gen *mecA* de *S. aureus* provenía de algún aislado de *Staphylococcus sciuri*, debido a que los genes *mecA* de ambas especies compartían un 79,5% de homología en su secuencia de ADN y un 87,8% en la de los aminoácidos (Wu, 1996). Sin embargo, *S. sciuri* no posee los dos genes reguladores *mecR1* ni *MecI*. Posteriormente, se detectaron los genes *mecA*, *mecR1* y *MecI*, aunque sin estar asociados a un SCCmec, en una especie filogenéticamente relacionada con *S. sciuri* denominada *Staphylococcus fleurettii*, que es comensal en animales (Tsubakishita, 2010).

Existen múltiples evidencias que apoyan la hipótesis de la transferencia de SCCmec desde estafilococos coagulasa negativos (ECN) a *S. aureus* (Plata, 2009). Así por ejemplo, se ha publicado en un neonato la transferencia *in vivo* del gen *mecA* desde un aislado de *S. epidermidis* resistente a la meticilina a un aislado de *S. aureus* sensible a la meticilina, formándose un aislado de SARM genéticamente indistinguible del sensible (Wiolders, 2001).

Asimismo, la IS1272, que es un componente del complejo *mec* de clase B, se encuentra intacta y en múltiples copias en el genoma de *Staphylococcus haemolyticus*, mientras que típicamente está truncada en *S. aureus* y *S. epidermidis*. Esto sugeriría que *S. haemolyticus* sería el principal huésped de la IS1272 y que, posteriormente, diversas cepas de *S. aureus* y *S. epidermidis* la habrían adquirido, por transferencia horizontal, a partir de *S. haemolyticus* (Kobayashi, 1999). Por último, el SCCmec tipo IV era común en los aislados de *S. epidermidis* durante la década de los 70, mientras que el primer aislado de SARM con SCCmec tipo IV data de 1982, lo que apoya la

hipótesis de que *S. epidermidis* pudiera ser un potencial reservorio del SCCmec (Wisplinghoff, 2003; Turlej, 2011).

Por otra parte, se han descrito en aislados de *S. aureus* y de ECN sensibles a la meticilina varios casetes “SCC no-mec”, provistos de una recombinasa funcional (Holden, 2004). Así, algún aislado de estafilococo sensible a la meticilina provisto de un casete SCC no-mec podría haber adquirido el complejo del gen *mec* de un aislado de *S. fleurettii*, tras haber estado sometido a una presión antibiótica. Asimismo, puesto que *S. fleurettii* es una especie saprófita en animales, la formación del SCCmec podría haber ocurrido inicialmente en animales y, a partir de ellos, pasar a los aislados de *S. aureus* humanos (Tsubakishita, 2010).

2.4.3 Resistencia a los glucopéptidos

Los glucopéptidos (vancomicina y teicoplanina) inhiben la síntesis del peptidoglucano de la pared celular bacteriana al unirse con D-alanil-D-alanina del precursor pentapéptido, alterando el crecimiento de la bacteria, aunque sin causar la muerte rápida, a diferencia de lo que ocurre con los β -lactámicos (Yao, 2011).

Se han descrito dos mecanismos de resistencia:

a) Resistencia intermedia a los glucopéptidos (GISA).

Desde 1996, se han detectado aislados clínicos de *S. aureus* que presentan una resistencia moderada a los glucopéptidos, con una concentración mínima inhibitoria (CMI) a la vancomicina comprendida entre 4 y 16 $\mu\text{g/mL}$ (Hiramatsu, 1997b), denominados con la abreviatura VISA (*vancomycin-intermediate S. aureus*), o preferentemente, GISA (*glycopeptide-intermediate S. aureus*). Estas cepas GISA no han adquirido genes externos de resistencia, sino que han ido acumulando una serie de mutaciones puntuales durante un proceso adaptativo gradual que han producido cambios en la biosíntesis del peptidoglucano (Pinho, 2008). Se han descrito múltiples genes implicados en este tipo de resistencia (Renzoni, 2011), como por ejemplo el gen *pbp2* (productor de la proteína fijadora de penicilina 2), el gen *pbp4* (productor de la proteína fijadora de penicilina 4), el gen regulador *vraSR* (*vancomycin-resistance associated sensor and response regulator*), el gen *tcaA* que codifica una proteína transmembrana, etc. La gran mayoría de las cepas GISA presentan un engrosamiento de la pared celular que podría ser consecuencia tanto de un incremento en la síntesis

del peptidoglucano como de un descenso del recambio de la pared celular (Pinho, 2008; Renzoni, 2011).

Por otra parte, se ha detectado la existencia de cepas de *S. aureus* que presentan una resistencia heterogénea a la vancomicina (presencia de células resistentes en una mayoría de población sensibles, pero que, al ser resistentes, podrían seleccionarse durante el tratamiento antibiótico) (Cercenado, 2010a). Además, algunos aislados de *S. aureus* pueden manifestar tolerancia a los glucopéptidos. La tolerancia implica que, en presencia de un determinado antibiótico bactericida (en este caso, los glucopéptidos), las células tolerantes dejarían de crecer y no se lizarían. El antibiótico pierde así su actividad bactericida, aunque conserva su actividad bacteriostática (Morosini, 2010). En España, alrededor del 6-10% de los aislados de SARM son tolerantes a la vancomicina y un 20% son tolerantes a la teicoplanina (Morosini, 2010; Picazo, 2011).

En los últimos años, se ha constatado la escasa actividad de los glucopéptidos para el tratamiento las infecciones producidas por SARM (Morosini, 2010; Cercenado, 2010a), incluso en aislados de SARM que son completamente sensibles a la vancomicina, según los criterios del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (CLSI, 2012) y del *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) (EUCAST, 2012) (punto de corte de sensibilidad: CMI ≤ 2 $\mu\text{g/mL}$, para ambos comités). Algunos trabajos publicados describen una mayor mortalidad en infecciones producidas por aislados de SARM con una CMI a la vancomicina de 2 $\mu\text{g/mL}$, frente a aislados de SARM que presentaban unos valores inferiores de CMI (Soriano, 2008; van Hal, 2012). Sin embargo, no existe una buena correlación entre los valores de CMI obtenidos por microdilución y por E-test®, en el sentido de que los valores obtenidos mediante este último suelen ser superiores que los de la microdilución convencional (Sader, 2009; Rojas, 2012). Actualmente no hay datos suficientes que permitan determinar qué valor de CMI medido por microdilución se asocia a una peor evolución clínica, ni tampoco que aconsejen la sustitución o complementación de la microdilución convencional de la vancomicina por el E-test® (Cercenado, 2010a; Rojas, 2012). Además, dentro de los SARM de un determinado hospital existe una elevada clonalidad, por lo que la mayor parte de cepas tienen la misma CMI, siendo difícil atribuir la mortalidad a la elevada CMI y no a otros factores comunes a un determinado clon.

b) Resistencia de alto nivel a los glucopéptidos (VRSA).

Se produce por la transferencia mediante conjugación del gen *vanA* desde una cepa de *Enterococcus faecalis* resistente a la vancomicina a otra de *S. aureus*. Estas cepas, denominadas VRSA (*vancomycin-resistant S. aureus*) desarrollan resistencia de alto nivel a la vancomicina (con CMI ≥ 128 $\mu\text{g/mL}$) y a la teicoplanina (Lowy, 2003). El gen *vanA* está codificado por el transposón Tn1546. Este transposón lleva un conjunto de genes que proporcionan una vía alternativa para la biosíntesis de los precursores del peptidoglucano, en concreto, sintetizan precursores D-Ala-D-Lac, en vez de D-Ala-D-Ala, con mucha menor afinidad hacia los glucopéptidos (Pinho, 2008; Malachowa, 2010). La primera cepa VRSA se detectó en 2002 en Michigan, EE.UU., en un paciente con diálisis (Chang, 2003). Desde 2002 hasta 2010, se han comunicado en EE.UU. un total de doce aislados de VRSA (CDC, 2010).

2.4.4 Resistencia a las oxazolidinonas

Síntesis protéica bacteriana

Las oxazolidinonas inhiben la síntesis de proteínas de la bacteria (Wilson, 2008). Para comprender mejor este mecanismo de acción, a continuación se explica el proceso de síntesis de proteínas bacteriana.

La síntesis protéica consiste en la traducción del ARN mensajero (ARNm) bacteriano a secuencias de aminoácidos específicas. Se compone de tres etapas esquematizadas en la **figura 13** (Forbes, 2007):

a) Iniciación de la traducción

- La subunidad 30S del ribosoma se une al codón de iniciación de metionina (AUG) del ARNm que se va a traducir.
- A continuación, se asocia el ARN de transferencia (ARNt) iniciador. Este ARNt contiene en uno de sus extremos el aminoácido formil-metionina (f-Met), mientras que, en una de sus asas lleva el triplete de nucleótidos (anticodón) UAC, que es complementario al codón de iniciación AUG del ARNm.
- A este grupo de moléculas se une la subunidad 50S del ribosoma, formándose el complejo de iniciación. Todos estos procesos están catalizados por factores de iniciación.

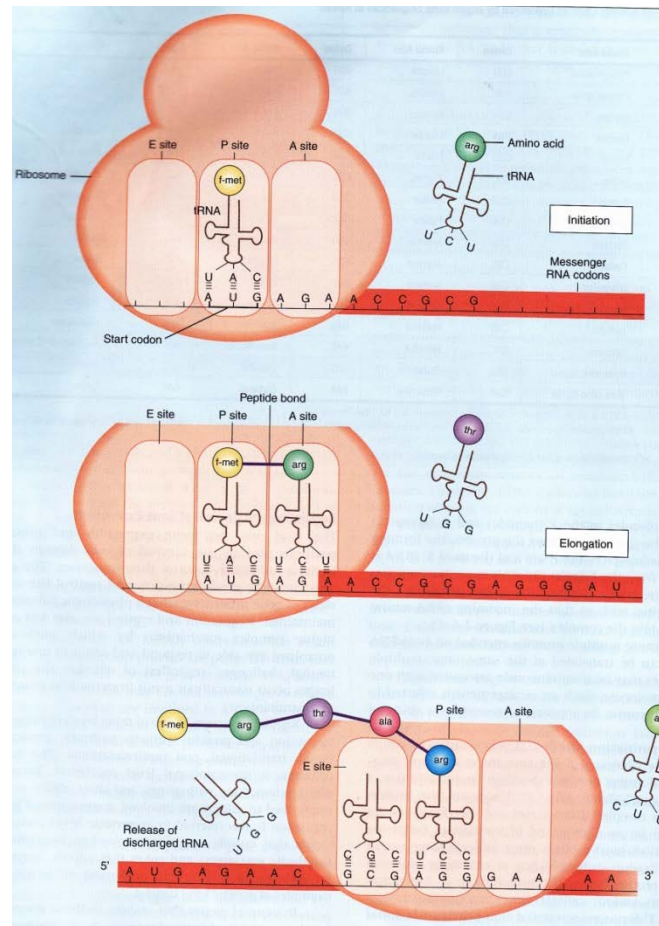


Figura 13. Esquema de la síntesis de proteínas (Forbes, 2007).

b) Elongación de la cadena polipeptídica

- El ARNt que transporta el primer aminoácido (f-Met-ARNt) se aparea con el codón de iniciación AUG del ARNm, en el **sitio P** (“peptidilo”) del ribosoma.
- El siguiente aminoacil-ARNt se acopla en el **sitio A** (“aminoacilo” ó “aceptor”) del ribosoma, apareándose con el segundo codón de ARNm. El factor de elongación Tu (EF-Tu), una pequeña GTPasa, facilita este acoplamiento.
- El carboxilo terminal (-COOH) del primer aminoácido (f-Met), situado en el sitio P, se une al amino terminal (-NH₂) del segundo aminoácido, situado en el sitio A, a través de un enlace peptídico. Esta reacción es conocida como transpeptidación y está catalizada por la enzima **peptidil transferasa**.
- El primer ARNt sin el aminoácido es liberado, saliendo del ribosoma a través del **sitio E** (*exit*, salida).

- El ribosoma se desplaza a lo largo del ARNm en sentido 5' > 3' avanzando tres nucleótidos, hasta que el segundo ARNt se encuentra en el sitio P. Este proceso está catalizado por el factor de elongación **G** (EF-G) gastando un GTP.
- Este movimiento deja vacío el sitio A, que contiene el codón de ARNm específico.
- El correspondiente aminoacil-ARNt se acerca al centro A. El proceso comienza de nuevo.

c) Terminación de la síntesis de la cadena polipeptídica

- Cuando el sitio A del ribosoma alcanza un codón de terminación, que no codifica ningún aminoácido, se libera el polipéptido.
- Se libera el último ARNt. El ribosoma se separa. Los ribosomas quedan disponibles para otro proceso de traducción ([Forbes, 2007](#); [Tortora, 2007](#)).

Mecanismo de acción de las oxazolidinonas

La linezolida es, hasta el momento, el único antibiótico de la familia de las oxazolidinonas aprobado para su uso clínico, si bien hay algunos otros compuestos de esta familia que se encuentran en ensayos clínicos de fase 3, como la radezolida y la tedizolida ([Shaw, 2011](#)).

Los estudios iniciales acerca del mecanismo de acción de la linezolida sugerían que la linezolida inhibía la formación del complejo de iniciación f-Met-ARNt-ribosoma-ARNm ([Swaney, 1998](#)). Sin embargo, estudios más recientes, utilizando sondas radiomarcadas que presentan fotoafinidad hacia la linezolida, han mostrado que las oxazolidinonas se unen al sitio A del centro peptidil transferasa de la subunidad 23S del ARN ribosómico (ARNr), que forma parte de la subunidad 50S del ribosoma. La linezolida ocuparía en el sitio A el lugar destinado al residuo aminoacilo del aminoacil-ARNt, con lo que no podría acomodarse al sitio A. El ARNt se disociaría entonces del ribosoma, interrumpiéndose la síntesis proteica ([Wilson, 2008](#), [Leach, 2011](#); [Shaw, 2011](#)).

Mecanismos de resistencia a las oxazolidinonas

Se han descrito tres mecanismos de resistencia a las oxazolidinonas:

a) Mutaciones en el gen ARNr 23S

Este es el mecanismo de resistencia a la linezolidina más frecuentemente detectado en estafilococos y también en enterococos. Se produce por mutaciones en el asa central del dominio V del gen ARNr 23S. Todas las mutaciones detectadas se sitúan alrededor del centro peptidil transferasa, de las cuales la más importante es la mutación G2576T (según la numeración empleada para *E. coli*) (Tsiodras, 2001; Zhu, 2007).

La mayor parte de las bacterias tienen múltiples copias (alelos) del operón de ARNr, incluyendo *S. aureus* (5-6 copias) y *S. epidermidis* (5-6 copias). Se ha demostrado que, a medida que aumenta el número de copias del gen ARNr 23S que presentan la mutación G2576T, se incrementa de forma gradual el valor de la CMI para la linezolidina. No obstante, la acumulación de la mutación G2576T en las diferentes copias del gen ARNr 23S causa una progresiva disminución en la *fitness* biológica de *S. aureus* (Besier, 2008).

Este tipo de resistencia se asocia a tratamientos prolongados y a dosis subterapéuticas de linezolidina (Yoshida, 2009; Hill, 2010; Endimiani, 2011). Asimismo, se ha observado que, a medida que aumenta la duración del tratamiento con linezolidina, se produce un aumento gradual del número de alelos mutados del gen ARNr 23S (Wilson, 2003). Una vez que una cepa contiene un alelo con la mutación G2576T, la reexposición a la linezolidina provoca una rápida selección de mutantes con múltiples alelos G2576T (Tsakris, 2007).

b) Alteraciones de proteínas ribosómicas

La resistencia a la linezolidina también puede producirse por mutaciones en genes que codifican las proteínas ribosómicas L3 y L4 de la subunidad 50S del ribosoma (Locke, 2009). En España, estas mutaciones se han detectado en aislados de *S. epidermidis* de un hospital de Zaragoza, asociados a la mutación G2576T (Lozano, 2013a) y en aislados de *S. aureus* (Locke, 2010) y *S. epidermidis* (Baos, 2013) de un hospital de Madrid asociados al gen *cfr* (ver más adelante).

La gran diversidad de mutaciones diferentes detectadas en L3, a diferencia de L4, está relacionada con la mayor proximidad de los residuos de aminoácidos de L3 hacia el centro peptidil transferasa del ribosoma (Shaw, 2011).

c) Adquisición del gen *cfr*

El tercer mecanismo de resistencia a la linezolid se debe a la presencia del gen *cfr*. Este gen se detectó por primera vez en 1997 en un aislado de *Staphylococcus sciuri* procedente de un ternero que sufría una infección respiratoria de una granja alemana tras haber recibido tratamiento con florfenicol (Schwarz, 2000). En los años sucesivos, el mismo grupo detectó este gen en cepas de *S. aureus*, *S. lentus* y *Staphylococcus simulans* aisladas de ganado vacuno y porcino en Alemania (Kehrenberg, 2006). Las primeras cepas clínicas de estafilococos con *cfr* fueron tres cepas de SARM aisladas en 2005 en Medellín, Colombia (Toh, 2007; Arias, 2008b), Indiana, EE.UU. (Locke, 2014) e Irlanda (Rossney, 2007; Shore, 2010a). Las dos primeras procedían de esputo y la última de un absceso en cuero cabelludo.

El gen *cfr* codifica la enzima Cfr metiltransferasa que cataliza la metilación de la adenosina A2503 (según numeración de *E. coli*) del ARNr 23S (Kehrenberg, 2005). La Cfr metiltransferasa pertenece a la superfamilia de enzimas con radical SAM, denominadas así porque requieren de **S**-adenosilmetionina (SAM) como cosustrato (Wang, 2007; Witte, 2011). Asimismo, el genoma de *S. aureus*, como el de otras especies bacterianas, codifica varias ARN metiltransferasas (MTasas), entre ellas la RlmN, que metila también la adenosina A2503 del ARNr 23S. Un estudio muestra que la Cfr metiltransferasa metila la adenosina en la posición C8 y menos en la posición C2, mientras que la RlmN metila solamente en la posición C2 (Grove, 2011) (figura 14). La enzima RlmN cumple funciones de *housekeeping*, en vez de resistencia. Un análisis filogenético de las metiltransferasas Cfr y RlmN sugiere que la enzima RlmN sería la forma ancestral, mientras que la enzima Cfr derivaría de ésta mediante duplicación y transferencia horizontal del gen (Kaminska, 2010).

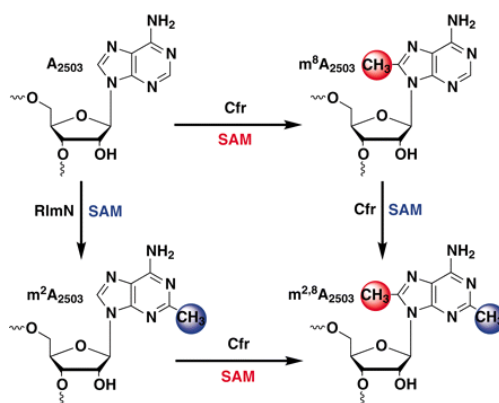


Figura 14. Reacciones catalizadas por RlmN y Cfr (Grove, 2011).

2.4.5 Resistencia a los macrólidos y lincosamidas

Mecanismo de acción de los macrólidos y lincosamidas

Los macrólidos, lincosamidas y estreptograminas **B** (MLS_B) son grupos de antibióticos estructuralmente diferentes, pero que comparten un mecanismo de acción similar. Todos ellos se unen al dominio V del ARNr 23S, que forma parte de la subunidad 50S del ribosoma bacteriano, interfiriendo en la transferencia del polipéptido. En consecuencia, impiden la elongación de la cadena peptídica y el complejo peptidil-ARNt se disocia del ribosoma (Sivapalasingam, 2012).

Mecanismos de resistencia a los macrólidos y lincosamidas

Existen tres mecanismos de resistencia descritos para estos fármacos.

a) Alteraciones de la diana

La metilación de la adenina en la posición 2058 (A2058, según numeración de *E. coli*) situada en la subunidad 23S del ARNr se asocia con la resistencia cruzada a los macrólidos, a las lincosamidas y a la estreptogramina de tipo B (fenotipo MLS_B). Este patrón de resistencia está mediado por los genes *erm* (*erythromycin ribosome methylation*), localizados en plásmidos y transposones. Esta metilación ocasiona una alteración estérica del ribosoma que reduce la afinidad de estos tres grupos antibióticos. En estafilococos se han descrito los genes *erm*(A), *erm*(B), *erm*(C) y *erm*(T) (Lozano, 2011b; Sivapalasingam, 2012; Lozano, 2013b).

Este tipo de resistencia puede ser constitutiva (MLS_B constitutivo), con alto nivel de resistencia a estos tres grupos antibióticos, o bien inducible (MLS_B inducible). Las cepas estafilocócicas con resistencia MLS_B inducible son resistentes a los macrólidos de 14 átomos (eritromicina y claritromicina) y 15 átomos (azitromicina), pero manteniendo la sensibilidad *in vitro* a los macrólidos de 16 átomos (josamicina), a las lincosamidas (clindamicina) y a las estreptograminas de tipo B. Sin embargo, el tratamiento con estos fármacos puede seleccionar *in vivo* mutantes con resistencia constitutiva. El CLSI (CLSI, 2012) y el EUCAST (EUCAST, 2012) recomiendan, para la detección de la resistencia inducible a la clindamicina en aislados de *Staphylococcus*, realizar el método de difusión con doble disco (*D-test*), explicado más adelante, en Metodología.

b) Bombas de expulsión activa de macrólidos

Se han descrito algunas bombas de expulsión activa a macrólidos de 14-15 átomos y a la estreptogramina de tipo **B** (fenotipo MS_B). El gen más frecuente productor de este tipo de resistencia es el gen *msr(A)*, localizado en un plásmido, descrito inicialmente en *S. epidermidis* (Ross, 1990; Sivapalasingam, 2012).

c) Modificación enzimática del fármaco

Algunos aislados de *S. aureus* (<1%) producen la enzima lincosamida nucleotidil transferasa, codificada por el gen *Inu(A)*. Esta enzima inactiva a la lincomicina, manteniendo la actividad de la clindamicina, si bien produce un aumento de la CMI de la clindamicina en 1-2 diluciones.

Además, se ha detectado en algunas cepas de *S. aureus* el gen *mph(C)* (*macrolide phosphotransferase C*) (Lozano, 2012a). Este gen, transportado en plásmidos, codifica una fosfotransferasa que confiere resistencia de bajo nivel a los macrólidos de 14, 15 y 16 átomos.

2.4.6 Resistencia a las quinolonas

Las quinolonas se unen a dos enzimas de la bacteria encargadas de la replicación del ADN bacteriano, la ADN-girasa y la topoisomerasa IV, inhibiendo la síntesis del ADN. En los estafilococos, las quinolonas inhiben principalmente a la topoisomerasa IV (Ng, 1996).

Existen dos mecanismos principales de resistencia para las quinolonas.

a) Alteraciones de la diana

Se debe a mutaciones cromosómicas en los genes responsables de la síntesis de la ADN-girasa (principalmente el gen *gyrA*) y de la topoisomerasa IV (principalmente el gen *parC*, denominado *griA* en estafilococos). Las mutaciones de los genes *griA* o *gyrA* producen cambios en los aminoácidos de la topoisomerasa IV o de la ADN-girasa, que provocan una disminución de la afinidad de las quinolonas hacia estas enzimas. Una única mutación en *griA* produce un aumento de la CMI a las quinolonas reduciendo la actividad bactericida para esta familia, mientras que dos mutaciones en *griA* y *gyrA* inactivan por completo estos fármacos (Lowy, 2003).

b) Bombas de expulsión activa de quinolonas

En *S. aureus*, están codificadas por el gen *norA*. La expresión aumentada de esta bomba ocasiona una resistencia de bajo nivel a las quinolonas.

2.4.7 Resistencia a los aminoglucósidos

Mecanismo de acción de los aminoglucósidos

Los aminoglucósidos son agentes bactericidas que se unen irreversiblemente a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano, inhibiendo la síntesis de proteínas. Los ribosomas bacterianos que están unidos a los aminoglucósidos se muestran incapaces de realizar la traducción del ARNm a proteínas, lo que provoca la muerte celular. Esta familia antimicrobiana también puede causar errores en la lectura del código genético, resultando en la producción de proteínas sin sentido (Schmitz, 1999; Yao, 2011).

Mecanismos de resistencia a los aminoglucósidos

Se han descrito tres mecanismos de resistencia a esta familia antimicrobiana.

a) Modificación enzimática del fármaco

Es el mecanismo más importante. Se debe a la producción de enzimas modificantes de aminoglucósidos. Se dividen en tres grupos principales: las aminoglucósido acetiltransferasas (AAC), las aminoglucósido adeniltransferasas (ANT, anteriormente abreviadas como AAD) y las aminoglucósido fosfotransferasas (*phosphotransferases*, APH). Los aminoglucósidos, modificados con grupos amino (por las enzimas AAC) o con grupos hidroxilo (por las enzimas ANT y APH), se unen muy débilmente a los ribosomas, por lo que se muestran incapaces de inhibir la síntesis proteica (Schmitz, 1999).

En *S. aureus* se han descrito tres enzimas modificantes de aminoglucósidos. La primera de ellas es la enzima bifuncional APH(2'')-Ia/AAC(6')-Ie, que ocasiona resistencia a la gentamicina, tobramicina, netilmicina, amikacina y kanamicina. Está codificada por un gen transportado en el transposón Tn4001, que a su vez se encuentra en diversos plásmidos y en el cromosoma (Schmitz, 1999).

La segunda enzima modificante de aminoglucósidos de *S. aureus* es la ANT(4')-Ia, también denominada AAD(4')(4'') (Lyon, 1987). Produce resistencia a la tobramicina, amikacina, kanamicina, neomicina y paromomicina. Su gen *ant(4')-Ia* (también denominado *aadD*) se localiza habitualmente en pequeños plásmidos multicopia, como el pUB110, que a su vez se integran en plásmidos conjugativos más grandes, como el pSK41. La integración del plásmido pUB110 en pSK41 está mediada por la IS257 (Byrne, 1991).

Por último, la tercera enzima modificante de aminoglucósidos de *S. aureus* es la APH(3')-IIIa, que media la resistencia a la kanamicina y neomicina, mientras que, suele presentar sensibilidad intermedia a la amikacina (Schmitz, 1999). El gen *aph(3')-IIIa* es transportado en el transposón Tn5405, que puede estar localizado en plásmidos o en el cromosoma.

b) Alteración de la diana (modificaciones del ribosoma)

Se han descrito mutaciones en los genes codificantes de proteínas ribosómicas que ocasionan alteraciones en la estructura del ribosoma que no permiten la unión de los aminoglucósidos al ribosoma. Este mecanismo únicamente confiere resistencia a la espectinomomicina y a la estreptomomicina (Lyon, 1987; Rice, 2011).

c) Disminución de la entrada (impermeabilidad)

Algunas variantes de colonia pequeña de estafilococos no permiten la entrada de aminoglucósidos a través de la membrana celular, lo que confiere una resistencia de bajo nivel a todos los aminoglucósidos (Rice, 2011).

2.4.8 Resistencia a las tetraciclinas

Mecanismo de acción de las tetraciclinas

Las tetraciclinas son antibióticos bacteriostáticos. Entran en la bacteria mediante un proceso dependiente de energía. Se unen a la subunidad 30S del ribosoma, bloqueando el acceso del aminoacil-ARNt al sitio A del ribosoma. Por tanto, las tetraciclinas inhiben la síntesis de proteínas (Lyon, 1987; Rice, 2011).

Mecanismos de resistencia a las tetraciclinas

Existen dos mecanismos de resistencia de las tetraciclinas:

a) Bombas de expulsión activa

En *S. aureus*, se han descrito los genes *tet(K)* y *tet(L)* que codifican proteínas de expulsión que confieren resistencia a la tetraciclina y a la clortetraciclina, pero no a la minociclina. Se encuentran generalmente en pequeños plásmidos transmisibles, en ocasiones integrados en el cromosoma o en plásmidos más grandes (Schmitz, 2001). Los plásmidos pequeños que contienen los genes *tet(K)* o *tet(L)*, cuando están integrados en otros plásmidos mayores o en el cromosoma, suelen estar flanqueados por elementos IS257 (Kadlec, 2009a).

b) Producción de proteínas de protección ribosómica

Son proteínas citoplasmáticas que presentan homología con los factores de elongación. Se unen al ribosoma, cambiando la conformación del sitio A, por lo que se inhibe la unión de las tetraciclinas al ribosoma (Rice, 2011). Confieren resistencia adicional a la doxiciclina y minociclina. En *S. aureus*, estas proteínas están producidas por los genes *tet(M)* y *tet(O)*, este último muy infrecuente, localizados en un transposón, o bien, en el cromosoma (Schmitz, 2001).

2.4.9 Resistencia a las sulfamidas y a la trimetoprima

La biosíntesis de varios aminoácidos y purinas depende de la disponibilidad del tetrahidrofolato (THF). Sin embargo la gran mayoría de bacterias, incluidos los estafilococos, son incapaces de absorber el THF preformado, por lo que tienen que sintetizarlo. Las sulfamidas y la trimetoprima inhiben la síntesis del THF a diferentes niveles. En concreto, las sulfamidas (como el sulfametoxazol), análogas del ácido *p*-aminobenzóico (PABA), inhiben competitivamente la enzima dihidropteroato sintasa (DHPS), que convierte el PABA en dihidrofolato. La trimetoprima, análogo del dihidrofolato, inhibe competitivamente la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR), que convierte el dihidrofolato en THF (figura 16) (Lyon, 1987; Proctor, 2008; Rice, 2011; Yao, 2011).

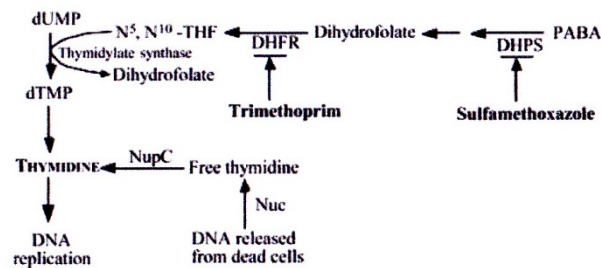


Figura 16. Esquema de la biosíntesis de la timidina y de los antagonistas del folato (Proctor, 2008).

La resistencia a las sulfamidas se debe a una hiperproducción de PABA o bien, a mutaciones en el gen *dhps*, que codifica la DHPS. Respecto a la trimetoprima, se han descrito dos mecanismos de resistencia:

a) Alteraciones de la DHFR cromosómica

Se debe a mutaciones puntuales en el gen cromosómico *dfrA*, que codifica la enzima DHFR. Confieren resistencia de bajo o moderado nivel a la trimetoprima. Es el mecanismo de resistencia a este antimicrobiano más frecuente en aislados clínicos de *S. aureus* (Dale, 1997).

b) Expresión de DHFR adquirida horizontalmente

Se debe a la adquisición horizontal de determinantes de resistencia, típicamente transportados en plásmidos, que codifican variantes de la DHFR resistentes a la trimetoprima. Confieren habitualmente un alto nivel de resistencia a la misma. En estafilococos se han descrito un total de cuatro proteínas codificantes de una DHFR alterada implicadas en la resistencia a la trimetoprima: DfrS1, DfrD, DfrG y DfrK (Kadlec, 2009a). La relación filogenética entre ellas se muestra en la figura 17.

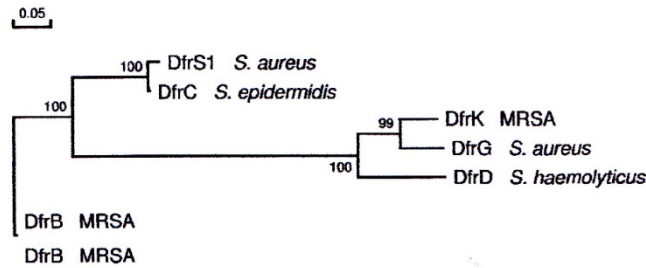


Figura 17. Árbol filogenético de las proteínas Dfr (Kadlec, 2009a).

2.4.10 Resistencia a otros antimicrobianos

La **rifampicina** es un antibiótico bactericida. Forma un complejo estable con la ARN-polimerasa bacteriana dependiente del ADN, impidiendo el inicio de la transcripción del ADN (Yao, 2011). La resistencia a la rifampicina se debe a mutaciones puntuales en el gen *rpoB* del cromosoma, codificante de la subunidad β de la ARN polimerasa. Este gen alterado produce una ARN polimerasa con una afinidad reducida hacia la rifampicina (Rice, 2011). La administración de rifampicina en monoterapia produce frecuentemente mutaciones en este gen, por lo que se desarrolla rápidamente resistencia *in vivo* a este antibiótico (Mandell, 1980).

La **mupirocina** es un antibiótico tópico derivado de los productos de la fermentación de *Pseudomonas fluorescens*. Inhibe la isoleucil-ARNt sintetasa, que es la enzima responsable de la adición de isoleucina al ARNt, ocasionando el cese de la síntesis proteica bacteriana. La resistencia de bajo nivel a la mupirocina se debe a mutaciones en el gen cromosómico *ileS*, produciendo una isoleucil-ARNt sintetasa alterada. Por el contrario, la resistencia de alto nivel a la mupirocina está mediada por la adquisición horizontal del gen *mupA*, transportado en plásmidos. Este gen codifica una isoleucil-ARNt sintetasa completamente diferente a la bacteriana y similar a las de las células eucariotas (Yao, 2011).

El **ácido fusídico** es un antibiótico de espectro estrecho derivado de *Fusidium coccineum*. Inhibe la síntesis de proteínas en la subunidad 50S del ribosoma bacteriano, al unirse al complejo formado por el factor de elongación **G** (EF-G) y el ribosoma. Se han descrito dos mecanismos de resistencia al ácido fusídico en *S. aureus*. El primero de ellos se debe a mutaciones cromosómicas en los genes *fusA* (codificante del factor de elongación G) o *rpIF* (codificante de la proteína ribosómica L6), que ocasionan alteraciones en el lugar de la diana del fármaco. El segundo

mecanismo se debe a la adquisición de los genes *fusB* y *fusC*, codificados en un plásmido o transposón, que producen una disminución de la permeabilidad de la membrana hacia el ácido fusídico (Lyon, 1987; Chen, 2010).

2.5 Aspectos epidemiológicos de *S. aureus* resistente a la meticilina

2.5.1 Reseña histórica general de la resistencia a la penicilina

Hasta antes de la era antibiótica, la mortalidad de la enfermedad invasora por *S. aureus* alcanzaba el 90%, llegando incluso al 98% en las bacteriemias de pacientes mayores de 50 años (Skinner, 1941). La introducción de la penicilina a principios de la década de 1940 mejoró espectacularmente el pronóstico de las infecciones por esta bacteria. Sin embargo, ya en 1940, antes de la utilización masiva de la penicilina, se publicó por primera vez la posibilidad de que extractos bacterianos pudieran “destruir” la penicilina (Abraham, 1940). En 1942, se detectaron las primeras cepas de *S. aureus* resistentes a la penicilina (Rammelkamp, 1942). Dos años más tarde, Kirby demostró que la penicilina se inactivaba con un extracto de cepas de *S. aureus* resistentes a la penicilina (Kirby, 1944) y en 1945 se describió la penicilinasa (posteriormente denominada β -lactamasa) (Bondi, 1946). Unos veinte años después, se publicó que la β -lactamasa formaba parte de un plásmido (Novick, 1963) y que podía transmitirse entre diferentes cepas.

Aunque al principio la resistencia a la penicilina era esporádica y limitada a hospitales, en 1948 alcanzó al 50% de los aislados de *S. aureus* detectados en hospitales (Barber, 1948). En la década de 1950, si bien la gran mayoría de las cepas de *S. aureus* hospitalarias eran resistentes a la penicilina, todavía las cepas comunitarias eran consideradas mayoritariamente sensibles. Sin embargo, desde mediados de la década de 1960, entre el 70% y el 90% de los aislados de *S. aureus* ya fueron resistentes a la penicilina, independientemente de su origen (Jessen 1969; Chambers, 2001) (figura 18). En los últimos años, tanto en España, como en la gran mayoría de países de nuestro medio, alrededor del 90% de los aislados de *S. aureus* se han hecho resistentes a este antibiótico (Cuevas, 2008; Jones, 2009b).

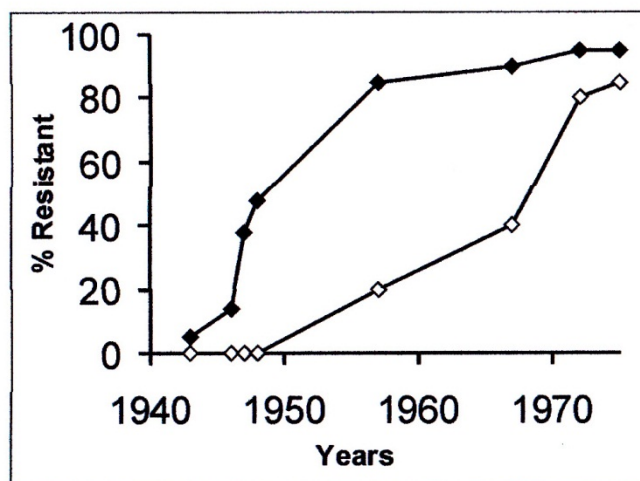


Figura 18. Tendencias en la frecuencia de cepas de SARM productoras de β -lactamasa, en hospitales (rombos negros) y en la comunidad (rombos blancos) (Chambers, 2001).

2.5.2 Reseña histórica general de la resistencia a la meticilina

Para tratar las infecciones por las cepas de *S. aureus* resistentes a la penicilina, se desarrollaron una serie de derivados semi-sintéticos de la penicilina estables frente a la β -lactamasa estafilocócica. El primero en aparecer fue la meticilina, en 1959, seguida de la oxacilina y la cloxacilina. Pero en julio de 1960, pocos meses después de la introducción de la meticilina en la práctica clínica, se detectó en Guilford, en el sur de Inglaterra, la primera cepa de *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM), curiosamente en un paciente que no había recibido tratamiento con este compuesto (Jevons, 1961; Barber, 1961; Parker, 1964). Un año después, en 1961, se describió por primera vez también en Inglaterra el primer brote hospitalario producido por SARM, afectando a 37 pacientes pediátricos en Carshalton, cerca de Londres (Stewart, 1963).

Durante la década de 1960, las cepas de SARM se aislaron esporádicamente en otros países europeos como EE.UU. (Bulger, 1967) y Australia (Rountree, 1968). En 1967 se detectó el primer brote de SARM en los Estados Unidos, en el que se afectaron 18 pacientes que estaban ingresados en un hospital de Boston (Barrett, 1968). La mayoría de estos brotes estaban limitados a hospitales y estaban causados por el fagotipo 83A de *S. aureus*, conocido como clon Arcaico. Este clon fue posteriormente tipificado, mediante MLST (Enright, 2000), como ST250-MRSA-I.

En el Reino Unido, la prevalencia de SARM fue aumentando progresivamente desde 1961, alcanzando en 1971 un pico del 5% de entre todos los aislados de *S. aureus*. Hubo un posterior descenso por el aumento de la administración de aminoglucósidos. Pero esta situación cambió a partir de 1981, cuando se detectó en Gran Bretaña la primera cepa de SARM epidémica (llamada EMRSA-1), que causó brotes en varios hospitales de ciudades distintas (Marples, 1992).

Las cepas de SARM se han convertido gradualmente en la mayoría de países en uno de los principales patógenos responsables de infecciones nosocomiales, especialmente en unidades quirúrgicas o de cuidados intensivos (Deurenberg, 2008; Enright, 2008). En general, las tasas más alta de SARM (>50% de *S. aureus*) ocurren en hospitales de América (tanto del norte como del sur) y Asia. Tasas intermedias (25-50%) se han comunicado en China, Australia, África y algunos países europeos. La prevalencia más baja de SARM se produce en Holanda y los países escandinavos (Stefani, 2012) (figura 19).

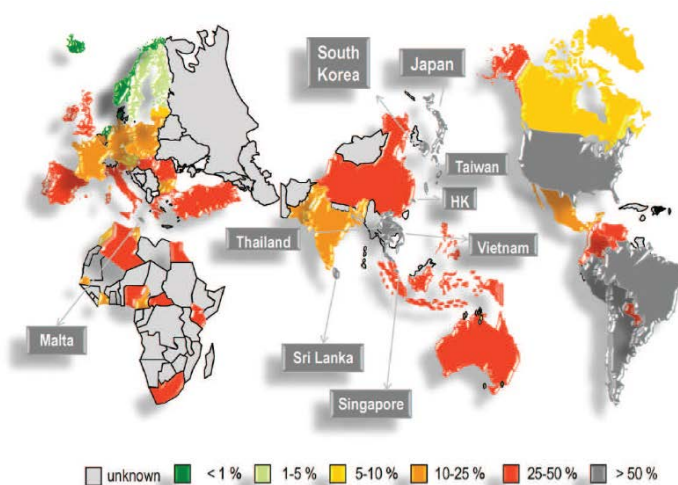


Figura 19. Prevalencia mundial de SARM hospitalario (Stefani, 2012).

Según los datos para el año 2011 de los programas ZAAPS (*Zyvox® Annual Appraisal of Potency and Spectrum program*), en el que participaron 33 países de diferentes partes del mundo (Flamm, 2013a), y LEADER (*Linezolid Experience and Accurate Determination of Resistance*, sólo para EE.UU.) (Flamm, 2013b), el porcentaje de resistencia a la meticilina en *S. aureus*, en relación al total de aislados detectados, fue del 30,2% en Europa (oscilando entre el 0,9% de Suecia y el 60,2% de

Portugal), del 49,8% en EE.UU., 34% en Canadá, 42,9% en América Latina y del 37,7% para la región de Asia Pacífico.

En Europa se observa un gradiente creciente de norte a sur en la resistencia a la metilina. Así, las cepas de SARM son menos frecuentes en los países del norte de Europa y mucho más en el sur. En el informe anual de la *European Antimicrobial Resistance Surveillance Network* (EARS-Net) del año 2013 (**figura 20**), el porcentaje de resistencia a la metilina en España en aislados de *S. aureus* detectados en hemocultivos fue del 22,6% (entre un total de 1.777 aislados de *S. aureus*). Esta tasa de resistencia española es menor que la detectada en Portugal (46,8%), Grecia (40,3%) e Italia (35,8%), similar a la de Francia (17,1%); pero mayor que la de países nórdicos como Noruega (0,7%), Suecia (1,0%) y Dinamarca (1,7%), y también mayor que en el Reino Unido (13,8%) y Alemania (12,7%) (*European Centre for Disease Prevention and Control* [ECDC, 2013]).

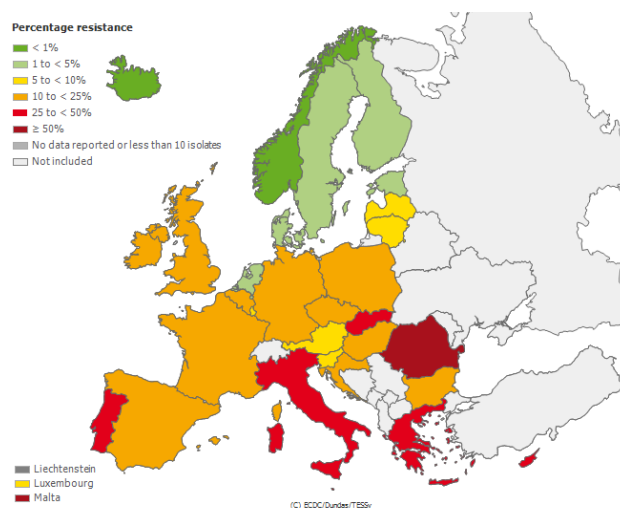


Figura 20. Proporción de aislados de SARM en los países participantes del estudio EARS-Net para el año 2013 (ECDC).

2.5.3 Epidemiología de SARM en España

En España, el primer brote por SARM se describió entre 1977 y 1979 en un hospital de San Sebastián, afectando especialmente a la Unidad de Neonatología (Pérez-Trallero, 1981; Pérez-Trallero, 1988). En 1986, en un estudio multicéntrico en que participaron 72 hospitales españoles la prevalencia de SARM, respecto a las cepas de *S. aureus* aisladas en un día concreto, fue baja, del 1,5% (Bouza, 1988).

Pero, a partir de finales de 1988 aparecieron varias epidemias hospitalarias por SARM en Madrid ([Parras, 1991](#)), Barcelona ([Domínguez, 1994](#)) y Valencia.

La mayoría de los aislados de SARM de estos brotes pertenecían al mismo clon, el denominado clon Ibérico ([Aparicio, 1992](#); [Domínguez, 1994](#)), posteriormente tipificado mediante MLST ([Enright, 2000](#)) como ST247-MRSA-I. Dicho clon se diseminó a otros países como Portugal ([Sanches, 1995](#)), Bélgica, Escocia, Italia, Alemania, y a un hospital de Nueva York ([da Silva Coimbra, 2003](#)). Las cepas del clon Ibérico se caracterizaron por presentar resistencia a múltiples grupos de antibióticos: macrólidos, tetraciclinas, aminoglucósidos, quinolonas y rifampicina, y por ser sensibles solamente (de entre los antimicrobianos comercializados entonces) a los glucopéptidos y al cotrimoxazol. Hasta 1995 el clon Ibérico ha sido el clon de SARM predominante en España pero, a partir de ese año, ha ido disminuyendo su predominio, siendo sustituido progresivamente por otros clones de SARM sensibles a más antibióticos ([Vindel, 2006](#); [Cuevas, 2007](#); [Rodríguez-Baño, 2009](#); [Gasch, 2011](#)).

La resistencia a la meticilina en *S. aureus* en nuestro país está en torno al 25%, como muestran tres estudios multicéntricos. En el primero de ellos, la incidencia de SARM, en relación a los aislados de *S. aureus* detectados en un día concreto, aumentó desde un 1,5% en 1986 (74 hospitales españoles participantes), un 17,9% en 1996 (107 hospitales participantes) ([Cercenado, 1997](#)), alcanzando un 31,2% en 2002 (143 hospitales participantes) ([Cuevas, 2004](#)). En 2006, este porcentaje se estabilizó al 29,2% (145 hospitales) ([Cuevas, 2008](#)).

El segundo trabajo se trata del Estudio VIRA (**Vigilancia de Resistencias a los Antimicrobianos**), en el que el porcentaje de resistencia a la meticilina aumentó significativamente del 24,8% en 2001 al 31,2% en 2004 ([Picazo, 2004](#)), estabilizándose en un 29,0% durante 2006 (40 hospitales participantes) ([Picazo, 2006](#)).

Por último, como ya se ha comentado anteriormente, los datos proporcionados en el informe anual de 2013 de la EARS-Net muestran que, para España, un 22,6% de los aislados de *S. aureus* causantes de bacteriemias y meningitis eran SARM ([ECDC, 2013](#)).

2.5.4 Evolución de los clones epidémicos de SARM hospitalarios

Se considera que un clon de SARM es epidémico cuando es capaz de producir brotes hospitalarios en un tiempo corto, en hospitales geográficamente distantes. Estudios epidemiológicos, usando diferentes técnicas de tipado, han mostrado que la mayoría de las infecciones por SARM adquiridas en el hospital están producidas por un número relativamente pequeño de clones de SARM diseminados por todo el mundo. Son los llamados clones pandémicos de SARM. Los principales clones pandémicos hospitalarios de los últimos años son: Ibérico ó EMRSA-5 (ST247-MRSA-I), Nueva York/Japón (ST5-MRSA-II), EMRSA-3 (ST5-MRSA-I), Brasileño/Húngaro (ST239-MRSA-III), Pediátrico (ST5-MRSA-IV), Alemán del sur (ST228-I), EMRSA-2/6 (ST8-MRSA-IV), EMRSA-15 (ST22-MRSA-IV), EMRSA-16 (ST36-MRSA-II) y Berlín (ST45-MRSA-IV) (Enright, 2002; Stefani, 2012) (tabla 6).

Tabla 6. Clones de SARM más comunes.

CC	ST	Clones epidémicos	Distribución mundial
CC5	ST5-MRSA-II	Nueva York/Japón	EE.UU., Japón, Canadá, Corea, Australia, Europa
	ST5-MRSA-IV	Pediátrico	EE.UU., Sudamérica, Europa
	ST5-MRSA-I	EMRSA-3	Europa, Sudamérica
	ST228-MRSA-I	Alemán del sur	Europa
CC8	ST8-MRSA-IV	EMRSA-2/6	Canadá, EE.UU., Europa, Australia
	ST247-MRSA-I	Ibérico, EMRSA-5	Europa, EE.UU.
	ST239-MRSA-III	Brasileño, Húngaro	Asia, Australia, Sudáfrica, Sudamérica, Europa
CC22	ST22-MRSA-IV	EMRSA-15	Europa, Australia, Canadá
CC30	ST36-MRSA-II	EMRSA-16	Europa, EE.UU., Australia, Canadá
CC45	ST45-MRSA-IV	Berlín	EE.UU., Europa

(Fuentes: Enright, 2002; Stefani, 2012).

Todas las primeras cepas de SARM que emergieron en el Reino Unido en 1960 (Jevons, 1961; Barber, 1961; Stewart, 1963) pertenecían al clon Arcaico (ST250-MRSA-I). Se han propuesto dos teorías opuestas para describir la relación entre los primeros aislados de SARM del clon Arcaico y los clones de SARM actuales. La teoría del clon único sugiere que todos los clones de SARM tienen un ancestro de SARM común que ha adquirido una única vez el SCCmec (Kreiwirth, 1993), mientras que la teoría multiclona sugiere que el SCCmec se ha introducido varias veces en diferentes

líneas genéticas de *S. aureus* inicialmente sensibles (Musser, 1992). Existen varios estudios que apoyan la teoría multiclonal, que se explican a continuación.

En un estudio realizado en 912 aislados de *S. aureus*, recogidos entre 1961 y 1999 en 20 países, se encontraron cinco líneas genéticas principales de SARM o complejos clonales (CC) que fueron: CC5, CC8, CC22, CC30 y C45. Este trabajo mostró que el primer SARM (el clon Arcaico, o ST250-I, detectado a partir de 1960) provenía de la cepa de *S. aureus* sensible a la meticilina ST8-MSSA, que está ampliamente distribuida a nivel mundial. Estos dos clones (ST250 y ST8) difieren únicamente en una mutación puntual en uno de los siete alelos *housekeeping* secuenciados para el MLST. Igualmente, el clon Ibérico (ST247-MRSA-I) se diferencia del clon Arcaico en otra mutación puntual en otro de los siete alelos del MLST (Enright, 2002). Así el origen propuesto de las primeras cepas de SARM sería (figura 21):

ST8-MSSA → ST250-MSSA → ST250-MRSA-I (Arcaico) → ST247-MRSA-I (Ibérico).

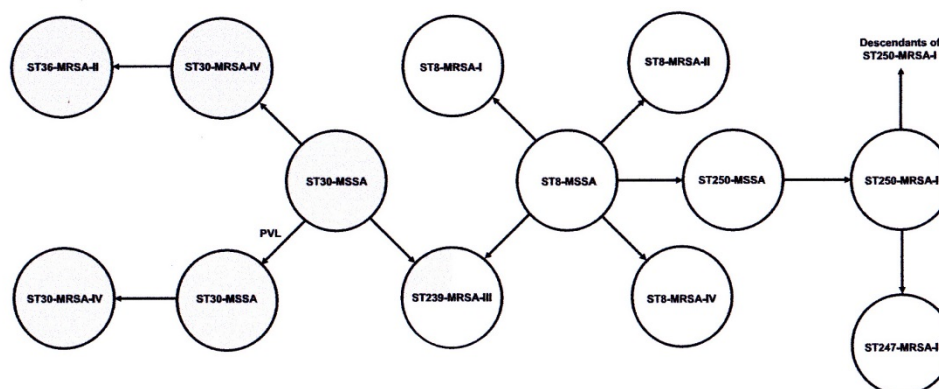


Figura 21. Origen evolutivo de dos de los principales complejos clonales de SARM: CC8 (color blanco) y CC30 (color gris). Las flechas indican: adquisición de un *SCCmec*, ó cambio de *SCCmec*, ó cambio de ST, ó adquisición de los genes codificantes de LPV (Deurenberg, 2008).

Robinson y Enright estimaron en 2002 que los aislados de SARM habrían emergido en, al menos, 20 ocasiones, tras haber adquirido un casete *SCCmec*. Según estos autores, la adquisición de un *SCCmec* por un clon de *S. aureus* sensible sería cuatro veces más frecuente que el reemplazo de un tipo de *SCCmec* por otro. Además, encontraron que el *SCCmec* tipo IV se transmitía más fácilmente que los

otros tipos de SCCmec, probablemente debido al menor tamaño del primero, y también, por tener un bajo costo en la *fitness* (Robinson, 2003).

Hay líneas genéticas de *S. aureus* que tendrían una mayor facilidad de adquirir el SCCmec que otras. Así, Katayama mostró que plásmidos que expresaban el gen *mecA* eran más fáciles de transformarse mediante electroporación en cepas de SARM de los complejos clonales CC1, CC5, CC8, CC22, CC30 y CC45 que en otras líneas genéticas de *S. aureus* (Katayama, 2005). No obstante, la introducción del SCCmec en clones de *S. aureus* sensibles es infrecuente comparada con la diseminación geográfica de los clones de SARM (Aires de Sousa, 2005).

Más recientemente, se han comparado las diversas secuencias completas de aislados de *S. aureus*, confirmándose que las poblaciones de este microorganismo son clonales, con diez líneas dominantes que colonizan e infectan a humanos, además de otras líneas encontradas en animales. Estas diez líneas dominantes en humanos son: CC1, CC5, CC8, CC12, CC15, CC22, CC25, CC30, CC45 y CC51 (Lindsay, 2006; Lindsay, 2014).

2.5.5 Clones de SARM en España

Un estudio multicéntrico español, realizado en 143 hospitales que remitieron al Centro Nacional de Microbiología (CNM) de Majadahonda (Madrid) las cepas de SARM aisladas en un día concreto de 2002, mostró que los dos clones más frecuentes en nuestro país eran los denominados E7 (26,1% de los aislados de SARM) y E8 (17,2%), en base a su nomenclatura de los patrones de bandas obtenidos mediante electroforesis en campo pulsado (ECP). Posteriormente se observó, mediante MLST, que estos dos clones tenían la misma secuencia tipo, la ST125-MRSA-IV (Cuevas, 2007).

En otro estudio multicéntrico en el que participaron 64 hospitales españoles que remitieron al Hospital de Bellvitge las cepas de SARM aisladas durante junio de 2003, los dos clones más frecuentes, presentes en 45 hospitales, fueron (según la nomenclatura de ECP en dicho hospital) el clon Q (37%) y el clon P (34%). Respecto al tipado mediante MLST, mayoría de los aislados de ambos clones formaban parte de los clones ST125-MRSA-IV y ST146-MRSA-IV (Rodríguez-Baño, 2009). Estos dos secuenciotipos se consideran variantes del clon Pediátrico (ST5-MRSA-IV), ya que sólo difieren de éste en uno de los siete alelos *housekeeping* (Vindel, 2006).

El clon ST125 apareció en España por primera vez en 1996 (Vindel, 2006). Actualmente, es el responsable de más del 50% de las infecciones nosocomiales por SARM. El ST125-MRSA-IV, como ya se ha comentado, tiene diferentes patrones en la ECP: clones E7, E8 y E20, según terminología del CNM de Majadahonda (Vindel, 2006; Cuevas, 2007; Pérez-Vázquez, 2009; Vindel, 2009), o clones P y Q, según la nomenclatura del Hospital de Bellvitge (Rodríguez-Baño, 2009).

Curiosamente, a diferencia de otros clones de SARM que están diseminados a lo largo de varios países de diferentes continentes (los denominados clones pandémicos), el clon ST125-IV únicamente predomina en España. No obstante, el ST125-IV también se ha detectado en Noruega a partir de 1999, constituyendo en 2003 el tercer clon de SARM más frecuente en dicho país (Fossum, 2006), país por cierto con un bajísima prevalencia de SARM. Además, como cabría esperar por su proximidad, este clon también se ha encontrado en el sudeste de Francia (durante septiembre 2006 – febrero 2007) (Grundmann, 2010) y en Portugal (durante enero – diciembre 2010) (Espadinha, 2013).

Respecto a Mallorca, las cepas de SARM eran rara vez aisladas hasta junio de 1999, cuando se detectó en el Hospital Universitari Son Dureta (HUSD) de Palma de Mallorca el primer brote de SARM, seguido de un período de endemia moderada. Por este motivo, se decidió la realización de diversos estudios de epidemiología molecular para determinar los distintos clones de SARM existentes en los pacientes atendidos en el HUSD y posteriormente en el Hospital Universitari Son Espases (HUSE) (Ruiz de Gopegui, 2005; Alcoceba, 2007; Ruiz de Gopegui, 2009). Asimismo, se presenta un trabajo que compara las cepas de SARM detectadas en cinco hospitales públicos de Mallorca (Alcoceba, 2007), y otro que compara las cepas de SARM detectadas en el HUSD con las procedentes de una residencia geriátrica de Mallorca (Ruiz de Gopegui, 2004; Manzur, 2008b; Manzur, 2010; Manzur, 2012).

2.6 Métodos de tipificación de SARM

2.6.1 Introducción

Para desarrollar estrategias efectivas en el control de la diseminación por SARM, es importante conocer la evolución de las cepas de SARM (Deurenberg, 2008), especialmente en caso de brotes (Rodríguez-Baño, 2008). Los métodos de tipificación

molecular son los más utilizados en la actualidad con este propósito. Se agrupan en dos categorías, las basadas en el patrón de bandas (como la ECP) y las basadas en la secuenciación de fragmentos (como el MLST) (Singh, 2006). Aunque la ECP sigue siendo una técnica ampliamente utilizada, hoy en día se prefieren los métodos de secuenciación ya que los datos son objetivos y permiten la comparación entre laboratorios de diferentes países.

2.6.2 Tipado de bacteriófagos (fagotipia)

La tipificación mediante fagos fue el primer método usado para analizar la estructura poblacional de *S. aureus* (Rountree, 1955). Este método se basa en analizar patrones de sensibilidad o resistencia de aislados bacterianos frente a una batería de fagos. Los bacteriófagos son virus capaces de adherirse a la pared celular de ciertas bacterias, entrar en ellas, multiplicarse y lizarlas. La capacidad diferencial de los fagos para infectar ciertas bacterias se debe a la disponibilidad de determinados receptores en la pared celular de la bacteria para que se puedan unir estos fagos. Este método tiene varias desventajas, como que la batería de fagos para el tipado no suele estar disponible en la mayoría de los laboratorios, la dificultad técnica para realizarla, y que este método muestra en general una baja reproducibilidad y estandarización (Singh, 2006).

2.6.3 Electroforesis en gel de campo pulsado

La ECP es uno de los métodos más discriminativos para el tipado de *S. aureus* y, actualmente, es el método genotípico más frecuentemente usado (Deurenberg, 2008). A diferencia de la técnica anterior, la ECP y los métodos de tipado que se mencionan más adelante estudian las variaciones existentes en el cromosoma, que es el componente fundamental de la identidad de la bacteria (Singh, 2006). La ECP se utilizó por primera vez aplicada a *S. aureus* en cepas detectadas de pacientes ingresados y personal sanitario de una UCI de un hospital de Estrasburgo, Francia (Prévost, 1991).

La ECP se basa en embeber las células bacterianas en agarosa y lizarlas *in situ* con enzimas y detergentes. A continuación, se corta un fragmento de cada bloque de agarosa y se digiere el ADN cromosómico con endonucleasas de restricción de baja frecuencia de corte, *Sma*I en el caso de *S. aureus*. Cada lámina de un bloque de

agarosa que contiene diversos fragmentos del ADN cromosómico se inserta en un pocillo de un gel de agarosa (Tenover, 1995).

Los fragmentos de ADN resultantes de la digestión con *Sma*I serían demasiado grandes para separarlos mediante una electroforesis de agarosa convencional, ya que los mayores a 50 kb no pueden migrar eficientemente. Sin embargo la ECP, mediante cambios periódicos en la dirección del campo eléctrico, permite la separación de fragmentos de ADN superiores a 1.000 kb. El método más comúnmente usado es el CHEF (*contour-clamped homogeneous electric field*), que consiste en una cámara de electroforesis con múltiples electrodos, que reorienta las moléculas de ADN utilizando un campo eléctrico con un gradiente de voltaje alternante en un ángulo de 120° (Singh, 2006).

Tras la tinción con bromuro de etidio, se obtienen diversos patrones de bandas que se visualizan con luz ultravioleta (UV). Se comparan unos patrones de bandas con otros para estudiar la relación epidemiológica. Se han hecho intentos para estandarizar los criterios usados para decidir si los aislados están asociados a un brote o no en función del patrón de bandas obtenido (Tenover, 1995). Con todo, tales criterios han resultado arbitrarios y científicamente insatisfactorios (Enright, 2008).

La ECP es altamente discriminativa. Es ideal para estudiar un número pequeño de aislados, pero este método es difícil de aplicar con unos tamaños de muestras grandes o en estudios epidemiológicos de larga duración, ya que pequeños cambios genéticos pueden cambiar radicalmente los patrones de bandas de la ECP (Enright, 2008). Otros inconvenientes son la complejidad técnica, la lentitud, la existencia de múltiples nomenclaturas y los errores de clasificación en algunas líneas genéticas (Stefani, 2012). Aunque se han hecho varios intentos para estandarizar la metodología de la ECP entre diversos laboratorios y establecer una nomenclatura común (van Belkum, 1998; Murchan, 2003; Cookson, 2007), el éxito ha sido limitado (Deurenberg, 2008). A causa de la necesidad de una adherencia estricta a unos protocolos estandarizados, las bases de datos basadas en la ECP solamente se han conseguido, a nivel nacional, en algunos países como EE.UU. (McDougal, 2003), Reino Unido (Johnson, 2005) o Australia (Gosbell, 2006).

2.6.4 *Multilocus sequence typing*

El tipado mediante secuenciación multilocus o *multilocus sequence typing* (MLST) se basa en el análisis de las secuencias de fragmentos de siete genes

housekeeping, cada uno aproximadamente de 400-600 pb de longitud, que en el caso de *S. aureus* son: *arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi*, *yqiL*. La secuencia obtenida del fragmento de cada uno de los siete genes *housekeeping* se introduce en una base de datos de una página web (<http://saureus.mlst.net>), obteniéndose el número de su alelo correspondiente. Tras introducir en la misma página web los siete números de cada uno de los alelos secuenciados, se obtiene el número de la secuencia tipo (ST) correspondiente (Deurenberg, 2008). Así, los aislados con el mismo perfil alélico se asignan como miembros del mismo clon (Singh, 2006). Por ejemplo, el perfil alélico obtenido por MLST 7-6-1-5-8-8-6, se ha definido con la secuencia tipo ST22. La nomenclatura de los clones de SARM se basa actualmente en el número de ST y el tipo de elemento SCC*mec* (Enright, 2002). Por ejemplo, el clon epidémico EMRSA-15 corresponde al ST22-MRSA-IV.

El MLST fue empleado originalmente para identificar líneas hipervirulentas de *Neisseria meningitidis* (Maiden, 1998). Respecto a *S. aureus*, se utilizó por primera vez entre 1997 y 1998, para tipar 155 aislados invasores de esta especie (Enright, 2000).

La gran ventaja de este método es que permite obtener una nomenclatura estándar de los distintos clones aplicada a cada laboratorio y, además, estudiar la evolución de los clones de SARM. Así, cuando cinco de los siete fragmentos de genes *housekeeping* secuenciados son idénticos, las cepas de *S. aureus* se agrupan en el mismo complejo clonal (Enright, 2002). En general, las desventajas de la MLST son que es una técnica cara y laboriosa (Deurenberg, 2008; Stefani, 2012).

2.6.5 Tipado del *locus spa*

Este método se basa en la variación de la secuencia de la región polimórfica X del gen de la proteína A (*spa*) de *S. aureus* (Frénay, 1994). La gran diversidad del gen *spa*, que contiene principalmente un número variable de repeticiones de 24 pb de longitud, se debe a deleciones y duplicaciones de estas repeticiones, así como a mutaciones puntuales (Deurenberg, 2008; Enright, 2008). El tipado de *spa* suele tener una potencia discriminativa entre la ECP y el MLST (Malachowa, 2005; Vindel, 2009).

En comparación con el MLST, el tipado de *spa*, al secuenciar únicamente un solo alelo, es menos caro y menos laborioso. Otra ventaja es el disponer, como el MLST, de una nomenclatura universal (<http://www.segnet.org/>). No obstante, algunas líneas genéticas son erróneamente clasificadas con este método, requiriendo en

algunos casos la determinación de más marcadores moleculares (Strommenger, 2008).

2.6.6 Tipado del casete SCCmec

Como ya se ha descrito anteriormente, hasta la fecha se ha descrito 11 tipos de SCCmec (Turlej, 2011; http://www.sccmec.org/Pages/SCC_TypesEN.html). El más frecuente en España es el tipo IV, seguido de los tipos I, II (Vindel, 2009) y, en ciertas zonas, del tipo V (Lozano, 2012a).

Existen dos métodos ampliamente utilizados, basados en la PCR, para tipificar los SCCmec más comunes. El primero consiste en realizar diferentes PCR para determinar el complejo del gen *ccr* y el complejo del gen *mec* (Ito, 2001; Lim, 2003). El segundo método se basa en el análisis de las regiones J del SCCmec, donde destaca la PCR múltiple descrita en 2002 por Oliveira y colaboradores (Oliveira, 2002a) y actualizada posteriormente (Milheiriço, 2007b).

Para distinguir las variantes del SCCmec tipo IV, de importancia especialmente en el SARM comunitario, se ha desarrollado un ensayo de PCR múltiple basado en la amplificación de diferentes *loci* específicos de la región J1 de los distintos subtipos del SCCmec tipo IV (Milheiriço, 2007a).

2.6.7 rep-PCR. DiversiLab®

La rep-PCR se basa en la amplificación por PCR de secuencias de ADN que están repetidas a lo largo del cromosoma bacteriano, obteniéndose en la electroforesis patrones de bandas específicos de cepas individuales (Versalovic, 1991).

El sistema de tipado DiversiLab® (bioMérieux, Francia) es una rep-PCR semiautomatizada con un alto nivel de estandarización, debido al uso de una electroforesis microcapilar que se interpreta con la ayuda de un programa informático. El DiversiLab® proporciona resultados rápidos y reproducibles. No obstante, en comparación con la ECP y el tipado de *spa*, el DiversiLab® muestra una menor discriminación (Babouee, 2011).

2.6.8 Tipado de la secuencia *dru*

Ryffel y colaboradores identificaron un conjunto de repeticiones imperfectas de 40 pb adyacentes a la IS431 del SCCmec, que denominaron unidades repetidas directas (*dru*). La mayoría de los aislados de SARM investigados poseen la región *dru*, en una cantidad de 1 a 15 repeticiones (Ryffel, 1991). Actualmente existe una nomenclatura de tipado internacional de *dru* (<http://www.dru-typing.org>).

Un estudio ha mostrado la utilidad de esta técnica en aislados de EMRSA-15, pero complementando a la ECP y al tipado de *spa* (Shore, 2010b).

2.6.9 MLVA

El MLVA (*multilocus variable-number tandem repeat [VNTR] analysis*) analiza la variación en el número de tándems repetidos de diversos genes. Existe un *kit* comercial basado en el MLVA (ceeramTools®, Francia), que se compone de cuatro pasos: extracción del ADN, amplificación de 16 VNTRs en dos PCR múltiples, análisis de los fragmentos mediante electroforesis capilar y asignación de un código de MLVA. Se ha observado que este ensayo es capaz de asignar correctamente aislados de *S. aureus* a MLST definidos (Sobral, 2012).

2.6.10 Microarrays y secuenciación completa del genoma

Se han desarrollado comercialmente varios *microarrays* de *S. aureus*, que incluyen un *software* para su interpretación y que han mostrado una gran correlación con el MLST (Shore, 2012).

En los últimos años han aparecido diversas técnicas que permiten secuenciar el genoma completo de la bacteria en unas pocas horas. Sin embargo, si bien el tiempo y los costes están descendiendo, todavía son unas técnicas caras, laboriosas, y sin criterios establecidos acerca de la interpretación epidemiológica (Lazarevic, 2011; Stefani, 2012).

2.7 SARM comunitario

2.7.1 Definición de SARM comunitario

Los términos SARM comunitario (adquirido en la comunidad o asociado a ella) y SARM hospitalario (adquirido en el hospital) se han usado indistintamente tanto para explicar las características genotípicas de los aislados como para indicar el origen de la infección, lo que ha creado bastante confusión (David, 2010).

Así, desde una perspectiva epidemiológica, se ha clasificado a los aislados de SARM en tres grupos (Tenover, 2006):

- a) SARM de origen hospitalario (nosocomial). Este grupo está formado por los aislados de SARM que producen infecciones en pacientes que están hospitalizados. Por definición, se detectan a partir de las 48 h del ingreso, o bien dentro de las 48 h tras el alta del paciente.
- b) SARM asociado a los cuidados sanitarios (ACS). Este grupo lo forman aquellos aislados de SARM detectados en pacientes no hospitalizados, pero que tienen alguna relación con el sistema sanitario. Los factores de riesgo establecidos para SARM-ACS son: historia de hospitalización, cirugía, diálisis o residencia en un centro de larga estancia en el año previo a la detección del SARM; o bien, la presencia de un catéter endovascular o un dispositivo percutáneo en el momento del cultivo; o bien, una historia previa de infección o colonización por SARM. Posteriormente, se ha excluido como factor de riesgo la detección de SARM previo (David, 2010). Los aislados de SARM de este grupo suelen ser idénticos que los aislados de SARM hospitalarios, por lo que sería un error clasificarlos como “SARM adquiridos en la comunidad”.
- c) SARM de origen comunitario, adquirido en la comunidad o asociado a la comunidad. Este grupo está formado por los aislados de SARM detectados en pacientes no ingresados o dentro de las primeras 48 h del ingreso; y además, el paciente carece de los factores de riesgo para la adquisición de SARM-ACS, explicados anteriormente (Morrison, 2006).

Además de las características epidemiológicas, el término “SARM comunitario” se usa para referirse a los aislados de SARM que poseen ciertas características microbiológicas diferentes a los aislados de SARM hospitalarios tradicionales (Cercenado, 2010a; David, 2010):

- Poseen los genes *lukF-PV* y *lukS-PV*, codificantes de la leucocidina de Pantón-Valentine (LPV).

- Son únicamente resistentes a los antibióticos β -lactámicos.
- Presentan genotipos (definidos como patrones de banda de la ECP) diferentes a las cepas de SARM hospitalarias y a las cepas de SARM-ACS.
- Llevan el casete *SCCmec* de tipo IV o de tipo V, mientras que, típicamente, los aislados de SARM hospitalarios suelen llevar los casetes *SCCmec* de los tipos I, II, III, que son de mayor tamaño.

Sin embargo, en los últimos años, la distinción entre SARM hospitalario y SARM comunitario se está haciendo cada vez más borrosa, por diversas razones.

1. Algunas infecciones por SARM que aparecen en pacientes no ingresados están producidas por genotipos típicamente hospitalarios, posiblemente como resultado de la presión (principalmente por razones económicas) de tratar a los pacientes de forma ambulatoria (David, 2010).
2. El clon de SARM comunitario más importante, el USA300 (ST8-MRSA-IVa, LPV+) es capaz de producir también brotes nosocomiales, principalmente en EE.UU. (Seybold, 2006), pero también, con menor frecuencia, en Europa (Sanchini, 2013).
3. Respecto a la resistencia antibiótica, si bien los aislados de SARM comunitarios suelen ser resistentes únicamente a los antibióticos β -lactámicos, recientemente se está detectando en aislados del clon USA300 un aumento de la resistencia a los macrólidos, a la tetraciclinas, y en menor medida, también a las fluoroquinolonas y a otros antibióticos (McDougal, 2010).
4. En cuanto al tipo de *SCCmec*, aunque el *SCCmec* tipo IV se asocia fuertemente al SARM comunitario, en muchos países, como en España desde 1996, la mayoría de los aislados de SARM hospitalarios también poseen este tipo de casete (Cuevas, 2007; Vindel, 2009).
5. La práctica totalidad de las cepas de SARM del clon ST398 (van den Broek, 2009; Feßler, 2010; van Cleef, 2011; Lozano, 2012a) o con el gen *mecC* (García-Garrote, 2014) no poseen los genes productores de LPV. Estas cepas se detectan en ciertas especies animales y en sus cuidadores. La mayoría de estas personas no están ingresadas, por lo que serían cepas de SARM comunitario. No obstante, para estos clones, se recomienda separarlos de los SARM comunitarios y agruparlos en una nueva categoría denominada SARM asociado al ganado (en inglés *livestock-associated MRSA*, LA-MRSA).
6. Los primeros aislados de SARM comunitario de Australia occidental detectados a principios de la década de 1990 no poseían los genes productores de LPV (Udo, 1993). Tampoco llevan estos genes la mayoría de cepas de SARM comunitario

detectadas en algunos países como el Reino Unido ([Otter, 2008](#)), Irlanda ([Rossney, 2007](#)) y Corea ([Park, 2009](#)).

Dada la compleja epidemiología de las cepas de SARM comunitarias y la circulación de cepas de SARM hospitalarias en la comunidad, no es posible establecer una clara delimitación entre comunitario y hospitalario. Además, el antecedente de haber tenido contacto con el sistema sanitario en el último año no excluye la posibilidad de ser colonizado o infectado por una cepa de SARM comunitario ([Klevens, 2007](#)). En resumen, se necesita una nueva revisión de la nomenclatura de SARM comunitario que refleje la epidemiología contemporánea de estas cepas ([David, 2010](#)).

2.7.2 Historia del SARM comunitario y clones circulantes

Los primeros casos de SARM adquirido en la comunidad se describieron en 1980 en Detroit, EE.UU., principalmente en usuarios a drogas por vía endovenosa. La mayoría de estos pacientes eran relativamente jóvenes (media de edad 45 años) y carecían de los factores de riesgo tradicionales para la infección por SARM, excepto el consumo previo de antibióticos (principalmente cefalosporinas y penicilinas semisintéticas) y el antecedente de hospitalización reciente. En 1981 esta cepa entró en algunos hospitales de Detroit, causando infecciones nosocomiales ([Saravolatz, 1982](#)). Curiosamente la cepa responsable de este brote era idéntica a otra cepa de SARM detectada en Japón en 1981, perteneciendo ambas al clon ST74-MRSA-IVA, que carecía de los genes codificantes de la LPV ([Johnson, 2006](#)). Por tanto, no se tratarían de verdaderos aislados de SARM comunitario.

En el oeste de Australia, a partir de 1989, se detectaron pequeños brotes de infecciones de piel y partes blandas por SARM en áreas dispersas de la región de Kimberley ([Udo, 1993](#)). La mayoría de estas infecciones ocurrían en individuos que vivían en condiciones socioeconómicas deficientes, principalmente en aborígenes, sin el antecedente de haber ingresado en un hospital y sin haber recibido tratamiento antibiótico previo. Estas cepas de SARM no eran multirresistentes y pertenecían al mismo clon, que fue tipificado mediante ECP denominándose clon WA5 (*Western Australia*). El clon WA5 carecía también de los genes productores de la LPV. Fue posteriormente caracterizado mediante MLST como ST8-MRSA-IVa. Por tanto, si bien el clon WA5 tiene la misma ST y el mismo subtipo de SCC*mec* que el clon USA300, carece de los genes codificantes de la LPV ([Coombs, 2011](#)).

En 1992, en Oakland, Nueva Zelanda, se detectaron por primera vez algunos aislados de SARM que poseían un patrón de fagos distinto al de las cepas de SARM de entonces. La mayoría de estos pacientes procedían de la región de Samoa Occidental, por lo que fue denominado clon WSPP (**W**estern **S**amoan **p**hage **p**attern). Los aislados de SARM de este clon no eran multirresistentes y se detectaron principalmente en pacientes de la comunidad (Mitchell, 1996). Mediante MLST, el clon WSPP tenía el secuenciotipo ST30-MRSA-IVc y poseía los genes codificantes de la LPV (Smith, 2005), por lo que sería cronológicamente el primer SARM comunitario que cumple todos los criterios.

En 1997, en varias ciudades del este de Australia, se detectaron una serie de infecciones de piel y partes blandas, especialmente forunculosis, que estaban producidas por una cepa SARM comunitario no multirresistente, con una fuerte asociación con población de origen polinesio (Collignon, 1998). La mayoría de estas infecciones estuvieron causadas por el denominado clon SWP (**S**outh-**W**est **P**acific), también productor de la LPV. Estudios posteriores demostraron que el clon SWP causante de estas infecciones en Australia era indistinguible del clon WSPP de Nueva Zelanda (Gosbell, 2001; Nimmo, 2006; Coombs, 2011). Los clones WSPP y SWP se han agrupado dentro del denominado clon Oceanía (Gosbell, 2006).

En EE.UU., los aislados de SARM comunitario se identificaron por primera vez en niños sin factores de riesgo que residían en el medio-oeste (*Midwest*) de este país a mediados de la década de 1990. La mayoría de estos aislados eran resistentes únicamente a los antibióticos β -lactámicos (Herold, 1998). Entre 1997 y 1999, se produjeron cuatro casos de muerte por neumonía grave en niños de Dakota del Norte y Minnesota (CDC, 1999). En los cuatro niños se aisló la misma cepa de SARM comunitario, que era productora de LPV, denominada cepa MW2 (**M**id-**W**estern), ya que esta cepa estaba extendida a lo largo de dicha área geográfica. En 2003, los **C**enters for **D**isease **C**ontrol and **P**revention (CDC) establecieron un nuevo sistema de nomenclatura para las cepas de *S. aureus* que estaban diseminadas por EE.UU., basado en los patrones de bandas de la ECP. La cepa MW2 fue caracterizada dentro del clon USA400 (McDougal, 2003) que, mediante MLST, tenía la secuencia tipo ST1-MRSA-IVa. Así, la primera onda de infecciones por SARM comunitario en EE.UU. estuvo causada por el clon USA400.

En el año 2000, durante la investigación por los CDC de un brote de infección de piel y parte blandas que ocurrió entre jugadores de fútbol americano en Pennsylvania (CDC, 2003a), se detectó por primera vez el denominado clon USA300

(McDougal, 2003). En estudios retrospectivos, este clon apareció en 1999 durante un brote de infecciones de piel y partes blandas en presos de una cárcel de Mississippi (CDC, 2001). A partir del año 2001, se detectaron diversos brotes originados por este clon en diversas poblaciones, como en presos (CDC, 2003b), en niños de guarderías y en atletas participantes en deportes de contacto (CDC, 2003a). A pesar de no haber relación epidemiológica entre ellos, todos estos brotes estaban causados por la misma cepa de SARM, que poseía en la ECP un idéntico pulsotipo (patrón de bandas) denominado USA300-0114 (Tenover, 2009). En 2004, en un estudio realizado en once ciudades de EE.UU., el clon USA300 constituía el 97% de los aislados de SARM entre los pacientes que acudían a Urgencias con una infección de piel y partes blandas (Moran, 2006). El clon USA400 ha sido progresivamente sustituido en EE.UU. por el clon USA300, que es actualmente uno de los dos clones de SARM más frecuentes en dicho país junto con el clon USA100 (ST5-MRSA-II), éste último multirresistente y típicamente asociado a infecciones nosocomiales (Tenover, 2009).

El clon USA300 y sus variantes se han detectado en los cinco continentes (Nimmo, 2012). El clon USA300 ha emergido en más de 15 países europeos (Nimmo, 2012) como Dinamarca (Larsen, 2007), el Reino Unido (Ellington, 2008), Italia (Baldan, 2009; Sanchini, 2013), Bulgaria, Dinamarca, Eslovaquia, Finlandia, Grecia, Holanda, Portugal, República Checa, Rumanía y Suecia (Rolo, 2012). La situación en España se explica en el siguiente apartado.

La cepa USA300-0114 y sus variantes más cercanas presentan una serie de características: el subtipo IVa del SCC*mec*, el tipo de *spa* t008, el poseer el gen de resistencia a macrólidos *msrA*, así como algunos genes de virulencia, como los genes *lukS-PV/lukF-PV* y el gen *arcA*, que codifican, respectivamente, la LPV y el elemento móvil catabólico de la arginina (ACME) (Tenover, 2006; Diep, 2008; Tenover, 2009).

A partir del año 2005, se ha detectado en varios países de Sudamérica, como Colombia (Álvarez, 2006; Arias, 2008a; Reyes, 2009), Ecuador y Venezuela (Reyes, 2009) la denominada variante latinoamericana del clon USA300 (Nimmo, 2012) o USA300-like (Cañas-Pedrosa, 2012; Marimón, 2012). El patrón de bandas de esta variante obtenido en la ECP difiere del de la cepa USA300-0114 en 1-6 bandas y presenta las siguientes características: secuenciotipo ST8, subtipo IVc del SCC*mec*, tipo de *spa* t008, presencia de los genes *lukS-PV/lukF-PV*, pero ausencia del gen *arcA* (productor del ACME). En ocasiones presentan, además, el gen de resistencia a la tetraciclina *tetK* (Reyes, 2009; Nimmo, 2012). Esta variante latinoamericana ha sido

detectada también en Australia (Monecke, 2009; Coombs, 2011) y en algunos países europeos como Italia (Baldan, 2009) y Suecia (Rolo, 2012), además de en España.

Hay también otros clones de SARM comunitarios productores de LPV diseminados internacionalmente, como el clon Europeo (ST80-MRSA-IVc) (Wannet, 2005), el clon Taiwán (ST59-MRSA-V_T, ST59-MRSA-VII) (Chen, 2005) y el clon Queensland (ST93-MRSA-IVa) (Coombs, 2011).

2.7.3 SARM comunitario en España

En el año 2003 se detectaron esporádicamente en algunas ciudades españolas como Madrid (Broseta, 2006), Barcelona (Manzur, 2008a; Rodríguez-Baño, 2009) y las Palmas de Gran Canaria (Cañas-Pedrosa, 2012) los primeros aislados de SARM productores de LPV; si bien, la mayoría de las infecciones por estas cepas ocurrieron a partir de 2004 (Broseta, 2006; Cercenado, 2008). Estos aislados de SARM presentaban un patrón inusual de resistencia, siendo resistentes únicamente a los antibióticos β -lactámicos y, en algunas ocasiones, también a la tetraciclina. La mayoría de los pacientes eran en niños o adultos jóvenes y solían presentar abscesos cutáneos o celulitis. Curiosamente, aproximadamente el 70% de las infecciones por SARM comunitario que ocurrieron de 2003 hasta 2006 se produjeron en población inmigrante procedente de América Latina, principalmente de Ecuador (Cercenado, 2008; Manzur, 2008a).

Desde el punto de vista genético, la práctica totalidad de estas infecciones (Cercenado, 2008; Manzur, 2008a; Daskalaki, 2010; Cañas-Pedrosa, 2012) estaban producidas por la variante latinoamericana del clon USA300 (o USA300-*like*), tipificado mediante MLST como ST8-MRSA-IVc. El USA300-*like* es también el clon más frecuente de SARM en Ecuador, Colombia y Venezuela (Reyes, 2009), por lo que es muy probable que se hubiera producido una importación transcontinental a España de este clon (Cercenado, 2008). En series posteriores a 2006 de infecciones ocasionadas por aislados de SARM productores de LPV, el clon mayoritario seguía siendo el ST8-MRSA-IVc, aunque ya más de la mitad de los pacientes eran de nacionalidad española. Esto sugiere la progresiva diseminación de este clon por la población española (Cercenado, 2008; Cobos-Trigueros, 2010; Cañas-Pedrosa, 2012). El clon ST8-IVc se ha detectado también en Bilbao desde 2005 (Blanco, 2011), en San Sebastián desde 2007 (Marimón, 2012) y en Mallorca desde 2007 (Ruiz de Gopegui, 2008).

En cuanto al clon USA300 (ST8-MRSA-IVa, LPV+, ACME+), está presente esporádicamente en diferentes ciudades como Madrid, Bilbao, San Sebastián y Gran Canaria (Blanco, 2011; Marimón, 2012; Cañas-Pedrosa, 2012). Otros clones de SARM productores de LPV más minoritarios son el ST5-MRSA-IVa, detectado en Madrid y Barcelona (Cercenado, 2008; Manzur, 2008a), el ST30-MRSA-IVc, en Bilbao y Gran Canaria (Blanco, 2011; Cañas-Pedrosa, 2012), y el ST80-MRSA-IVc, en Madrid y Bilbao (Cercenado, 2008; Blanco, 2011).

2.7.4 Origen del SARM comunitario

La formación de los diversos clones de SARM comunitario se habría producido por la adquisición en el genoma de *S. aureus* de dos elementos genéticos distintos: un fago lisogénico portador de los genes *lukS-PV* y *lukF-PV* (codificantes de LPV) y un SCCmec de los tipos IV o V (Boyle-Vavra, 2007; David, 2010) (figura 22). Unas pocas líneas genéticas de *S. aureus* dotadas con la mejor *fitness* habrían sobrevivido y se habrían diseminado. Es improbable que la transferencia horizontal del fago y del SCCmec se haya producido a la vez, ya que estos dos elementos se integran en sitios distintos del cromosoma (Boyle-Vavra, 2007).

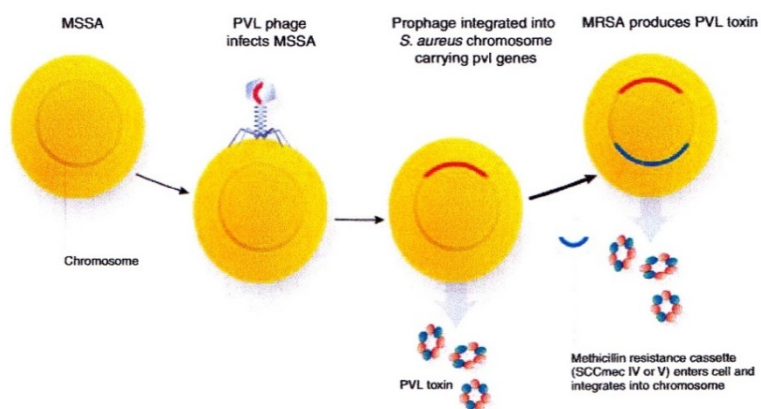


Figura 22. Modelo de emergencia del SARM comunitario (Boyle-Vavra, 2007).

Los aislados de SARM del secuenciotipo ST8, precursores del USA300, se encuentran diseminados por todo el mundo y han adquirido, en diversas ocasiones, varios tipos de SCCmec (Deurenberg, 2008). De hecho, los primeros aislados de SARM detectados a partir de 1960 (el clon Arcaico, ST247-MRSA-I) pertenecían al

CC8 y se cree que derivaban de un aislado de SARM ST8 (Enright, 2002; Deurenberg, 2008). Todo ello sugiere que la línea ST8 se acomoda fácilmente a la inserción de un elemento *SCCmec* (Boyle-Vavra, 2007). Asimismo, Strommenger sugiere que los genes *lukSF-PV*, codificantes de LPV, únicamente se adquirieron una sola vez en el ST8 (Strommenger, 2014), si bien los aislados de SARM del secuenciotipo ST8 productores de LPV se encuentran ampliamente diseminados por muchos países alejados geográficamente (Pérez-Vázquez, 2009; Daskalaki, 2010; Monecke, 2014).

La emergencia mundial en diferentes líneas genéticas de *S. aureus* que llevan un fago lisogénico codificante de la LPV y un casete cromosómico *SCCmec* de pequeño tamaño (tipos IV o V) hace pensar una presión selectiva común en muchas zonas geográficas del planeta. Existen algunos estudios que indican un aumento de la colonización nasofaríngea por *S. aureus* en niños que recibieron la vacuna neumocócica heptavalente (Prevenar®) (van Gils, 2011); con todo, no explica la relación entre el SARM comunitario con la toxina LPV (Boyle-Vavra, 2007).

2.7.5 Factores de virulencia de SARM comunitario

Se han identificado en cepas de SARM comunitario, tanto en estudios epidemiológicos como experimentales, una serie de factores de virulencia, la mayoría en aislados del clon USA300 (Kennedy, 2009; David, 2010). Algunos de estos factores de virulencia se describen a continuación.

Leucocidina de Pantón-Valentine (LPV)

Es una exotoxina formadora de poros, presente en algunas cepas de *S. aureus*, tanto sensibles como resistentes a la meticilina. Se describió por primera vez en 1894 (van de Velde, 1894), aunque fue en 1932 cuando Pantón y Valentine asociaron esta toxina con el desarrollo de infecciones cutáneas (Pantón, 1932).

Esta toxina consta de dos componentes codificados por dos genes separados (*lukF-PV* y *lukS-PV*), organizados en un operón. Los productos pueden ensamblarse entre sí o con los componentes de la γ -hemolisina. Las dos proteínas que constituyen la LPV actúan de forma sinérgica lisando las membranas de los polimorfonucleares y monocitos/macrófagos humanos (Lina, 1999). Además, la LPV puede formar poros en la membrana externa de la mitocondria, induciendo la apoptosis (Genestier, 2005). Los dos genes *lukF-PV* y *lukS-PV* están transportados por un bacteriófago lisogénico móvil

que puede pasar a otras cepas e integrarse en el cromosoma en forma de profago (Kaneko, 1997).

La evidencia clínica y varios estudios experimentales han mostrado una asociación entre las cepas de *S. aureus* productoras de LPV con las infecciones de piel y partes blandas (Lina, 1999), con la neumonía necrosante (Gillet, 2002) y con la osteomielitis (Bocchini, 2006). Con todo, no todos los estudios llegan a esta conclusión y todavía existe controversia acerca de la patogenicidad de la LPV (Watkins, 2012).

Uno de los primeros estudios realizados *in vivo* mostró que la inyección intradérmica de la LPV en conejos producía un infiltrado eritematoso seguido de una necrosis cutánea (Cribier, 1992). Sin embargo, posteriores experimentos *in vivo* que usaron modelos murinos pusieron en duda la virulencia de esta toxina. Así por ejemplo, un estudio encontró que las cepas de SARM comunitario que carecían de la LPV eran igual de virulentas que las cepas con esta toxina en modelos de sepsis y abscesos de ratones (Voyich, 2006).

En contraposición, dos trabajos experimentales posteriores efectuados en conejos demostraron que la presencia de los genes de LPV en cepas del clon USA300, frente a cepas del clon USA300 sin estos genes, aumentaba la gravedad de los síntomas de la neumonía necrosante (Diep, 2010) y de las infecciones cutáneas (Lipinska, 2011). La razón de esta inconsistencia podría deberse a que los neutrófilos de ratones son relativamente insensibles a los efectos citolíticos de la LPV, en contraposición a los neutrófilos de conejos y de humanos (Diep, 2010; Löffler, 2010). Esta diferencia se ha explicado por la interacción específica de especie entre la LPV con los receptores del complemento C5aR (Spaan, 2013). Además de causar la lisis de neutrófilos, la LPV tiene importantes efectos pro-inflamatorios. La destrucción prematura de los neutrófilos liberaría componentes de éstos (como radicales libres de oxígeno), produciendo necrosis tisular.

No obstante, si bien la LPV contribuye a la virulencia del SARM comunitario, probablemente no sea el único factor responsable (Watkins, 2012).

Elemento móvil catabólico de la arginina (ACME)

El denominado elemento móvil catabólico de la arginina (ACME) es un segmento de ADN de 30,9 kb, identificado por primera vez al secuenciar el genoma completo de una cepa del clon USA300 (Diep, 2006b). Se ha detectado un alta

prevalencia de ACME en aislados de *S. epidermidis*, lo que sugiere que el origen de este elemento se encuentra en esta especie (Watkins, 2012).

En las cepas de SARM, el ACME está adyacente al *SCCmec*. Estos dos elementos se integran en el mismo sitio *attB* del gen *orfX*. El ACME se compone de dos grupos de genes: los genes *arc* (*arcA*, *arcB*, *arcC*, *arcD*) y los genes *opp*. El gen *arcA* codifica una arginina desaminasa, que convierte la L-arginina en dióxido de carbono, ATP y amonio. Los genes *opp* producen una oligopéptido permeasa. El gen *arcA* contenido en el ACME tiene una secuencia de nucleótidos diferente a la del gen *arcA housekeeping* (utilizado para el MLST), presente este último en todos los aislados estafilocócicos. Las consecuencias de la diferencia en las dos secuencias son desconocidas (Diep, 2006b; Kennedy, 2009; David, 2010).

La patogenia del ACME es controvertida. Se ha especulado que el ACME aumentaría la *fitness* del clon USA300 al incrementar la supervivencia de estas cepas en un medio ácido, como sería la piel humana (mediante la arginina desaminasa) y que potenciaría la ingesta de nutrientes de la bacteria (mediante la oligopéptido permeasa) (Diep, 2006b; Diep, 2008).

En apoyo de la implicación del ACME en la patogenia, en un modelo de bacteriemia en conejos, la delección de los genes productores del ACME produjo una disminución en la capacidad de diseminación de una cepa del clon USA300 a los principales órganos (Diep, 2008). Por el contrario, otro estudio no encontró diferencias significativas entre cepas de USA300 ACME-positivas frente a las de USA300 ACME-negativas en un modelo en ratas con neumonía necrosante y en otro modelo en ratones con infecciones cutáneas (Montgomery, 2009).

Hasta el momento, el principal interés del ACME es epidemiológico, para distinguir las cepas del clon USA300-0114 y sus variantes más cercanas (que poseen el subtipo *SCCmec* IVa y los genes *arc*), de la variante latinoamericana del USA300 (con el subtipo *SCCmec* IVc y sin los genes *arc*) (Nimmo, 2012). El ACME también se ha encontrado esporádicamente en otros clones de SARM diferentes al USA300 (Ellington, 2008).

Modulinas solubles en fenol (PSMs)

Las modulinas solubles en fenol (PSMs) son péptidos de hélice α producidos por varias especies de estafilococos. Tienen la capacidad de reclutar, activar y lisar los

neutrófilos humanos. Si bien el operón *psma*, productor de las PSMs, se encuentra en todas las cepas de *S. aureus*, en los aislados de SARM comunitario se expresan en mayor cantidad.

2.7.6 Factores de riesgo para la infección por SARM comunitario

Hasta finales de la década de 1990, la mayoría de las infecciones por SARM ocurrían en personas ingresadas o que tenían relación con el sistema sanitario. Sin embargo, las infecciones por las cepas de SARM comunitario se producen frecuentemente en otras poblaciones, como en neonatos y población pediátrica, nativos americanos (de EE.UU. y Canadá) y aborígenes australianos y de otras islas del Pacífico, presos de cárceles, militares y atletas con deportes de contacto. No obstante, algunos pacientes con infecciones por SARM comunitario no tienen ningún factor de riesgo aparente (David, 2010).

El contacto directo con individuos infectados se cree que es el modo de transmisión de los aislados de SARM comunitarios (Moran, 2006; Kennedy, 2009). En el caso de los deportes de contacto, las abrasiones y roturas de la piel, el uso compartido de toallas, el agua de saunas contaminadas y los cosméticos del afeitado se han asociado al desarrollo de infecciones cutáneas por SARM comunitario (Begier, 2004). Curiosamente, la colonización nasal por SARM comunitario en EE.UU. es baja, frente al relativamente alto número de infecciones causadas por este tipo de cepas (Gorwitz, 2008).

2.8 SARM en centros geriátricos

2.8.1 Importancia de la infección por SARM en pacientes geriátricos

Según los datos del estudio español EPINE del año 2011, el 44,6% de las infecciones por cualquier microorganismo en pacientes hospitalizados ocurrían en personas de más de 69 años (EPINE, 2011). Este escenario es similar en muchos países de nuestro entorno y en EE.UU. (Emori, 1991).

Staphylococcus aureus constituye una de las principales causas de bacteriemia, infección de tejidos blandos y neumonía en personas mayores ingresadas en hospitales de agudos (Emori, 1991; Bradley, 2002). Las bacteriemias por *S. aureus*

son bastante más frecuentes en personas mayores de 65 años, como muestra un estudio multicéntrico español (Oteo, 2002). Como es sabido, la mortalidad en los pacientes ancianos infectados por este microorganismo es mayor conforme avanza la edad (Holmes, 2011; Albur, 2012; Pastagia, 2012).

Además, hay muchos estudios que indican que la colonización por *S. aureus*, si bien es alta en los recién nacidos, disminuye a lo largo de los primeros años de vida, pero luego se incrementa con la edad, siendo mayor por encima de los 70-80 años (Ayliffe, 1977), especialmente en el caso de SARM (Eveillard, 2006b; Gorwitz, 2008). Y también muchos otros que demuestran una clara asociación entre la colonización nasal por *S. aureus* y la infección posterior por la misma cepa en pacientes ingresados en hospitales de agudos, especialmente en las UCI (Corbella, 1997; von Eiff, 2001), así como en pacientes en hemodiálisis (Yu, 1986). Asimismo, la colonización de las úlceras crónicas por SARM o SARM (Masaki, 2001; Roghmann, 2001) es un factor de riesgo para el desarrollo de bacteriemia subsiguiente.

Por lo que se refiere a las infecciones invasivas por SARM, principalmente las bacteriemias, como cabría esperar, son también mucho más frecuentes en mayores de 65 años (Morgan, 2000; Oteo, 2002; Manzur, 2007; Rodríguez-Baño, 2009; Gasch, 2011).

2.8.2 Colonización por SARM en las residencias geriátricas

Los centros de larga estancia constituyen un grupo heterogéneo de instituciones (públicas o privadas) que proporcionan residencia y cobertura sanitaria, mayoritariamente a pacientes geriátricos, con diferentes grados de dependencia (Manzur, 2008c).

Las mejoras sanitarias y cambios sociales que se han producido en muchos países europeos y americanos han provocado un aumento de la población mayor de 65 años. Una proporción importante de esta población va a residir de forma permanente o durante un período más o menos prolongado en una residencia geriátrica (Manzur, 2008c). Así, por ejemplo, en EE.UU. en torno a unas 1,4 millones de personas residían en centros geriátricos en 2008; sin embargo, se cree que en 2030 esta cifra podría alcanzar los 5,3 millones de personas (Garazi, 2009).

Muchos de los pacientes de las residencias geriátricas van a ingresar intermitentemente en un hospital de agudos, volviendo más tarde a la residencia,

formándose un circuito entre ambas instituciones. El intercambio de pacientes entre los hospitales de agudos y las residencias geriátricas es cada vez mayor en los últimos años, asumiendo estas últimas altas hospitalarias que se dan con mayor precocidad (Manzur, 2008c; Pujol, 2011). Una consecuencia de este intercambio entre hospital y residencia geriátrica es que una proporción de pacientes que residen en centros geriátricos van a estar colonizados por bacterias multirresistentes, como enterobacterias productoras de β -lactamasa de espectro extendido (BLEE), *Acinetobacter baumannii* resistente a las carbapenemas y SARM.

Respecto al SARM, desde la década de los años noventa, se está produciendo en muchos países una diseminación desde los hospitales de agudos hacia el ámbito sanitario extrahospitalario, incluyendo los centros de larga estancia y residencias geriátricas (Manzur, 2008c). En la mayoría de los casos, los residentes geriátricos adquieren el SARM al ingresar o ser atendidos en el hospital y, a partir de aquí, lo transfieren a la residencia geriátrica (Bradley, 1999). Existen numerosos estudios publicados que muestran que la hospitalización reciente constituye un factor de riesgo independiente para la colonización por SARM en pacientes que residen en un centro geriátrico (von Baum, 2002; Garazi, 2009; Lasseter, 2010; García-García, 2011; Pfingsten-Würzburg, 2011; Murphy, 2012b).

Como era previsible, las residencias geriátricas forman también un importante reservorio de SARM fuera de los hospitales (Eveillard, 2008; Manzur, 2008c; Garazi, 2009; García-García, 2011; Pfingsten-Würzburg, 2011). Apoyando esto, algunos trabajos encuentran que los pacientes hospitalizados con un SARM tienen una mayor probabilidad de proceder de un centro geriátrico que de la comunidad (Hsu, 1988; Eveillard, 2006a). Así un estudio retrospectivo, realizado en el Hospital de Bellvitge, mostró que los dos únicos factores que predecían la resistencia a la meticilina en pacientes que ingresaban en dicho hospital con una bacteriemia por *S. aureus* eran el antecedente de un SARM previo y la procedencia de un centro de larga estancia (Manzur, 2007).

Las tasas de colonización por SARM en las residencias geriátricas varían ampliamente y dependen de múltiples factores, como la localización geográfica de la residencia, el tamaño (número de camas), la prevalencia de SARM en los hospitales de agudos de referencia, el tipo de residentes ingresados, las prácticas del control epidemiológico del centro, la calidad de la limpieza de la residencia (Murphy, 2012a), el momento en que se realiza el estudio de colonización (si se realiza de forma basal o bien, durante un brote de infección), los tipos de muestra, el número de muestras que

se recogen en los estudios de vigilancia y los medios de cultivo microbiológicos en que se siembran los escobillones (McNeil, 2002).

La prevalencia de portadores de SARM en las residencias geriátricas de diferentes países europeos oscila entre un 1,1% y un 7,6% en Alemania (von Baum, 2002; Pflingsten-Würzburg, 2011), del 4,7% al 22% en el Reino Unido (Cox, 1999; Barr, 2007), del 1% al 27% en Irlanda (O'Sullivan, 2000b), y del 37,6% en un geriátrico francés (Eveillard, 2008). En los pocos estudios españoles realizados, la tasa de colonización en geriátricos oscila entre el 6,7% y 35,8% en la provincia de Barcelona (Espejo, 2006; Manzur, 2008b), y del 10,6% en la provincia de Sevilla (García-García, 2011). En EE.UU., el porcentaje de portadores de SARM en las residencias geriátricas suele ser más alto, con una tasa de colonización del 8% al 53% en exudados nasales, y del 30% al 82% en heridas (Bradley, 1999). La tasa de colonización por SARM en centros geriátricos suele ser superior a la encontrada en hospitales, incluyendo las UCI (Murphy, 2012b).

Entre los factores de riesgo más frecuentes de colonización por SARM en los centros geriátricos se incluyen el sexo masculino, la edad mayor de 80 años, el ingreso hospitalario reciente, el encamamiento o estado funcional disminuido, la presencia de cuerpos extraños (sondas nasogástricas, catéteres intravenosos, sondas urinarias), la presencia de heridas y úlceras de decúbito, el tratamiento antibiótico previo, la colonización previa por SARM, y un número de camas por cuidador de la residencia igual o superior a 6 (O'Sullivan, 2000a; McNeil, 2002; von Baum, 2002; Barr, 2007).

2.8.3 Infección por SARM en las residencias geriátricas

Como ya se ha comentado, la colonización por SARM constituye un importante factor de riesgo para desarrollar una infección por la misma cepa en pacientes hospitalizados (Corbella, 1997). Sin embargo, a pesar de que la colonización asintomática por SARM suele ser frecuente en los residentes de centros geriátricos, las infecciones por SARM son raras. La mayoría de ellas suelen ser infecciones de herida que no van a requerir ingreso hospitalario.

Se ha establecido que los pacientes colonizados por SARM presentan un riesgo de desarrollar una infección por SARM del 30-60% durante un ingreso en un hospital de agudos, mientras que este riesgo sería sólo del 5% durante su estancia en una residencia geriátrica (Bradley, 1991; McNeil, 2002). La comorbilidad de los

pacientes colonizados por SARM suele ser un predictor más importante que la edad en sí misma para desarrollar una infección por SARM (McNeil, 2002), principalmente la presencia de diabetes y de enfermedad vascular periférica (Terpenning, 1994).

A modo de resumen, las residencias geriátricas son altamente heterogéneas, afectadas por muchas variables como el país, el tipo de población de la residencia, la prevalencia de SARM en la región, el control epidemiológico del SARM en el hospital de referencia del centro, etc. La gran mayoría de artículos publicados se han realizado en residencias de veteranos americanas, que no son del todo comparables a las residencias públicas de nuestra área. Por eso hacía falta realizar más estudios acerca de la importancia de la colonización e infección SARM en residencias geriátricas, especialmente en España, país en el que existen escasos estudios publicados sobre este tema.

Entre estos pocos artículos está el realizado por nuestro grupo, publicado en 2004. Se trata de un estudio retrospectivo de los aislados de *S. aureus* procedentes de úlceras de decúbito que se detectaron durante el período 2000-2002 en los residentes geriátricos ingresados en la Residencia Bonanova, un centro público con un elevado número de residentes para la que nuestro hospital es el centro de referencia. Según mostró dicho estudio, la resistencia a la meticilina entre los aislados de *S. aureus* detectados en úlceras fue del 70%. El análisis de ECP reveló, entre los 17 aislados de SARM de pacientes distintos, la presencia de cuatro clones de SARM, todos ellos encontrados también en los pacientes ingresados en el hospital de referencia de dicho centro (Ruiz de Gopegui, 2004).

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

Parte 1. Estudio de epidemiología molecular de los aislados de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina detectados en el Hospital Universitari Son Dureta y Son Espases durante 15 años (1999-2013).

Los aislados de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) comenzaron a detectarse en el HUSD a partir de junio 1999, constituyendo un problema de primera magnitud en nuestro hospital, como sucede en otros hospitales. Asimismo, en los últimos años, se ha producido la diseminación en la mayoría de países de aislados de SARM comunitario, con características epidemiológicas, microbiológicas y moleculares que se diferencian de los aislados de SARM detectados en los hospitales. Dada la importancia que presenta este microorganismo, se ha planteado la realización de diversos estudios de epidemiología molecular de SARM, con los siguientes objetivos:

- I. Estudiar la relación clonal de los aislados de SARM detectados en los pacientes atendidos en el HUSD y posteriormente en el HUSE durante cuatro períodos: 1999-2000, 2002-2004, 2008 y 2012-2013.
- II. Comparar la relación clonal de los aislados de SARM detectados en el HUSD con los aislados de SARM detectados en los otros cuatro hospitales públicos de Mallorca existentes entonces: el Hospital Son Llätzer (HSSL), el Hospital de Manacor (HM), el Hospital General (HG) y el Hospital Joan March (HJM).
- III. Estudiar la prevalencia de resistencia antimicrobiana en los diferentes aislados de SARM.
- IV. Determinar la frecuencia de la leucocidina de Pantón-Valentine (LPV) y del elemento móvil catabólico de la arginina (ACME) entre los aislados de SARM.

- V. Realizar el genotipado y subtipado del casete cromosómico SCC*mec*.

Parte 2. Estudio epidemiológico de colonización e infección por *S. aureus* resistente a la meticilina en una residencia geriátrica de Mallorca.

Las residencias geriátricas constituyen un importante reservorio de SARM. Además, muchos residentes geriátricos ingresan en un hospital de agudos regresando otra vez a la residencia, con lo que se crea un importante flujo de pacientes entre los centros geriátricos y sus hospitales de referencia. La gran mayoría de artículos publicados se han realizado en residencias de veteranos americanas, que no son del todo comparables a las residencias públicas de nuestra área. Por ello, dado los escasos trabajos que evalúen la importancia de la colonización e infección SARM en residencias geriátricas, se planteó realizar en España un estudio multicéntrico (aquí se presentan únicamente los datos de la Residencia Bonanova, de Palma de Mallorca), con los siguientes objetivos:

- VI. Estudiar la prevalencia de la colonización por SARM en frotis nasales y exudados de úlcera de los pacientes ingresados en un centro geriátrico, la Residencia de Pensionistas “Bonanova” de Palma de Mallorca (corte transversal).
- VII. Determinar los factores de riesgo de la colonización por SARM en los residentes de dicha residencia geriátrica (estudio caso-control).
- VIII. Evaluar la evolución en el tiempo de los pacientes colonizados por SARM y de un grupo de los residentes no colonizados en el estudio inicial (estudio longitudinal).
- IX. Estudiar la prevalencia de resistencia antibiótica en los aislados de SARM.
- X. Estudiar de la relación clonal de las cepas de SARM aisladas en estos residentes, comparándolas con las detectadas en el hospital de referencia.

- XI. Determinar la prevalencia de los genes codificantes de la LPV.
- XII. Realizar el genotipado y subtipado del casete SCC*mec*.

Parte 3. Caracterización de un nuevo plásmido de multirresistencia que contiene los genes *cfr*, *tet(L)*, *ant(4')-Ia* y *dfrK*, en dos aislados de SARM y en un aislado de *Staphylococcus epidermidis*.

En agosto del 2010, en dos pacientes con EPOC ingresados en el HUSD, se aislaron dos cepas de SARM, resistentes también a la linezolidina (doble halo), cloranfenicol, clindamicina, tetraciclina, tobramicina y ciprofloxacino. Se detectaron en muestras de esputo y de exudados nasales, axilares e inguinales. Estos dos pacientes habían recibido tratamiento con linezolidina en 2009 por otra infección respiratoria por SARM (entonces sensible a la linezolidina). En septiembre del 2010 se detectó un aislado de *S. epidermidis* con el mismo perfil de resistencia. El gen de resistencia *cfr* explicaría la resistencia a la linezolidina, clindamicina y al cloranfenicol, pero no la resistencia a la tetraciclina ni a la tobramicina. Por ello, se decidió realizar un estudio con los siguientes objetivos:

- XIII. Estudiar la relación clonal de los dos aislados de SARM resistentes a la linezolidina detectados en dos pacientes ingresados en el HUSD, así como de otros dos aislados de SARM sensibles a la linezolidina detectados previamente en los mismos pacientes.
- XIV. Realizar el genotipado y subtipado del casete SCC*mec* de los cuatro aislados de SARM detectados en esos dos pacientes.
- XV. Analizar el mecanismo de resistencia a la linezolidina, tobramicina y a la tetraciclina en los dos aislados de SARM y en el aislado de *S. epidermidis* resistentes a la linezolidina.
- XVI. Determinar si el plásmido de multirresistencia es conjugativo y cuál es su tamaño.

- XVII. Determinar la secuencia de nucleótidos del fragmento del plásmido que contiene los genes de resistencia.

Parte 4. Estudio de epidemiología molecular y caracterización del mecanismo de resistencia de un brote de *Staphylococcus hominis* resistente a la linezolid.

A partir de marzo del 2008, se detectaron los primeros aislados de *Staphylococcus hominis* resistentes a la linezolid y a la teicoplanina, entre otros antibióticos, en dos hospitales terciarios de Mallorca (HSSL y HUSD), principalmente a partir de hemocultivos de pacientes ingresados en la UCI. Por ello, se llevó a cabo un estudio entre los dos hospitales con los siguientes objetivos:

- XVIII. Estudiar la resistencia antibiótica en diferentes aislados de *S. hominis* resistentes a la linezolid, detectados en estos dos hospitales de Mallorca, durante el período marzo 2008-febrero 2009.
- XIX. Estudiar la epidemiología molecular de un grupo de aislados de *S. hominis* resistentes a dicho antimicrobiano.
- XX. Estudiar el mecanismo de resistencia a la linezolid en un grupo de aislados de *S. hominis*.

METODOLOGÍA

4. METODOLOGÍA

4.1 Cepas, plásmidos y cebadores

Tabla 7. Cepas de laboratorio usadas en este trabajo.

Especie	Cepa	Descripción	Genotipo	Referencia
<i>S. aureus</i>	Clon A	Cepa de SARM del HUSD	ST125-IVc	Este trabajo
	Clon B	Cepa de SARM del HUSD	ST228-I	Este trabajo
	Clon C	Cepa de SARM del HUSD	ST22-IVh	Este trabajo
	Clon Ibérico	Cepa de SARM (cedida por la Dra. de Lencastre)	ST247-I	Sanches, 1995
	Clon NY/Japón	Cepa de SARM (cedida por la Dra. de Lencastre)	ST5-II	Chung, 2000
	Clon Brasileño	Cepa de SARM (cedida por la Dra. de Lencastre)	ST239-III	Aires de Sousa, 1998
	Cepa DEN4561	Cepa de SARM (cedida por la Dra. de Lencastre)	ST22-IVh (EMRSA-15)	Faria, 2005
	Cepa HAR22	Cepa de SARM (cedida por la Dra. de Lencastre)	ST22-IVh (EMRSA-15)	Murchan, 2003
	Cepa NCTC 8325	Cepa de <i>S. aureus</i> usada como marcador de peso molecular en la ECP	-	Tenover, 1995
	Cepa 3922-04	Cepa de SARM LPV+ (cedida por la Dra. Cercenado)	ST8-IVc	Cercenado, 2008
	Clon USA300	Cepa de SARM LPV+, ACME+ (cedida por la Dra. Cercenado)	ST8-IVa	-
	HC08	Cepa de SARM <i>cfr+</i> , <i>fexA+</i> (cedida por la Dra. Betriu)	ST228-I	Morales, 2010
	05069371	Cepa de SARM del HUSD resistente a la linezolidina (<i>cfr+</i>)	ST125-IVc	Este trabajo
	ATCC® 29213	Cepa tipo usada para la conjugación del pERGB	-	CLSI, 2012
<i>E. coli</i>	XL-1 Blue	Cepa usada para la transformación del pERGB	-	Bullock, 1987

Abreviaturas. HUSD: Hospital Universitari Son Dureta; NY: Nueva York; DEN: *Denmark*; ECP: electroforesis en campo pulsado; LPV: leucocidina de Panton-Valentine; ACME: elemento móvil catabólico de la arginina.

Tabla 8. Plásmidos usados en este trabajo.

Plásmido	Genotipo	Referencia
pUCP24	Vector de clonación. Contiene tres genes: <i>rep</i> , <i>lacZα</i> y <i>aacC1</i>	Olsen, 1982
pERGB	Plásmido de multirresistencia de la cepa 05069371. Contiene los genes de resistencia: <i>cfr</i> , <i>ant-4'-la</i> , <i>tet(L)</i> y <i>dfrK</i>	Este trabajo
pUCPcfr12	Plásmido resultante de la clonación de un fragmento del pERGB de 8.675 pb en el pUCP24. Contiene los genes de resistencia: <i>cfr</i> , <i>ant-4'-la</i> y <i>tet(L)</i>	Este trabajo

Tabla 9. Cebadores utilizados para este trabajo.

Cebador	Secuencia de oligonucleótidos (5'-3')	Tamaño producto PCR (pb)	Uso	Referencia
27F 907R 519R	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT GWA TTA CCG CGG CKG CTG	-	Secuenciación del ARNr 16S	Lane, 1991
<i>arcC</i> -Up <i>arcC</i> -Dn <i>aroE</i> -Up <i>aroE</i> -Dn <i>glpF</i> -Up <i>glpF</i> -Dn <i>gmk</i> -Up <i>gmk</i> -Dn <i>pta</i> -Up <i>pta</i> -Dn <i>tpi</i> -Up <i>tpi</i> -Dn <i>yqiL</i> -Up <i>yqiL</i> -Dn	TTG ATT CAC CAG CGC GTA TTG TC AGG TAT CTG CTT CAA TCA GCG ATC GGA AAT CCT ATT TCA CAT TC GGT GTT GTA TTA ATA ACG ATA TC CTA GGA ACT GCA ATC TTA ATC C TGG TAA AAT CGC ATG TCC AAT TC ATC GTT TTA TCG GGA CCA TC TCA TTA ACT ACA ACG TAA TCG TA GTT AAA ATC GTA TTA CCT GAA GG GAC CCT TTT GTT GAA AAG CTT AA TCG TTC ATT CTG AAC GTC GTG AA TTT GCA CCT TCT AAC AAT TGT AC CAG CAT ACA GGA CAC CTA TTG GC CGT TGA GGA ATC GAT ACT GGA AC	570 536 576 488 575 475 598	MLST	Enright, 2000
cA1 cA2 cA3 cB	AAC CTA TAT CAT CAA TCA GTA CGT TAA AGG CAT CAA TGC ACA AAC ACT AGC TCA AAA GCA AGC AAT AGA AT ATT GCC TTG ATA ATA GCC TTC T	695 937 1.791	Tipado del complejo <i>ccr</i> 1,2 y 3 del <i>SCCmec</i>	Lim, 2003
mA ROrf2	ACC AAA CCC GAC AAC TAC AAC GGA CAA CTT AAG CCA GGG TA	1.005	Tipado complejo <i>mec</i> clase B	Lim, 2003

Tabla 9. Cebadores utilizados para este trabajo (continuación).

Cebador	Secuencia de oligonucleótidos (5'-3')	Tamaño producto PCR (pb)	Uso	Referencia
ccrC-F2	GTA CTC GTT ACA ATG TTT GG	449	Tipado <i>ccr</i> 5 del SCC <i>mec</i>	Milheiroço, 2007b
ccrC-F2	GTA CTC GTT ACA ATG TTT GG			
J-IVa-F	ATA AGA GAT CGA ACA GAA GC	278	Subtipado SCC <i>mec</i> IV	Milheiroço, 2007a
J-IVa-R	TGA AGA AAT CAT GCC TAT CG	483		
J-IVc-F	CCA TTG CAA ATT TCT CTT CC			
J-IVc-R	ATA GAT TCT ACT GCA AGT CC	663		
J-IVh-F	TTC CTC GTT TTT TCT GAA CG			
J-IVh-R	CAA ACA CTG ATA TTG TGT CG			
mecA-F	GTG AAG ATA TAC CAA GTG ATT	147	Detección <i>mecA</i>	Zhang, 2005
mecA-R	ATG CGC TAT AGA TTG AAA GGA T			
nuc-1	GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT	270	Detección <i>nuc</i>	Brakstad, 1992
nuc-2	AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC			
lukPV-1	ATC ATT AGG TAA AAT GTC TGG ACA TGA TCC A	433	Detección LPV	Lina, 1999
lukPV-2	GCA TCA AST GTA TTG GAT AGC AAA AGC			
arcA-F	GAG CCA GAA GTA CGC GAG	724	Detección ACME	Diep, 2006b
arcA-R	CAC GTA ACT TGC TAG AAC GAG			
cfr-F	TGA AGT ATA AAG CAG GTT GGG AGT CA	746	Detección <i>cfr</i>	Kehrenberg, 2006
cfr-R	ACC ATA TAA TTG ACC ACA AGC AGC			
fexA-F	GTA CTT GTA GGT GCA ATT ACG GCT GA	1.272	Detección <i>fexA</i>	Kehrenberg, 2006
fexA-R	CGC ATC TGA GTA GGA CAT AGC GTC			
TetK-F	CCT GGA ATT ACA AAC TGG GT	1.080	Detección <i>tet(K)</i>	Jones, 2006
TetK-R	CCT CCT ACA ATT GCT ATA CC			
TetM-F	GGA GCG ATT ACA GAA TTA GG	1.780	Detección <i>tet(M)</i>	Jones, 2006
TetM-R	CGG GTC TGG CAA ACA GGT T			
TetL-F	CCT GTT CCC TCT GAT AAA	1.051	Detección <i>tet(L)</i>	Pang, 1994
TetL-R	CAA ACT GGG TGA ACA CAG			
ANT4-F	CTG CTA AAT CGG TAG AAG C	173	Detección <i>ant(4)-Ia</i>	Vanhoof, 1994
ANT4-R	CAG ACC AAT CAA CAT GGC ACC			
dfrK-F	GCT GCG ATG GAT AAT GAA CAG	214	Detección <i>dfrK</i>	Feßler, 2010
dfrK-R	GGA CGA TTT CAC AAC CAT TAA AGC			
vgaC-F	CCG TAT GCC CAG AGT GAG AT	671	Detección <i>vgaC</i>	Feßler, 2010
vgaC-R	TGC TTG GGA ACA AGT CCT TC			
23S-F	TGG GCA CTG TCT CAA CGA	634	ARNr 23S	Tsiodras, 2001
23S-R	GGA TAG GGA CCG AAC TGT CTC			

4.2 Características de los centros sanitarios

Hospital Universitari Son Dureta

El antiguo Hospital Universitari Son Dureta (HUSD) era un hospital terciario con aproximadamente 800 camas, que a su vez era el hospital de referencia de la residencia geriátrica Bonanova y el centro asistencial de referencia de las Islas Baleares. A mediados de diciembre del 2010 cesó su actividad, trasladándose a las instalaciones del nuevo Hospital Universitari Son Espases (HUSE), con el mismo personal y similar estructura asistencial.

El HUSD estaba compuesto por dos pabellones de hospitalización separados, aunque situados en el mismo recinto: el edificio de hospitalización general (A) y el hospital materno-infantil (B), además de un edificio de “Consultas” (K) (**figura 23**).

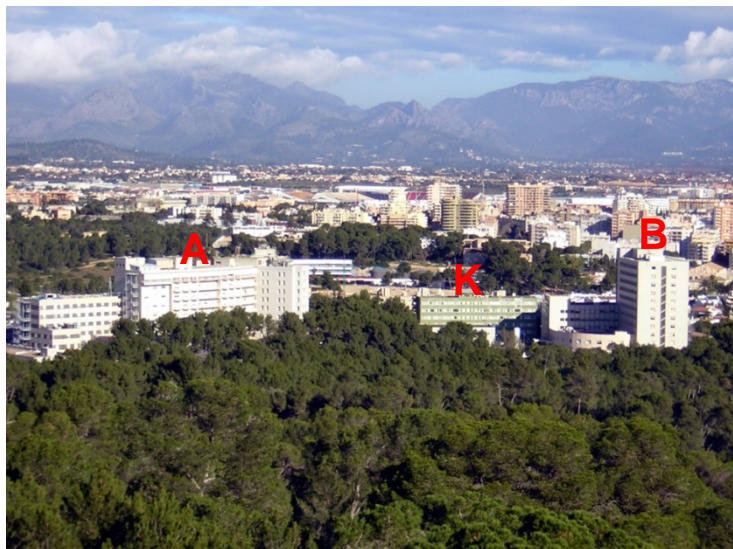


Figura 23. Hospital Universitari Son Dureta, con los tres edificios: Hospitalización general (A), Maternal (B) y Consultas (K) (Foto obtenida en www.datuopinion.com).

La UCI del HUSD estaba situada en la séptima (y última) planta del edificio de hospitalización general “A”. Disponía de 30 camas, repartidas en 5 unidades: Coronaria, Médica, Quirúrgico-Traumatológica, Neurocrítica y Cirugía Cardíaca.

Hospital Universitari Son Espases

El **Hospital Universitari Son Espases** (HUSE) se inauguró en diciembre 2010. Ocupa una superficie edificada de más de 172.000 m² (aproximadamente dos veces y media más que el HUSD), tiene una capacidad de 1.020 camas de hospitalización, 26 quirófanos, 107 camas de cuidados intensivos, además de áreas de urgencias y consultas (**figura 24**).



Figura 24. Hospital Universitari Son Espases.

Este hospital atiende una población de 330.000 habitantes del Sector Ponent de Palma que incluye los municipios de Esporles, Banyalbufar, Estellencs, Valldemossa, Andratx, Calvià, Sóller, Fornalutx y Deià. Además, es el hospital de referencia para toda la población de las Illes Balears.

Hospital Son Llàtzer

El **Hospital Son Llàtzer** (HSL) es un hospital terciario inaugurado en 1988. Está situado en Palma de Mallorca, con 377 camas. Atiende a una población de 262.713 habitantes del Sector Llevant de Palma y de los municipios de Marratxí, Lluçmajor, Algaida, Santa Maria, Bunyola, Santa Eugènia, Sóller, Fornalutx y Deià. La UCI del HSL es una unidad médico-quirúrgica con 18 camas.

Resto de hospitales participantes de Mallorca

El Hospital de Manacor (HM) es un hospital comarcal con 232 camas, situado en el levante de la isla de Mallorca, a unos 50 km de Palma. Se inauguró en 1997. Proporciona cobertura a 143.460 habitantes de los municipios de Manacor, Campos, Villafranca, Santanyi, Felanitx, Son Servera, Artà y Capdepera.

El Hospital General (HG) y Hospital Joan March (HJM) son dos centros de larga estancia y de perfil sociosanitario. Ambos hospitales remitían las muestras de los cultivos al laboratorio de Microbiología del HSLL en el momento del estudio.

Residencia geriátrica Bonanova

La Residencia mixta de Pensionistas “Bonanova” de Palma de Mallorca es el mayor centro geriátrico en Mallorca, con 552 camas (252 plazas para residentes válidos y 300 para asistidos) y tiene al hospital HUSD-HUSE como centro de referencia. Se divide en dos áreas funcionales diferenciadas pero comunicadas, una para pacientes asistidos (pisos 1-4) y otra para residentes válidos (pisos 7-9) (**figuras 25 y 26**). Es de titularidad pública, gestionada por el *Institut Mallorquí d’Afers Socials* del Consell de Mallorca. Los criterios de ingreso son el ser mayor de 60 años y pensionista de la Seguridad Social. Dispone de un área de atención a personas con demencia. El servicio médico propio del centro estaba compuesto en el momento del estudio por tres médicos en turno de mañana, otro facultativo por las tardes, además de un médico de guardia cada sábado. Dispone de los correspondientes servicios de enfermería.



Figuras 25-26. Diferentes aspectos de la Residencia Bonanova.

A lo largo del estudio aquí presentado, los residentes estaban acomodados en habitaciones con una o dos camas. Los cultivos para el cribado de portadores de SARM no se realizaban de forma rutinaria, ni se habían aplicado tratamientos para descolonización de SARM. El aislamiento de los pacientes infectados por SARM se aplicó ocasionalmente, especialmente en el caso de infecciones respiratorias. No se denegaba el ingreso en la residencia de personas que eran portadoras de SARM.

4.3 Diseño de los estudios epidemiológicos

4.3.1 Epidemiología molecular de SARM en el HUSD-HUSE

A partir de los registros microbiológicos, se documentaron todos los pacientes con aislamiento de SARM en muestras clínicas que ingresaron en el HUSD-HUSE, o bien que acudieron a Urgencias o a las Consultas Externas de dicho hospital, durante cuatro períodos de tiempo no consecutivos: junio 1999-diciembre 2000, julio 2002-junio 2004 ([Ruiz de Gopegui, 2005](#); [Alcoceba, 2007](#)), enero-diciembre 2008 ([Ruiz de Gopegui, 2009](#)) y septiembre 2012-febrero 2013.

Se incluyó un solo aislado de SARM por paciente para realizar los estudios de sensibilidad y de epidemiología molecular. Se excluyeron las cepas aisladas de cultivos de vigilancia del estado de portador (exudados nasales, axilares o inguinales), así como las muestras con SARM de pacientes procedentes de centros de salud o de residencias geriátricas.

Asimismo, se comparó la epidemiología molecular de los aislados de SARM detectados en el HUSD con la de los otros hospitales públicos de la isla. Para ello, se documentaron todos los pacientes con aislamiento de SARM en muestras clínicas atendidos en alguno de los cinco hospitales públicos existentes en el momento (HUSD, HSSL, HM, HG y HJM), durante el período comprendido entre enero 2003 y junio 2004. También en este caso se incluyó un único aislado de SARM por paciente, a excepción de 10 pacientes que ingresaron en dos hospitales diferentes a lo largo de dicho período, por lo que se incluyó el primer aislado detectado en cada uno de los dos ingresos ([Alcoceba, 2007](#)).

Tras la identificación de los aislados de *S. aureus* y el estudio de sensibilidad, se congelaron a -70°C para la realización posterior de los diversos estudios de epidemiología molecular (ver más adelante).

En todos los episodios de infección por SARM, se recogió información de los pacientes en una hoja de cálculo Excel, que incluía la edad, el sexo, el tipo de muestra, la fecha de la muestra, el servicio hospitalario del ingreso y el antecedente de SARM previo.

4.3.2 Estudio de prevalencia de SARM en la Residencia Bonanova

Se tomó un exudado nasal a todos los residentes ingresados en la Residencia “Bonanova” que aceptaron participar en este estudio, coincidiendo con la campaña de vacunación de la gripe, entre el 18 de octubre y el 21 de noviembre del 2005. Adicionalmente, se recogió un exudado cutáneo a los residentes que tuvieran algún tipo de úlcera o herida cutáneas. La recogida de los exudados nasales y de los exudados cutáneos de úlcera del estudio de prevalencia inicial la llevó a cabo el personal de enfermería o médico del centro.

En aquellos residentes incluidos en el estudio, el equipo médico del centro cumplimentó un formulario prefijado con los datos clínicos para determinar los factores de riesgo de colonización, que incluían el índice de co-morbilidad de Charlson ([Charlson, 1987](#)) y grado de dependencia medido con el índice de Barthel ([Mahoney, 1965](#)). La totalidad de los parámetros recopilados en los residentes participantes se muestra en la **tabla 10** de la página siguiente.

Asimismo, se llevó a cabo un seguimiento clínico y de la colonización nasal por *S. aureus* al cabo de 8 meses (julio 2006), 1 año (noviembre 2006) y 18 meses (mayo 2007), tanto en los pacientes colonizados por SARM (“casos”) como en un grupo de residentes que no estaban colonizados por SARM durante el estudio inicial (“controles”). El grupo control estaba compuesto por el mismo número de pacientes que los residentes colonizados por SARM (“casos”), seleccionados al azar de entre los residentes que no habían estado colonizados por SARM durante el estudio inicial. La información recopilada durante el seguimiento (a los 8, 12 y 18 meses) fue la presencia de úlceras de decúbito, los ingresos hospitalarios, el consumo de antibióticos y las infecciones clínicas. Las muestras de los exudados nasales durante el seguimiento fueron obtenidas, en su mayor parte, por el doctorando de esta tesis.

Durante el período de 18 meses no se realizó cambios en los protocolos para el control de infección en la residencia, ni se aplicaron tratamientos de descolonización nasal en los residentes colonizados por SARM detectados en el estudio.

Tabla 10. Variables clínicas recogidas en el estudio de prevalencia de SARM en residencias geriátricas.

Variable	Opciones de respuesta
Edad	
Sexo	Varón, mujer
Fecha de ingreso en la residencia	
Procedencia	Hospital agudos, domicilio, otros geriátricos
Estancia previa geriátricos	Sí, No
Ingreso previo hospitalario (últimos 5 años)	Sí, No
Nº de ingresos hospitalarios en los últimos 5 años	
Co-Morbilidad (índice de Charlson):	
Infarto de miocardio (1)	Sí, No
Insuficiencia cardiaca congestiva (1)	Sí, No
Enfermedad vascular periférica (1)	Sí, No
Demencia (1)	Sí, No
Enfermedad pulmonar crónica (1)	Sí, No
Enfermedad ulcerosa (1)	Sí, No
Enfermedad hepática leve (1)	Sí, No
Diabetes mellitus (1)	Sí, No
Hemiplejia (2)	Sí, No
Enfermedad renal moderada o severa (2)	Sí, No
Diabetes con afectación órgano diana (2)	Sí, No
Cualquier tumor (2)	Sí, No
Leucemia (2)	Sí, No
Linfoma (2)	Sí, No
Enfermedad hepática severa (3)	Sí, No
Tumor sólido metastásico (6)	Sí, No
SIDA (6)	Sí, No
Grado de dependencia (índice de Barthel):	
Alimentación	Incapaz, ayuda, independiente
Baño	Dependiente, independiente
Higiene	Dependiente, independiente
Deposiciones	Incontinente/enemas, incontinencia ocasional, continente
Orina	Incontinente, incontinencia ocasional, continente
Uso lavabo	Dependiente, necesita ayuda, independiente
Tranferencia cama/silla	Incapaz, ayuda directa, ayuda mínima, independiente
Movilidad (superficies)	Inmóvil, dependiente de silla, camina con ayuda, independiente
Escaleras	Incapaz, necesita ayuda, independiente
Factores de riesgo extrínsecos:	
Úlceras de decúbito	Sí, No
Otras lesiones cutáneas	Sí, No
Sonda nasogastrica	Sí, No
Gastrostomía-yeyunostomía alimentación	Sí, No
Sonda urinaria	Sí, No
Catéter vascular actual	Sí, No
Tratamiento antibiótico actual	Sí, No
Tratamiento antibiótico previo último mes	Sí, No
Cultivo previo positivo para SARM	Sí, No

Definiciones de portadores nasales de SARM

Se definió portador nasal de SARM como la detección de SARM en los cultivos de los exudados nasales. Se clasificó el estado de persistencia nasal, siguiendo los criterios estrictos del CDC, en dos tipos: a) portador persistente (todos los cultivos nasales recogidos fueron positivos para SARM; y b) portador intermitente (al menos, un cultivo nasal fue positivo para SARM, pero no todos) (Stone, 2012).

Procesamiento de las muestras recogidas en la Residencia Bonanova

Los exudados nasales y de úlcera se recogieron empleando un escobillón estéril de rayón con medio de transporte de Amies (Copan Venturi Transystem®, Italia). Las muestras fueron remitidas al Servicio de Microbiología del HUSD en un plazo máximo de 24 h.

Los escobillones se sembraron en una placa de agar manitol salado (medio de Chapman, Oxoid, Basingstoke, Reino Unido). Las placas se incubaron a 35°C durante 48 h y se leyeron a las 24 y 48 h. En aquellas colonias de color amarillo o dorado (fermentadoras del manitol, lo que es sugestivo de *S. aureus*, aunque otras especies de estafilococos también pueden fermentarlo, **figura 27**), se realizó una resiembra en una placa de agar sangre de cordero.



Figura 27. Agar manitol salado tras 48 h de incubación. A: colonias de *S. aureus* (amarillas, fermentadoras del manitol); B: colonias de estafilococos coagulasa negativa (blancas, no fermentadoras).

4.3.3 Estudio de caracterización de un plásmido de multirresistencia

En agosto del 2010 se detectaron dos aislados de SARM, también resistentes a la linezolid, clindamicina, cloranfenicol, tetraciclina, tobramicina y al ciprofloxacino. Las dos cepas se aislaron en distintas muestras de esputo y de exudados nasales de dos pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) que estaban ingresados en el Servicio de Neumología del HUSD. Curiosamente, ambos habían recibido tratamiento con linezolid en 2009 por otra infección respiratoria por SARM. Aunque los dos pacientes habían estado ingresados en la misma unidad durante el mismo período, no se constató que hubieran compartido habitación. Adicionalmente, en septiembre 2010 se detectó un aislado de *S. epidermidis* con el mismo patrón de resistencia en un catéter de otro paciente que procedía de la UCI.

En los dos aislados previos de SARM sensibles a la linezolid y en los dos subsiguientes, resistentes a este antibiótico, se realizó el estudio de sensibilidad y se determinó la relación clonal entre ellos. Se efectuaron diversas PCR para el tipado del *SCCmec*, detección de los genes codificantes de LPV, así como para la detección de algunos genes de resistencia: *cfr* (resistencia a la linezolid, cloranfenicol, clindamicina, pleuromutilinas, estreptogramina A y macrólidos de 16 miembros), *ant(4')-Ia* (también conocido como *aadD*, resistencia a la tobramicina), *tet(L)*, *tet(K)*, *tet(M)* (resistencia a la tetraciclina), *dfrrK* (resistencia a la trimetoprima), *fexA* (resistencia al cloranfenicol) y *vgaC* (resistencia a las pleuromutilinas, lincosamidas y estreptogramina A).

Asimismo, se comprobó si dicho plásmido era conjugativo, se determinó de forma aproximada el tamaño del mismo y se secuenció parcialmente, de acuerdo con los métodos que se detallan más adelante.

4.3.4 Epidemiología molecular de *S. hominis* resistente a la linezolid

A partir de marzo del 2008, se detectaron en el HSLL y posteriormente en el HUSD, los primeros aislados de *Staphylococcus hominis* resistentes a la linezolid y a la teicoplanina. La mayoría de estas cepas se aislaron a partir de hemocultivos.

Se llevó a cabo un trabajo con el fin de investigar el mecanismo de resistencia a la linezolid y la epidemiología molecular de los aislados de *S. hominis* resistentes a la linezolid detectados en ambos hospitales en el período comprendido entre marzo 2008 hasta febrero 2009 ([Ruiz de Gopegui, 2011](#)).

4.4 Procedimientos de identificación

4.4.1 Identificación de los aislados de *S. aureus*

La identificación inicial de los aislados de *S. aureus* se realizó mediante métodos convencionales: aspecto de la colonia, una reacción de catalasa positiva y una aglutinación de látex positiva para la detección del factor de agregación (Dryspot Staphylect Plus®, Oxoid, Reino Unido). La identificación definitiva de *S. aureus* se basó en una prueba positiva de DNAasa (Oxoid, Reino Unido) (Becker, 2011).

4.4.2 Identificación de los aislados de *S. hominis*

Los aislados de *S. hominis* procedentes del HSSL o del HUSD se identificaron mediante la tarjeta GP del sistema Vitek® 2 (bioMérieux, Francia), en el caso del HSSL, o bien, con la galería API® ID 32 STAPH (bioMérieux, Francia) en el HUSD.

Para confirmar la identificación de *S. hominis* se realizó, en la Unidad de Secuenciación del HUSD, una amplificación del gen ARNr 16S en un aislado de *S. hominis* resistente a la linezolid. Para ello se usaron los cebadores 27F y 907R (Lane, 1991). Posteriormente se realizó un estudio de secuenciación de dicho gen utilizando los cebadores 27F y 519R (Lane, 1991). Para el análisis de las secuencias se consultaron las bases de datos del *Genbank* y del *Ribosomal Database Project*. La secuencia de los cebadores empleados se muestra en la **tabla 9** del apartado 4.1.

4.5 Métodos de sensibilidad antimicrobiana

4.5.1 Aislados de SARM del HUSD-HUSE

Se determinó el perfil de sensibilidad antibiótica mediante el método de difusión con discos (Neo-Sensitabs, Rosco, Taastrup, Dinamarca) a los siguientes antibióticos: penicilina, oxacilina, cefoxitina, eritromicina, clindamicina, ciprofloxacino, gentamicina, cotrimoxazol, rifampicina, vancomicina, teicoplanina, mupirocina y ácido fusídico. Desde 2008, se incluyeron también la tetraciclina, tobramicina y linezolid. Las placas

de agar Mueller-Hinton se incubaron a 30°C durante 24 h y la lectura se realizó siguiendo los criterios del CLSI (CLSI, 2012) (figura 28).



Figura 28. Antibiograma por el método de difusión con discos.

Los discos de eritromicina y clindamicina se colocaron en la placa a una distancia de 15 mm (borde a borde), con el fin de detectar la inducción de la resistencia a la clindamicina. Se detectaron cuatro fenotipos de resistencia: a) resistencia a la eritromicina y clindamicina (fenotipo MLS_B constitutivo); b) resistencia a la eritromicina y sensibilidad a la clindamicina, pero con achatamiento en el halo de clindamicina próximo al de eritromicina (fenotipo MLS_B inducible); c) resistencia a la eritromicina y sensibilidad a la clindamicina sin achatamiento (fenotipo M); d) sensibilidad a ambos antibióticos (figura 29).

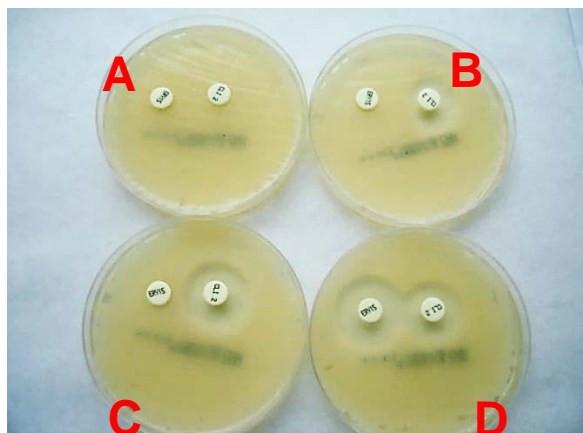


Figura 29. Técnica de difusión con doble disco. A: fenotipo MLS_B constitutivo, B: fenotipo MLS_B inducible, C: fenotipo M, D: sensibles a la eritromicina y clindamicina.

4.5.2 Aislados de SARM de la residencia geriátrica

Inicialmente en los aislados de *S. aureus*, detectados en los exudados nasales y de úlcera de los residentes geriátricos, se determinó la resistencia a la oxacilina mediante el método de difusión con un disco de oxacilina en una placa de agar Mueller-Hinton. Las placas de agar Mueller-Hinton se incubaron a 30°C durante 18-24 h. La lectura se realizó siguiendo los criterios del CLSI (CLSI, 2012).

Para la confirmación de la resistencia a la oxacilina, se determinó la CMI de la oxacilina mediante una tira de E-test® (AB Biodisk, Solna, Suecia) en una placa de agar Mueller-Hinton. Las placas de agar Mueller-Hinton se incubaron a 30°C durante 24 h y la lectura se realizó también siguiendo los criterios del CLSI (CLSI, 2012).

En los aislados de *S. aureus* con resistencia comprobada a la oxacilina (SARM) se determinó el perfil de sensibilidad mediante el método de difusión con discos (Neo-Sensitabs, Rosco, Dinamarca) a los siguientes antibióticos: cefoxitina, eritromicina, clindamicina, ciprofloxacino, gentamicina, tobramicina, tetraciclina, cloranfenicol, cotrimoxazol, vancomicina, teicoplanina, mupirocina y ácido fusídico.

4.5.3 Aislados de SARM resistentes a la linezolida

Se determinó la CMI de la cepa de SARM resistente a la linezolida del paciente 1, de la cepa de *S. aureus* ATCC® 29213 resistente a la rifampicina y del derivado transconjugante para una serie de antibióticos. Se utilizó las tiras de E-test® (bioMérieux, Francia) para la penicilina, oxacilina, eritromicina, clindamicina, ciprofloxacino, trimetoprim-sulfametoxazol (cotrimoxazol), vancomicina, teicoplanina, daptomicina, tigeciclina, tetraciclina, linezolida y tobramicina. Se empleó la microdilución en caldo manual para la gentamicina, cloranfenicol y rifampicina. Para la interpretación, se siguieron los criterios del CLSI (CLSI, 2012).

4.5.4 Aislados de *S. hominis* resistentes a la linezolida

El estudio de sensibilidad inicial de los aislados de *S. hominis* resistentes a la linezolida se realizó con la tarjeta Vitek® 559 (bioMérieux, Francia, en los aislados del HSSL) o por disco-difusión (Rosco, Dinamarca, en los aislados del HUSD), en ambos casos según las recomendaciones del CLSI (CLSI, 2012). Posteriormente, se

determinó la CMI de los aislados de *S. hominis* resistentes mediante tiras de E-test® (bioMérieux, Francia) para los siguientes antimicrobianos: oxacilina, eritromicina, clindamicina, ciprofloxacino, cotrimoxazol, vancomicina, teicoplanina, daptomicina y linezolid. Se consideraron también los puntos de corte definidos por el CLSI (CLSI, 2012).

4.6 Análisis de la clonalidad

4.6.1 Electroforesis en campo pulsado

La relación clonal de los aislados de SARM, así como de los aislados de *S. hominis* resistentes a la linezolid, se determinó mediante un gel de electroforesis en campo pulsado (ECP). El protocolo seguido para la ECP se detalla en el **Anexo 1**.

4.6.2 Multilocus sequence typing (MLST)

El MLST consiste en el análisis mediante secuenciación del ADN de fragmentos internos de siete genes *housekeeping* (metabólicos), de aproximadamente 500 pb (Maiden, 1998). Los siete genes *housekeeping* utilizados para tipificar las cepas de *S. aureus* son: *arcC* (carbamato cinasa), *aroE* (shikimato deshidrogenasa), *glpF* (glicerol cinasa), *gmk* (guanilato cinasa), *pta* (fosfato acetiltransferasa), *tpi* (triosafosfato isomerasa), *yqiL* (acetil coenzima A acetiltransferasa) (Enright, 2000).

Se llevó a cabo una extracción del ADN total de 3 cepas de SARM de cada uno de los distintos subtipos de la ECP. Posteriormente, se realizó siete reacciones de PCR independientes, para cada uno de los siete genes *housekeeping* utilizados.

La amplificación se efectuó con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min; seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 min, hibridación a 55°C durante 1 min y extensión a 72°C durante 1 min; para finalizar con una extensión a 72°C durante 10 min (Enright, 2000). Tras la PCR, se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, con posterior tinción con bromuro de etidio para la detección de los amplicones. En la **figura 30** se muestra los patrones de banda de dos cepas de SARM junto a un control negativo para las siete reacciones de PCR del MLST.

Tras comprobar la obtención de bandas, se procedió a purificar los productos amplificados mediante el sistema comercial QIAquick® PCR Purification Kit (QIAGEN, Hilden, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. La elución final tuvo lugar con 30 µL de agua destilada.

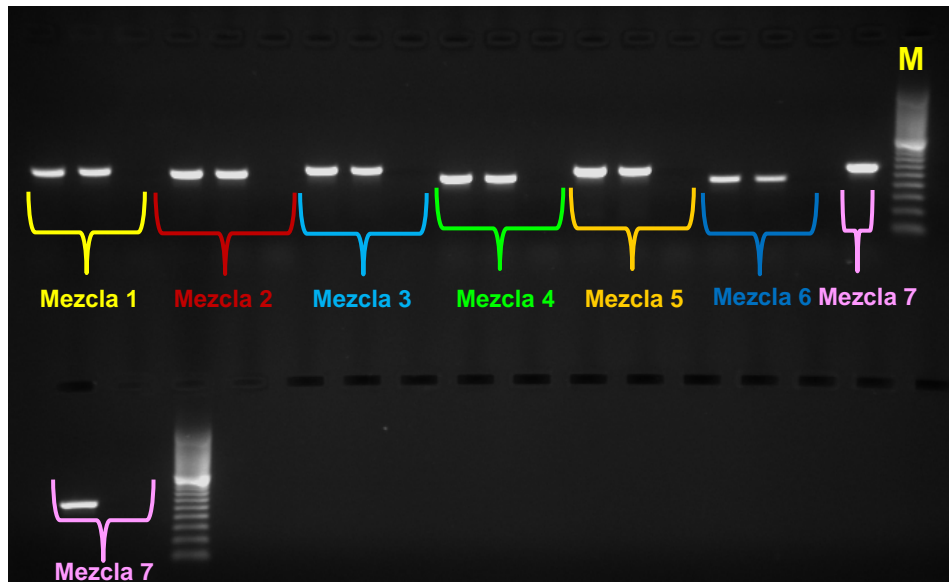


Figura 30. Electroforesis para MLST de dos cepas de SARM junto con un control negativo. En los extremos se encuentra el marcador de peso molecular (100-1000 pb).

Tras la purificación de los amplicones, se realizó la secuenciación de los mismos en la Unidad de Secuenciación del HUSD-HUSE. Para el análisis de las curvas de las secuencias obtenidas se utilizó el programa Chromas 2.33 (Technelysium Pty Ltd, Australia).

Una vez obtenidas las siete secuencias de las cepas estudiadas, se compararon con las secuencias almacenadas en la página web <http://saureus.mlst.net/>. Para ello, en la opción “Locus Query”, “Single Locus” de esta página web, se introdujo la secuencia de nucleótidos del fragmento del gen amplificado. Se obtuvo así el número del alelo correspondiente. Posteriormente, en “Profile Query”, “Allelic”, se escribió los números de los siete alelos de cada cepa tipada, obteniéndose el **secuenciotipo (ST)** para cada uno de los diferentes perfiles alélicos.

4.7 Técnicas de amplificación genética por PCR

4.7.1 Extracción del ADN

Los aislados de SARM, previamente congelados, fueron subcultivados en una placa de agar sangre de cordero incubada a 35°C durante 18-24 h.

Se realizó una extracción del ADN en todos los aislados de SARM usando indistintamente los *kit* comerciales DNeasy® Blood & Tissue Kit, o bien, el QIAamp® DNA Mini kit (ambos de Qiagen, Hilden, Alemania).

Brevemente, se colocó en un tubo cónico tipo *ependorf* de 1,5 mL, 180 µL del tampón ATL, añadiéndose 1-2 colonias de estafilococos y 20 µL de proteinasa K. Los tubos se incubaron en un termobloque a 56°C durante aproximadamente 1 h. Posteriormente, se añadió a cada tubo 200 µL de tampón de lisis AL, incubándose en un termobloque a 70°C durante 10 min. A continuación, se añadió a cada tubo 200 µL de etanol absoluto, colocándose el contenido de cada tubo en una columna de QIAGEN. Tras dos centrifugaciones con dos tampones distintos (AW1 y AW2), se realizó la elución con 75 µL de agua destilada. Se guardó el eluido, tras su centrifugación, congelado a -20°C.

4.7.2 Amplificación y detección del ADN

Todas las PCR para el tipado de SARM y detección de los genes de resistencia se realizaron con el termociclador 2720 de Applied Biosystems (Foster City, EE.UU.). Tras las PCR, se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, con posterior tinción con bromuro de etidio para la detección de los diferentes amplicones.

En la **tabla 9** del apartado 4.1 se especifica la secuencia de nucleótidos de cada uno de los cebadores empleados en las diferentes reacciones de amplificación junto con el tamaño (en pares de bases) de los productos amplificados. La composición de las mezclas de reacción se encuentra en el **Anexo 1**.

4.7.3 PCR del casete cromosómico SCC mec (tipos I-IV)

Una de las técnicas para el tipado del SCC mec se basa en la amplificación mediante PCR de un fragmento del complejo del gen *ccr* y de otro fragmento del

complejo del gen *mec* (Ito, 2001). Este es el método empleado en todas las cepas de SARM, tanto en las procedentes de la Residencia “Bonanova” como, a partir del 2008, en las detectadas en el HUSD-HUSE.

Así, en cada aislado de SARM se realizó una PCR múltiple que amplifica un fragmento del complejo del gen *ccr* de los tipos 1, 2 y 3. El gen *ccr* tipo 1 (cebadores cA1 y cB) es específico del SCC*mec* tipo I, el *ccr* tipo 2 (cebadores cA2 y cB) está presente en el SCC*mec* tipo II y SCC*mec* tipo IV, mientras que el *ccr* tipo 3 (cebadores cA3 y cB) es específico del SCC*mec* tipo III (Lim, 2003) (tabla 11). Posteriormente, se excluyó de la mezcla de reacción el cebador cA3, debido a la inexistencia en nuestro medio del SCC*mec* tipo III, demostrada por la experiencia a lo largo del estudio.

Tabla 11. Principales tipos de SCC*mec* (IWG-SCC, 2009) y cebadores utilizados en este trabajo (Ito, 2001; Lim, 2003; Milheiriço, 2007b).

Tipo de SCC <i>mec</i>	Complejo del gen <i>ccr</i> ^a	Complejo del gen <i>mec</i>	Cebadores utilizados
I	1 (A1B1)	B	cA1 y cB
II	2 (A2B2)	A	cA2 y cB
III	3 (A3B3)	A	cA3 y cB
IV	2 (A2B2)	B	cA2 y cB
V	5 (C)	C2	ccrC-F2 y ccrC-R2

^aEntre paréntesis se indica los nombres de los genes del complejo *ccr*.

Se utilizaron como controles positivos una cepa representativa de los cuatro primeros tipos de SCC*mec*: clon Ibérico (ST247-MRSA-I), clon Nueva York/Japón (ST5-MRSA-II), clon Brasileño (ST239-MRSA-III) y clon EMRSA-15 (ST22-MRSA-IVh). El volumen de cada reactivo para la mezcla de reacción se detalla en el **Anexo 1**.

En aquellos aislados en los que detectó el *ccr* de tipo 2, para distinguir el casete SCC*mec* tipo II del SCC*mec* tipo IV (ambos con *ccr* tipo 2), se realizó otra PCR que amplifica un fragmento del complejo *mec* de clase B, presente en el SCC*mec* tipo IV (además del SCC*mec* tipo I). En la **figura 31** de la página siguiente se muestra esquemáticamente los dos tipos más importantes de complejo *mec* y los cebadores mA y ROrf2, utilizados para la detección del complejo *mec* de clase B (en SCC*mec* tipos I y IV). El volumen de cada reactivo de reacción se muestra en el **Anexo 1** del final del trabajo.

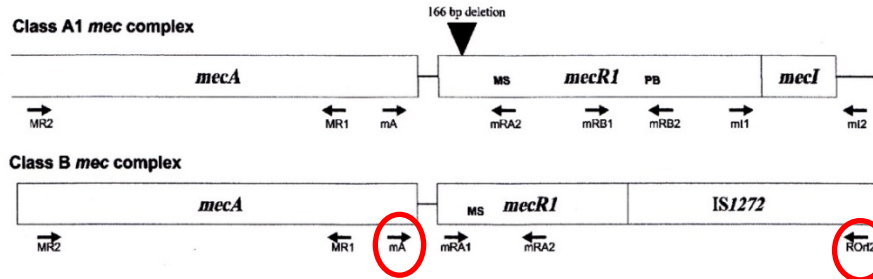


Figura 31. Diagrama esquemático de la región *mecA-mecR1-mecI*, mostrando la localización de los cebadores mA y ROrf2 (Lim, 2003).

Las condiciones para las dos PCR fueron: desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min; seguida de 10 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 45 seg, hibridación a 65°C durante 45 seg y extensión a 72°C durante 1,5 min; otros 25 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 45 seg, hibridación a 55°C durante 45 seg y extensión a 72°C durante 1,5 min; para finalizar con una extensión a 72°C durante 10 min (Zhang, 2005).

4.7.4 PCR del casete cromosómico SCCmec tipo V

En aquellos aislados de SARM en los que no se detectó SCCmec de los tipos I-IV, se realizó una PCR que amplificaba un fragmento del gen *ccrC*, específico del SCCmec tipo V (Anexo 1).

Las condiciones utilizadas en la PCR fueron desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min; seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 seg, hibridación a 53°C durante 30 seg y extensión a 72°C durante 1 min; para finalizar con una extensión a 72°C durante 10 min (Milheiriço, 2007b).

4.7.5 PCR para el subtipo del SCCmec tipo IV

En las cepas de SARM portadoras de SCCmec tipo IV, se realizó una PCR múltiple para el subtipo de dicho casete. En la mezcla de reacción se utilizaron seis cebadores para la amplificación de los subtipos IVa, IVc y IVh del SCCmec tipo IV, que son los subtipos más frecuentes detectados en España (Pérez-Vázquez, 2009; Vindel, 2009). Se utilizaron respectivamente como controles positivos respectivamente tres cepas de SARM de los clones ST8-MRSA-IVa (USA300), ST125-MRSA-IVc y ST22-MRSA-IVh (EMRSA-15). La mezcla de reacción utilizada se detalla en el Anexo 1.

La PCR se hizo con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min; seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 seg, hibridación a 48°C durante 30 seg y extensión a 72°C durante 2 min; para finalizar con una extensión a 72°C durante 10 min ([Milheiriço, 2007a](#)).

4.7.6 PCR de la LPV

En todas las cepas de SARM procedentes de la Residencia Bonanova se realizó una PCR múltiple, amplificando un fragmento de los genes *mecA* (resistencia a la meticilina) ([Zhang, 2005](#)), *nuc* (codificante de una nucleasa específica de *S. aureus*) ([Brakstad, 1992](#)) y *luk-PV* (productora de la LPV) ([Lina, 1999](#)). Se utilizó como control positivo la cepa de SARM 3922-04 (ST8-MRSA-IVc) productora de LPV (cedida por la Dra. Emilia Cercenado, Hospital Gregorio Marañón de Madrid) ([Cercenado, 2008](#)). Para los estudios efectuados a partir de 2008 de las cepas de SARM del HUSD-HUSE se realizó una PCR simple, utilizando únicamente cebadores para la detección de los genes productores de la LPV.

Las condiciones de la amplificación que se utilizaron fueron: desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min; seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 seg, hibridación a 55°C durante 30 seg y extensión a 72°C durante 1 min; con una extensión final a 72°C durante 10 min ([Lina, 1999](#)).

4.7.7 PCR del ACME

En todas las cepas de SARM detectadas desde 2008 en el HUSD-HUSE, se realizó una PCR que amplificaba un fragmento del gen *arcA*, codificante del ACME ([Diep, 2006b](#)). Se utilizó como control positivo una cepa de SARM perteneciente al clon USA300 y productora de LPV y de ACME (**tabla 7** de la página correspondiente). La mezcla de la reacción se detalla en el **Anexo 1** final.

Para la PCR, se utilizaron estas condiciones: desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min; seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 seg, hibridación a 55°C durante 30 seg y extensión a 72°C durante 1 min; con una extensión final a 72°C durante 10 min ([Goering, 2007](#)).

4.7.8 PCR del gen *cfr*

En los aislados de SARM, *S. epidermidis* y *S. hominis* resistentes a la linezolidina, así como en la cepa transconjugante de *S. aureus*, se realizó una PCR para la detección del gen *cfr*. Se utilizó como control positivo la cepa de SARM HC08, portadora de los genes *cfr* y *fexA* (cedida por la Dra. Carmen Betriu, Hospital Clínico San Carlos de Madrid) ([Morales, 2010](#)).

Las condiciones de esta PCR fueron: desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min; seguida de 34 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 min, hibridación a 48°C durante 2 min y extensión a 72°C durante 3 min; con una extensión final a 72°C durante 10 min ([Kehrenberg, 2006](#)).

4.7.9 PCR del gen *fexA*

En las cepas de SARM y *S. epidermidis* resistentes a la linezolidina, se realizó una PCR para el gen *fexA*, que codifica una bomba de expulsión que confiere resistencia al cloranfenicol ([Kehrenberg, 2004b](#)). Se usó como control positivo la cepa de SARM HC08 ([Morales, 2010](#)). La composición de la mezcla de la reacción es la misma que la referida para la PCR del gen *cfr* (ver **Anexo 1**).

La amplificación se realizó con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min; seguida de 34 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 min, hibridación a 58°C durante 2 min y extensión a 72°C durante 3 min; con una extensión final a 72°C durante 10 min ([Kehrenberg, 2006](#)).

4.7.10 PCR de los genes de resistencia a la tetraciclina

Para detectar los tres principales genes de resistencia a la tetraciclina en *S. aureus*, los genes *tet(K)*, *tet(M)* y *tet(L)*, se llevaron a cabo tres ensayos de PCR independientes en las cepas de SARM y *S. epidermidis* resistentes a la linezolidina, así como también en el derivado transconjugante. La composición de la mezcla de reacción se muestra en el **Anexo 1**.

Las condiciones del termociclador, para los genes *tet(K)* y *tet(M)*, fueron: desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min; seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 min, hibridación a 56°C durante 1 min y extensión a 72°C durante 1 min; con una extensión final a 72°C durante 10 min ([Jones, 2006](#)).

Respecto a la PCR para el gen *tet(L)*, se realizó una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min; seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 20 seg, hibridación a 45°C durante 30 seg y extensión a 72°C durante 2 min; con una extensión final a 72°C durante 10 min (Pang, 1994).

4.7.11 PCR del gen *ant(4')-Ia*

Se realizó una PCR para detectar el gen *ant(4')-Ia* (también conocido como *aadD*), que confiere resistencia a la tobramicina, amikacina, kanamicina y neomicina. Se llevó a cabo en las mismas cepas de SARM y *S. epidermidis* mencionadas anteriormente, incluyendo el transconjugante. Los volúmenes de los reactivos utilizados para la mezcla de reacción son los mismos que los ya referidos para el gen *cfr* (Anexo 1).

Las condiciones que se utilizaron para esta PCR fueron una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min; seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 20 seg, hibridación a 55°C durante 1 min y extensión a 72°C durante 50 seg; con una extensión final a 72°C durante 10 min (Schmitz, 1999).

4.7.12 PCR del gen *dfrK*

Se realizó una PCR para amplificar un fragmento del gen *dfrK* que produce resistencia a la trimetoprima (Feßler, 2010), en las mismas cepas de SARM en las que se efectuó la PCR de *cfr* y de los otros genes de resistencia ya mencionados. Las condiciones técnicas son las mismas que las ya referidas en el Anexo 1.

Para esta PCR, se emplearon las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min; seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 min, hibridación a 50°C durante 1 min y extensión a 72°C durante 1 min; con una extensión final a 72°C durante 10 min (Feßler, 2010).

4.7.13 PCR del gen *vga(C)*

En las cepas de SARM resistentes a la linezolidina se efectuó una PCR para detectar el gen *vga(C)*, que produce resistencia a la pleuromutilina, lincosamida y estreptogramina A. Los volúmenes de reactivos de la mezcla de la reacción fueron los mismos que las últimas PCR (Anexo 1).

Se emplearon estas condiciones: desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min; seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 min, hibridación a 58°C durante 1 min y extensión a 72°C durante 1 min; con una extensión final a 72°C durante 10 min (Feßler, 2010).

4.8 Estudio de las mutaciones en el gen ARNr 23S

4.8.1 Amplificación del dominio V del gen ARNr 23S

Para identificar las posibles mutaciones responsables de la resistencia a la linezolidina en *S. hominis*, se amplificó el dominio V del gen ARNr 23S en tres aislados de *S. hominis* sensibles a la linezolidina (todos fueron detectados en hemocultivos, uno procedente del HSL y dos del HUSD), y en cinco aislados de *S. hominis* resistentes a la linezolidina (tres del HSL y dos del HUSD). Los cebadores y la composición de la mezcla se detallan en los apartados correspondientes.

Para esta PCR, se efectuó una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min; seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 min, hibridación a 55°C durante 1 min y extensión a 72°C durante 1 min; extensión final a 72°C durante 10 min.

4.8.2 Secuenciación del dominio V del gen ARNr 23S

Tras la realización de la PCR del gen ARNr 23S, y tras comprobar la obtención de bandas en la electroforesis, se procedió a purificar los productos amplificados mediante el sistema comercial QIAquick® PCR Purification Kit (QIAGEN, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. La elución final se realizó con 30 µL de agua destilada.

Los productos de PCR purificados se secuenciaron en la Unidad de Secuenciación del HUSD. Una vez obtenidas las secuencias, se alinearon con las secuencias de oligonucleótidos del gen ARNr 23S de la cepa de referencia de *S. aureus* (número de acceso en GenBank X68425), utilizando el programa BLAST® (*Basic Local Alignment Search Tool*, NCBI). Para la numeración de los nucleótidos, se empleó la numeración en dicho gen para *E. coli* (número de acceso GenBank AF053966) (Tsiodras, 2001).

4.9 Caracterización del plásmido de multirresistencia

4.9.1 Conjugación del plásmido

Se realizó un experimento de conjugación para evaluar si el gen *cfr* se encontraba dentro de un plásmido y si dicho plásmido era conjugativo. Para ello se adaptó el protocolo descrito por Shore *et al.* (Shore, 2010a). Se usó como cepa donante el aislado de SARM resistente a la linezolid detectado en el primer paciente, mientras que como cepa receptora se empleó la cepa control de *S. aureus* ATCC® 29213 resistente a la rifampicina. El protocolo usado se describe a continuación.

Obtención de aislados de *S. aureus* resistentes a la rifampicina

- Se inocula una colonia de la cepa control de *S. aureus* ATCC® 29213 en un tubo cónico con 5 mL de caldo cerebro-corazón (**Brain-Heart Infusion**, BHI).
- Se incuba el tubo cónico *overnight* en estufa de agitación a 37°C.
- Al día siguiente, se inocula 1.000 µL del cultivo en medio líquido en 4 placas de agar BHI con rifampicina a una concentración de 20 µg/mL. La siembra se realiza de forma cuantitativa.
- Se incuban las placas de agar BHI con rifampicina en una estufa a 35°C durante 24-48 h.
- Transcurrido dicho período, habrán crecido en las placas de agar BHI con rifampicina algunas colonias de *S. aureus* resistentes a la rifampicina.
- Se realiza un pase de algunas colonias de *S. aureus* crecidas a varias placas de agar BHI con rifampicina, para comprobar su resistencia a la rifampicina.
- Estas colonias de *S. aureus* resistentes a la rifampicina se van a usar como receptoras en la conjugación. Se congelan algunas de ellas.

Protocolo de conjugación

Día 1

- Se preparan dos tubos cónicos tipo *Falcon* de 50 mL con 5 mL de caldo BHI.

- En el primer tubo, se inocula una colonia del aislado de SARM *cfr* positivo (donante).
- En el segundo tubo, se inocula una colonia del aislado de *S. aureus* ATCC® 29213 resistente a la rifampicina (receptor).
- Se incuban los dos tubos en estufa de agitación a 37°C, durante 16-18 h.

Día 2

- En 3 tubos cónicos tipo *ependorf* de 1,5 mL se inoculan:
 - Tubo 1: 500 µL del cultivo de la cepa donante + 500 µL del cultivo de la cepa receptora.
 - Tubo 2: 1.000 µL del cultivo de la cepa donante.
 - Tubo 3: 1.000 µL del cultivo de la cepa receptora.
- Se centrifugan los tres tubos en una microcentrífuga durante 3 min a máxima velocidad (13.000 rpm).
- Se decantan los tres tubos, desechando el sobrenadante. Se resuspende el *pellet* (sedimento) de cada tubo con la ayuda de una pipeta.
- Se coloca todo el *pellet* resuspendido de cada uno de los tubos en el centro de una placa de agar sangre (un botón), con lo que habrá 3 placas de agar sangre (una placa de agar sangre para cada uno de los tres tubos).
- Se incuban las tres placas de agar sangre en estufa durante 6-8 h.
- Transcurrido ese tiempo (6-8 h), con un asa de siembra, se coge todo el botón y se resuspende en un tubo cónico *ependorf* que contiene 1 mL de suero fisiológico (SF). Así, habrá 3 tubos *ependorf*: uno conteniendo el botón del donante, otro tubo con el botón del receptor y otro con el botón del donante-receptor, todos ellos resuspendidos en 1 mL de SF.
- Para la conjugación se preparan placas de:
 - Agar BHI con rifampicina a 20 µg/mL.
 - Agar BHI con cloranfenicol a 15 µg/mL.
 - Agar BHI con rifampicina a 20 µg/mL y cloranfenicol a 15 µg/mL.
- Se pipetea:
 - 100 µL del tubo de SF con la cepa “donante” (como control) en una placa de agar BHI cloranfenicol + rifampicina.
 - 100 µL del tubo de SF con la cepa “receptora” (como control) en una placa de agar BHI cloranfenicol + rifampicina.

- 100 µL del tubo de SF con las cepas “donante + receptora” (como control) en una placa de agar BHI rifampicina.
 - 100 µL del tubo de SF con las cepas “donante + receptora” (como control) en una placa de agar BHI cloranfenicol.
 - 100 µL del tubo de SF con las cepas “donante + receptora” en una placa de agar BHI cloranfenicol + rifampicina. Esto se repite en 9 placas, hasta acabar el 1 mL del SF con el “donante + receptor” resuspendido.
- Los 100 µL de los diversos cultivos resuspendidos en SF se siembran de forma cuantitativa, extendiéndolos bien a lo largo de la placa de agar BHI, con la ayuda de un asa de siembra.

Día 3

- De cada colonia que haya crecido en las diversas placas de agar BHI con cloranfenicol + rifampicina, sembradas a partir del tubo “donante + receptor”, se hace un antibiograma con un disco de ciprofloxacino. Sólo se inocula una sola colonia para el antibiograma.

La elección de ciprofloxacino se debe a que la resistencia a este antibiótico está mediada por mutaciones cromosómicas en los genes responsables de la síntesis de la ADN-girasa (principalmente *gyrA*) y de la topoisomerasa IV (principalmente *grlA* en estafilococos) (Rice, 2011). La cepa donante (SARM *cfr+*) es resistente al ciprofloxacino mientras que la cepa receptora (ATCC® 29213 resistente a la rifampicina) es sensible a este compuesto. Si en el agar BHI con cloranfenicol y rifampicina, tras haber inoculado las cepas donante y receptora juntas, crecen colonias de estafilococos y estas colonias fuesen **resistentes** al ciprofloxacino, no pueden ser transconjugantes, porque la resistencia a quinolonas, con alguna excepción, no es transmisible mediante plásmidos. Tampoco podrían ser cepas receptoras, puesto que esta cepa es sensible al ciprofloxacino, y además, no podría crecer en un agar con cloranfenicol. Así, las colonias de estafilococos **resistentes** al ciprofloxacino van a tratarse de la cepa donante (SARM *cfr+*) que se ha hecho resistente a la rifampicina. Por el contrario, las colonias de estafilococos que crezcan en agar BHI con cloranfenicol y rifampicina y fuesen **sensibles** al ciprofloxacino, no pueden ser cepas donantes, porque la cepa de SARM *cfr+* es resistente al ciprofloxacino; ni tampoco pueden ser cepas receptoras, porque no crecerían en un medio con cloranfenicol. Así que, probablemente, se tratarán de derivados transconjugantes.

Día 4

- Se lee la sensibilidad al ciprofloxacino. Las cepas conjugadas han de ser sensibles al ciprofloxacino. En nuestro caso, la gran mayoría de colonias (unas 25) fueron resistentes al ciprofloxacino y sólo una única colonia fue sensible a este compuesto.
- Tras la comprobación de la sensibilidad al ciprofloxacino, se determina la sensibilidad a los demás antibióticos.

Día 5

- Las colonias resultantes, si ha habido conjugación (los derivados “transconjugantes”), deben de ser resistentes a la linezolid, cloranfenicol, clindamicina (mediada por el gen *cfr*) y a la rifampicina; y sensibles a la oxacilina y al ciprofloxacino.
- Se realiza una extracción del ADN total seguida de una PCR para el gen *cfr*, para comprobar que el transconjugante posea este gen.
- En el caso de obtener una PCR positiva para el gen *cfr*, se congela la cepa transconjugante.
- Se realiza posteriormente una extracción del plásmido.

4.9.2 Extracción del ADN plasmídico

Se realizó una extracción del plásmido en dicho transconjugante, utilizando un protocolo modificado del *kit* comercial QIAGEN® Plasmid Midi kit (Qiagen, Alemania). Este protocolo se resume a continuación.

- Se preparan dos tubos cónicos tipo *Falcon* con 50 mL de caldo **Luria-Bertani** (LB) en cada uno.
- Se inocula una colonia del transconjugante en cada uno de los dos tubos. Se incuban durante 16-18 h en una estufa en agitación (hasta fase logarítmica media).
- Al día siguiente, se centrifugan los tubos a 6000 x *g* durante 15 min en una centrífuga refrigerada a 4°C.
- Se desecha el sobrenadante de los dos tubos. Se resuspende el *pellet* de uno de los tubos con 10 mL del *Buffer* P1, conteniendo 50 µg/mL de lisostafina (McDougal, 2010). Se coloca el cultivo resuspendido del primer tubo en el otro tubo, resuspendiendo también el *pellet* del otro tubo.

- Se añade 10 mL del *Buffer* P2. Se invierte el tubo varias veces. Se incuba el tubo a temperatura ambiente (15-25°C) durante 5 min.
- Se añade 10 mL del *Buffer* P3. Se invierte el tubo varias veces. Se incuba el tubo en hielo durante 20 min.
- Se centrifuga a $\geq 20.000 \times g$ durante 30 min a 4°C. Se recoge el sobrenadante que contiene el plásmido de ADN.
- Se centrifuga de nuevo a $\geq 20.000 \times g$ durante 15 min a 4°C. Se recoge el sobrenadante.
- Se equilibra una punta de QIAGEN, colocando en la columna 10 mL de *Buffer* QBT. Se deja que la columna se vacíe por gravedad del flujo.
- Se coloca el sobrenadante en la punta. Se deja que la resina se vacíe por gravedad.
- Se lava la columna con 30 mL de *Buffer* QC.
- Se eluye el ADN con 15 mL de *Buffer* QF.
- Se precipita el ADN eluido añadiendo 10,5 mL de isopropanol. Se mezcla.
- Se coloca el contenido en dos tubos de ultracentrífuga. Se centrifugan inmediatamente en una ultracentrífuga a $\geq 15.000 \times g$ durante 30 min a 4°C. Se decanta cuidadosamente el sobrenadante.
- Se lava el *pellet* de ADN con 5 mL de etanol al 70%.
- Se centrifuga en una ultracentrífuga a $\geq 15.000 \times g$ durante 10 min a 4°C. Se decanta cuidadosamente el sobrenadante.
- Se deja secar el *pellet* a temperatura ambiente durante 5 min.
- Se disuelve el ADN con agua destilada.
- Se coloca el contenido en un tubo cónico tipo *ependorf*.
- Se guarda el plásmido, congelado o en nevera.

4.9.3 Determinación del tamaño del plásmido

Se digirió el ADN del plásmido, extraído de la cepa transconjugante, con la enzima de restricción *EcoRI* (New England Biolabs, EE.UU.), incubando la mezcla ADN y enzima durante unas 3 h.

A continuación, se realizó una electroforesis en gel de agarosa del ADN plasmídico digerido con *EcoRI*, utilizando el fago λ DNA Hind III (New England Biolabs) como marcador de peso molecular. El tamaño aproximado del plásmido se determinó

mediante análisis del tamaño de los fragmentos de restricción, comparando el tamaño de las diversas bandas con las del fago λ DNA Hind III.

4.9.4 Clonación del plásmido

Para determinar la secuencia de nucleótidos del fragmento del plásmido portador de los cuatro genes de resistencia [los genes *cfr*, *tet(L)*, *ant-4'-Ia* y *dfrK*], se realizó una clonación del plásmido de multirresistencia en el vector pUCP24.

El plásmido pUCP24 es un vector de clonación que contiene tres genes: el gen *rep* (codifica una replicasa implicada en la integración y escisión del ADN), el gen *lacZ α* (codifica el α -péptido, uno de los dos componentes de la β -galactosidasa) y el gen *aacC1* (productor de la enzima gentamicina 1,3-acetiltransferasa, que confiere resistencia a este antibiótico) (Olsen, 1982).

Para el experimento de clonación, inicialmente se llevó a cabo una extracción (como ya se ha comentado) del plásmido de multirresistencia (posteriormente denominado pERGB) a partir de la cepa transconjugante. A continuación, se realizó una extracción del plásmido pUCP24 contenido en una cepa de *E. coli* XL1 Blue. Para esta última extracción se usó el *kit* comercial QIAGEN® Plasmid Mini kit (Qiagen, Alemania), protocolo explicado más adelante.

A continuación, se realizó una digestión de los plásmidos pERGB y pUCP24, utilizando *EcoRI* (New England Biolabs) como enzima de restricción. El plásmido pERGB posee múltiples puntos de restricción para esta enzima, como ya se comprobó previamente, al digerir este plásmido con *EcoRI* para evaluar el tamaño del mismo (explicado brevemente en el apartado anterior). Por el contrario, el pUCP24 posee un único punto de corte para esta enzima, que está situado dentro del gen *lacZ α* .

Posteriormente, se realizó la ligación (con ADN-ligasa, New England Biolabs), uniendo uno de los fragmentos del plásmido pERGB al gen *lacZ α* del vector pUCP24.

Los plásmidos resultantes de la clonación (pUCP24 ligado con un fragmento del pERGB) se transformaron en células competentes de la cepa *E. coli* XL1 Blue mediante el método del cloruro cálcico (CaCl_2) (Sambrook, 2006). Los transformantes se seleccionaron en placas de agar LB suplementadas con: 100 $\mu\text{g/mL}$ de X-Gal, 200 $\mu\text{g/mL}$ de IPTG y 5 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicina. El protocolo de la transformación empleado se resume más adelante.

Fundamento de la clonación mediante el método *blue-white screen*.

La β -galactosidasa es una enzima codificada por el gen *lacZ*. Posee dos dominios: el péptido α (N-terminal pequeño) y el péptido ω (C-terminal grande). Estos dos dominios cuando están separados no presentan actividad enzimática, pero al volverse a unir (aunque sea de forma no covalente), se reestablece esta actividad. Este fenómeno se denomina α -complementación.

La cepa de *E. coli* XL-1 Blue posee una mutación en el gen *lacZ* (denominada *lacZ Δ M15*), con lo que no puede codificar el péptido α y, por tanto, es incapaz de producir una β -galactosidasa funcional. Además, esta cepa contiene una segunda mutación, denominada *lacI^f*, que ocasiona un incremento de la producción de LacI, un represor del operón *lac*.

No obstante, cuando el vector pUCP24 intacto (portador del gen *lacZ α*) se transforma en la cepa de *E. coli* XL1 Blue, este *E. coli* ya será capaz de producir una β -galactosidasa funcional.

La producción de β -galactosidasa puede detectarse con X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido). El X-Gal es hidrolizado por la β -galactosidasa en galactosa y 5-bromo-4-cloro-hidroindol. Este último es oxidado a 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo, un compuesto azul insoluble.

De este modo, el crecimiento de colonias azules de *E. coli* XL1 Blue en agar LB con X-Gal, IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosida, un inductor de la β -galactosidasa) y gentamicina indica la producción de una β -galactosidasa funcional. Estas cepas de *E. coli* azules han adquirido, mediante transformación, el vector pUCP24 con el gen *lacZ α* intacto, sin portar ningún fragmento de ADN adicional.

Por el contrario, el crecimiento de colonias blancas de *E. coli* XL1 Blue en agar LB con X-Gal+IPTG y gentamicina, indica que, probablemente, un fragmento de ADN externo se haya insertado en el gen *lacZ α* del pUCP24. Esta inserción interrumpiría la producción del α -péptido, y por tanto, no podría expresar una β -galactosidasa funcional (Messing, 1977).

Protocolo de transformación con CaCl_2 .

Día 1

- Se inocula una colonia de la cepa de *E. coli* XL1 Blue en un tubo cónico tipo *Falcon* de 50 mL con 10 mL de caldo LB.
- Se incuba durante 16-18 h en una estufa en agitación a 37°C.

Día 2

- Se inocula 500 μ L del cultivo de la cepa de *E. coli* XL1 Blue en un matraz estéril conteniendo 50 mL de caldo LB.
- Se incuba el matraz en una estufa en agitación a 37°C aproximadamente durante 2 h, hasta alcanzar una densidad óptica (medida con un espectrofotómetro) de DO_{600} : 0,2.
- Se enfría el matraz durante 30 min en hielo.
- Transcurrido este tiempo, se pasa todo el volumen a un tubo cónico tipo *Falcon* de 50 mL.
- Se centrifuga el tubo a 3.000 rpm durante 15 min, a una temperatura de 4°C (en centrífuga refrigerada). Se desecha el sobrenadante.
- Se resuspende el *pellet* en 20 mL de $CaCl_2$ 0,1 M frío (en hielo).
- Se mantiene el tubo durante 30 min en hielo.
- Transcurrido este tiempo, se centrifuga el tubo a 3.000 rpm durante 15 min, a 4°C. Se desecha el sobrenadante.
- Se resuspende el *pellet* en 500 μ L de $CaCl_2$ 0,1 M frío (en hielo). En este momento ya disponemos de células competentes.
- Para preparar las transformaciones, se pone en un tubo cónico tipo *ependorf* (tres tubos en total) los siguientes volúmenes:
 - Transformación: 100 μ L de células competentes + 10 μ L del producto de ligación (plásmido pUCP24 + fragmento plásmido pERGB, digeridos ambos con *EcoRI*).
 - Control positivo: 100 μ L de células competentes + 10 μ L del plásmido pUCP24, sin digerir.
 - Control negativo: 100 μ L de células competentes.
- Se dejan los tres tubos en hielo durante 30 min.
- Transcurrido este tiempo, se ponen los tres tubos en un baño de agua a 42°C durante 1 min exacto.
- Se dejan los tres tubos en hielo durante 2 min.
- Se añade 1 ml de caldo LB a cada uno de los tubos.
- Se pasa el contenido de cada uno de los tubos a un tubo cónico de 10 mL (“tapón verde”).
- Los tres tubos se incuban durante 1 h en estufa a 37°C (no es necesario agitación).

- Los transformantes se seleccionan en placas de agar LB suplementadas con: 100 µg/mL de X-Gal, 200 µg/mL de IPTG y 5 µg/mL de gentamicina.
- Transcurrido ese tiempo, se siembra por el método cuantitativo:
 - Transformación: se siembran 200 µL del cultivo por cada placa de agar LB con X-Gal, IPTG y gentamicina. En total, para repartir todo el volumen (1.200 µL), se siembran 6 placas de agar LB con X-Gal+IPTG y gentamicina.
 - Control positivo: se siembra 100 µL del cultivo en una placa de agar LB con X-Gal+IPTG y gentamicina.
 - Control negativo: se siembra 200 µL del cultivo en una placa de agar LB con X-Gal+IPTG y gentamicina.
- Las placas se incuban en estufa a 37°C durante 48 h.
- A las 48 h, si ha ocurrido la transformación del plásmido pERGB en la cepa de *E. coli* XL1 Blue, se va a producir crecimiento de colonias blancas (sugestivas de haber adquirido el pUCP24 con un fragmento del plásmido pERGB) y colonias azules (han adquirido sólo el pUCP24).
- Se resiembra cada colonia de *E. coli* blanca en una placa de agar LB con X-Gal+IPTG y gentamicina (o, en su ausencia, agar McConkey).
- Se realiza la extracción del plásmido de algunos posibles transformantes (colonias blancas) utilizando el *kit* comercial QIAGEN® Plasmid Mini kit (Qiagen, Alemania).

Extracción de los plásmidos con los fragmentos de pERGB clonados.

Los plásmidos resultantes de la clonación que contenían ADN de un fragmento del pERGB unido al pUCP24 se extrajeron y purificaron usando el *kit* comercial QIAGEN Plasmid Mini Kit (QIAGEN, Alemania). El protocolo se resume a continuación:

- Se prepara para cada cepa (transformante) un tubo cónico con 3 mL de caldo LB con gentamicina (5 µg/mL).
- Se inocula una colonia de la cepa transformante en el tubo que contiene caldo LB con gentamicina.
- Se incuban los tubos en una estufa en agitación a 37°C durante 16-18 h.
- Al día siguiente, se pasa el cultivo líquido de cada tubo *Falcon* a dos tubos cónicos tipo *ependorf* de 1,5 mL.
- Los tubos se centrifugan a 13.000 rpm durante 15 min en una centrifuga refrigerada a 4°C.

- Se desecha el sobrenadante de cada tubo. Se resuspende el *pellet* con 300 μ L de *Buffer P1*.
- Se añade a cada tubo 300 μ L de *Buffer P2*. Se mezclan 4-6 veces, invirtiendo cada tubo. Los tubos se incuban a temperatura ambiente (15-25°C) durante 5 min.
- Se añade a cada tubo 300 μ L de *Buffer P3*. Se mezclan 4-6 veces, invirtiendo cada tubo. Se incuban en hielo durante 5 min.
- Se centrifugan los tubos en una microcentrífuga a 13.000 rpm durante 10 min. Se recoge el sobrenadante.
- Se equilibra una punta de QIAGEN, colocando en la columna 1 mL de *Buffer QBT*. Se deja que la columna se vacíe por gravedad del flujo.
- Se coloca el sobrenadante en la punta. Se deja que entre la resina por gravedad.
- Se lava la columna con 2 x 2 mL de *Buffer QC*.
- Se eluye el ADN con 800 μ L de *Buffer QF*. El eluido se recoge en tubos cónicos tipo *ependorf* de 1,5 mL.
- Se precipita el ADN añadiendo a cada tubo 560 μ L de isopropanol al ADN eluido. Se mezcla.
- Se centrifugan los tubos en una microcentrífuga a 13.000 rpm durante 30 min y se decanta con cuidado el sobrenadante.
- Se lava el *pellet* de ADN con 1 mL de etanol al 70%.
- Se centrifugan cada tubo en una microcentrífuga a 13.000 rpm durante 10 min.
- Se decanta el sobrenadante sin estropear el *pellet*.
- Se deja secar el *pellet* 5-10 min.
- Se disuelve el *pellet* de ADN añadiendo a cada tubo 50 μ L de agua destilada.

Caracterización del fragmento clonado del pERGB que contiene los genes de resistencia

Inicialmente, se realizó una PCR para el gen *cfr* (Kehrenberg, 2006) en el ADN plasmídico extraído en 28 colonias del *E. coli* XL1 Blue obtenidas tras el proceso de transformación. Esta PCR fue positiva en un único de los transformantes estudiados, el número 12. Al plásmido resultante de la clonación de un fragmento del pERGB (que contenía el gen *cfr*) con el pUCP24 se le denominó pUCPcfr12.

Las reacciones de PCR para los genes *ant(4')-Ia* y *tet(L)* fueron también positivas en el plásmido pUCPcfr12, mientras que la PCR para el gen *dfpK* fue negativa. El ADN del pUCPcfr12 fue completamente secuenciado mediante el método

primer walking. Para ello, se diseñaron diversos cebadores utilizando la información de las secuencias disponibles en GenBank para el gen *cfr* del plásmido pSCFS3 (número de acceso GenBank AM086211.1) (Kehrenberg, 2006) y para los genes *ant(4')-Ia* y *tet(L)* del plásmido pKKS825 (número de acceso GenBank FN377602.2) (Kadlec, 2009b). El tamaño de dicho fragmento clonado fue de 8.675 pb.

Secuenciación de los genes adyacentes al fragmento clonado del pERGB

Para obtener la secuencia de los genes adyacentes al fragmento clonado, se realizaron numerosas reacciones de PCR en el ADN plasmídico extraído del derivado transconjugante.

Para el extremo 5' (izquierdo) del fragmento clonado, los cebadores se diseñaron (tanto directos como en sentido invertido) en base a la secuencia descrita del plásmido pSCFS3. Para el extremo 3' (derecho) del fragmento clonado, los cebadores se diseñaron (directos e invertidos) según las secuencias de los plásmidos pKKS825 (Kadlec, 2009b) y pKKS2187 (número de acceso FM207105.1) (Kadlec, 2009a), para los diferentes genes descritos del fragmento secuenciado de estos dos plásmidos.

En los casos en los que se obtuvo una reacción de PCR positiva, los productos de PCR, tras ser purificados, se secuenciaron, en la Unidad de Secuenciación del HUSE. Las secuencias obtenidas se analizaron con el programa Chromas 2.33. Se compararon con las secuencias de los plásmidos mencionados en el párrafo anterior utilizando el programa BLAST®.

4.10 Consideraciones éticas

El trabajo acerca del estudio de colonización e infección por *S. aureus* en una residencia geriátrica de Mallorca formó parte de un estudio multicéntrico de la REIPI (Red Española de Investigación en Patología Infecciosa) del Ministerio de Sanidad y Consumo. En este proyecto participaron, además de nuestro hospital, el Hospital Universitario de Bellvitge (que incluyó 5 centros geriátricos) y el Hospital Parc Taulí de Sabadell (que incluyó 3 centros geriátricos). Este estudio fue coordinado por el Dr. Miquel Pujol del Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital de Bellvitge y se aprobó por el Comité Ético de dicho hospital. Únicamente se exigió el consentimiento

oral a los residentes geriátricos o bien, en caso de demencia o dificultad mental, a sus familiares o cuidadores.

El equipo médico de la residencia geriátrica desconocía en todo momento los resultados de los cultivos de colonización nasal y de úlceras. Por tanto, no se realizó aislamiento ni se aplicó tratamientos de descolonización a ningún residente en función de los resultados de los cultivos realizados para este trabajo.

En cuanto al resto de los trabajos de esta tesis, se ha trabajado sobre cepas clínicas, básicamente en aspectos de epidemiología molecular, factores de virulencia y mecanismos de resistencia, sin implicaciones éticas, manteniendo en todo momento la confidencialidad de los pacientes.

4.11 Análisis estadístico

Para realizar el análisis univariante de los factores de riesgo de la colonización por SARM en los residentes geriátricos se utilizó el test de Chi-cuadrado (análisis de proporciones de variables cualitativas). Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

PARTE 1. ESTUDIO DE EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE LOS AISLADOS DE SARM DETECTADOS EN EL HOSPITAL UNIVERSITARI SON DURETA-SON ESPASES DURANTE 15 AÑOS (junio 1999-febrero 2013)

5.1 Prevalencia de SARM respecto al total de *S. aureus* en el HUSD-HUSE

En la **tabla 12** se observa el porcentaje de aislamientos de SARM, respecto a los de *S. aureus* totales, desde 2003 hasta 2012, detectados en muestras clínicas de los pacientes atendidos en el HUSD (hasta diciembre 2010) y en el HUSE (a partir de esa fecha).

Tabla 12. Porcentaje de aislados de *S. aureus* resistentes a la meticilina respecto al total de *S. aureus* en muestras clínicas por año.

	HUSD ^a								HUSE ^a	
	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
%	38,0	31,7	22,9	27,7	32,6	28,1	31,3	31,1	23,1	20,7

^aAbreviaturas. HUSD: Hospital Universitari Son Dureta; HUSE: Hospital Universitari Son Espases.

En 2003, el porcentaje de aislados de SARM con respecto a *S. aureus* totales en muestras clínicas fue del 38%, si bien este porcentaje descendía al 30% al referirlo a pacientes distintos. Desde 2004 y hasta 2010, se ha ido produciendo un descenso moderado del porcentaje de SARM, estabilizándose en torno al 30% (en muestras clínicas). En 2011, coincidiendo con el cambio de hospital, se ha constatado una disminución importante del porcentaje de SARM, siendo del 23,1% en 2011. En 2012 incluso todavía ha descendido moderadamente este porcentaje.

5.2 Características de los pacientes con SARM atendidos en el HUSD-HUSE

Se han realizado, como ya se ha explicado en la Metodología, cuatro estudios de epidemiología molecular en los aislados clínicos de SARM detectados en el HUSD-HUSE en cuatro períodos de tiempo no consecutivos: junio 1999-agosto 2000, julio 2002-junio 2004, enero-diciembre 2008 y septiembre 2012-febrero 2013.

Conviene recordar que en estos cuatro estudios se han excluido los pacientes en los que el aislamiento de SARM se llevó a cabo únicamente en muestras recogidas para estudio de portador (exudados nasales, axilares e inguinales), así como en aquéllos con SARM detectados en muestras procedentes de centros de salud o de residencias geriátricas. Se trata, por tanto, de aislamientos hospitalarios.

El número de pacientes distintos con SARM estudiados en cada período ha sido: 110 en el primer período, 208 en el segundo, 132 en el tercero y 29 en el cuarto. En la **tabla 13** se resumen las características de los pacientes.

Tabla 13. Características de los pacientes estudiados en cada período y tipos de muestra.

	Período estudiado			
	1999-2002	2002-2004	2008	2012-2013
Nº de meses estudiados	14	24	12	5
Nº de pacientes incluidos	110	208	132	29
Sexo:				
Masculino	70 (64%)	147 (71%)	86 (65%)	18 (62%)
Femenino	40 (36%)	61 (29%)	46 (35%)	11 (38%)
Edad mediana (intervalo)	64 años (24-94)	67 años (3 días-90)	68 años (4 días-95)	57 años (1 mes-84)
Servicio de procedencia				
Unidad de críticos	39 (36%)	31 (15%)	10 (8%)	3 (10%)
Servicios médicos	33 (30%)	78 (38%)	45 (34%)	14 (49%)
Servicios quirúrgicos	30 (27%)	69 (33%)	33 (25%)	5 (17%)
Urgencias / Consultas Externas	8 (7%)	27 (13%)	36 (27%)	2 (7%)
Pediatria	–	3 (1%)	7 (5%)	5 (17%)
Diálisis	–	–	1 (1%)	–
Tipos de muestra				
Secreciones respiratorias	42 (38%)	77 (37%)	50 (38%)	9 (31%)
Exudados	39 (35%)	73 (35%)	62 (47%)	10 (35%)
Hemocultivos	20 (18%)	27 (13%)	9 (6%)	4 (14%)
Catéteres	4 (4%)	16 (8%)	2 (2%)	1 (3%)
Líquidos estériles	3 (3%)	4 (2%)	2 (2%)	4 (14%)
Orinas	2 (2%)	4 (2%)	1 (1%)	–
Biopsias	–	5 (2%)	5 (3%)	1 (3%)
Jugo gástrico	–	1 (0,5%)	–	–
Prótesis	–	1 (0,5%)	–	–
Lentillas	–	–	1 (1%)	–

En total, se han incluido 479 pacientes, de ellos 321 varones (67,0%) y 158 mujeres (33,0%). La **edad** de estos pacientes estaba comprendida entre los 0 años (un recién nacido de 4 días) y los 95 años, con una edad mediana de 64-68 años en los tres primeros períodos y de 57 en el cuarto (con pocos pacientes estudiados).

En cuanto al **servicio** de procedencia de los pacientes con SARM, se han producido cambios notables a lo largo de los distintos períodos de estudio, como se observa en la **figura 32**. En 1999-2000, hubo un predominio en las unidades de críticos (UCI y Reanimación, 36%), seguidas de los servicios médicos (30%) y quirúrgicos (27%), mientras que sólo un 7% procedían de Urgencias o de Consultas Externas, sin haberse constatado ningún caso pediátrico. Por el contrario, en 2008, sólo un 8% de los pacientes con SARM se encontraban en una unidad de críticos, un 34% estaban ingresados en un servicio médico, otro 25% en un servicio quirúrgico, un 5% procedían de Pediatría, y el 27% restante habían acudido a Urgencias o habían sido atendidos en Consultas Externas. Así, en conjunto se observa que desde junio 1999 hasta el 2008 ha habido una disminución de la proporción de los casos de SARM en las unidades de críticos, con un aumento importante de SARM en los pacientes que acudieron a Urgencias o a Consultas Externas.

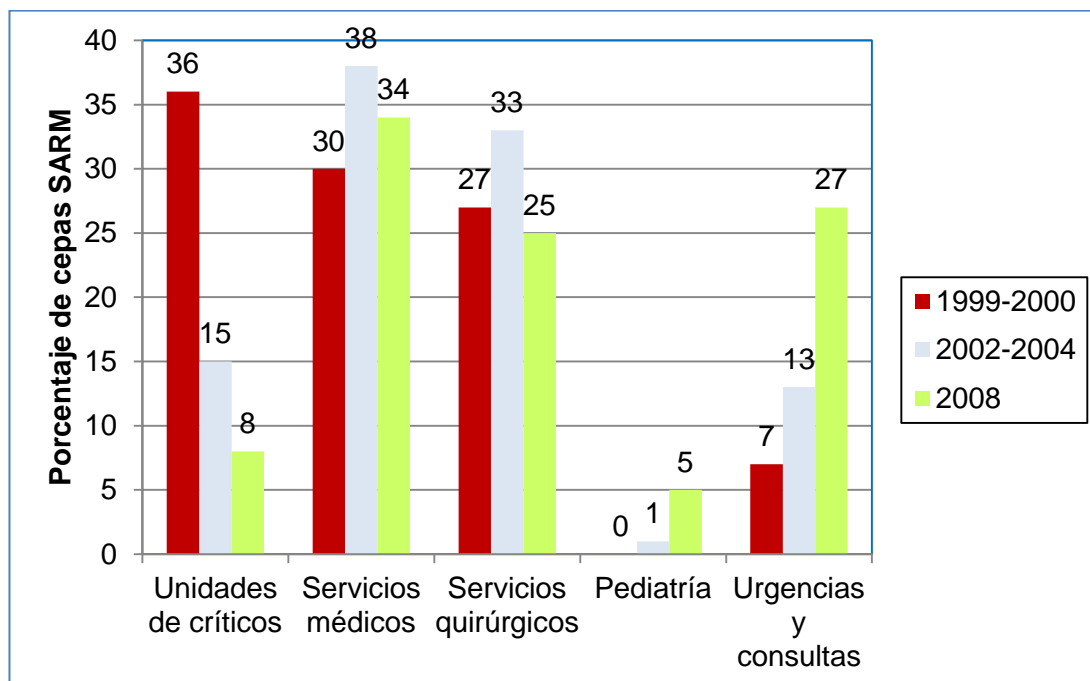


Figura 32. Comparación de la distribución de las cepas de SARM del HUSD por servicios durante los períodos 1999-2000, 2002-2004 y 2008.

Respecto al **número de muestras diferentes** positivas para SARM, durante el segundo estudio del 2002-2004, en 80 de los 208 pacientes con SARM estudiados (el 38%) se detectó esta bacteria multirresistente en un único tipo de muestra; mientras que en los 128 restantes (el 62%) se aisló SARM en, al menos, dos tipos de muestra diferentes (una muestra clínica y en otro tipo de muestra, ya sea clínica o para estudio de portador). En el período del 2008, 74 de los 132 pacientes con SARM incluidos (56%) se les detectó en un único tipo de muestra clínica, mientras que de los 58 restantes (44%) se aisló SARM en, al menos, dos tipos de muestras diferentes.

De entre las diferentes **tipos de muestra** en los que se realizó la tipificación molecular, durante los dos primeros períodos (1999-2004) predominaron las secreciones respiratorias (38% en 1999-2000 y 37% en 2002-2004, respecto al total de muestras clínicas con SARM tipificadas). Sin embargo, en 2008 y 2012-2013 se detectó SARM con mayor frecuencia en exudados de herida y úlcera (47% en 2008 y 35% en 2012-2013). En todos los períodos estudiados, los hemocultivos constituyeron la tercera muestra más frecuente con SARM. Estos datos se han esquematizado en la **figura 33**.

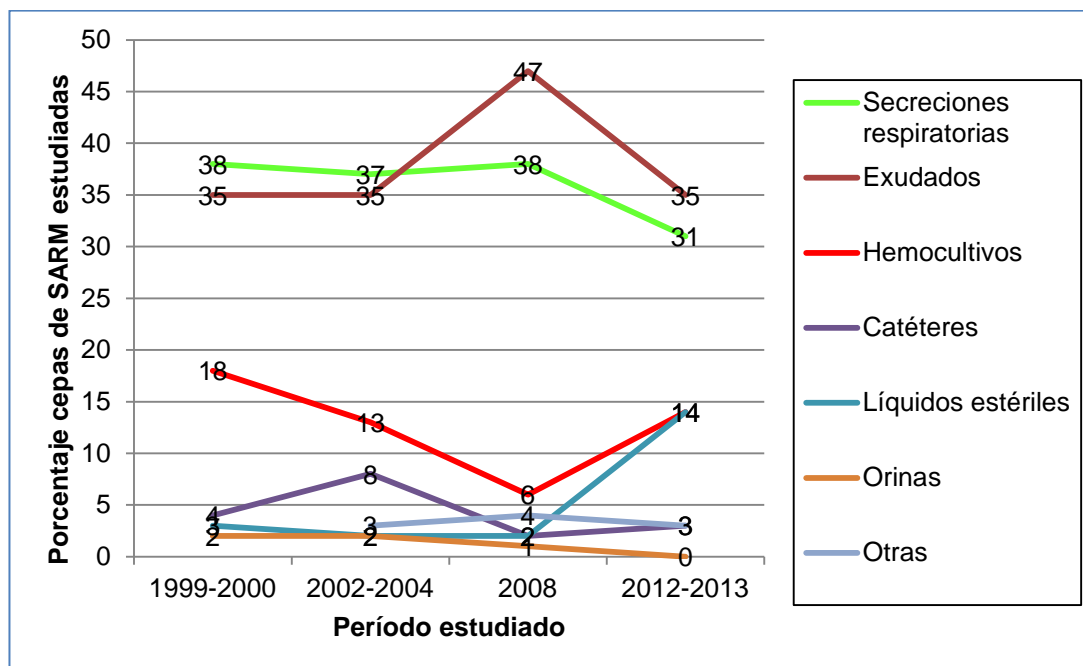


Figura 33. Tipos de muestras clínicas con SARM incluidas en los diferentes estudios de epidemiología molecular.

5.3 Epidemiología molecular de los aislados de SARM del HUSD-HUSE

En el **primer período** (junio 1999-agosto 2000) se constató, mediante ECP, la existencia de tres clones mayoritarios de SARM que comprendían casi el 98% de los pacientes, así como otros tres clones minoritarios, cada uno de éstos de un único paciente. Los tres clones predominantes de SARM fueron denominados: clon A (69 pacientes, 63%), clon B (25 pacientes, 23%) y clon C (13 pacientes, 12%; **figura 34**). Los clones A y B tenían cada uno un único patrón de bandas en la ECP, mientras que el clon C tenía 3 subtipos distintos. En este período, el clon A era el más frecuente en todos los servicios, si bien, en las unidades de críticos destacaba la elevada frecuencia del clon B (**figura 35**).

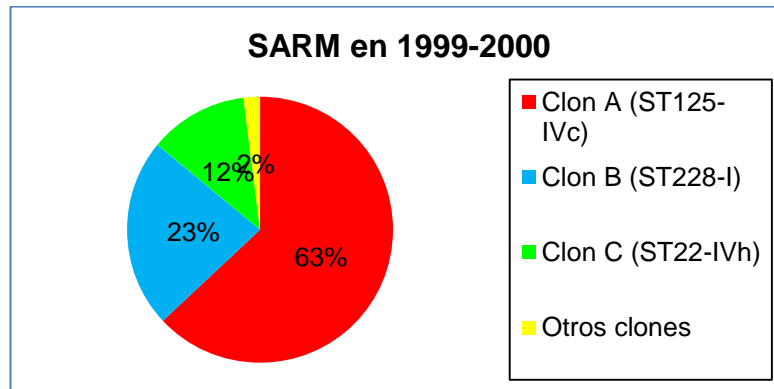


Figura 34. Proporción de clones de SARM del HUSD en 1999-2000.

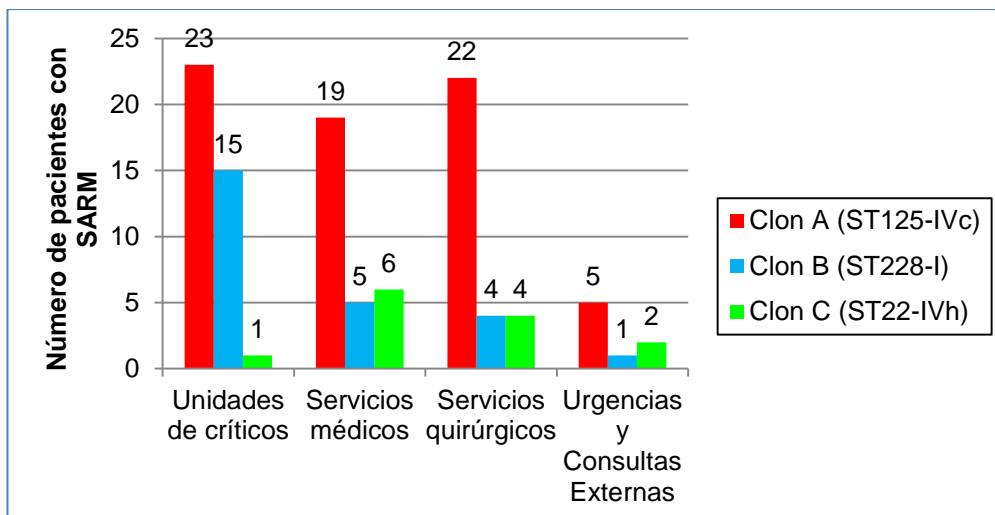


Figura 35. Distribución de los clones de SARM del HUSD por servicios (1999-2000).

Posteriormente, estos tres clones fueron caracterizados mediante MLST y tipado del SCCmec. El clon A se correspondía con el ST125-MRSA-IVc, el clon B con el ST228-MRSA-I y el clon C con el ST22-MRSA-IVh (también conocido como clon epidémico EMRSA-15).

Durante el **segundo período** (julio 2002-junio 2004), se seguían detectando los mismos tres clones mayoritarios de SARM y comprendían el 93% de los aislados procedentes de muestras clínicas del HUSD. Asimismo, hubo doce clones minoritarios, cada uno de éstos en uno o dos pacientes.

Sin embargo, la proporción de los tres clones mayoritarios era diferente a la del período anterior, con una disminución relativa del clon A. Así, el clon predominante durante 2002-2004 fue el clon B (ST228-I) detectado en el 43,0% de los pacientes, seguido del clon A (ST125-IVc) en el 26,0% de los pacientes, y del clon C (ST22-IVh, EMRSA-15) en el 24,0% de los mismos (**figura 36**). Cada uno de estos tres clones tenía diferentes subtipos en la ECP: 2 subtipos diferentes en el caso del clon A, 3 subtipos para el clon B y 5 subtipos para el clon C.

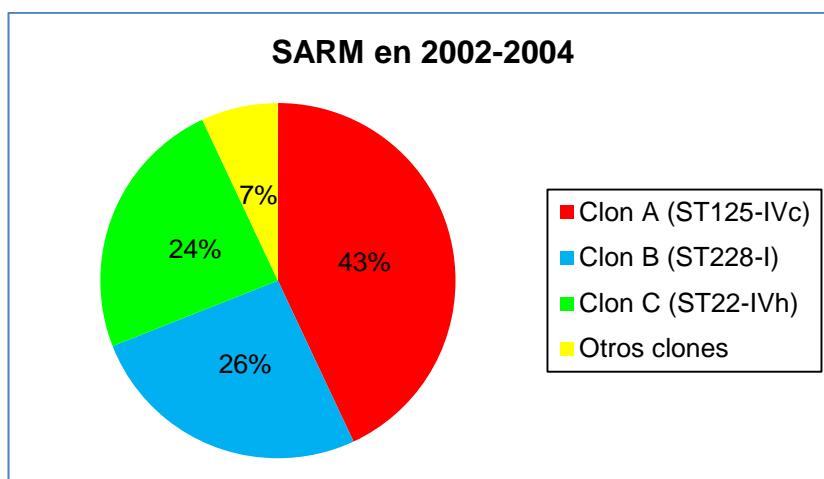


Figura 36. Proporción de clones de SARM del HUSD en 2002-2004.

Respecto a la distribución por servicios, como se muestra en la **figura 37**, en este segundo período el clon B (ST228-I) fue el más frecuente en pacientes de las unidades de críticos y de las áreas quirúrgicas, mientras que, en los servicios

médicos y en Urgencias/Consultas Externas, la frecuencia de los tres clones era similar.

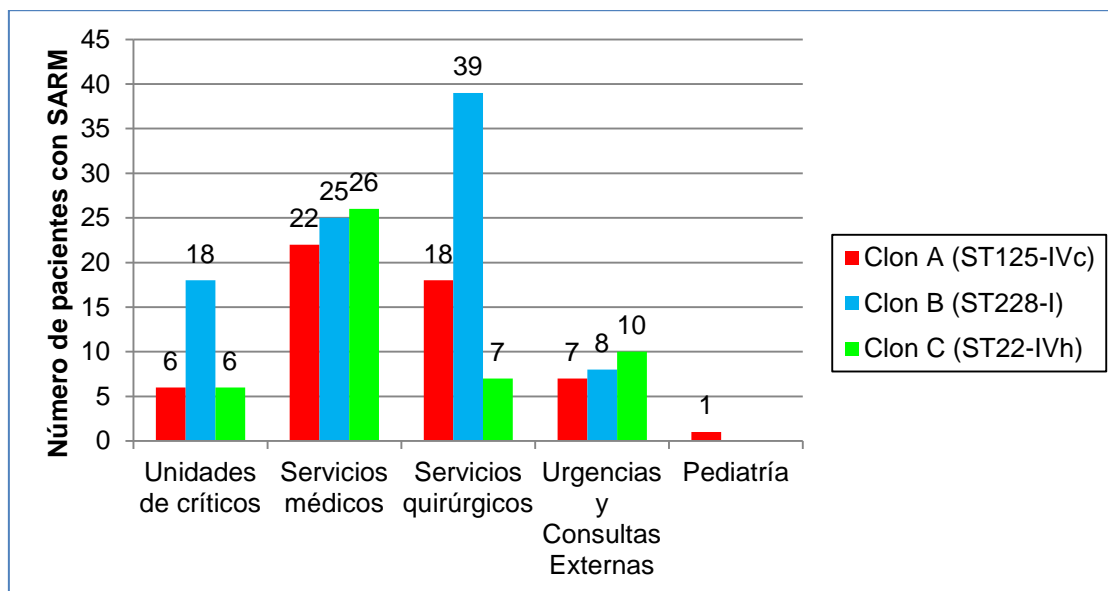


Figura 37. Distribución de los clones de SARM del HUSD por servicios (2002-2004).

Durante el **tercer período** (enero-diciembre 2008), se detectaron 5 clones mayoritarios de SARM (en el 92% de los pacientes con SARM) y 7 clones minoritarios. Curiosamente, a diferencia de los otros períodos, en 2008 el clon predominante de SARM fue el clon C (ST22-IVh, EMRSA-15) que comprendía el 40% de las cepas de SARM de los pacientes atendidos en el HUSD durante ese año. A continuación, le seguían en frecuencia el clon A (ST125-IVc, 30% de las cepas de SARM), el clon ST72-IVc (10%), y el clon ST8-IV (7%). El clon B (ST228-I), presente en el 5% de los aislados de SARM de 2008, perdió claramente el protagonismo que había tenido anteriormente (**figuras 38-39** y **tabla 14**, en las siguientes dos páginas).

Los clones minoritarios durante 2008 fueron: ST146-MRSA-IVc (2 aislados), ST5-MRSA-IV (2 aislados, con 2 subtipos distintos), ST36-MRSA-II (EMRSA-16), ST88-MRSA-IVa, ST97-MRSA-IVc, ST225-MRSA-II y ST398-MRSA-V, detectados cada uno en un único paciente. Respecto al clon ST398-MRSA-V, no se obtuvo ningún patrón de bandas en la ECP ya que, como es conocido, la enzima *SmaI* no es capaz de cortar el genoma de este clon ([Huijsdens, 2006](#)).

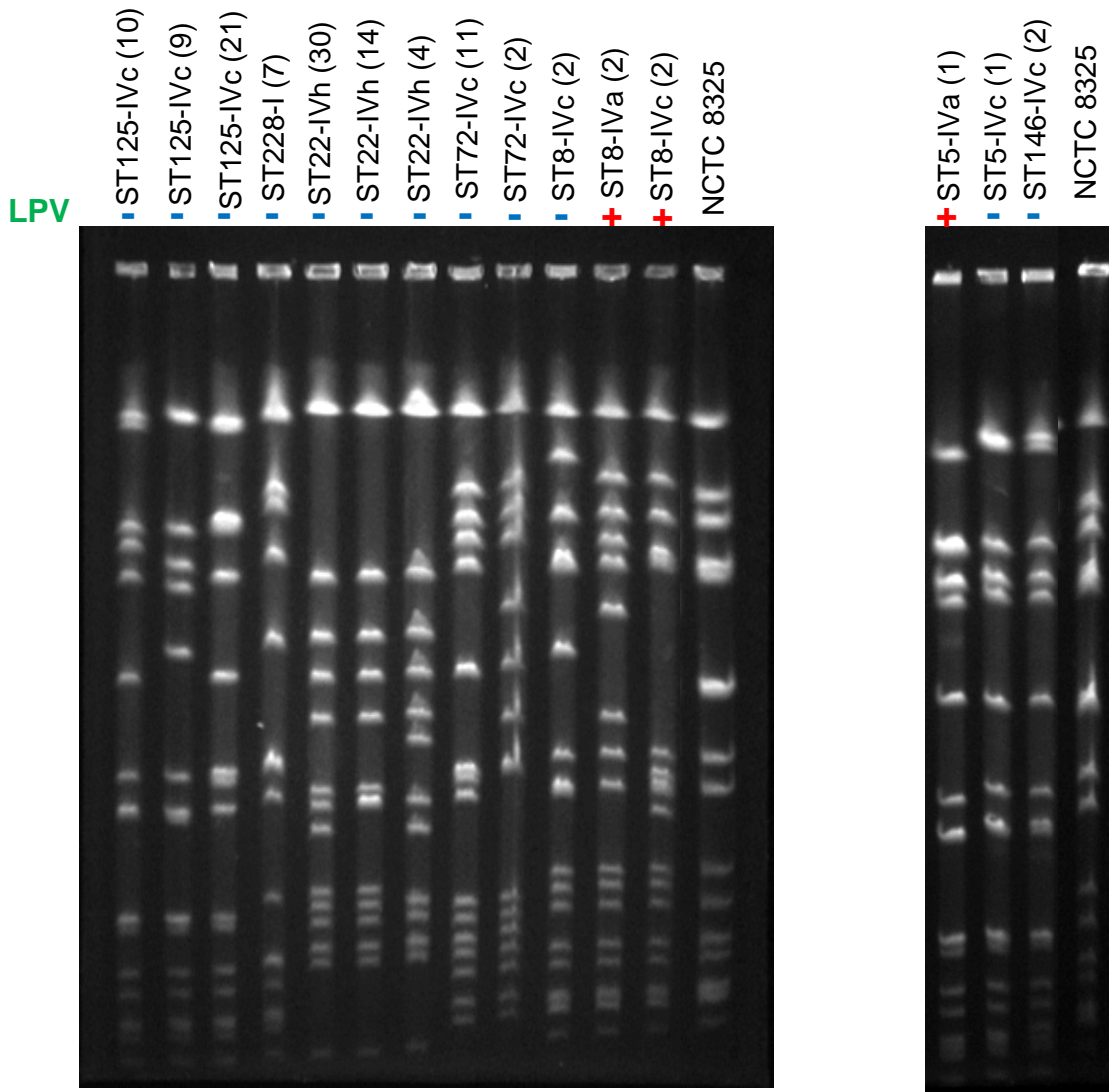


Figura 38. ECP de la mayoría de los subtipos de SARM detectados en 2008 en HUSD. Debajo de cada subtipo se indica la producción (+) o no producción (-) de LPV. (Entre paréntesis se señala el número de cepas de cada subtipo).

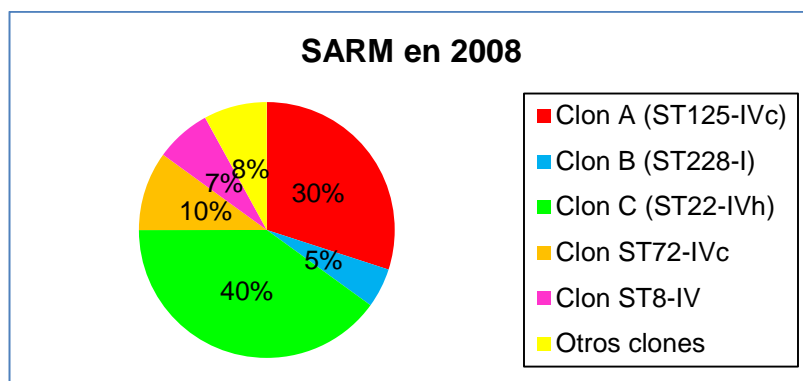


Figura 39. Proporción de clones de SARM del HUSD en 2008.

Tabla 14. Clones de SARM del HUSD en 2008.

Clon	Nº aislados (%)	Nº subtipos en la ECP
ST22-MRSA-IV (clon C, EMRSA-15)	53 (40)	6
ST125-MRSA-IVc (clon A)	40 (30)	3
ST72-MRSA-IVc (USA700)	13 (10)	2
ST228-MRSA-I (clon B)	7 (5)	1
ST8-MRSA-IVa (USA300)	4 (3)	4
ST8-MRSA-IVc LPV+ (USA300-like)	4 (3)	3
ST8-MRSA-IVc LPV-	2 (2)	1
ST146-MRSA-IVc	2 (2)	1
ST5-MRSA-IVa	1 (1)	1
ST5-MRSA-IVc	1 (1)	1
ST36-MRSA-II (EMRSA-16)	1 (1)	1
ST88-MRSA-IVa	1 (1)	1
ST97-MRSA-IVc	1 (1)	1
ST225-MRSA-II	1 (1)	1
ST398-MRSA-V	1 (1)	–
Total	132 (100)	

En cuanto a la procedencia, en 2008 los clones ST22-IVh y ST125-IVc fueron los más frecuentes en los servicios médicos, quirúrgicos y en los pacientes procedentes de Urgencias o de Consultas Externas. Sin embargo, en Pediatría, el clon de SARM mayoritario fue el ST8-IV, con diferentes subtipos (**figura 40**).

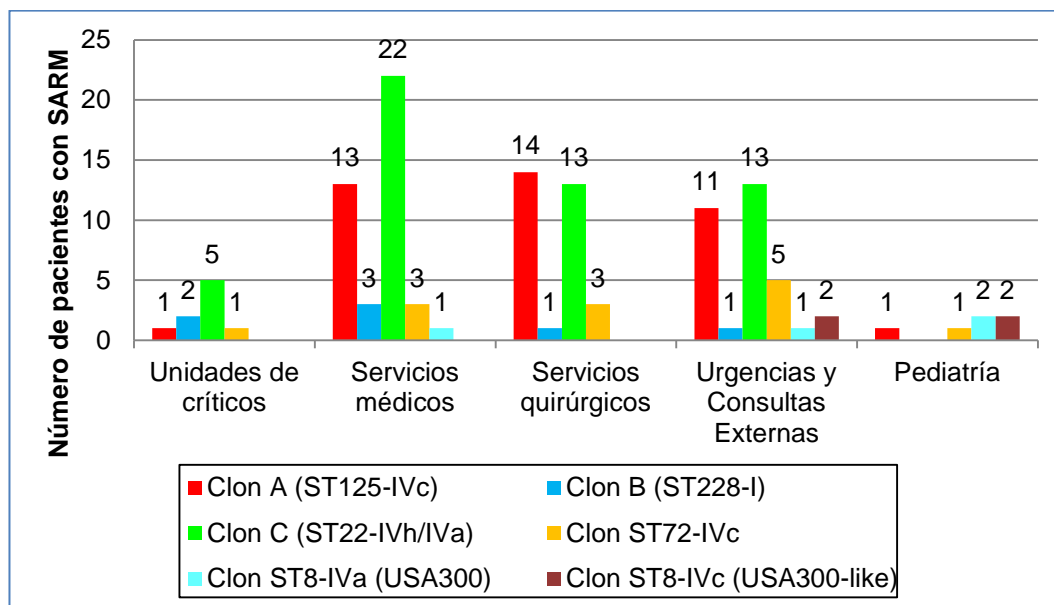


Figura 40. Distribución de los clones de SARM del HUSD por servicios (2008).

Durante el **cuarto período** (septiembre 2012-febrero 2013), a pesar de que únicamente se realizó ECP en 29 aislados, se observó una amplia variabilidad de diferentes patrones de bandas. Los clones más frecuentes fueron el clon C (ST22-IVh) en 9 aislados (32%), que consolidó su posición como clon más prevalente en nuestro hospital; seguido del clon A (ST125-IVc) en 7 (25%), y del clon ST8-IV en otros 7 (25%), presentando diferentes subtipos (**figura 41** y **tabla 15**).

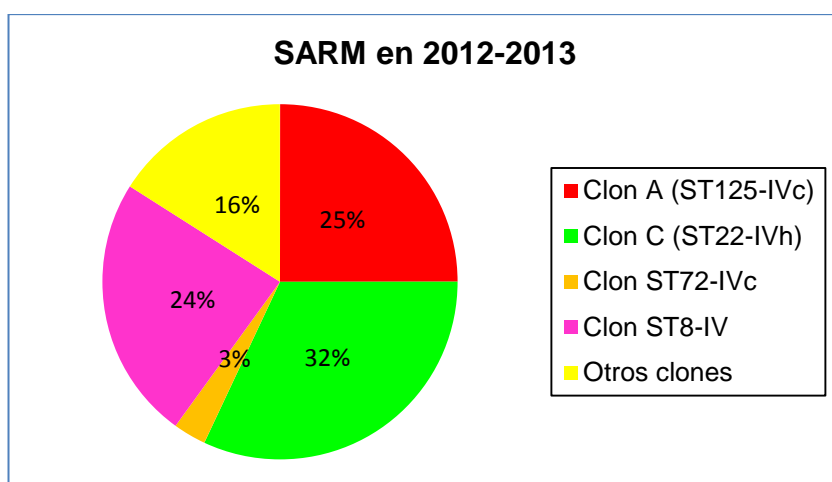


Figura 41. Proporción de clones de SARM del HUSE en 2012-2013.

Tabla 15. Clones de SARM del HUSE en 2012-2013.

Clon	Nº aislados (%)
ST22-MRSA-IVh (clon C, EMRSA-15)	9 (32)
ST125-MRSA-IVc (clon A)	7 (25)
ST8-MRSA-IVc LPV+ (USA300-like)	3 (11)
ST8-MRSA-IVc LPV-	2 (7)
ST36-MRSA-II (EMRSA-16)	2 (7)
ST1-MRSA-IVa	1 (3)
ST8-MRSA-IVa LPV+ (USA300)	1 (3)
ST8-MRSA-IV _? LPV+ (USA300-like)	1 (3)
ST45-MRSA-IVh	1 (3)
ST72-MRSA-IVc	1 (3)
ST398-MRSA-V	1 (3)
Total	29 (100)

Respecto a la distribución por servicios, durante 2012-2013 los clones C (ST22-MRSA-IVh) y A (ST125-MRSA-IVc) fueron los más frecuentes en los servicios médicos y quirúrgicos (**figura 42**). En cuanto a las unidades de críticos, hubo dos pacientes ingresados en la UCI durante el mismo período a los que se les detectó a cada uno una cepa del clon ST36-MRSA-II (EMRSA-16), si bien, no fueron atendidos en la misma área y no se pudo establecer ninguna relación epidemiológica entre ambos. De los cinco aislados de SARM detectados en pacientes pediátricos, dos fueron productores de LPV, de los cuales una cepa pertenecía al clon ST8-IVa (un exudado de uña) y la otra al clon ST8-IVc (un exudado cutáneo).

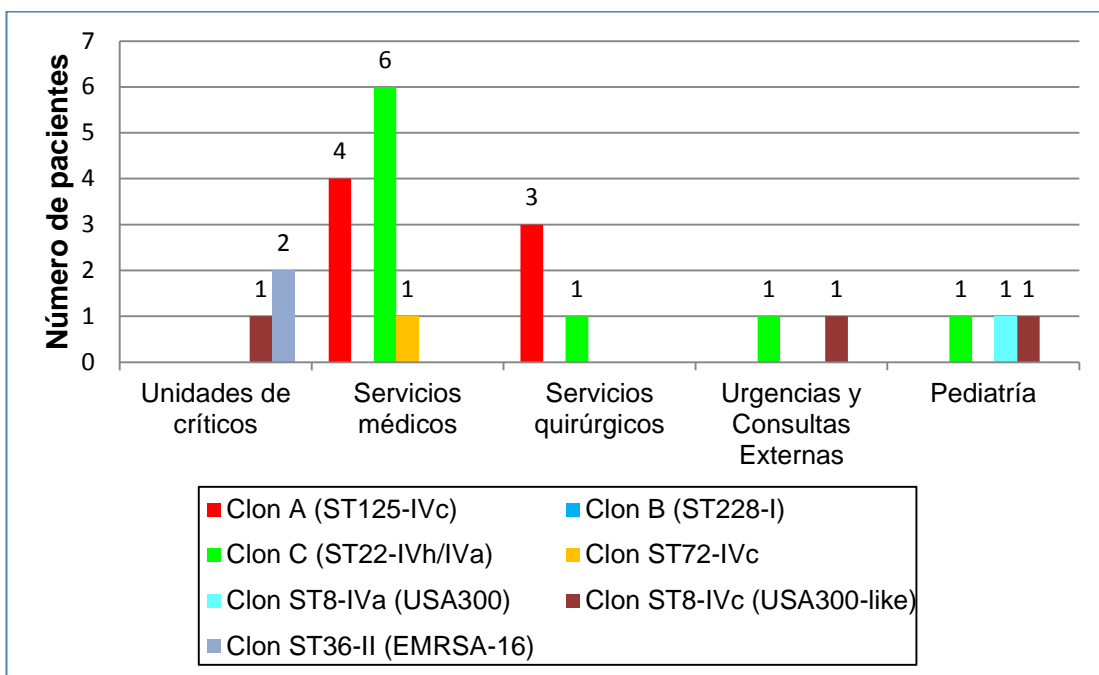


Figura 42. Distribución de los diversos clones de SARM del HUSE por servicios (2012-2013).

En la **figura 43** se muestra un gráfico que resume la frecuencia de los diversos clones de SARM detectados en los cuatro períodos estudiados. Al inicio de la epidemia de SARM en el HUSD (junio 1999-agosto 2000), el 63% de los aislados de SARM detectados en dicho período pertenecían al clon ST125-MRSA-IVc (clon A); le seguían en frecuencia el clon ST228-MRSA-I (clon B, 23%) y el clon ST22-MRSA-IVh (clon C, 12%). Sin embargo, durante el período comprendido entre 2002-2004, el clon más frecuente de SARM fue el ST228-I (clon B, 43% de los aislados de

SARM). Pero en 2008 y 2012-2013, el clon más frecuente de SARM fue el ST22-IVh o EMRSA-15 (clon C, 40% de los aislados de SARM del 2008 y 31% en 2012-2013).

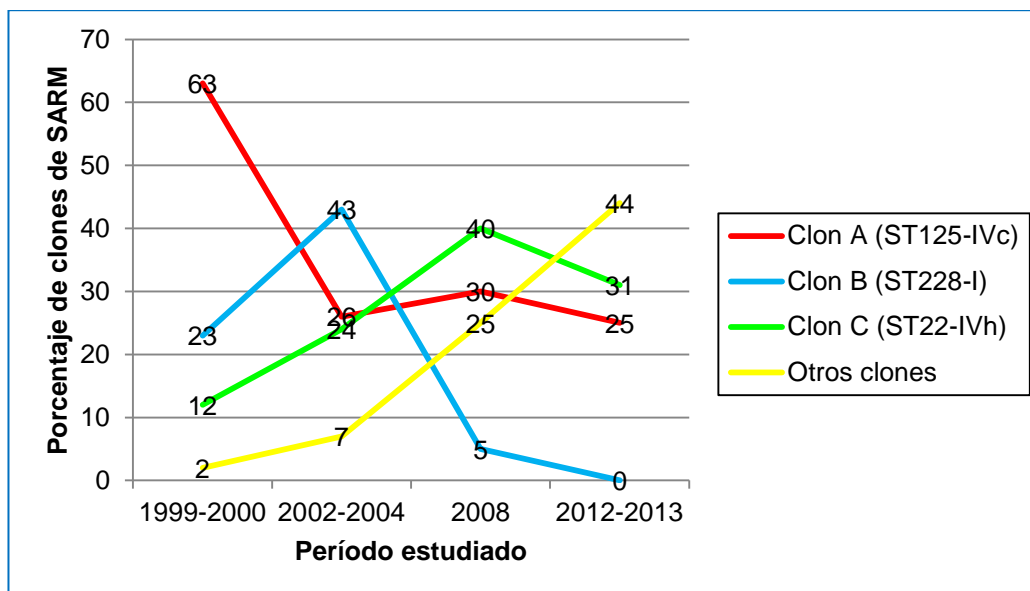


Figura 43. Distribución clonal de SARM en el HUSD-HUSE en el tiempo.

Asimismo, en el primer estudio efectuado (1999-2000) la epidemia de SARM era claramente oligoclonal, ya que el 98% de los aislados de SARM formaban parte de uno de los tres clones anteriores. Sin embargo, en 2008 un 25% de los aislados de SARM pertenecían a otros clones diferentes a estos tres, mientras que, en 2012-2013 esta cifra alcanzaba ya el 44%, observándose una tendencia hacia la dispersión clonal con el paso del tiempo.

5.4 Epidemiología molecular de SARM en cinco hospitales de Mallorca

5.4.1 Población de estudio

Durante el período comprendido entre enero 2003 y junio 2004 se estudiaron 317 aislados de SARM consecutivos detectados en 307 pacientes atendidos en alguno de los cinco hospitales públicos de Mallorca existentes entonces. Se incluyeron también en este análisis 10 pacientes que ingresaron en dos hospitales diferentes a lo largo del período de estudio.

Estos 317 aislados de SARM se obtuvieron principalmente de exudados de herida / úlcera (128 aislados, el 40%) seguidos de secreciones respiratorias (112 aislados, 35%) y de hemocultivos (34 aislados, 11%) (**tabla 16**).

Tabla 16. Distribución de los aislados de SARM por tipo de muestra.

Tipo de muestra	Número (%)
Exudados herida / úlcera	128 (40)
Secreciones respiratorias	112 (35)
Hemocultivo	34 (11)
Catéter	15 (5)
Orina	13 (4)
Biopsias	6 (2)
Líquidos estériles	6 (2)
Exudados genitales	3 (1)
Total	317 (100,0)

El 51% de los aislados de SARM procedían de pacientes atendidos en el HUSD, otro 23% de aislados provenían de pacientes atendidos en el Hospital Son Llätzer (HSL), un 9% de pacientes ingresados en el Hospital General (HG), otros 9% de pacientes ingresados en el Hospital Joan March (HJM), y el 8% restante procedía de pacientes atendidos en el Hospital de Manacor (HM) (**tabla 17**).

Tabla 17. Distribución de los principales clones de SARM, agrupados según hospital.

	Nº de aislados de SARM (%)			
	SARM totales (n=317)	Clon A (ST125-IVc) (n=106)	Clon C (ST22-IVh) (n=101)	Clon B (ST228-I) (n=91)
Hospital				
Son Dureta	162 (51%)	48 (30%)	46 (29%)	57 (36%)
Son Llätzer	72 (23%)	30 (42%)	20 (28%)	20 (28%)
General	30 (9%)	8 (27%)	14 (47%)	6 (20%)
Joan March	30 (9%)	16 (53%)	8 (27%)	5 (17%)
Manacor	23 (8%)	4 (17%)	13 (57%)	3 (13%)
Tipo de muestra				
Exudados herida	128	39 (31%)	43 (34%)	36 (28%)
Tracto respiratorio	112	41 (37%)	30 (27%)	37 (33%)
Hemocultivos	34	10 (29%)	18 (53%)	4 (12%)

(En rojo y negrita se señala el clon de SARM predominante en cada centro).

5.4.2 Epidemiología molecular de los SARM en cinco hospitales de Mallorca

El análisis de los patrones de banda de la ECP reveló que 298 de los 317 aislados de SARM (94%) pertenecían a uno de los tres clones mayoritarios de SARM detectados previamente en el HUSD. Así, de los 317 aislados de SARM detectados en los cinco hospitales, 106 (33%) pertenecían al clon A (ST125-IVc), 101 aislados (32%) al clon C (ST22-IVh) y 91 aislados (29%) al clon B (ST228-I). Cada uno de estos tres clones tenía diferentes subtipos en la ECP: 3 subtipos del clon A, 4 subtipos del clon C y otros 4 subtipos del clon B (tabla 17 y figura 44).

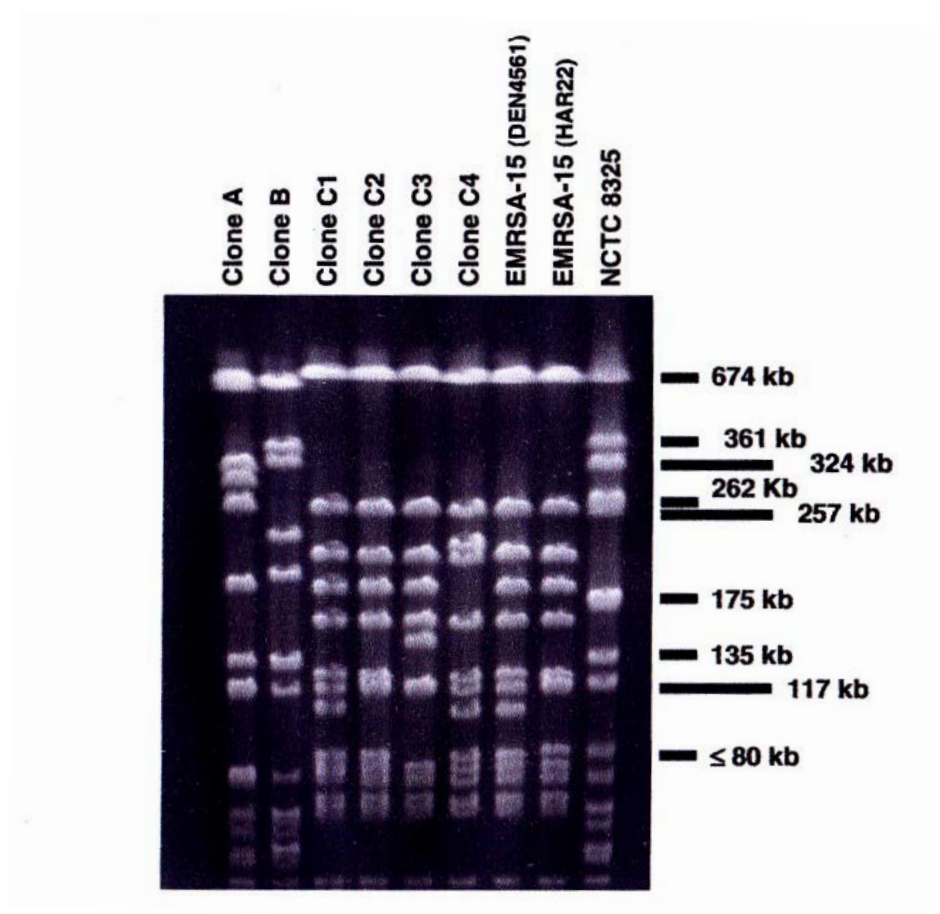


Figura 44. ECP, usando *Sma*I como enzima de restricción, de los tres clones mayoritarios detectados en el HUSD (clones A, B, C). Se han incluido dos cepas control del clon EMRSA-15 y la cepa de referencia NCTC 8325 utilizada como marcador de peso molecular (Alcoceba, 2007).

Antes de disponer en nuestro hospital de una unidad para secuenciación, se comparó el patrón de bandas del clon C con dos cepas control del clon EMRSA-15,

las cepas DEN4561 y HAR22, descritas en la **tabla 7** del apartado **4.1**. Los subtipos C1 y C2 del HUSD resultaron ser idénticos, respectivamente, a las cepas DEN4561 y HAR22, con lo que se comprobó que el clon C se correspondía con el clon EMRSA-15 (**figura 44**). Unos años más tarde se confirmaría mediante MLST.

Si bien estos tres clones mayoritarios de SARM se detectaron en los cinco centros participantes, hubo diferencias en cada hospital en cuanto a la proporción de cada uno de los tres clones. En el HUSD, el clon mayoritario durante dicho período fue el clon B (ST228-I), presente en el 36% de los pacientes con un cultivo positivo para SARM. Sin embargo, el clon A (ST125-IVc) fue el clon de SARM más frecuente en el HJM (53% de los aislados de SARM) y en el HSL (42%), mientras que el clon C (ST22-IVh) fue el más frecuente en el HM (57%) y en el HG (47%) (**tabla 17**).

Respecto a los 10 pacientes que ingresaron en dos hospitales distintos durante este período, en 8 de ellos se les aisló el mismo clon con el mismo subtipo de SARM, mientras que otro paciente tuvo el mismo clon con diferente subtipo. Sin embargo, en el paciente restante se le detectó un clon distinto durante cada ingreso (dicho paciente ingresó en dos hospitales diferentes con un intervalo de 3 meses entre los dos cultivos positivos). Estos datos se muestran en la **tabla 18**.

Tabla 18. Pacientes que ingresaron en dos hospitales distintos.

Paciente (Iniciales)	Hospital 1º ingreso	Clon SARM 1º ingreso	Hospital 2º ingreso	Clon SARM 2º ingreso	Intervalo entre los dos cultivos positivos
1 (DAV)	HUSD	C2	HSL	C2	10 meses
2 (EBV)	HUSD	A	HG	A	3 meses
3 (AMN)	HUSD	B4	HM	B4	1 mes
4 (RMD)	HM	C2	HUSD	C2	7 meses
5 (MPC)	HUSD	C2	HJM	A1	3 meses
6 (APA)	HUSD	C2	HG	C2	7 meses
7 (ASG)	HSL	A	HUSD	A	1 día
8 (VSR)	HUSD	B4	HM	B4	6 meses
9 (ASN)	HUSD	B	HJM	B	2 meses
10 (BVM)	HSL	A1	HUSD	A	1 mes

(En rojo se muestra el paciente con el cambio de clon y en verde el paciente con el mismo clon pero diferente subtipo).

5.5 Tipado del SCCmec

El tipado del SCC*mec* se realizó mediante dos PCR en las cepas de SARM detectadas en 2008 y 2012-2013 (**figuras 45 y 46**). La primera era una PCR múltiple que amplifica un fragmento de los complejos *ccr* tipo 1 (presente en el SCC*mec* tipo I) y *ccr* tipo 2 (presente en los SCC*mec* tipo II y tipo IV). La segunda PCR amplifica un fragmento del complejo *mec* de clase B (presente en los SCC*mec* tipo I y tipo IV).

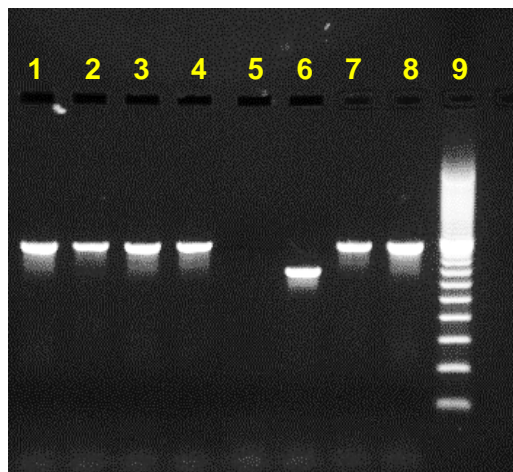


Figura 45. PCR del complejo *ccr* del SCC*mec*. Carriles 1-4: cepas de SARM con SCC*mec* tipo IV (*ccr* tipo 2); carril 5: control negativo; carril 6: clon ST228-I (*ccr* tipo 1); carril 7: clon ST36-II (*ccr* tipo 2); carril 8: clon ST22-IVh (*ccr* tipo 2); carril 9: marcador de peso molecular de 100-1000 pb.

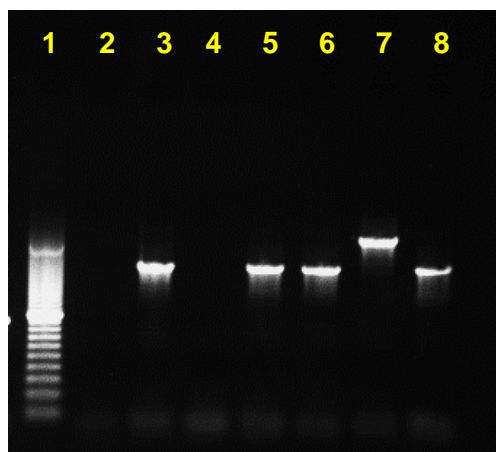


Figura 46. PCR del complejo de clase B del SCC*mec*. Carril 1: marcador de peso molecular de 100-1000 pb; carril 2: control negativo; carril 3: clon ST228-I (complejo *mec* de clase B); carril 4: clon ST36-II (complejo *mec* de clase A); carril 5: clon ST8-IVa (complejo *mec* de clase B); carril 6: clon ST125-IVc (complejo *mec* de clase B); carril 7: clon ST72-IVc (complejo *mec* de clase B); carril 8: clon ST22-IVh (complejo *mec* de clase B).

En el período de 2008, de los 132 aislados de SARM analizados, 7 (5%) tuvieron el complejo *ccr* de tipo 1, 124 (94%) el complejo *ccr* de tipo 2, y 1 aislado (1%) el complejo *ccr* de tipo 5. Respecto al complejo *mec* de clase B, se detectó en 129 de los 132 aislados de SARM (98%). Curiosamente, el fragmento amplificado del complejo *mec* de clase B en todos los aislados del clon ST72-IVc era de un tamaño mayor que en el resto de clones. Ello se debe a que dentro del fragmento amplificado del clon ST72-IVc se encuentra insertado el gen *tnp20*, perteneciente a la familia de la transposasa 20, de 1.014 pb (**figura 47**) (Park, 2009).

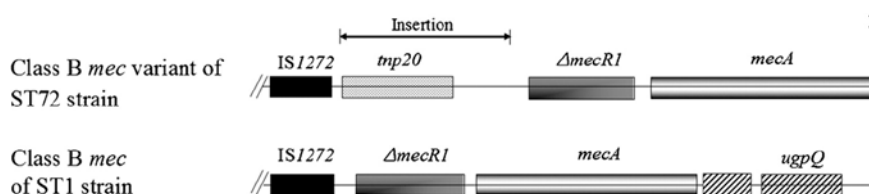


Figura 47. Comparación del complejo *mec* de clase B del clon ST72-IVc (con la inserción del *tnp20*) con el clon ST1-IVc (complejo *mec* de clase B convencional) (Park, 2009).

En consecuencia, de los 132 aislados de SARM detectados en 2008, 122 (92%) fueron clasificados como portadores del SCC*mec* tipo IV, 7 (5%) con el SCC*mec* tipo I, otros 2 (2%) con el SCC*mec* tipo II y 1 aislado (1%) con el SCC*mec* tipo V.

Respecto al último período estudiado (2012-2013), 28 de los 29 aislados de SARM (96,6%) tenían el *ccr* de tipo 2 y el aislado restante (3,4%) el *ccr* de tipo 5. El complejo *mec* de clase B estaba presente en 26 de 29 aislados (89,7%). Así, 26 cepas de SARM (89,7%) tuvieron el SCC*mec* tipo IV, dos (6,9%) el SCC*mec* tipo II y una cepa (3,4%) el SCC*mec* tipo V.

5.6 Subtipado del SCC*mec* tipo IV

Se realizó el subtipado del SCC*mec* tipo IV en los 122 aislados de SARM portadores del SCC*mec* tipo IV detectados en 2008, utilizando cebadores para la amplificación de los subtipos IVa, IVc y IVh (**figura 48**). De las 122 cepas, 63 (51%) tenían el subtipo IVc, 52 (43%) el subtipo IVh y los 7 restantes (6%) el subtipo IVa.

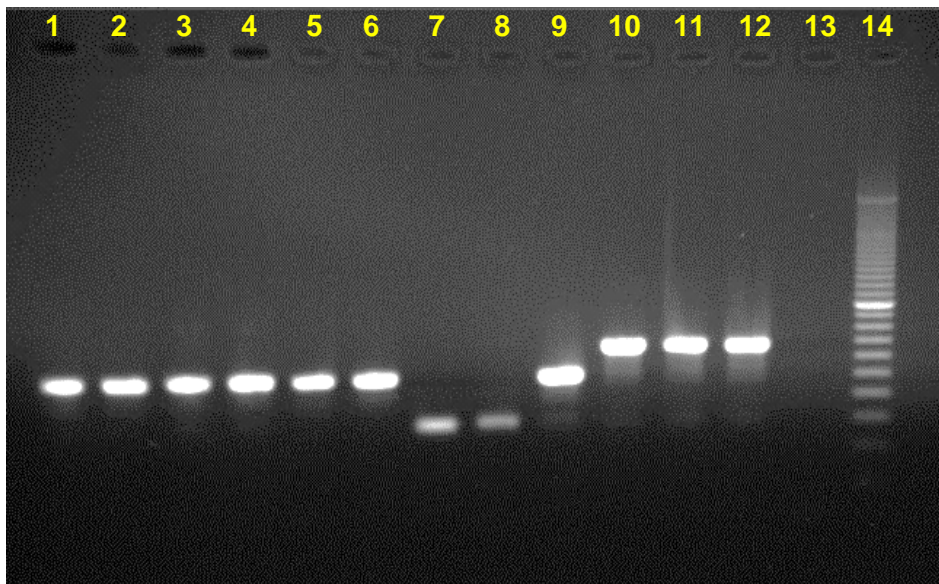


Figura 48. PCR para el subtipado del SCCmec tipo IV. Carriles 1-6: subtipo IVc; carriles 7-8: subtipo IVa; carril 9: subtipo IVc; carriles 10-12: subtipo IVh; carril 13: control negativo; carril 14: marcador de peso molecular de 100-1000 pb.

Llama la atención que, de las 53 cepas clínicas del clon ST22-MRSA-IV (EMRSA-15) detectadas en 2008, 52 poseían en subtipo IVh del SCCmec. Sin embargo, hubo una cepa con el secuenciotipo ST22 (confirmado por MLST) que era portadora del subtipo IVa del SCCmec. Esta cepa se aisló en una herida de un paciente proveniente de Rumanía ingresado en la UCI. El patrón de bandas de la ECP se correspondía con el subtipo C1. Curiosamente, en el estudio de sensibilidad, dicha cepa (ST22-IVa) era únicamente resistente a los antibióticos β -lactámicos.

En el período 2012-2013, de las 26 cepas con SCCmec tipo IV estudiadas, 13 (50,0%) tenían el subtipo IVc, otras 10 (38,5%) el subtipo IVh, y 2 (7,7%) el subtipo IVa. Hubo un aislado (3,8%) del clon ST8-IV que no se pudo subtipar con cebadores para los subtipos IVa, IVc y IVh. Asimismo, se detectó un aislado con el secuenciotipo ST45 portador del subtipo SCCmec IVh, subtipo uniformemente asociado al clon ST22-IV (EMRSA-15). Ello podría indicar una recombinación entre dos SCCmec, si bien este aspecto no se ha estudiado.

5.7 Detección de los genes codificantes de la LPV y del ACME

En 2007 se detectaron en nuestro hospital las primeras cepas de SARM resistentes únicamente a los antibióticos β -lactámicos. La PCR para los genes productores de la LPV era positiva en la mayoría de estas cepas.

En 2008, se efectuó la PCR de LPV en las 132 cepas de SARM de pacientes distintos atendidos en el HUSD. Nueve de estos 132 aislados de SARM (7%) fueron productores de LPV. De ellos, 4 pertenecían al clon ST8-MRSA-IVa (USA300), otros 4 al clon ST8-MRSA-IVc (USA300-*like*) y 1 aislado al clon ST5-MRSA-IVa. En la **tabla 19** se describen las características de los pacientes con detección positiva de LPV. Estas nueve cepas productoras de LPV se aislaron a partir de exudados cutáneos, abscesos o úlceras. Cuatro procedían de pacientes de Urgencias de adultos, tres de Urgencias de Pediatría, uno de Neonatología, mientras que el paciente restante procedía de Consultas Externas de Enfermedades Infecciosas. En la ECP se detectaron varios subtipos de ellos (**figura 49**).

Tabla 19. Características clínico-microbiológicas de los pacientes con SARM LPV+ de 2008.

Paciente (iniciales)	Fecha cultivo	Servicio procedencia	Clínica	Edad (años)	País nacimiento	Clon
1 (PJGR)	Febrero 2008	Urgencias Pediatría	Absceso glúteo	2	España (padres de Ecuador)	ST8-IVc
2 (FJML)	Marzo 2008	Urgencias Traumatología	Absceso	23	Desconocido	ST8-IVc
3 (DJAC)	Julio 2008	CE. Infecciosas	Forunculosis	34	España	ST8-IVa
4 (JRC)	Agosto 2008	Urgencias Pediatría	Absceso	3	España	ST8-IVc
5 (RMC)	Noviembre 2008	Urgencias Pediatría	Impétigo	7	España (padres de Rumanía)	ST8-IVa
6 (MFS)	Noviembre 2008	Neonatos	Epidermolisis ampollosa congénita	0	España	ST8-IVa
7 (RARV)	Noviembre 2008	Urgencias adultos	Celulitis tras picadura insecto	28	Desconocido	ST5-IVa
8 (SP)	Diciembre 2008	Urgencias adultos	Úlcera pie diabético	58	Desconocido	ST8-IVa
9 (APP)	Diciembre 2008	Urgencias adultos	Úlcera pierna	83	España	ST8-IVc

(CE: Consultas Externas).

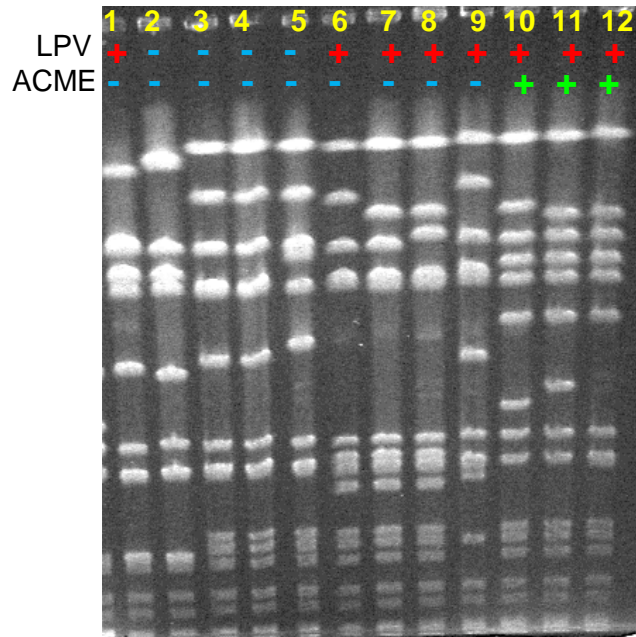


Figura 49. ECP de distintos subtipos de los clones ST5-IV y ST8-IV. Carril 1: ST5-IVa (LPV+); carril 2: ST5-IVc (LPV-); carriles 3-5: ST8-IVc (LPV-); carriles 6-9: ST8-IVc (LPV+, ACME-, USA300-like); carriles 10-12: ST8-IVa (LPV+, ACME+, USA300). Encima de cada carril se indica la producción (+) o no producción (-) de LPV, así como la producción (+) o no producción (-) de ACME.

El gen *arcA*, codificante del ACME, se detectó en 4 de los 132 aislados de SARM (3%), todos ellos pertenecientes al clon ST8-MRSA-IVa (USA300) (figura 50).

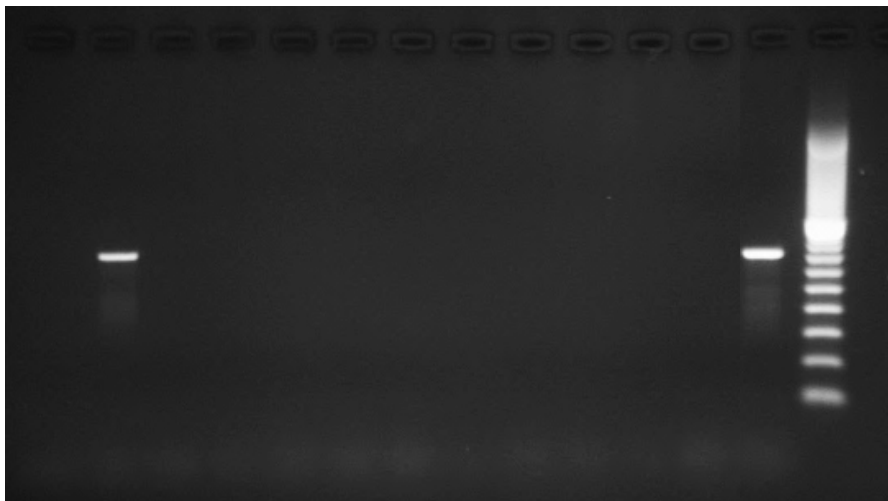


Figura 50. PCR del ACME. Carril 1: cepa ACME negativa; carril 2: cepa ACME positiva; carriles 3-11: cepas ACME negativas; carril 12: control negativo; carril 13: control positivo (USA300); carril 14: marcador de peso molecular de 100-1000 pb.

En el período septiembre 2012-febrero 2013, se detectaron los genes productores de la LPV en 5 de las 29 cepas de SARM tipificadas (17%). De estas cinco cepas, tres pertenecían al clon ST8-MRSA-IVc (USA300-*like*) y una al ST8-MRSA-IVa (USA300). La otra cepa productora de LPV también tenía el secuenciotipo ST8-MRSA-IV, pero no se pudo obtener un resultado positivo en la PCR para el subtipado del SCC mec tipo IV (usando cebadores para los subtipos IVa, IVc y IVh). Los genes productores del ACME se detectaron únicamente en el aislado del clon ST8-MRSA-IVa (USA300).

Los cinco aislados de SARM productores de LPV de 2012-2013 procedían a partir de tres exudados (cutáneo, de absceso y de uña), de un líquido ascítico y de un esputo. Las características de estos pacientes se resumen en la **tabla 20**.

Tabla 20. Características clínico-microbiológicas de los pacientes con SARM LPV+ de 2012-2013.

Paciente (iniciales)	Fecha cultivo	Servicio	Clínica	Edad (años)	País nacimiento	Clon
1 (ERGB)	Sept. 2012	Consultas	Absceso mano	40	España	ST8-IVc
2 (GSR)	Sept. 2012	UCI	Bronquitis	60	Desconocido	ST8-IVc
3 (YLAC)	Nov. 2012	Pediatría	Uña encarnada	14	Desconocido	ST8-IVa
4 (MECR)	Dic. 2012	CGD	Ascitis	56	Desconocido	ST8-IV
5 (KGG)	Febr. 2013	Pediatría	Celulitis	1 mes	España (padres de América Latina)	ST8-IVc

(UCI: Unidad de Cuidados Intensivos; CGD: Cirugía General y Digestiva).

5.8 Patrones de resistencia antibiótica de las cepas de SARM del HUSD-HUSE

La información en cuanto a la sensibilidad de los aislados de SARM del período 1999-2000 se encuentra disponible en un sistema informático antiguo en uso en el HUSD, aunque únicamente constan los resultados de unos pocos antibióticos. Por razones de uniformidad y coherencia, el análisis de la sensibilidad de los aislados de SARM se ha llevado a cabo a partir de 2002.

Durante el segundo período (julio 2002-junio 2004), todos los aislados de SARM del HUSD fueron sensibles a la vancomicina y teicoplanina, mientras que únicamente el 1% de las cepas fueron resistentes al cotrimoxazol, un 2% a la rifampicina, un 4% al ácido fusídico y un 5% a la mupirocina. Por el contrario, la gran mayoría de los aislados de SARM fueron resistentes al ciprofloxacino (96%) y a la eritromicina (82%). Con respecto a la clindamicina, 141 aislados (68%) presentaban una resistencia MLS_B constitutiva, mientras que otros 28 aislados (14%) mostraban

un fenotipo MLS_B inducible. La resistencia a la gentamicina fue variable (48%). Todos estos datos se muestran en la **tabla 21**.

Durante el tercer estudio (enero-diciembre 2008), todas las cepas de SARM del HUSD fueron sensibles a la vancomicina, teicoplanina, linezolid y cotrimoxazol, mientras que únicamente un 1% de las cepas (un único aislado) fueron resistentes a la tetraciclina, un 2% a la rifampicina, otro 2% al ácido fusídico y un 5% a la mupirocina. La resistencia al ciprofloxacino (91%), eritromicina (52%) y clindamicina (resistencia MLS_B constitutiva 19%) fue menor que en el período anterior.

Respecto al cuarto estudio (septiembre 2012 – febrero 2013), dado el bajo número de aislados de SARM tipificados, no se pueden sacar conclusiones fiables. A pesar de ello, a modo orientativo, se confirma la tendencia observada en 2008 de una mayor susceptibilidad de los aislados de SARM al ciprofloxacino (resistencia del 79%), a la eritromicina (resistencia del 45%) y a la clindamicina (resistencia MLS_B constitutiva del 7%). Por el contrario, se constató un leve aumento de la resistencia MLS_B inducible a la clindamicina (14% en el segundo y tercer período, frente a un 24% en el cuarto).

Tabla 21. Resistencia antibiótica general de los aislados de SARM del HUSD-HUSE en los tres períodos estudiados.

Antibiótico	Nº de aislados de SARM resistentes (%)		
	Julio 2002 - junio 2004 (n=208)	Enero 2008 - diciembre 2008 (n=132)	Septiembre 2012 - febrero 2013 (n=29)
Eritromicina	170 (82%)	69 (52%)	13 (45%)
Clindamicina MLS _B constitutivo ^a	141 (68%)	25 (19%)	2 (7%)
MLS _B inducible ^a	28 (14%)	19 (14%)	7 (24%)
Ciprofloxacino	199 (96%)	120 (91%)	23 (79%)
Gentamicina	100 (48%)	24 (18%)	0
Tobramicina	ND ^b	68 (52%)	7 (24%)
Tetraciclina	ND ^b	1 (1%)	4 (14%)
Cotrimoxazol	3 (1%)	0	0
Rifampicina	4 (2%)	3 (2%)	1 (3%)
Vancomicina	0	0	0
Teicoplanina	0	0	0
Linezolid	ND ^b	0	0
Mupirocina	11 (5%)	6 (5%)	2 (7%)
Ácido fusídico	8 (4%)	2 (2%)	0

^aMLS_B: fenotipo de resistencia a macrólidos, lincosamida, estreptogramina tipo B; ^bND: no determinado.

En la **figura 51** se representa gráficamente la resistencia antibiótica de los aislados de SARM del HUSD-HUSE durante los tres períodos. No se muestran los antibióticos que no presentan resistencia ni aquellos en los que únicamente se ha realizado el estudio de sensibilidad a partir de 2008 (tetraciclina, tobramicina y linezolidina), al igual que en las gráficas similares posteriores.

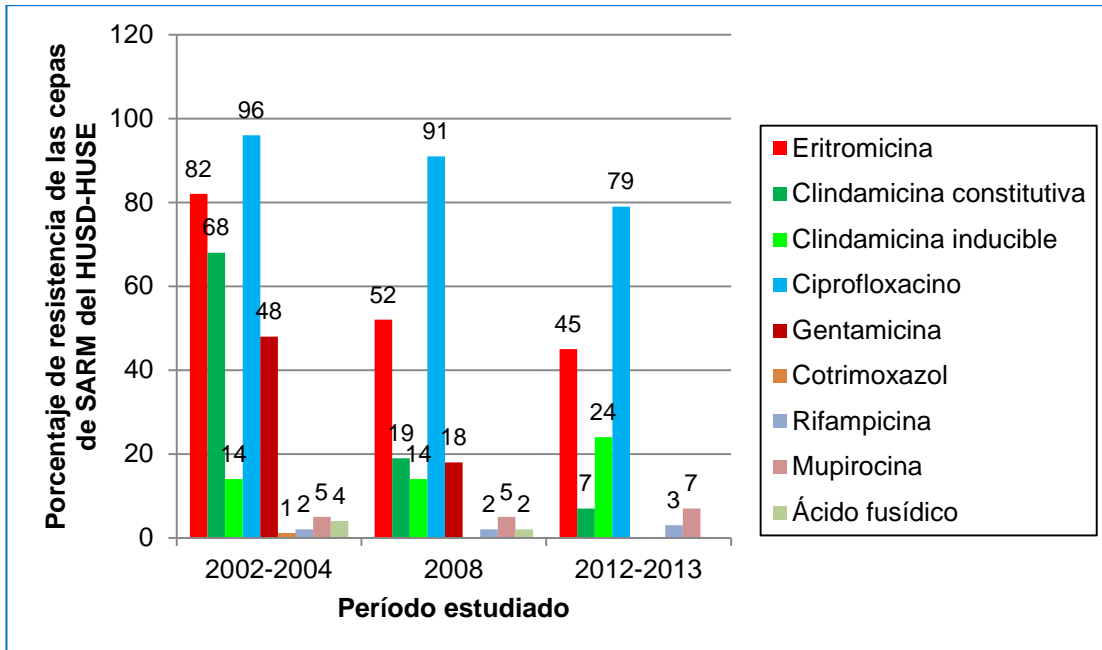


Figura 51. Esquema de la resistencia antimicrobiana de las cepas de SARM del HUSD-HUSE durante los tres períodos estudiados.

En las siguientes tres tablas (**tablas 22-24**) y figuras (**figuras 52-54**) se muestra la sensibilidad analizada para cada uno de los tres clones mayoritarios de SARM del HUSD-HUSE en los tres estudios. El clon ST228-MRSA-I (clon B), predominante en 2002-2004, fue significativamente más resistente que los otros dos, presentando de forma uniforme resistencia al ciprofloxacino y tobramicina; y mayoritariamente (>97%) también a la eritromicina, clindamicina y a gentamicina. Por contra, el clon ST22-MRSA-IVh (clon C, EMRSA-15) mostró las tasas más bajas de multirresistencia de entre estos tres clones, con una muy baja resistencia a la gentamicina y tobramicina. Curiosamente, la resistencia MLS_B inducible fue más frecuente en el clon ST22-IVh que en los otros dos. En comparación al período 2002-2004, a partir de 2008 se ha constatado un descenso en la tasa de resistencia a la clindamicina para los clones ST22-IVh (clon C) y ST125-IVc (clon A).

Tabla 22. Resistencia antibiótica del clon ST125-MRSA-IVc (clon A) en los tres periodos estudiados.

Antibiótico	Nº de aislados de SARM resistentes (%)		
	Julio 2002 - junio 2004 (n=54)	Enero - diciembre 2008 (n=40)	Septiembre 2012 - febrero 2013 (n=7)
Eritromicina	39 (72%)	31 (78%)	3 (43%)
Clindamicina			
MLS _B constitutivo ^a	36 (67%)	9 (23%)	0
MLS _B inducible ^a	3 (6%)	1 (3%)	0
Ciprofloxacino	52 (97%)	40 (100%)	7 (100%)
Gentamicina	9 (17%)	14 (35%)	0
Tobramicina	ND ^b	39 (98%)	4 (57%)
Tetraciclina	ND ^b	0	0
Cotrimoxazol	0	0	0
Rifampicina	4 (7%)	2 (5%)	0
Vancomicina	0	0	0
Teicoplanina	0	0	0
Linezolid	ND ^b	0	0
Mupirocina	3 (6%)	5 (13%)	0
Ácido fusídico	3 (6%)	0	0

^aMLS_B: fenotipo de resistencia a macrólidos, lincosamida, estreptogramina tipo B. ^bND: no determinado.

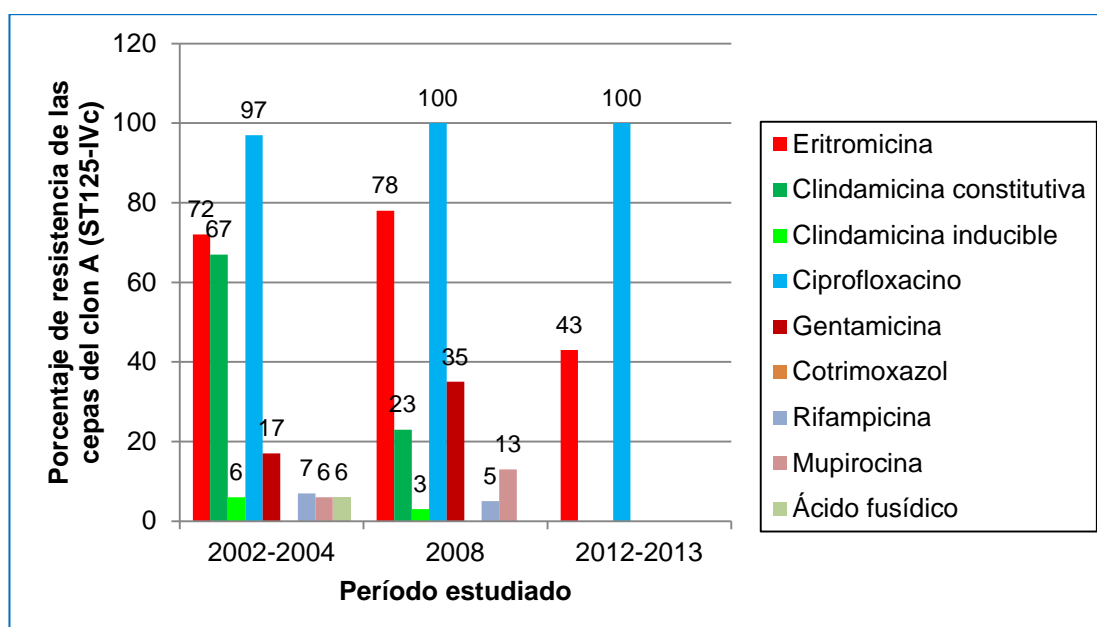


Figura 52. Esquema de la resistencia antimicrobiana del clon A (ST125-IVc) durante los tres periodos estudiados.

Tabla 23. Resistencia antibiótica del clon ST228-MRSA-I (clon B) en dos períodos estudiados^a.

Antibiótico	Nº de aislados de SARM resistentes (%)	
	Julio 2002 - junio 2004 (n=90)	Enero - diciembre 2008 (n=7)
Eritromicina	89 (99%)	7 (100%)
Clindamicina MLS _B constitutivo ^b	87 (97%)	7 (100%)
MLS _B inducible ^b	2 (2%)	0
Ciprofloxacino	90 (100%)	7 (100%)
Gentamicina	87 (97%)	7 (100%)
Tobramicina	ND ^c	7 (100%)
Tetraciclina	ND ^c	0
Cotrimoxazol	1 (1%)	0
Rifampicina	0	1 (14%)
Vancomicina	0	0
Teicoplanina	0	0
Linezolid	ND ^c	0
Mupirocina	8 (9%)	0
Ácido fusídico	1 (1%)	0

^a: no se encontró ningún aislado de este clon durante el período 2012-2013.

^bMLS_B: fenotipo de resistencia a macrólidos, lincosamida, estreptogramina tipo B. ^cND: no determinado.

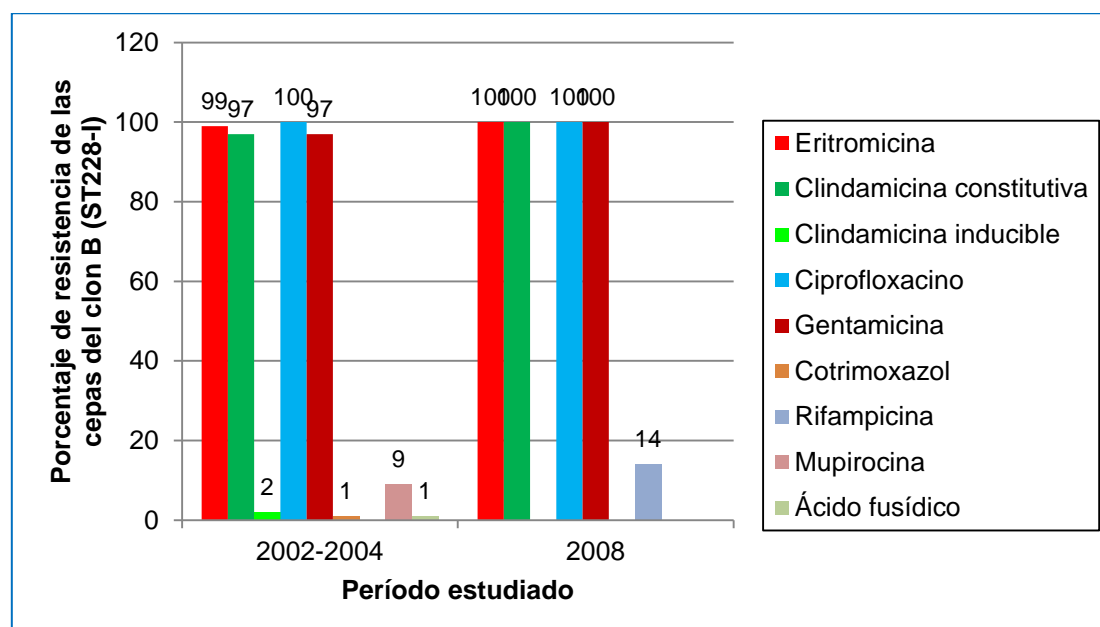


Figura 53. Esquema de la resistencia antimicrobiana del clon B (ST228-I) en dos períodos estudiados.

Tabla 24. Resistencia antibiótica del clon ST22-MRSA-IVh (clon C) en los tres períodos estudiados.

Antibiótico	Nº de aislados de SARM resistentes (%)		
	Julio 2002 - junio 2004 (n=49)	Enero - diciembre 2008 (n=53)	Septiembre 2012 - febrero 2013 (n=9)
Eritromicina	33 (67%)	19 (36%)	4 (45%)
Clindamicina			
MLS _B constitutivo ^a	9 (18%)	4 (8%)	1 (11%)
MLS _B inducible ^a	23 (47%)	15 (28%)	3 (34%)
Ciprofloxacino	48 (98%)	52 (98%) ^c	9 (100%)
Gentamicina	1 (2%)	1 (2%)	0
Tobramicina	ND ^b	3 (6%)	0
Tetraciclina	ND ^b	0	0
Cotrimoxazol	0	0	0
Rifampicina	0	0	0
Vancomicina	0	0	0
Teicoplanina	0	0	0
Linezolid	ND ^b	0	0
Mupirocina	0	0	0
Ácido fusídico	4 (8%)	1 (2%)	0

^aMLS_B: fenotipo de resistencia a macrólidos, lincosamida, estreptogramina tipo B. ^bND: no determinado.

^cUn aislado del clon C sensible al ciprofloxacino poseía el subtipo IVa, en vez del IVh.

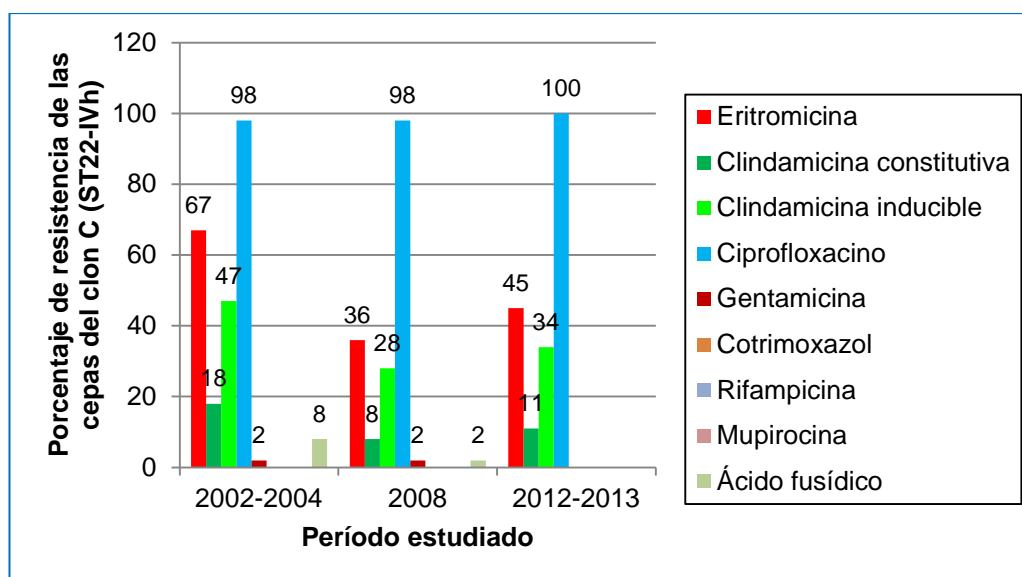


Figura 54. Esquema de la resistencia antimicrobiana del clon C (ST22-IVh) durante los tres períodos estudiados.

En la **tabla 25** se muestra los perfiles de resistencia de los clones de SARM de 2008 (excluyendo algunos clones minoritarios).

Tabla 25. Perfiles de resistencia de los principales clones (2008).

Secuenciotipo	Perfil de resistencia	Nº aislados
ST125-IVc (clon A)	CIP + TOB + ERI	13 / 40
	CIP + TOB	6 / 40
	CIP + TOB + ERI + CLI	5 / 40
	CIP + TOB + ERI + GEN	4 / 40
	CIP + TOB + ERI + GEN + MUP	3 / 40
	CIP + TOB + ERI + CLI + GEN	2 / 40
	CIP + TOB + GEN	2 / 40
	CIP + TOB + ERI + CLI + GEN + RIF	1 / 40
	CIP + TOB + ERI + CLI + GEN + MUP	1 / 40
	CIP + TOB + GEN + MUP	1 / 40
	CIP + TOB + RIF	1 / 40
	CIP + ERI + CLI ind	1 / 40
ST228-I (clon B)	CIP + TOB + ERI + CLI + GEN	6 / 7
	CIP + TOB + ERI + CLI + GEN + RIF	1 / 7
ST22-IVh (clon C)	CIP	31 / 52
	CIP + ERI + CLI ind	14 / 52
	CIP + ERI + CLI	4 / 52
	CIP + ERI + CLI ind + FUS	1 / 52
	CIP + TOB	1 / 52
	CIP + TOB + GEN	1 / 52
ST22-IVa	Sólo β -lactámicos	1 / 1
ST72-IVc	CIP + TOB	10 / 13
	CIP + TOB + ERI + CLI ind	1 / 13
	CIP + TOB + ERI + CLI ind + MUP	1 / 13
	TOB	1 / 13
ST8-IVa LPV+ (USA300)	ERI	2 / 4
	ERI + CIP	2 / 4
ST8-IVc LPV+ (USA300-like)	Sólo β -lactámicos	3 / 4
	ERI + CLI	1 / 4
ST8-IVc LPV-	CIP + TOB + ERI + CLI	2 / 2
ST146-IVc	CIP	1 / 2
	CIP + FUS	1 / 2
ST398-V	TET + TOB + ERI + CLI	1 / 1

^aAbreviaturas. CIP: ciprofloxacino; CLI: clindamicina; ERI: eritromicina; FUS: ácido fusídico; GEN: gentamicina; ind: resistencia inducible; MUP: mupirocina, RIF: rifampicina; TET: tetraciclina, TOB: tobramicina.

Como se observa en la tabla anterior, el clon ST228-I fue resistente a más grupos antibióticos que los clones ST125-IVc y ST72-IVc, y estos a su vez, más resistentes que el clon ST22-IVh. En las **figuras 55-57** se ha esquematizado los perfiles de resistencia antibiótica de los tres clones mayoritarios de SARM de durante los dos primeros períodos.

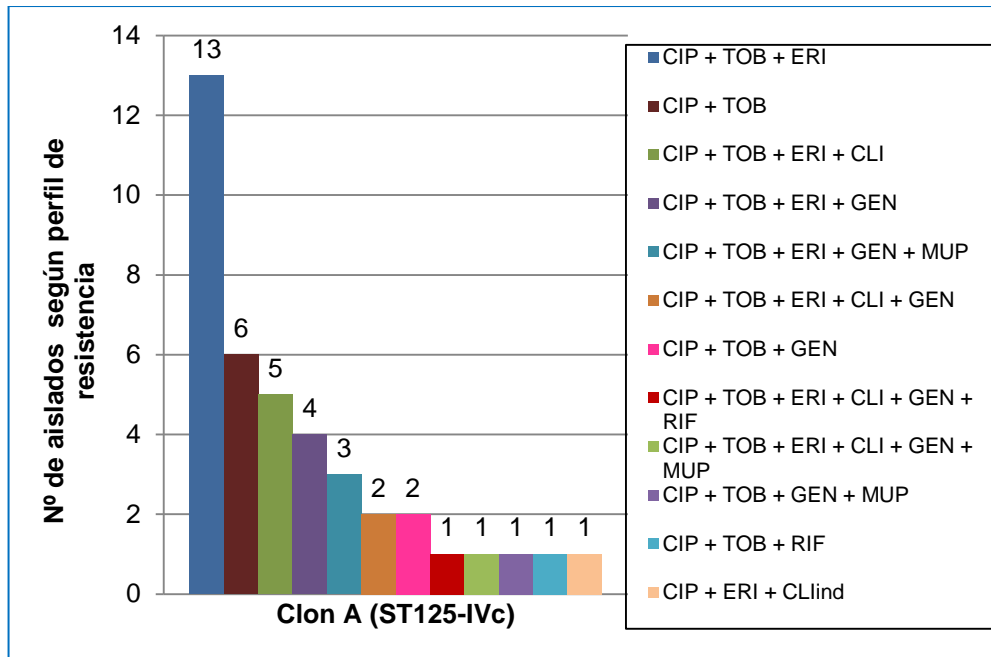


Figura 55. Esquema de los diversos perfiles de resistencia antimicrobiana del clon A (ST125-MRSA-IVc) en 2008.

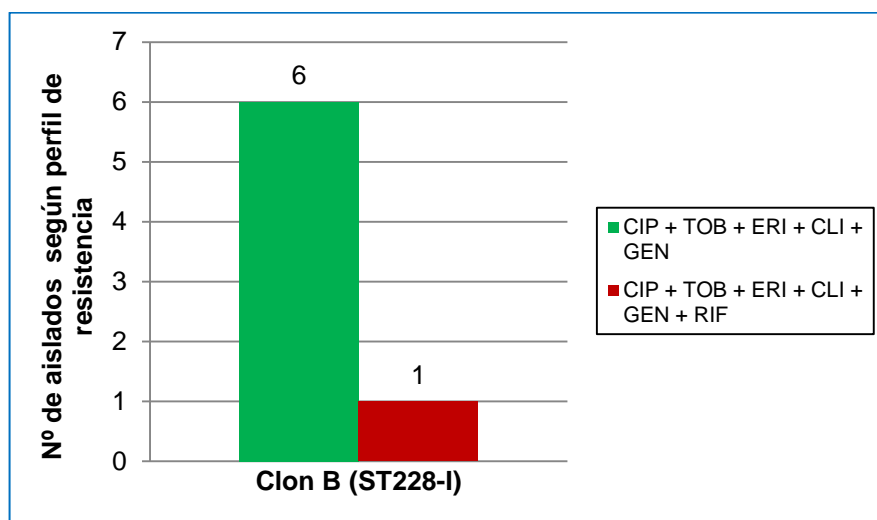


Figura 56. Esquema de los diversos perfiles de resistencia antimicrobiana del clon B (ST228-MRSA-I) en 2008.

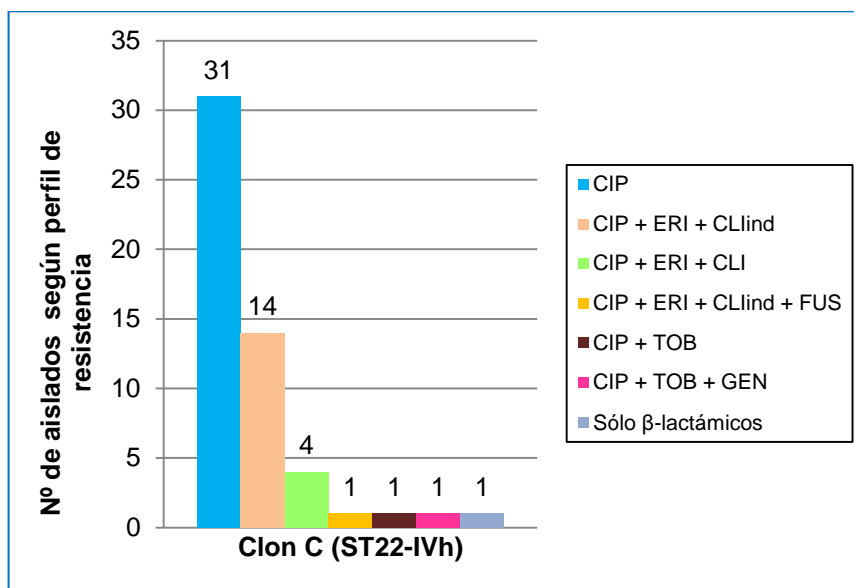


Figura 57. Esquema de los diversos perfiles de resistencia antimicrobiana del clon C (ST22-MRSA-IVh) en 2008.

Por último, respecto a los aislados del clon ST8-IV que eran productores de LPV del 2008, llama la atención el diferente perfil de sensibilidad que presentaban las cepas del clon ST8-MRSA-IVc LPV+ ACME- (*USA300-like*) respecto a las cepas del clon ST8-MRSA-IVa LPV+ ACME+ (*USA300*). Así, tres de las cuatro cepas del clon *USA300-like* fueron sensibles a todos los antibióticos no β-lactámicos analizados; mientras que, todas las cuatro cepas del clon *USA300* fueron resistentes a la eritromicina, siendo dos de ellas, además, resistentes al ciprofloxacino.

PARTE 2: ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DE COLONIZACIÓN E INFECCIÓN POR *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A LA METICILINA EN UNA RESIDENCIA GERIÁTRICA DE MALLORCA

5.9 Residentes participantes y características poblacionales

Durante el control inicial (octubre-noviembre 2005), se recogió un exudado nasal a 465 de los 552 residentes geriátricos (84,2%). El motivo principal de la no recogida de muestras a más residentes fue el rechazo de algunos de ellos a la vacuna antigripal, ya que la obtención del frotis nasal tuvo lugar en el mismo momento que la vacunación. A todos los participantes se les solicitó su consentimiento oral.

Adicionalmente, se tomó un exudado cutáneo de las áreas de ruptura de la barrera cutánea (como úlceras de decúbito o heridas) a un total de 23 de los 465 residentes (4,9%) a los que se les recogió previamente un exudado nasal.

Las características de la población a estudio se reflejan en la **tabla 26**. La población participante de la residencia estaba formada por 317 mujeres (68%) y 148 varones (32%), con una edad mediana de 83 años. La mitad de los residentes (51%) habían ingresado en algún hospital en los últimos 5 años. El índice de Barthel medio (grado de dependencia) fue de 68 puntos (oscilando entre 0 -dependencia total- y 100 -independencia-).

Tabla 26. Características de los residentes participantes.

Característica	Residentes participantes (n=465)
Edad mediana (rango)	83 (60-103) años
Sexo	317 mujeres, 148 varones
Tiempo medio estancia (rango)	65 meses (2 días-23 años)
Procedencia:	
Domicilio	81%
Otros geriátricos	15%
Hospital de agudos	4%
Ingreso en hospital últimos 5 años	51%
Índice de Barthel medio	68 puntos
Enfermedad de base	72%
Úlcera de decúbito	6%
Otras lesiones cutáneas	7%

El 72% de los participantes en el estudio tenía alguna enfermedad de base; entre ellas, demencia (29%), diabetes mellitus (22%), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC, 16%), enfermedad vascular (10%) y neoplasia de órgano sólido (8%). En ninguno de ellos se diagnosticó una neoplasia hematológica, infección por VIH ni conectivopatía.

En resumen, se trataba de una población de edad muy avanzada, pero con un estado de salud aceptable para dicha edad.

5.10 Estudio de prevalencia de la colonización por *S. aureus*

Entre los 465 residentes participantes, un total de 89 fueron portadores nasales de *S. aureus*, de los que 37 (41,5% de los aislados de *S. aureus*) eran SARM. Así, un 8,0% de los residentes participantes tenían una colonización nasal por SARM (**figura 58**).

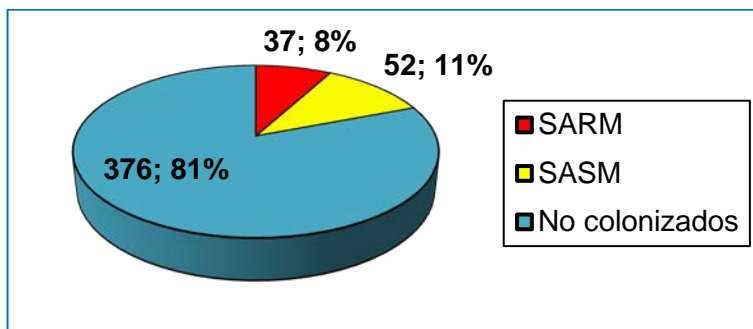


Figura 58. Colonización nasal por *S. aureus*.

En los 23 exudados de úlceras se detectaron 10 aislados de *S. aureus*, de los que 3 fueron SARM (**figura 59**). De estos tres residentes colonizados con SARM en la úlcera, dos eran también portadores nasales de SARM, mientras que, en el tercer residente se aisló SARM en una herida del pie con el cultivo nasal negativo.

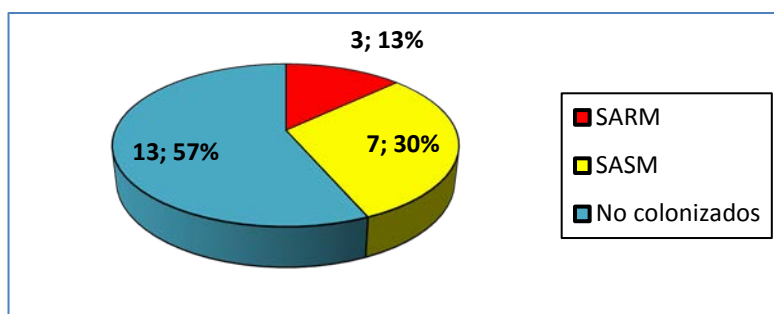


Figura 59. Colonización en úlcera por *S. aureus*.

En conjunto, detectamos 38 residentes colonizados con SARM (37 portadores nasales y 1 solamente en úlcera), lo que representa que el 8,1% de ellos estaban colonizados por esta bacteria multirresistente.

5.11 Factores de riesgo de la colonización por SARM

En el análisis univariante, los factores de riesgo de la colonización nasal por SARM se detallan en la **tabla 27** de la página siguiente. Como se aprecia en dicha tabla, los factores que parecieron estar relacionados con dicha colonización en nuestro estudio fueron el tratamiento antibiótico en el último mes ($p=0,0003$), el tener una enfermedad vascular ($p=0,009$), la EPOC ($p=0,003$), el ingreso previo en un hospital en los últimos 5 años ($p=0,03$), y el antecedente de neoplasia de órgano sólido ($p=0,03$) o de enfermedad renal ($p=0,03$).

Asimismo, los residentes portadores de SARM presentaban una tendencia a un mayor grado de dependencia (índice de Barthel de 54 en residentes colonizados por SARM frente a 68 en colonizados por SASM y 69 en no colonizados por *S. aureus*) y a una mayor comorbilidad (índice de Charlson de 2,3 en colonizados por SARM y 1,4 en no colonizados), sin alcanzar significación estadística.

Tabla 27. Análisis univariado de factores de riesgo de colonización por SARM^{a,b}.

Característica	Colonizados con SARM (n=38)	Colonizados con SASM (n=52)	No colonizados (n=375)	p
Edad mediana (rango)	86 (62-95)	81 (64-103)	83 (60-101)	
Sexo masculino/femenino	34% / 66%	21% / 79%	33% / 67%	
Duración estancia (meses)	70,27	61,38	65,30	
Procedencia:				
Domicilio	70%	90%	81%	
Otros geriátricos	22%	6%	15%	
Hospital de agudos	8%	4%	4%	
Ingreso en hospital últimos 5 años	68%	61%	48%	0,03
IAM	0	2%	6%	
ICC	3%	4%	7%	
Enfermedad vascular	21%	17%	7%	0,009
Demencia	39%	19%	30%	0,42
EPOC	37%	15%	14%	0,003
Enfermedad hepática	3%	4%	3%	0,66
Diabetes mellitus	31%	29%	20%	0,12
Hemiplejía	0	6%	4%	
Enfermedad renal	18%	8%	7%	0,03
Neoplasia órgano sólido	18%	10%	7%	0,03
Índice de Charlson (media)	2,3	1,6	1,4	
Índice de Barthel (media)	54	68	69	
Úlcera de decúbito	10%	0	6%	0,4
Otras lesiones cutáneas	13%	10%	6%	0,5
Sonda nasogástrica	0	0	0,3%	
Sonda urinaria	0	0	1%	
Catéter vascular	0	2%	0	
Tratamiento antibiótico actual	5%	2%	3%	0,66
Trat. antibiótico último mes	29%	6%	9%	0,0003
SARM previo conocido	5%	0	1%	0,16

^aAbreviaturas. IAM: infarto agudo de miocardio; ICC: insuficiencia cardíaca congestiva; EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; Trat: tratamiento.

^bSe muestran en color rojo y negrita las variables que son estadísticamente significativas.

5.12 Estudio de epidemiología molecular

5.12.1 Electroforesis en campo pulsado y MLST

Entre los 38 aislados de SARM, únicamente se detectaron, mediante ECP, dos clones distintos, con varios subtipos: el clon A [12 aislados (32%), con 3 subtipos] y el clon C [26 aislados (68%), con 5 subtipos]. Los diferentes patrones de bandas observados en la ECP se muestran en la **figura 60** de la página siguiente),

mientras que, en la **tabla 28** se especifica el número de aislados detectados de cada subtipo de SARM.

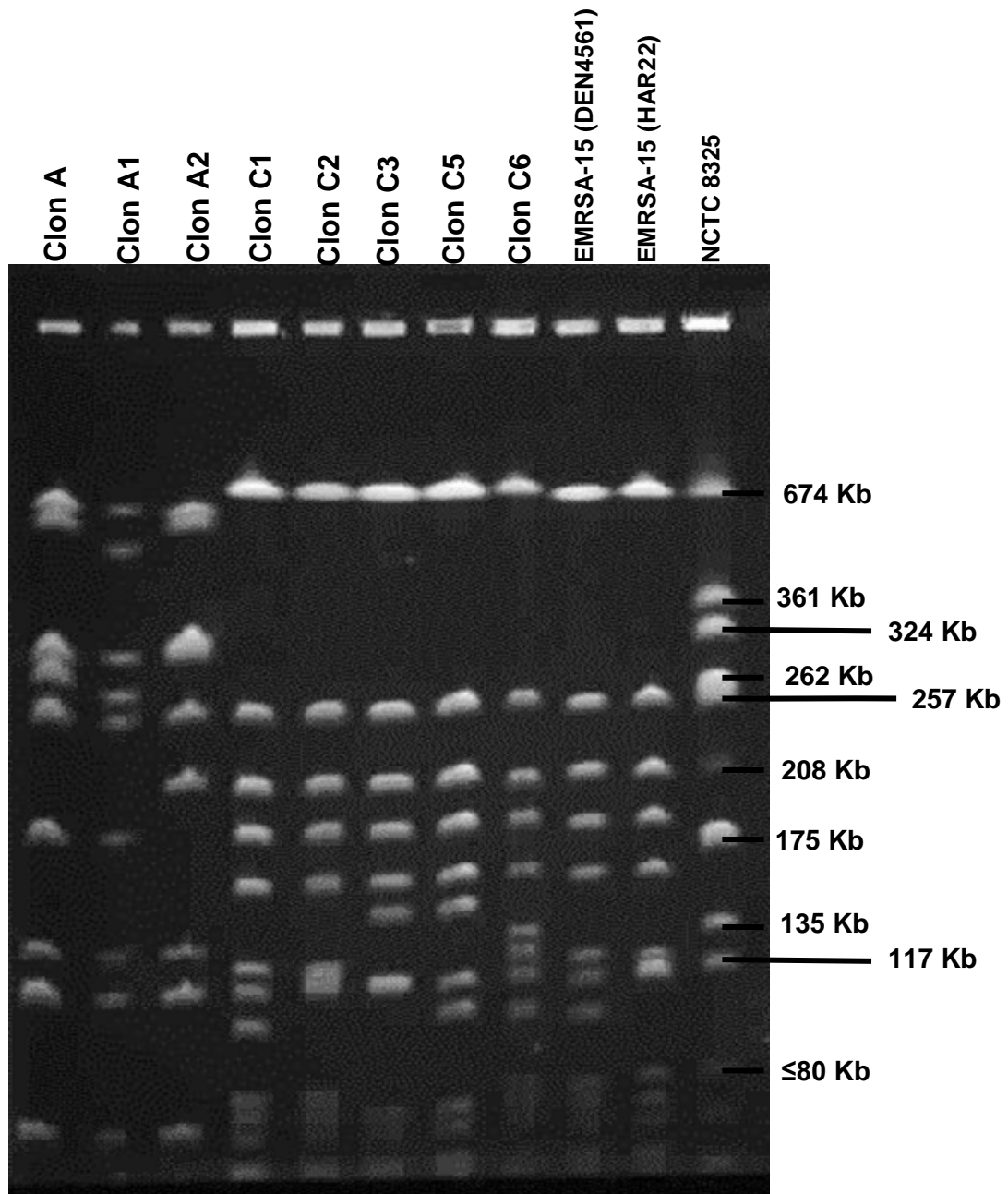


Figura 60. Electroforesis en campo pulsado de los diferentes clones y subtipos de SARM aislados en la Residencia Bonanova, junto con dos cepas tipificadas del clon EMRSA-15 y la cepa de *S. aureus* NCTC 8325 utilizada como marcador de peso molecular.

Tabla 28. Clones y subtipos de SARM en la Residencia Bonanova

Clon ECP	Secuenciotipo	Nº de aislados (%)
A	ST125-IVc	8 (21%)
A1	ST125-IVc	1 (3%)
A2	ST125-IVc	3 (7%)
C1	ST22-IVh	13 (34%)
C2	ST22-IVh	9 (24%)
C3	ST22-IVh	1 (3%)
C5	ST22-IVh	2 (5%)
C6	ST22-IVh	1 (3%)
Total		38 (100,0%)

Posteriormente, se realizó tipado mediante MLST ([Enright, 2000](#)) en dos aislados representativos de cada subtipo. Todos los aislados del clon A (subtipos A, A1 y A2) tenían el secuenciotipo ST125, mientras que todos los aislados del clon C (con los distintos cinco subtipos) tenían el secuenciotipo ST22.

Como ya se ha mencionado, la Residencia Bonanova está dividida en dos áreas funcionales diferenciadas pero comunicadas, una para pacientes asistidos (pisos 1-4) y otra para residentes válidos (pisos 7-9). El clon A (ST125-IVc) fue aislado casi exclusivamente en pacientes asistidos (11 asistidos, 1 válido), mientras que el clon C (ST22-IVh) estuvo más repartido (18 asistidos, 8 válidos). Hubo una pareja de residentes en el área de asistidos (que compartían habitación), que fueron ambos portadores nasales del mismo clon con el mismo subtipo (clon A).

5.12.2 Tipado del SCCmec

En la primera PCR, para la amplificación del complejo *ccr* de los tipos 1-3, todas las 38 cepas de SARM presentaron el complejo *ccr* de tipo 2 (presente en el SCCmec tipo II y SCCmec tipo IV) (**figura 61**). La segunda PCR, que amplifica un fragmento del del complejo *mec* de clase B, presente en el SCCmec tipo I y en el SCCmec tipo IV, fue positiva en todas las cepas (**figura 62**). En consecuencia, las 38 cepas de SARM fueron clasificadas como portadoras del casete cromosómico de resistencia SCCmec tipo IV.



Figura 61. PCR para el genotipado del complejo *ccr* del *SCCmec*. Carriles 1-14: cepas de SARM de la Residencia Bonanova (*SCCmec* tipo IV, con *ccr* tipo 2); carril 15: control negativo; carril 16: clon Ibérico (*SCCmec* tipo I, con *ccr* tipo 1); carril 17: clon NY/Japón (*SCCmec* tipo II, con *ccr* tipo 2); carril 18: clon Brasileño (*SCCmec* tipo III, con *ccr* tipo 3); carril 19: clon EMRSA-15 (*SCCmec* tipo IV, con *ccr* tipo 2); carril 20: marcador de peso molecular de 100-1000 pb.

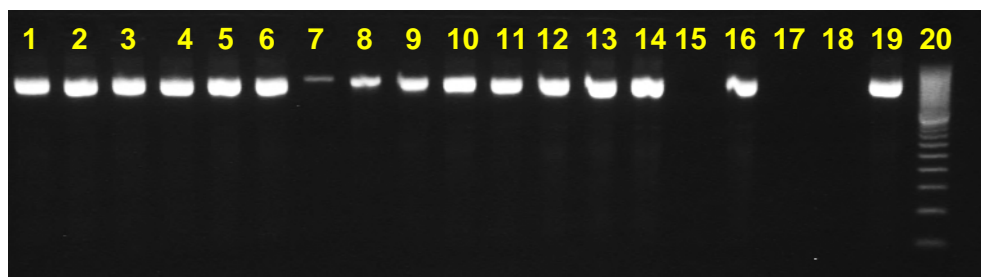


Figura 62. PCR para el genotipado del complejo *mec* de clase B. Carriles 1-14: cepas de SARM de la Residencia Bonanova (*SCCmec* tipo IV, con complejo *mec* de clase B); carril 15: control negativo; carril 16: clon Ibérico (*SCCmec* tipo I, con complejo *mec* de clase B); carril 17: clon NY/Japón (*SCCmec* tipo II, con complejo *mec* de clase A); carril 18: clon Brasileño (*SCCmec* tipo III, con complejo *mec* de clase A); carril 19: clon EMRSA-15 (*SCCmec* tipo IV, con complejo *mec* de clase B); carril 20: marcador de peso molecular de 100-1000 pb.

5.12.3 Subtipado del *SCCmec* tipo IV

Todos los aislados del clon ST125-IV (clon A) fueron portadores del subtipo IVc, mientras que todos los aislados del clon ST22-IV (clon C) fueron encuadrados en el subtipo IVh (**figura 63**).

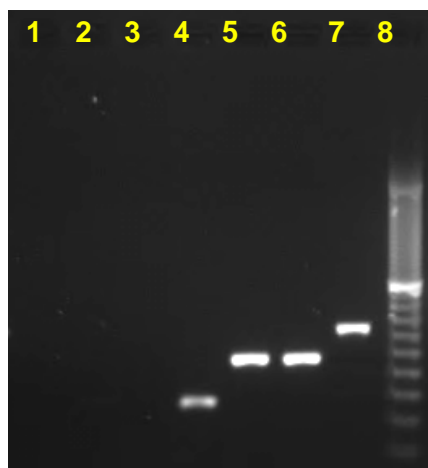


Figura 63. PCR para el subtipado del SCCmec tipo IV. Carril 1: control negativo; carril 2: clon Ibérico (SCCmec tipo I); carril 3: clon NY/Japón (SCCmec tipo II); carril 4: clon USA300 (SCCmec tipo IVa); carriles 5 y 6: cepas de SARM de la Residencia Bonanova (clon A, SCCmec tipo IVc); carril 7: cepa de SARM de la Residencia Bonanova (clon C, SCCmec tipo IVh); carril 8: marcador de peso molecular de 100-1000 pb.

5.13 Detección de la leucocidina de Panton-Valentine

No se detectaron los genes productores de esta toxina (*lukS-PV* y *lukF-PV*) en ningún aislado de SARM, mediante una PCR triple (**figura 64**). Por el contrario, como era de esperar, en todas las cepas de SARM aisladas en los residentes se detectaron los genes *mecA* (resistencia a la meticilina) y *nuc* (específico de *S. aureus*).

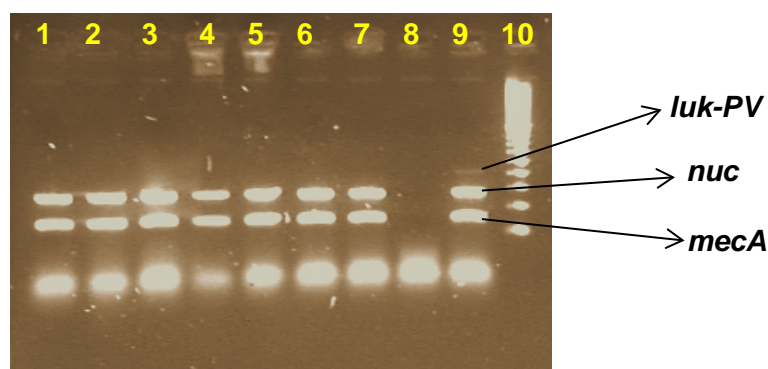


Figura 64. PCR para la detección de LPV. Carriles 1-7: cepas de SARM de la Residencia Bonanova; carril 8: control negativo; carril 9: cepa 3922-04 (control positivo); carril 10: marcador de peso molecular de 100-1000 pb.

5.14 Estudio de sensibilidad antimicrobiana

La resistencia antimicrobiana general y especificada por clones de las cepas de SARM del estudio inicial se resume en la **tabla 29** y en la **figura 65** de la siguiente página. Los resultados son un reflejo de la elevada clonalidad mostrada en el estudio de epidemiología molecular y coherentes también con los datos de los aislados clínicos de los hospitales de Mallorca.

Todos los aislados de SARM fueron sensibles a la vancomicina, teicoplanina, cotrimoxazol, rifampicina, tetraciclina, cloranfenicol y al ácido fusídico; y todos ellos fueron resistentes al ciprofloxacino. La resistencia fue variable para la tobramicina (todas las cepas del clon ST125-IVc fueron resistentes, mientras que todas las del clon ST22-IVh fueron sensibles), eritromicina (47% de resistencia) y clindamicina (10% de resistencia MLS_B constitutiva y 24% de resistencia MLS_B inducible). Un aislado del clon ST125-IVc fue resistente a la gentamicina y a la mupirocina.

Tabla 29. Resistencia antibiótica de SARM de la Residencia Bonanova.

Antibiótico	SARM totales (n=38)	Clon A (ST125-IVc) (n=12)	Clon C (ST22-IVh) (n=26)
Eritromicina	18 (47%)	8 (67%)	10 (38%)
Clindamicina			
MLS _B constitutivo ^a	4 (10%)	4 (33%)	0
MLS _B inducible ^a	9 (24%)	0	9 (35%)
Ciprofloxacino	38 (100%)	12 (100%)	26 (100%)
Gentamicina	1 (3%)	1 (8%)	0
Tobramicina	12 (31%)	12 (100%)	0
Cotrimoxazol	0	0	0
Rifampicina	0	0	0
Tetraciclina	0	0	0
Vancomicina	0	0	0
Cloranfenicol	0	0	0
Mupirocina	1 (3%)	1 (8%)	0
Ácido fusídico	0	0	0

^aMLS_B: fenotipo de resistencia a macrólidos, lincosamida, estreptogramina tipo B.

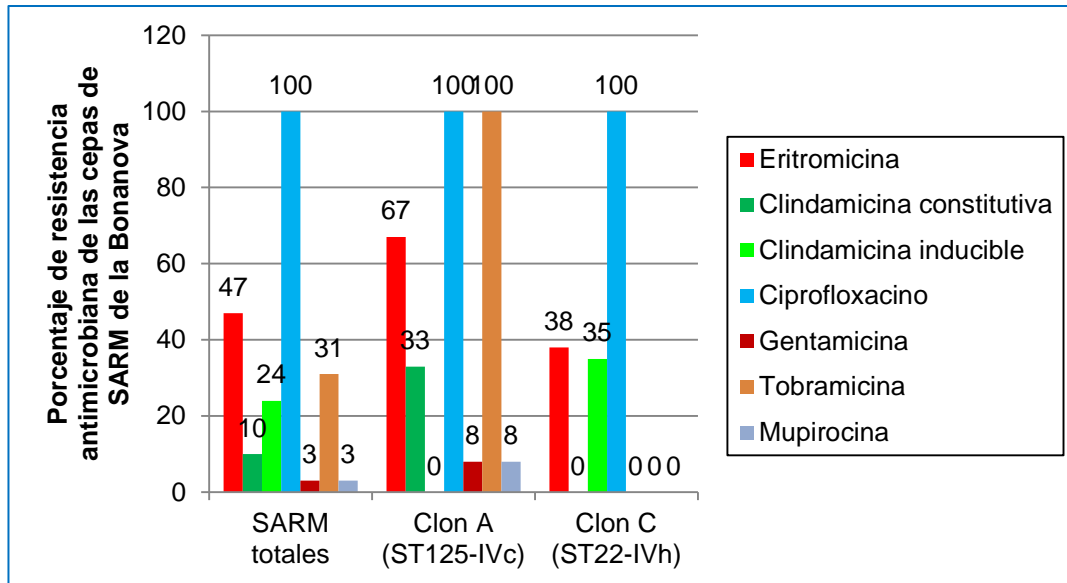


Figura 65. Esquema de la resistencia antimicrobiana de las cepas de SARM de la Residencia Bonanova.

5.15 Estudio de seguimiento longitudinal

Como ya se expuso en la Metodología, a los 8, 12 y 18 meses del estudio inicial se obtuvieron cultivos nasales de los residentes geriátricos que estaban colonizados con SARM (“casos”) en dicho estudio. Hay que recordar también que ninguno de los 38 residentes en los que se detectó la colonización por SARM recibió tratamiento antibiótico tópico (con mupirocina o ácido fusídico) durante dicho período.

Asimismo, se tomó un exudado nasal a un grupo seleccionado al azar compuesto por 36 residentes no colonizados por SARM en el estudio inicial (“controles”).

Durante el seguimiento, no se tomó ningún exudado de úlcera o herida.

5.15.1 Seguimiento a los 8 meses

A los 8 meses, de los 38 residentes que estuvieron colonizados con SARM durante el estudio inicial (37 nasales y uno únicamente en herida), se tomó un frotis nasal a 28 de ellos (incluido el paciente colonizado en la herida, sin colonización nasal). De los 10 casos restantes, 7 habían fallecido y en 3 no se pudo obtener la muestra (dos residentes se encontraban ausentes ese día, mientras que el tercero lo rechazó explícitamente).

La causa de la muerte en los siete residentes fallecidos no estuvo relacionada con una infección por SARM, si bien uno de ellos ingresó en enero del 2006 en el HUSD por una infección de herida quirúrgica por SARM y, posteriormente, tras varias complicaciones, falleció por una colitis pseudomembranosa por *Clostridium difficile*.

El cultivo nasal en estos 28 residentes, previamente colonizados por SARM hacía 8 meses (“casos”), fue el siguiente: SARM en 14 de ellos (50%), SASM en 5 (18%) y cultivo negativo para *S. aureus* en 9 de ellos (32%, incluyendo el paciente con colonización en herida como única localización) (tabla 30 y figura 66 de la página siguiente).

Tabla 30. Resumen del número de casos y controles.

	8 meses	12 meses	18 meses
Casos iniciales	38 (100%)	38 (100%)	38 (100%)
Se toma muestra	28 (74%)	30 (79%)	23 (60%)
No se toma muestra	10 (26%)	8 (21%)	15 (40%)
Fallecimiento ^a	7 (18%)	8 (21%)	15 (40%)
Ausencia	2 (5%)	0	0
Rechaza la toma	1 (3%)	0	0
Resultados cultivos:			
SARM	14 (50%)	16 (53%)	11 (48%)
SASM	5 (18%)	2 (7%)	5 (22%)
Ausencia de <i>S. aureus</i>	9 (32%)	12 (40%)	7 (30%)
Infección por SARM	3 (8%)	0	0
Controles iniciales^b	36 (100%)	36 (100%)	36 (100%)
Se toma muestra	36 (100%)	33 (92%)	31 (86%)
No se toma muestra	0	3 (8%)	5 (14%)
Fallecimiento ^a	0	2 (5%)	4 (11%)
Ausencia	0	0	0
Rechaza la toma	0	1 (3%)	1 (3%)
Resultados cultivos			
SARM	2 (6%)	3 (9%)	6 (19%)
SASM	7 (19%)	4 (12%)	5 (16%)
Ausencia de <i>S. aureus</i>	27 (75%)	26 (79%)	20 (65%)
Infección por SARM	0	0	1 (3%)

^aNinguno relacionado por infección por SARM.

^bDe los 36 controles, 30 no estaban colonizados por *S. aureus* en el estudio inicial y 6 estaban colonizados por SASM.

El cultivo nasal en los 36 residentes del grupo control (30 no colonizados por *S. aureus* en el estudio inicial y 6 colonizados por SASM) fue el siguiente: negativo en 27 (75%), SASM en 7 (19%) y SARM en 2 (6%). Estos dos pacientes portadores

de SARM del grupo control no habían ingresado en ningún hospital a lo largo de estos 8 meses, con lo que parece probable que la adquisición de SARM tuviera lugar en la misma residencia geriátrica.

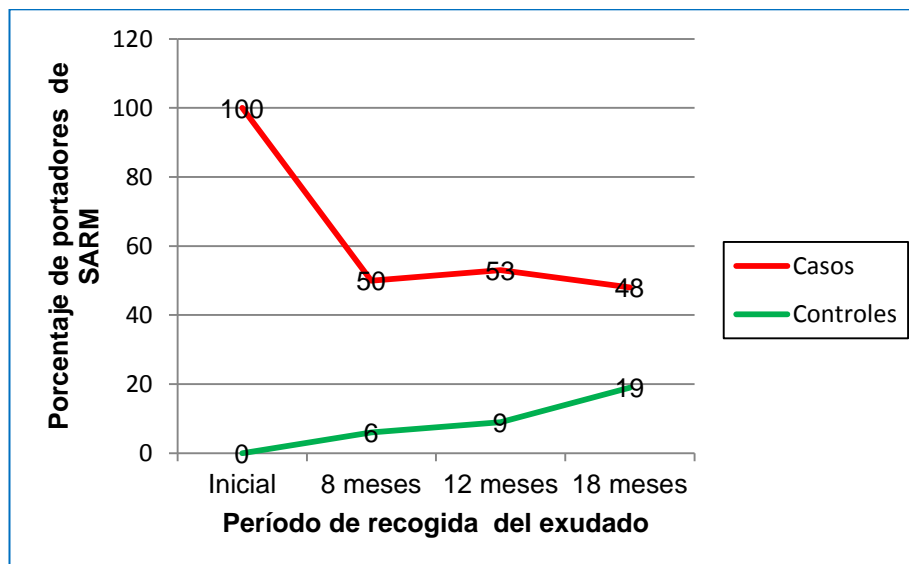


Figura 66. Detección de SARM en el estudio longitudinal.

Por lo que respecta al antecedente de infección por SARM durante los primeros 8 meses, 3 de los 38 residentes colonizados por SARM en el momento inicial (“casos”) fueron diagnosticados de una infección por SARM. En todos los tres pacientes se trataba de una infección de herida/úlceras. El cultivo nasal a los 8 meses en estos tres residentes fue: un residente con cultivo nasal positivo para SARM, otro con cultivo nasal negativo (el paciente que durante el estudio inicial únicamente estaba colonizado en la herida), mientras que el tercer residente, como ya se ha mencionado, falleció a los 4 meses del estudio inicial debido a una colitis pseudomembranosa por *C. difficile*, por lo que no se pudo recoger una muestra a los 8 meses. Asimismo, no se detectó ninguna infección por SARM en los pacientes del grupo control en este período.

5.15.2 Seguimiento a los 12 meses

En noviembre de 2006 se realizó un cultivo nasal a los pacientes inicialmente portadores de SARM y al mismo grupo control anterior. De los 38 residentes inicialmente colonizados por SARM (“casos”), se tomó un frotis nasal a 30 de ellos,

ya que los ocho residentes restantes habían fallecido. Los resultados a los 12 meses fueron: SARM en 16 (53%), SASM en 2 (7%) y negativo en 12 (40%), incluyendo el paciente únicamente colonizado en la herida en el período inicial (**tabla 30**).

De los 36 residentes del grupo control, se recogió muestra en 33 de ellos. Dos de ellos fallecieron y el otro residente rehusó la participación en el estudio. El cultivo nasal en los controles, como se muestra en la **tabla 30**, fue: negativo en 26 (79%), SASM en 4 (12%) y SARM en 3 (9%). Los tres residentes del grupo control portadores nasales de SARM a los 12 meses fueron diferentes de los dos residentes portadores de SARM a los 8 meses (los dos residentes colonizados con SARM a los 8 meses tuvieron el cultivo nasal negativo a los 12 meses). Los tres pacientes del grupo control portadores nasales de SARM a los 12 meses no habían ingresado en ningún hospital en el último año con lo que, muy probablemente, la adquisición del SARM también tuviera lugar en la misma residencia geriátrica.

Respecto a los residentes que fallecieron, en ningún caso la causa de este fallecimiento estuvo relacionada con el SARM. Tampoco se detectó ninguna infección por SARM en los dos grupos entre los 8-12 meses del estudio inicial.

5.15.3 Seguimiento a los 18 meses

En mayo de 2007 se realizó el último cultivo nasal a los pacientes inicialmente portadores nasales de SARM (“casos”) y al mismo grupo control anterior. Al igual que en los dos períodos anteriores, no se obtuvieron muestras de exudados cutáneos.

De los 38 residentes colonizados por SARM en la fase inicial, se tomó un frotis nasal a 23 de ellos. Los 15 residentes restantes habían fallecido (incluyendo el paciente con colonización de herida como única localización). El cultivo nasal fue: SARM en 11 (48%), SASM en 5 (22%) y negativo en 7 (30%).

De los 36 residentes del grupo control, se recogió un exudado nasal a 31 de ellos (cuatro de ellos habían fallecido y el quinto seguía rechazando la participación en el estudio). El cultivo fue: negativo en 20 (65%), SASM en 5 (16%) y SARM en 6 (19%). Sólo 2 de los 6 residentes con SARM habían ingresado en el hospital en los últimos 6 meses por lo que, probablemente, la adquisición del SARM en los 4 restantes tuvo lugar en la residencia (uno de ellos era también portador de SARM a los 12 meses). En la **figura 67** de la página siguiente se esquematiza gráficamente los aislamientos de *S. aureus* en los controles seguidos longitudinalmente.

Nº residente	Inicial	8 meses	12 meses	18 meses
13				
15				C1
33				
57				
76				
77				
87				C1 ^a
139				
146				
148				
158				
173				C1
179				
183			C1	
201				
215				
235				
247				
252				
261				
284			A2	
306				C1
323				
355				C5
372				
390				
393		A		
394				
397				C1
409				
424			Rechaza la recogida	
432		A		
434				
448				
450			A2	A2
462				

Color rojo: colonización por SARM; **color amarillo:** colonización por SASM; **color azul:** no colonizado por *S. aureus*; **color lila:** *exitus*.

En los recuadros rojos en negrita se muestra el clon de SARM.

^aSARM a los 13 meses.

Figura 67. Seguimiento longitudinal del grupo control.

En cuanto al antecedente de infección por SARM a los 12-18 meses, un paciente del grupo control (número 87 de la **figura 67**) ingresó en el HUSD a los 13 meses (diciembre 2006) por una hipoglucemia grave. Se le recogió un exudado de úlcera de pie diabético al 4º día del ingreso, aislándose SARM. El cultivo del exudado nasal durante este ingreso también fue positivo para SARM. Fue dado de alta al 11º día, volviendo a la residencia. Posteriormente, falleció por causas no relacionadas con el SARM. Aparte del paciente anterior, no se detectó ninguna infección por SARM clínicamente significativa en los portadores ni en el grupo control.

5.16 Epidemiología molecular de SARM en el estudio de seguimiento

Al 64-71% de los residentes inicialmente colonizados por SARM (“casos”) se les aisló la misma cepa (mismo clon, subtipo y antibiograma) en todos los cultivos nasales realizados. Esto sucedió en 10 de las 14 cepas de SARM detectadas a los 8 meses, en 11 de las 16 detectadas a los 12 meses y en 7 de las 11 detectadas a los 18 meses. Sin embargo, en ocasiones se aisló una cepa de SARM con un subtipo (o incluso un clon) diferente, o con distinta sensibilidad a la eritromicina (**tabla 31**).

Tabla 31. Residentes con cambio del clon de SARM o antibiograma durante el seguimiento (“casos”).

Nº	Clon de SARM (Sensibilidad a la eritromicina y clindamicina)			
	Estudio inicial	8 meses	12 meses	18 meses
93	C1 (Eri. y Cli. sensibles)	SASM	Negativo	A2 (Fenotipo M)
129	C6 (Fenotipo M)	C1 (Eri. y Cli. sensibles)	C6 (Fenotipo M)	<i>EXITUS</i>
166	C1 (Fenotipo MLS _B ind.)	SASM	C1 (Eri. y Cli. sensibles)	<i>EXITUS</i>
213	C1 (Eri. y Cli. sensibles)	A2 (Fenotipo M)	C2 (Eri. y Cli. sensibles)	C2 (Eri. y Cli. sensibles)
216	C5 (Fenotipo MLS _B ind.)	Negativo	A2 (Fenotipo M)	SASM
342	C2 (Fenotipo MLS _B ind.)	C3 (Fenotipo MLS _B ind.)	C2 (Eri. y Cli. sensibles)	A2 (Fenotipo M)
440	A (Fenotipo MLS _B con.)	A (Eri. y Cli. sensibles)	A (Eri. y Cli. sensibles)	A (Fenotipo MLS _B con.)

- Caso 93. Un residente tuvo SARM del clon C1 en el cultivo inicial, pero a los 18 meses se detectó una cepa de SARM del clon A2.
- Caso 129. Otro residente tuvo inicialmente SARM del clon C6 con fenotipo M, a los 8 meses una cepa del clon C1 sensible a la eritromicina y clindamicina, mientras que a los 12 meses se le aisló una cepa idéntica a la inicial.
- Caso 166. Un residente tuvo una cepa del clon C1 en el estudio inicial y a los 12 meses, pero con diferencias en la sensibilidad a la eritromicina y la clindamicina.
- Caso 213. Este residente presentó un clon C1 en el estudio inicial, pero a los 8 meses se le aisló una cepa de SARM del clon A2. En los siguientes dos estudios se observó el mismo clon (con distinto subtipo) al del estudio inicial.
- Caso 216. Otro residente tuvo el cultivo nasal inicial y el de los 12 meses con SARM, pero ambos aislados fueron de dos clones distintos. En el estudio inicial fue del clon C5, mientras que, a los 12 meses, se le aisló una cepa del clon A2. Curiosamente, este paciente ingresó en el HUSD entre los 6 - 12 meses.
- Caso 342. Un residente tuvo en los tres primeros cultivos dos subtipos diferentes del clon C, mientras que, a los 18 meses se produjo un cambio de clon (clon A2).
- Caso 440. Un residente tuvo un clon A en los cuatro cultivos, pero con diferencias en la sensibilidad a la eritromicina y clindamicina.

Los clones de las cepas de SARM detectadas en el grupo control se han esquematizado en la **figura 67**. Las dos cepas detectadas a los 8 meses pertenecían al clon A (ST125-IVc); mientras que, de las tres cepas de SARM detectadas a los 12 meses, dos eran del clon A2 (ST125-IVc) y una del clon C1 (ST22-IVh). A los 18 meses, hubo seis residentes del grupo control con cultivos nasales positivos para SARM: cuatro eran del clon C1, una era del clon C5 y una del clon A2. Hubo un único residente del grupo "control" (paciente nº 450) al que se le detectó dos cultivos nasales positivos para SARM, a los 12 y 18 meses; estas dos cepas eran del mismo clon y tenían el mismo antibiograma.

5.17 Persistencia del estado de portador nasal de SARM

En el estudio inicial se detectaron 37 residentes geriátricos como portadores nasales de SARM. Siete de ellos fallecieron antes de la obtención de una segunda

muestra, por lo que disponemos de 30 residentes portadores nasales de SARM con, al menos, una segunda muestra nasal en el seguimiento.

Siguiendo los criterios más estrictos de persistencia (crecimiento de SARM en todos los cultivos recogidos; Stone, 2012), 9 de los 30 residentes (30%) fueron portadores nasales persistentes y 21 (70%) portadores intermitentes (**figura 68**).

Nº	Cultivo nasal inicial	Cultivo nasal 8 meses	Cultivo nasal 12 meses	Cultivo nasal 18 meses	Tipo portador nasal
43	C1	C1			Intermitente
47	A2		A2	A2	Intermitente
66	C1		C1		Intermitente
93	C1			A2	Intermitente
103	C1	C1	C1	C1	Persistente
124	C2				Intermitente
129	C6	C1	C6		Persistente
149	C1	C1		C1	Intermitente
160	C3				Intermitente
166	C1		C1		Intermitente
213	C1	A2	C2	C2	Persistente
216	C5		A2		Intermitente
226	A				Intermitente
240	A	A	A	A	Persistente
242	A1				Intermitente
246	A	A	A	A	Persistente
250	A				Intermitente
264	C1	C1	C1		Persistente
279	A				Intermitente
283	A	Rechaza recogida	A		Intermitente
285	C1	C1	C1	C1	Persistente
290	C1	C1		C1	Intermitente
342	C2	C3	C2	A2	Persistente
381	C1	C1	C1		Intermitente
405	A2	No recogida			Intermitente
412	C2	No recogida			Intermitente
421	C2	C2	C2		Intermitente
435	C1				Intermitente
440	A	A	A	A	Persistente
460	C2				Intermitente

Color rojo: colonización por SARM; **color amarillo:** colonización por SASM; **color azul:** no colonizado por *S. aureus*; **color lila:** *exitus*.

En el recuadro rojo en **negrita** se muestra el clon de SARM.

Figura 68. Seguimiento de los residentes portadores nasales de SARM.

PARTE 3. CARACTERIZACIÓN DE UN NUEVO PLÁSMIDO DE MULTIRRESISTENCIA QUE CONTIENE LOS GENES *cfr*, *tet(L)*, *ant(4')-la* Y *dfrK*, EN DOS AISLADOS DE SARM Y EN UN AISLADO DE *Staphylococcus epidermidis*

5.18 Historia clínica de dos pacientes con SARM resistentes a la linezolidina

La primera cepa de SARM resistente a la linezolidina detectada en el HUSD (**paciente 1**) se había aislado en un varón de 76 años, exfumador de 40 cigarrillos/día (100 paquetes/año) desde 1994. Había trabajado durante 30 años como minero del carbón. Los antecedentes patológicos más destacados eran: silicosis, carcinoma de laringe (intervenido en 1996), EPOC con oxigenoterapia domiciliaria, apnea obstructiva del sueño, e hipogammaglobulinemia, que fue diagnosticada en mayo de 2009. Por dicho motivo, era portador de un catéter *Port-a-cath*® permanente para la administración de inmunoglobulinas endovenosas. Se trataba, por lo tanto, de un paciente con pluripatología respiratoria, inmunodeprimido (debido tanto a su inmunodeficiencia variable como a la administración de corticoides) y portador de un catéter vascular permanente.

Este paciente, de octubre de 2006 a agosto de 2010, había ingresado en el HUSD 32 veces por infecciones respiratorias bajas, recibiendo tratamiento antimicrobiano en cada ingreso. Algunos de los microorganismos detectados en muestras respiratorias fueron: *Pseudomonas aeruginosa* (en octubre 2006 y septiembre 2007), *Haemophilus influenzae* (abril 2007), *Stenotrophomonas maltophilia* (julio 2007), *Serratia marcescens* (julio 2007 y en varios ingresos de 2008), *Klebsiella pneumoniae* productora de metalo- β -lactamasa (MBL, tipificada como VIM-1, en varios ingresos entre septiembre 2008 y mayo 2009) y *Escherichia coli* productora de β -lactamasa de espectro extendido (BLEE, en febrero-marzo 2009).

En junio de 2009, se le detectó por primera vez una cepa de SARM en un cultivo de esputo. Este aislado era resistente por disco-difusión a los β -lactámicos, ciprofloxacino y tobramicina. El paciente recibió tratamiento con linezolidina seguido de cotrimoxazol, presentando una evolución favorable.

En los ingresos de septiembre 2009 y noviembre 2009 se le detectó en los cultivos de esputo un aislado de SARM que tenía un fenotipo de resistencia peculiar: sensible a la eritromicina y resistente a la clindamicina. Se informó la linezolida como sensible, por lo que en ambos ingresos el paciente recibió tratamiento con vancomicina endovenosa seguida de linezolida oral.

Posteriormente, en el ingreso de enero-marzo 2010, el paciente sufrió una bacteriemia por una cepa de *K. pneumoniae* productora de MBL. Durante dicho ingreso, crecieron en un catéter de subclavia más de 100 UFC de SARM (sensible a la eritromicina y clindamicina) y de *S. epidermidis* (sensible a la eritromicina pero resistente a la clindamicina). El paciente fue tratado entonces con vancomicina endovenosa seguida de clindamicina oral.

En julio y agosto de 2010, el paciente ingresó dos veces con un intervalo de una semana entre ambos ingresos, a causa de una traqueobronquitis aguda. En los cultivos de esputo de los dos ingresos se aisló $>10^6$ UFC de SARM de nuevo sensible a la eritromicina pero resistente a la clindamicina, informándose inicialmente la linezolida como sensible. El paciente recibió tratamiento con linezolida en ambos ingresos. En septiembre de 2010, a las 48 h de haber sido dado de alta, reingresó de nuevo por una neumonía por SARM, con idéntico antibiograma.

Durante el ingreso de agosto de 2010, se observó en el antibiograma un doble halo de inhibición con el disco de linezolida. Tras realizar una determinación de sensibilidad para la linezolida por el método del E-test® (ver más adelante), se informó que la cepa era resistente a este antimicrobiano. Sin embargo, el paciente ya había sido dado de alta con linezolida oral. Durante el reingreso de septiembre 2010, se cambió el tratamiento a vancomicina y gentamicina, con una buena evolución.

En agosto de 2010, se detectó otro caso de infección respiratoria por SARM también resistente a la linezolida, con idéntico patrón del antibiograma que el del paciente 1. Este segundo paciente (**paciente 2**), padecía también de EPOC y estaba ingresado en la misma unidad (Neumología) que el paciente 1. A señalar que el paciente 2 había ingresado en nuestro hospital en febrero del 2009 por un absceso pulmonar por SARM, recibiendo entonces tratamiento con linezolida.

En el estudio de portador efectuado en estos dos pacientes (agosto 2010), todos los exudados nasales, axilares e inguinales fueron también positivos para SARM, con el mismo patrón de sensibilidad, incluyendo la resistencia a la linezolida.

Incidentalmente, en septiembre 2010 se detectó también un aislado de *S. epidermidis* con el mismo patrón de resistencia en el cultivo del catéter de otro paciente que estaba ingresado en la UCI del HUSD (**paciente 3**).

5.19 Estudios de sensibilidad

5.19.1 Cepas iniciales de SARM sensibles a la linezolida

En septiembre de 2010, se recuperaron los dos aislados iniciales de SARM de los pacientes 1 y 2 del 2009, sensibles a la linezolida, y se volvió a realizar el estudio de sensibilidad de ambos. Estos datos se muestran en la **tabla 32**.

Tabla 32. Perfiles de resistencia en los aislados de SARM y *S. epidermidis* de los pacientes 1-3.

Nº paciente	Fecha	ST	Fenotipo de resistencia ^a
1	Junio 2009	ST125-IVc	OXA, CIP, TOB
1	Agosto 2010	ST125-IVc	OXA, CIP, TOB, CLI, LIN, CLO, TET, _{SXT}
2	Febrero 2009	ST22-IVh	OXA, CIP, ERI, CLI _{ind.}
2	Agosto 2010	ST125-IVc	OXA, CIP, TOB, CLI, LIN, CLO, TET, _{SXT}
3	Septiembre 2010	<i>S. epidermidis</i>	OXA, CIP, TOB, CLI, LIN, CLO, TET, SXT
Transconjugante			TOB, CLI, LIN, CLO, TET, _{SXT} , (RIF)

^aCIP: ciprofloxacino; CLI: clindamicina; CLI_{ind.}: resistencia inducible a la clindamicina; CLO: cloranfenicol; ERI: eritromicina; LIN: linezolida; OXA: oxacilina; RIF: rifampicina; SXT: trimetoprim-sulfametoxazol (cotrimoxazol); TET: tetraciclina; TOB: tobramicina. _{SXT} indica una sensibilidad disminuida al cotrimoxazol. El paréntesis de la rifampicina indica que esta resistencia no es transferible mediante el plásmido.

El aislado de SARM inicial del paciente 1, detectado en junio 2009, era resistente mediante difusión con disco-placa a los β -lactámicos, ciprofloxacino y a la

tobramicina; mientras que era sensible a la eritromicina, clindamicina, gentamicina, cloranfenicol, tetraciclina, rifampicina, vancomicina, teicoplanina, linezolid, mupirocina y al ácido fusídico.

El aislado inicial de SARM del paciente 2, detectado en febrero 2009, era resistente a los β -lactámicos, ciprofloxacino y a la eritromicina, con resistencia MLS_B inducible a la clindamicina. Por el contrario, esta cepa era sensible a la gentamicina, tobramicina, cloranfenicol, tetraciclina, rifampicina, vancomicina, teicoplanina, linezolid, mupirocina y al ácido fusídico.

5.19.2 Cepas de SARM y *S. epidermidis* resistentes a la linezolid

Los aislados de SARM resistentes a la linezolid de los pacientes 1 y 2 tenían el mismo perfil de sensibilidad antibiótica mediante difusión con disco-placa. Según los puntos de corte del CLSI (CLSI, 2012), los dos aislados eran resistentes a los β -lactámicos, ciprofloxacino, tobramicina, clindamicina, cloranfenicol y tetraciclina; siendo sensibles a la eritromicina, gentamicina, rifampicina y teicoplanina. Asimismo, siguiendo los criterios del EUCAST (EUCAST, 2012) también eran sensibles a la mupirocina y al ácido fusídico. La CMI a la vancomicina por E-test® era de 2 μ g/mL, sensible según los criterios del CLSI (CLSI, 2012).

Respecto a la linezolid y al cotrimoxazol, los dos aislados eran, por disco-difusión, aparentemente sensibles, pero se observó un doble halo de inhibición (figuras 69 y 70 de la página siguiente). Cuando se determinó la sensibilidad a estos dos antibióticos mediante E-test®, también se observaba de nuevo un doble halo de inhibición, con una CMI a la linezolid comprendida entre 6-8 μ g/mL, por lo que se consideraron resistentes (figura 71 de la página siguiente). La CMI al cotrimoxazol, determinada por E-test®, era de 1,5 μ g/mL, todavía dentro del rango de sensibilidad.



Figura 69. Antibiograma del primer aislado de SARM resistente a la linezolid.



Figura 70. Doble halo con el disco de linezolid.

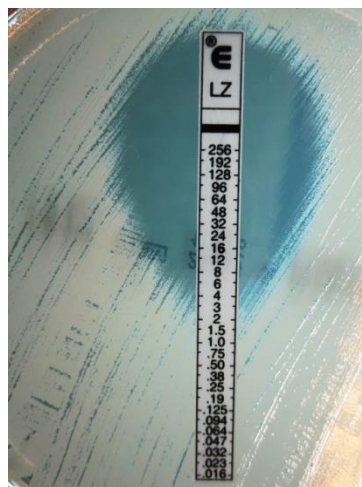


Figura 71. E-test a la linezolid en la cepa anterior.

El aislado de *S. epidermidis* resistente a la linezolidina tenía el mismo perfil de resistencia que las dos cepas de SARM, con la única excepción del cotrimoxazol que era completamente resistente.

5.20 Relación clonal de los aislados de SARM resistentes a la linezolidina

Tanto los dos aislados de SARM resistentes a la linezolidina de los pacientes 1 y 2 como también el aislado de SARM sensible a la linezolidina del primer paciente tenían un patrón de bandas idéntico en la ECP, que correspondía al clon A, según nuestra nomenclatura. Se realizó MLST y tipado del SCCmec en el aislado de SARM resistente a la linezolidina del paciente 1, confirmándose que se trataba del clon ST125-MRSA-IVc.

El perfil de bandas de la ECP del aislado inicial del paciente 2 sensible a la linezolidina (detectado en 2009) se correspondía al del clon C2, mientras que en el subtipado del SCCmec era portador del SCCmec subtipo IVh; por lo que se trataba del clon ST22-MRSA-IVh (EMRSA-15), por tanto, no relacionado con el clon resistente a la linezolidina de los dos pacientes.

Asimismo, se pudo comprobar que el patrón de bandas de los dos aislados de SARM resistentes a la linezolidina de los pacientes 1 y 2 era distinto al de la cepa HC08, responsable del brote de SARM resistente a la linezolidina descrito en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid en 2008 (Morales, 2010). Se realizó también MLST y tipado del SCCmec en la cepa HC08, correspondiéndose con el clon ST228-MRSA-I.

Todas las cepas de SARM sensibles y resistentes a la linezolidina fueron negativas para los genes productores de LPV (*lukS-PV* y *lukF-PV*) y ACME (*arcA*).

5.21 Estudio del mecanismo de resistencia a la linezolidina

Para determinar el mecanismo de resistencia a la linezolidina, se realizó una amplificación mediante PCR del gen *csr*, utilizando la cepa HC08 como control positivo. Esta PCR fue negativa en los dos aislados de SARM iniciales sensibles a la linezolidina de los dos pacientes, pero positiva en los dos aislados de SARM resistentes a la linezolidina, así como en el aislado de *S. epidermidis* resistente a este antimicrobiano (**figura 72** de la página siguiente).

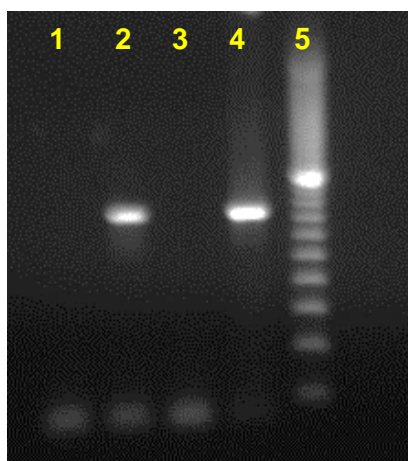


Figura 72. PCR para el gen *cfr*. Carril 1: SARM sensible a la linezolidina del paciente 1; carril 2: SARM resistente a la linezolidina del paciente 1; carril 3: control negativo; carril 4: control positivo (cepa HC08); carril 5: marcador de peso molecular de 100-1000 pb.

La amplificación por PCR para el gen *fexA*, que codifica una bomba de expulsión activa que confiere resistencia al cloranfenicol (Kehrenberg, 2004b), fue negativa en los aislados de SARM y *S. epidermidis* resistentes a la linezolidina de los tres pacientes, pero positiva en la cepa control HC08.

5.22 Estudios de conjugación

En el experimento de conjugación, usando la cepa de SARM resistente a la linezolidina del paciente 1 como donante y un mutante resistente a la rifampicina de la cepa de *S. aureus* ATCC® 29213 como receptora, se obtuvo crecimiento de unas 25 colonias de *S. aureus* (en un total de nueve placas de agar BHI con rifampicina y cloranfenicol). Se determinó la sensibilidad al ciprofloxacino mediante disco-difusión en cada una de estas colonias, detectándose una única colonia de *S. aureus* sensible al ciprofloxacino. Este aislado sensible al ciprofloxacino era resistente a la rifampicina (la cepa receptora de *S. aureus* ATCC® era resistente a este compuesto), a la clindamicina, cloranfenicol y a la linezolidina (con un doble halo, como cabría esperar por la resistencia mediada por el gen *cfr*); pero curiosamente, también era resistente a la tetraciclina, a la tobramicina y presentaba un halo reducido al cotrimoxazol.

El ensayo de PCR para el gen *cfr* en el transconjugante fue también positivo, por lo que se comprobó que dicho gen estaba presente en un plásmido y que este plásmido era conjugativo, capaz de transferirse a otros aislados de estafilococos.

Se determinó la sensibilidad para diversos antimicrobianos, por E-test® o microdilución en caldo, en la cepa de SARM donante resistente a la linezolida del paciente 1, en la cepa de *S. aureus* receptora resistente a la rifampicina y en el transconjugante (tabla 33).

Tabla 33. Perfiles de resistencia antimicrobiana del aislado de SARM *cfr+* del paciente 1 (cepa 05069371), de la cepa de *S. aureus* ATCC® 29213 resistente a la rifampicina (Rif^r, receptora) y su derivado transconjugante.

Antimicrobiano	Método de sensibilidad	CMI (µg/mL)		
		SARM 05069371 (donante)	ATCC® 29213 Rif ^r (receptora)	Transconjugante
Penicilina	E-test®	>32	0,5	0,38
Oxacilina	E-test®	>256	0,5	0,5
Eritromicina	E-test®	0,19	0,094	0,064
Clindamicina	E-test®	>256	0,047	>256
Ciprofloxacino	E-test®	>32	0,19	0,19
Cotrimoxazol	E-test®	1,5	0,064	0,75
Vancomicina	E-test®	2	2	2
Teicoplanina	E-test®	1	1	1
Daptomicina	E-test®	0,19	0,25	0,25
Tigeciclina	E-test®	1,5	0,19	0,5
Tetraciclina	E-test®	16	0,094	16
Linezolida	E-test®	6	0,38	3
Tobramicina	E-test®	6	0,38	3
Gentamicina	Microdilución en caldo	0,5	0,25	0,25
Cloranfenicol	Microdilución en caldo	8	2	8
Rifampicina	Microdilución en caldo	≤0,06	>32	>32

Como ya se observaba en el antibiograma realizado mediante disco-difusión, el transconjugante no sólo había adquirido resistencia o sensibilidad disminuida a la clindamicina, cloranfenicol y a la linezolidina (como era de esperar por la transferencia del gen *cfr*), sino también a la tetraciclina, tobramicina y al cotrimoxazol. La CMI a la tigeciclina estaba también ligeramente elevada.

5.23 Determinación del tamaño del plásmido

Para determinar el tamaño del plásmido, se realizó una extracción del ADN plasmídico en el derivado transconjugante. Tras su digestión con *EcoRI*, se comparó el tamaño de las bandas obtenidas con las bandas del fago λ . El tamaño aproximado del plásmido transferido portador del *cfr* fue de unas 50 kb.

5.24 Detección de los restantes genes de resistencia transferidos

Siguiendo la metodología explicada en el apartado correspondiente, se realizó una serie de amplificaciones a diversos genes de resistencia a partir del ADN total extraído de los aislados de SARM sensibles y resistentes a la linezolidina de los pacientes 1 y 2, en el ADN total del aislado de *S. epidermidis* resistente a la linezolidina del paciente 3 y en el ADN plasmídico extraído del transconjugante.

Todas las amplificaciones para los genes *ant(4')-Ia* (también conocido como *aadD*, que confiere resistencia a la tobramicina, amikacina, kanamicina y neomicina; [Schmitz, 1999](#)), *tet(L)* (resistencia a la tetraciclina; [Pang, 1994](#)) y *dfxK* (resistencia a la trimetoprima; [Kadlec, 2009a](#)) fueron positivas en los aislados de estafilococos resistentes a la linezolidina de los pacientes 1-3, así como en el derivado transconjugante. Asimismo, la PCR para el gen *ant(4')-Ia* fue también positiva en el aislado de SARM inicial sensible a la linezolidina del paciente 1. Estos resultados se muestran en la **tabla 34**.

Por el contrario, las PCR para la detección de los genes *tet(K)* y *tet(M)* (resistencia a la tetraciclina; [Jones, 2006](#)), para el gen *vga(C)* (resistencia a la pleuromutilina/lincosamida/estreptogramina A; [Feßler, 2010](#)) y para el gen *fexA* (codificante de una bomba de expulsión activa de fenicoles; [Kehrenberg, 2006](#)) fueron negativas en todos los aislados de SARM y en la cepa de *S. epidermidis*.

Tabla 34. Genes de resistencia detectados en los aislados de SARM y *S. epidermidis* de los pacientes 1-3.

Nº paciente	Fecha	ST	Genes de resistencia			
			<i>ant(4')-la</i> (<i>aadD</i>)	<i>cfr</i>	<i>tet(L)</i>	<i>dfrK</i>
1	Junio 2009	ST125-IVc	+	-	-	-
1	Agosto 2010	ST125-IVc	+	+	+	+
2	Febrero 2009	ST22-IVh	-	-	-	-
2	Agosto 2010	ST125-IVc	+	+	+	+
3	Septiembre 2010	<i>S. epidermidis</i>	+	+	+	+
Transconjugante			+	+	+	+

Este nuevo plásmido de multiresistencia detectado en las tres cepas de estafilococos del HUSD fue denominado como pERGB y registrado en GenBank con el número de acceso JN970906.

5.25 Caracterización molecular del entorno genético de los cuatro genes de resistencia en el plásmido pERGB

Inicialmente se secuenció un fragmento clonado de 8.675 pb a partir del ADN plasmídico del pUCPcfr12 de una de las colonias obtenidas durante la transformación. A continuación, tras realizar numerosas reacciones de PCR en el ADN plasmídico extraído a partir del derivado transconjugante, se consiguió secuenciar un fragmento del plásmido pERGB de 15.259 pb, disponible en GenBank, que contenía los cuatro genes de resistencia. En la **figura 73** de la página siguiente se muestra un esquema de la estructura genética de dicho fragmento.

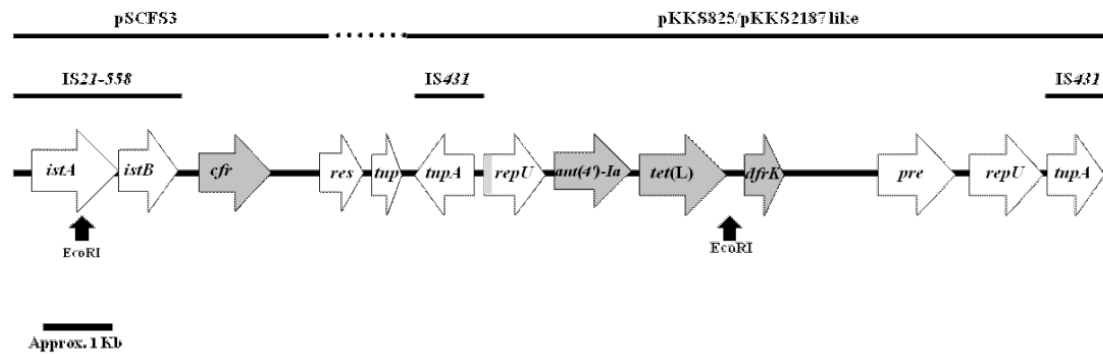


Figura 73. Estructura genética del fragmento de ADN secuenciado de 15.259 pb del plásmido de multirresistencia pERGB. Los puntos de corte de la enzima de restricción *EcoRI*, que delimitan el fragmento de 8.675 pb clonado, están representados con flechas negras. En la parte superior de la figura se indican las regiones homólogas a los plásmidos descritos previamente. La barra gris en el primer gen *repU* representa que está truncado por la IS431 en su extremo 5' (Ruiz de Gopegui, 2012).

En el segmento inicial del fragmento secuenciado se encuentra una estructura similar a una secuencia de inserción (IS). Se compone de dos genes, *istA* e *istB*. Cada uno de ellos codifica una transposasa similar a las integrasas IstA e IstB, ambas de la familia IS21. Este elemento IS fue inicialmente descrito en el plásmido pSCFS3, también portador del gen *cfr*, asociado al transposón Tn558, por lo que recibió el nombre de IS21-558 (número de acceso en GenBank AM086211). El plásmido pSCFS3 se aisló en dos cepas de *S. lentus* y en una cepa de *S. aureus*, aisladas en vacas y cerdos de Alemania en 2000-2003 (Kehrenberg, 2006). La secuencia de nucleótidos de la región IS21-558 del pERGB muestra un grado de homología superior al 99% (2.916/2.930 pb) respecto a la del plásmido pSCFS3.

A continuación de la IS21-558, tras 490 pb de ADN no codificante, se halla el gen *cfr*. La secuencia de nucleótidos de este gen es idéntica al gen *cfr* de los plásmidos pSCFS1 (Schwarz, 2000; Kehrenberg, 2004a), pSCFS6 (Kehrenberg, 2007) y pSCFS7 (Shore, 2010a), mientras que únicamente presenta un solo nucleótido de diferencia (1.049/1.050 pb) con el del plásmido pSCFS3 (Kehrenberg, 2006) (figura 74 de la siguiente página).

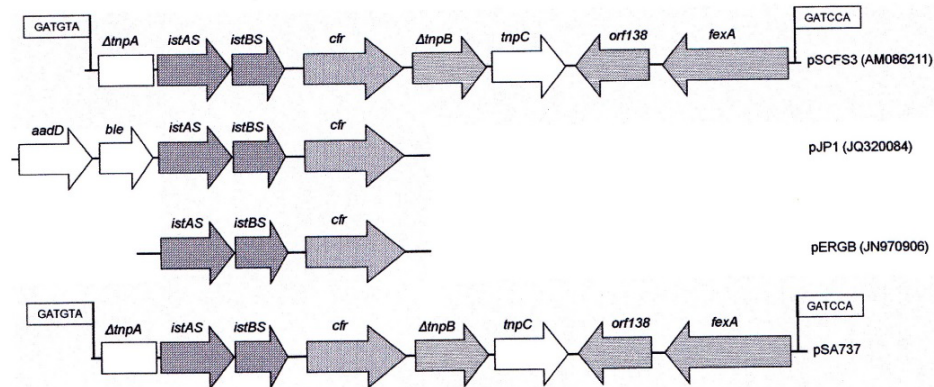


Figura 74. Representación esquemática del entorno genético del gen *cfr* en los plásmidos pERGB, pSCFS3, pJP1, pSA737 (Mendes, 2013).

A continuación del gen *cfr*, hay una región de ADN no codificante de 688 pb, con una secuencia de nucleótidos idéntica (100%) a la del plásmido pSCFS3 (Kehrenberg, 2006).

Sin embargo, adyacente a esta región no codificante, se detectó una nueva estructura, no descrita previamente, compuesta por un gen *res* y un gen *tnp*. El gen *res* codifica una resolvasa, que es una enzima que cataliza la recombinación de un fragmento de ADN durante la transposición replicativa (Hirano, 2011). Presenta una homología del 72%, en cuanto a la secuencia de nucleótidos, con el gen *res* del plásmido pWSH-002 detectado en *Bacillus megaterium* (número de acceso GenBank CP003018.1; Liu, 2011). El gen *tnp*, situado a continuación, codifica una transposasa similar a una transposasa del plásmido pAH820_272 de *Bacillus cereus* (homología del 76% en la secuencia de aminoácidos deducida, número de acceso CP001285.1).

Tras el gen *tnp* se encuentra una copia invertida de la secuencia de inserción IS431 casi idéntica a la IS431 cromosómica de la cepa 04-02981 (799/801 pb) de *S. aureus* (número de acceso GenBank CP001844.2; Nübel, 2010) y a la IS431 del plásmido TW20 (794/795 pb) de *S. aureus* (número de acceso GenBank FN433596.1; Holden, 2010).

A continuación, se sitúa una copia truncada del gen *repU*, que codifica una proteína para la replicación del plásmido. Sin embargo, en el pERGB este gen se encuentra interrumpido en su extremo 5' por la integración del elemento IS431, produciendo una delección funcional. Este gen *rep* presenta una homología superior al 99% (924/929 pb) con el gen *repB* del plásmido pUB110 (McKenzie, 1987; Rolain,

2009). Asimismo, es también muy similar al gen *repU* de los plásmidos pKKS2187 (787/794 pb) (número de acceso GenBank FM207105.1; Kadlec, 2009a) y pKKS825 (826/830 pb) (número de acceso GenBank FN377602.2; Kadlec, 2009b). Los plásmidos pKKS825 y pKKS2187 procedían de dos aislados de SARM porcino del clon ST398, detectados en Alemania en 2004 y 2005, respectivamente (Schwarz, 2008). En la **figura 75** se muestra un esquema genético de ambos plásmidos.

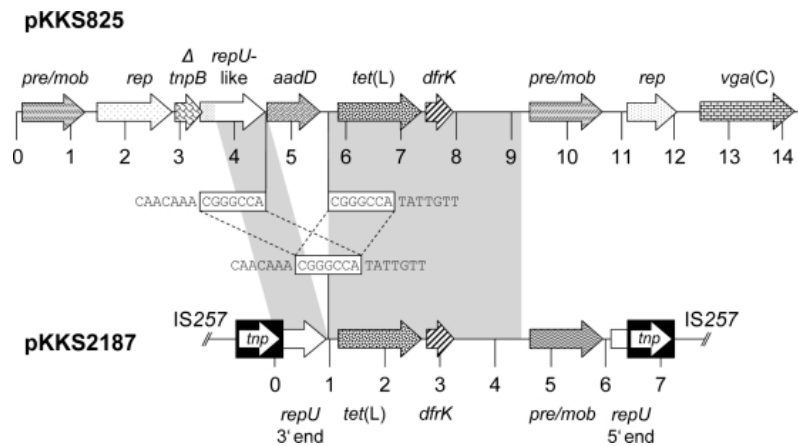


Figura 75. Estructura de los plásmidos pKKS825 y pKKS2187 (Kadlec, 2009b).

Tras el gen *repU* truncado, se detectaron tres genes de resistencia antimicrobiana: los genes *ant(4')-Ia* (también conocido como *aadD*), *tet(L)* y *dfrK*. La secuencia de nucleótidos de esta región, desde el inicio del gen *ant(4')-Ia* hasta el final del gen *dfrK* (3.228 pb), es idéntica a la detectada en el plásmido pKKS825 (Kadlec, 2009b), con la única excepción de tres nucleótidos adicionales (TGC) encontrados en el gen *tet(L)* del pKKS825 pero no en el pERGB. A su vez, el gen *tet(L)* del pERGB es idéntico al descrito en el plásmido pKKS2187 (Kadlec, 2009a).

A continuación, se detectó una copia del gen *pre/mob*, que codifica una proteína de recombinación y movilización, involucrada en la recombinación del plásmido. Presenta una similitud del 97% con pKKS2187 (1.229/1.263 pb) (Kadlec, 2009a).

Después del gen *pre/mob*, se encontró una copia entera del gen *repU*, casi idéntica (1.036/1.039 pb) al gen *repB* del pUB110 (Rolain, 2009). Este gen está involucrado con la replicación del plásmido. El extremo 3' de las 1.038 pb del gen *rep*

del pERGB es también muy similar a los plásmidos pKKS2187 (835/841 pb) ([Kadlec, 2009a](#)) y pKKS825 (697/705 pb) ([Kadlec, 2009b](#)).

Por último, al final del fragmento secuenciado, se encontró una copia directa de la IS431, idéntica a la IS431 situada en el SCC*mec* de la cepa de *S. cohnii* WC28 ([Zong, 2010](#)).

PARTE 4. ESTUDIO DE EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR Y CARACTERIZACIÓN DEL MECANISMO DE RESISTENCIA DE UN BROTE DE *Staphylococcus hominis* RESISTENTE A LA LINEZOLIDA

5.26 Características de los pacientes con *S. hominis* resistente a la linezolida

Durante febrero 2008 y marzo 2009 se detectaron en los hospitales HSSL y HUSD un total de 15 aislados clínicos de *Staphylococcus hominis* subsp. *hominis* resistentes a la linezolida en 14 pacientes distintos. Un paciente tuvo dos hemocultivos positivos a este microorganismo (con el mismo antibiograma) durante dos ingresos diferentes en el mismo hospital separados 100 días entre sí. De estos 15 aislados de *S. hominis*, 12 se detectaron en pacientes atendidos en el HSSL (11 de ellos en la UCI) y los otros 3 estaban ingresados en el HUSD, todos ellos en el área quirúrgica-traumatológica de la UCI de este hospital. La decisión sobre la significación clínica se adoptó tras revisar las historias clínicas y los antecedentes microbiológicos de los pacientes (tabla 35).

Tabla 35. Características de los pacientes con *S. hominis* resistente a la linezolida^a.

Paciente	Hospital	Fecha de aislamiento	Muestra	Sexo	Significación clínica
1	HSSL	29/03/2008	Hemocultivo	F	No
2	HSSL	22/05/2008	Hemocultivo	F	Sí
3	HSSL	06/08/2008	Hemocultivo	F	No
4	HSSL	19/08/2008	Hemocultivo	M	No
5	HSSL	01/09/2008	Hemocultivo, cable marcapasos	F	Sí
6	HSSL	01/10/2008	Hemocultivo	M	No
6	HSSL	21/01/2009	Hemocultivo	M	Sí
7	HUSD	11/11/2008	LCR	F	Sí
8	HUSD	16/11/2008	Catéter	M	Sí
9	HSSL	17/12/2008	Hemocultivo	M	No
10	HSSL	28/01/2009	Líquido sinovial	F	No
11	HSSL	06/02/2009	Exudado herida	M	Sí
12	HSSL	13/02/2009	Hemocultivo	M	No
13	HSSL	23/02/2009	BAS	F	Sí
14	HUSD	26/02/2009	Catéter	M	Sí

^aAbreviaturas. HSSL: Hospital Son Llätzer; HUSD: Hospital Universitari Son Dureta; M: masculino; F: femenino; LCR: líquido cefalorraquídeo; BAS: aspirado bronquial.

Es importante señalar que en dicho período no se produjo ninguna transferencia de pacientes entre las UCI de ambos hospitales y tampoco hubo ningún traslado de instrumental entre ellas. No obstante, dos enfermeras compatibilizaban el trabajo en ambas UCI durante el período de tiempo del brote.

Respecto al tipo de muestra (**tabla 35**), los aislados de *S. hominis* resistentes a la linezolidina se obtuvieron de hemocultivos (9), seguidos de catéteres (2), líquidos estériles (2), cable de marcapasos (1) y exudado herida (1). Adicionalmente, se llevó a cabo un estudio de colonización (nasal, axilar e inguinal) en los últimos tres pacientes del HSLL. Todos ellos tuvieron colonización axilar e inguinal por *S. hominis* multirresistente, con el mismo antibiograma que su cepa clínica correspondiente.

La evolución en los 15 episodios infecciosos fue buena en 12 de ellos, otros 2 fallecieron por causas no relacionadas, mientras que el paciente restante desarrolló una bacteriemia con infección del cable de marcapasos por este microorganismo, falleciendo a los pocos días por una probable endocarditis (**tabla 36**).

Tabla 36. Tratamiento y evolución de los pacientes con *S. hominis* resistente a la linezolidina^a.

Paciente	Días de tratamiento con linezolidina previos a la detección de <i>S. hominis</i>	Tratamiento previo con glucopéptidos	Tratamiento dirigido	Evolución
1	16	No	No	<i>Exitus</i> NR
2	10	Vancomicina	Vancomicina	Buena
3	0	No	No	Buena
4	9	Vancomicina	No	Buena
5	6	No	Vancomicina	<i>Exitus</i> R
6	0	No	Vancomicina	Buena
6	4	Vancomicina	Vancomicina	Buena
7	19	Vancomicina	Vancomicina	<i>Exitus</i> NR
8	17	No	Vancomicina	Buena
9	3	No	No	Buena
10	42	No	No	Buena
11	1	No	Vancomicina	Buena
12	0	No	No	Buena
13	11	Vancomicina	Tigeciclina	Buena
14	11	No	Tigeciclina	Buena

^aAbreviaturas. NR: no relacionado; R: relacionado.

5.27 Identificación de especie y estudio de sensibilidad

La secuenciación del gen ARNr 16S en una cepa de *S. hominis* multirresistente (previamente identificada mediante la tarjeta Vitek® GP, bioMérieux) confirmó la identificación de *S. hominis* subsp. *hominis*.

Todos estos aislados fueron resistentes a la penicilina, oxacilina (CMI > 256 µg/mL), teicoplanina (CMI > 256 µg/mL), cotrimoxazol (CMI > 32 µg/mL), ciprofloxacino (CMI > 32 µg/mL), levofloxacino, tobramicina y linezolid (CMI ≥ 96 µg/mL). Por el contrario, todos ellos fueron sensibles a la eritromicina, tetraciclina, gentamicina y daptomicina. La CMI para la daptomicina fue de 0,25 µg/mL en todos ellos.

Respecto a la vancomicina, todas las cepas presentaron una CMI de 4 µg/mL, todavía sensibles siguiendo los criterios del CLSI (sensible ≤4 µg/mL, intermedio 8-16 µg/mL, resistente ≥32 µg/mL) (CLSI, 2009; CLSI, 2012), y también sensibles con los puntos de corte del EUCAST del 2012 (sensible ≤4 µg/mL, resistente >4 µg/mL) (EUCAST, 2012).

En relación con la clindamicina, casi todos los aislados tuvieron una sensibilidad intermedia a este antibiótico (CMI = 0,75 µg/mL), excepto en dos de ellos. Uno de los aislados fue sensible (CMI = 0,5 µg/mL) y el otro resistente a la clindamicina (CMI = 4 µg/mL) (CLSI, 2009; CLSI, 2012). Todas las cepas fueron sensibles a la rifampicina, excepto una que presentó sensibilidad intermedia.

5.28 Mecanismo de resistencia a la linezolid

En el análisis de secuenciación de un fragmento del gen ARNr 23S, los cinco aislados de *S. hominis* resistentes a la linezolid que fueron secuenciados presentaron la mutación G2576T (según numeración de *E. coli*) en el dominio V del gen ARNr 23S, mientras que ninguno de los tres aislados sensibles presentaron dicha mutación (**figuras 76 y 77** de la página siguiente).

En comparación con la secuencia del dominio V del gen ARNr 23S de una cepa de *S. aureus* disponible en GenBank (número de acceso X68425), se encontró además, la sustitución C2163T en los ocho aislados de *S. hominis* secuenciados

(tanto los sensibles como los resistentes a la linezolid). Por ello, se consideró que esta sustitución era un polimorfismo de especie.

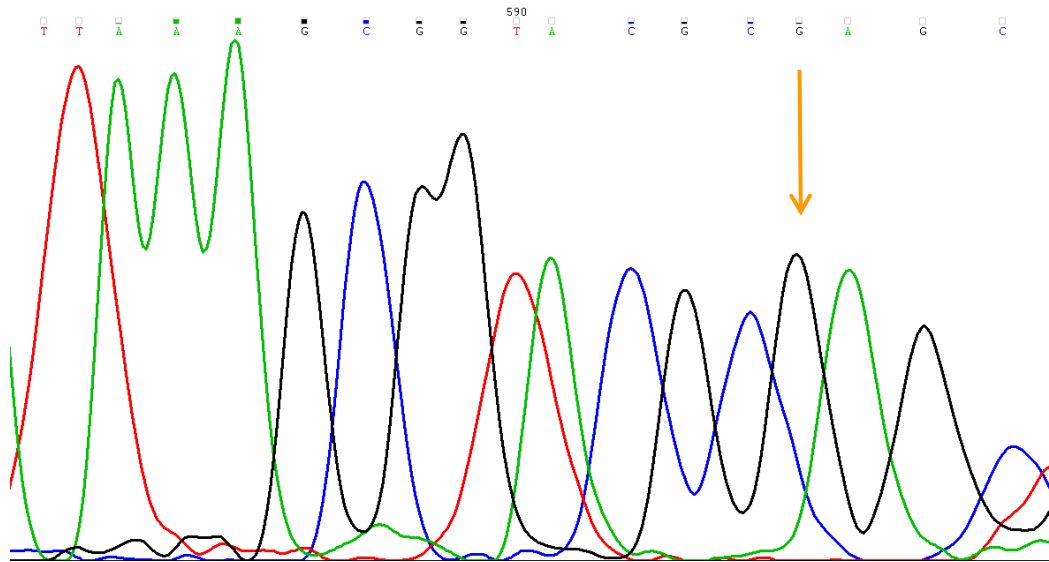


Figura 76. Cromatograma de un fragmento de las secuencias del gen ARNr 23S en un aislado de *S. hominis* sensible a la linezolid. La flecha naranja indica la guanina en la posición 2.576 (según numeración de *E. coli*), sin detectarse ninguna mutación).

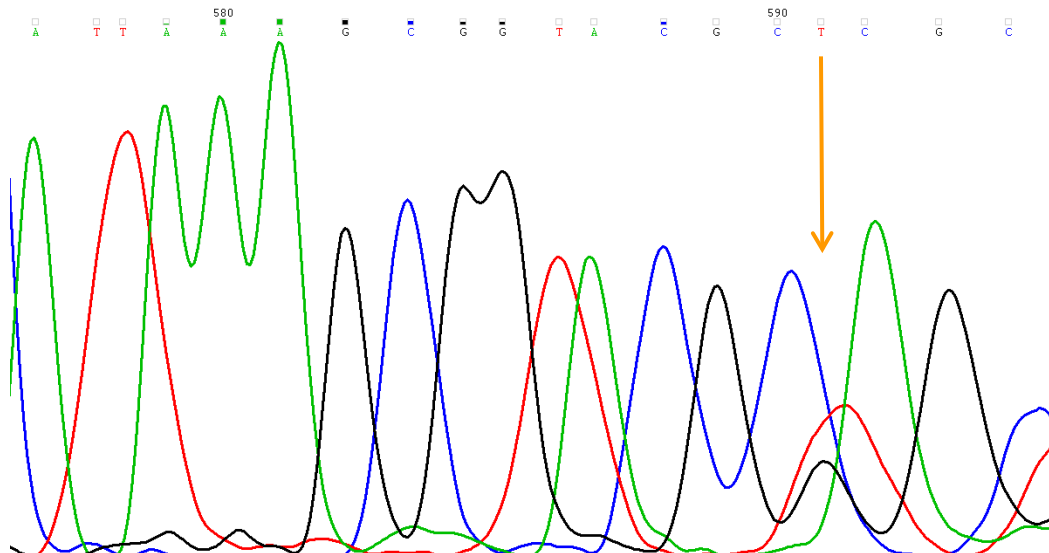


Figura 77. Cromatograma de un fragmento de las secuencias del gen ARNr 23S en un aislado de *S. hominis* resistente a la linezolid. La flecha naranja indica la posición 2.576 (según numeración de *E. coli*), observándose una doble curva, siendo la curva de la timina (alelos mutados) superior a la curva de la guanina (alelos no mutados).

Por último, no se detectó el gen *cf*r en los ocho aislados de *S. hominis*, tanto sensibles como resistentes a la linezolida, usando la cepa de SARM HC08 (Morales, 2010) como control positivo de la amplificación.

5.29 Estudio de epidemiología molecular

La ECP, tras digestión con *Sma*I, mostró que todos los aislados de *S. hominis* resistentes a la linezolida tenían el mismo patrón electroforético, aunque únicamente se observaban tres bandas, por lo que era poco discriminativa. Por el contrario, los aislados de *S. hominis* sensibles a la linezolida tuvieron 3-4 bandas en diferentes posiciones (figura 78).

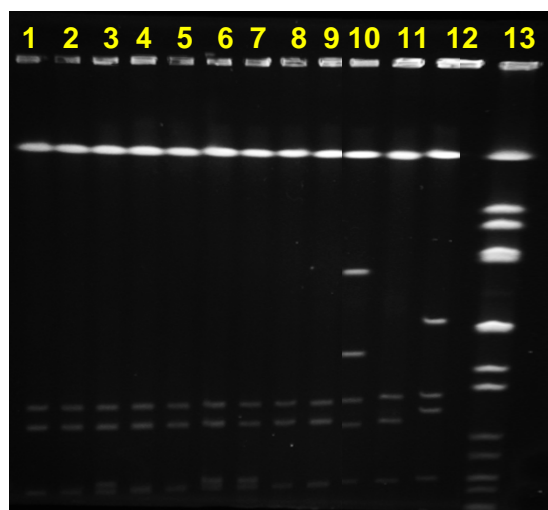


Figura 78. ECP usando *Sma*I como enzima de restricción. Líneas 1-6: aislados de *S. hominis* resistentes a la linezolida del HSL. Líneas 7-9: aislados de *S. hominis* resistentes a la linezolida del HUSD. Líneas 10-12: aislados de *S. hominis* sensibles a la linezolida de ambos hospitales. Línea 13: cepa de referencia de *S. aureus* NCTC 8325.

Cuando se utilizó *Apa*I como enzima de restricción, la ECP mostró que todos los aislados resistentes a la linezolida pertenecían al mismo clon, mientras que los sensibles a este compuesto pertenecían a diferentes clones (figura 79).

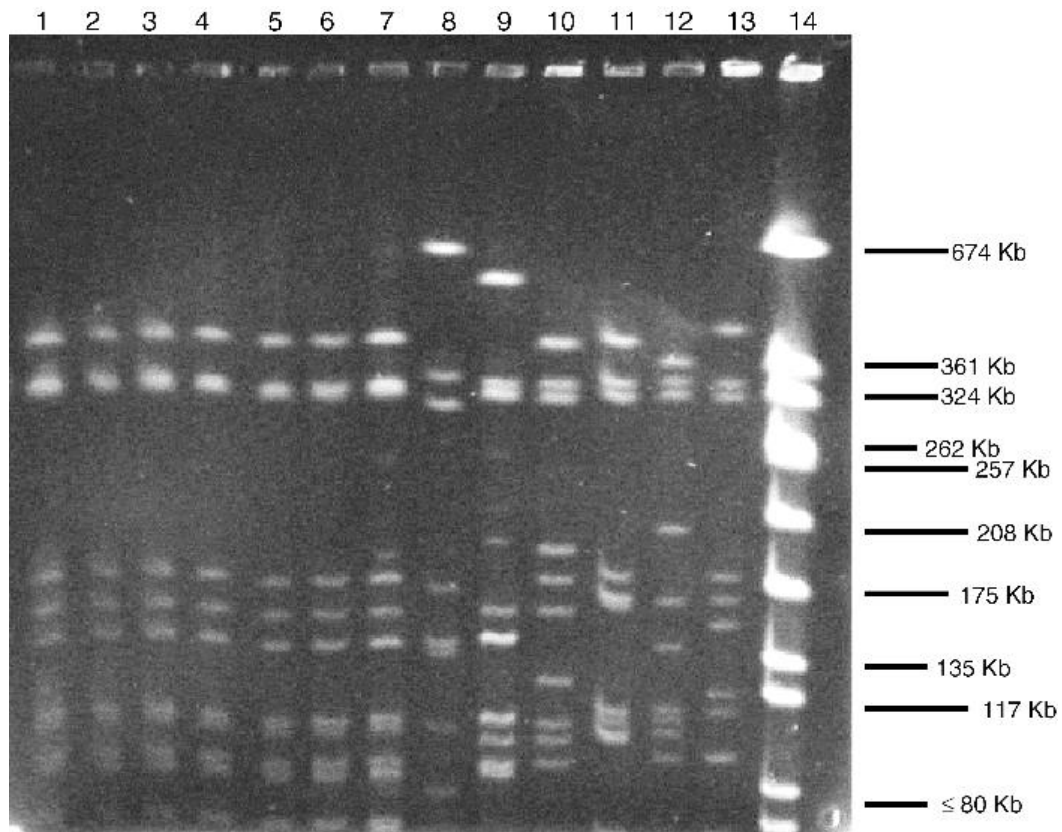


Figura 79. ECP usando *Apal* como enzima de restricción. Líneas 1-6: aislados de *S. hominis* resistentes a la linezolid del HSSL. Línea 7: aislado de *S. hominis* resistente a la linezolid del HUSD. Línea 8: aislado de *S. hominis* sensible a la linezolid del HUSD. Líneas 9-13: aislados de *S. hominis* sensibles a la linezolid del HSSL. Línea 14: cepa de referencia de *S. aureus* NCTC 8325 (Ruiz de Gopegui, 2011).

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

6.1 Epidemiología molecular de SARM en Mallorca

El comienzo del problema

Staphylococcus aureus resistente a la meticilina continua siendo uno de los principales patógenos responsables de infecciones nosocomiales (EPINE, 2011). Una vez que se introduce en el hospital, habitualmente llega a situaciones de endemicidad, a pesar de las medidas del control de la infección (da Silva Coimbra, 2003). Las infecciones por SARM tienen peor pronóstico que las infecciones por SASM, con una mayor morbilidad, mortalidad, duración de la estancia hospitalaria y costes (Gould, 2012).

En la mayoría de hospitales del territorio peninsular español, la epidemia de SARM empezó en 1990, alcanzando un primer pico en 1991-1992. La mayoría de estos casos estaban producidos por el denominado clon Ibérico (Domínguez, 1994; Gasch, 2011). Sin embargo, en el HUSD, el primer brote de SARM se detectó una década más tarde, en junio de 1999. Inicialmente se aisló en pacientes ingresados en UCI y Traumatología, extendiéndose después al resto de plantas del pabellón de hospitalización general. Con el transcurso del tiempo, la situación epidémica inicial de nuestro hospital se transformó en una endemia moderada.

En nuestro primer estudio de epidemiología molecular (junio 1999-agosto 2000) la epidemia de SARM era claramente oligoclonal, con tres clones mayoritarios de SARM que comprendían el 98% de las cepas clínicas de nuestro hospital. Desde junio de 1999 hasta diciembre de ese año, únicamente se encontraron en el HUSD dos clones de SARM, el clon A (tipificado posteriormente como ST125-MRSA-IVc) y el clon C (ST22-MRSA-IVh). A partir de enero 2000 se detectó por primera vez, en pacientes que estaban ingresados en UCI, el clon B (ST228-MRSA-I).

La práctica totalidad de las infecciones por SARM durante 1999-2004 estuvieron producidas por tres únicos clones. En este sentido, nuestro trabajo concuerda con otros que señalan que las cepas de SARM hospitalarias corresponden a unos pocos clones. Así, por ejemplo, en un estudio realizado en más de 3.000 aislados de SARM procedentes de hospitales de Europa y América, casi el 70% de los

aislados pertenecía a uno de los cinco clones pandémicos (Oliveira, 2002b). En otro trabajo, el 79% de 2.093 aislados de SARM procedentes de hospitales de diversos estados de EE.UU. detectados durante 2011 pertenecía a dos únicos clones, el USA300 y el USA100 (Diekema, 2014).

Otra de las cosas que llama la atención en nuestro estudio es la ausencia del clon Ibérico (ST247-MRSA-I) en el HUSD durante la pandemia inicial del SARM. El clon Ibérico fue el clon de SARM predominante en España desde 1990 hasta 1995, disminuyendo progresivamente su prevalencia a partir de 1996 y siendo prácticamente inexistente a partir de 2000 (Vindel, 2006). En el Hospital de Bellvitge, el primer hospital donde se describió este clon, la prevalencia del clon Ibérico disminuyó del 100% de todos los clones de SARM en el período 1990-1994, un 66% durante 1996-1999, al 5% en 2000-2004 (Gasch, 2011). Asimismo, en un hospital de Tenerife, el clon Ibérico comprendía el 97% de los aislados de SARM en 1998, el 74% en 1999, el 44% en 2000, pero en 2001, únicamente el 4% de sus cepas de SARM pertenecían a este clon (Pérez-Roth, 2004). Posteriormente, el clon Ibérico ha desaparecido de estos hospitales.

El primer clon de SARM detectado en el HUSD a comienzos de junio de 1999, principalmente en pacientes de UCI, fue el clon A, que se correspondía con el ST125-IVc. Este clon pertenece al complejo clonal 5 (CC5), ya que difiere del clon ST5 en uno de los siete alelos (*yqiL*) *housekeeping* utilizados para el tipado mediante MLST. Por ello, se ha sugerido (Pérez-Roth, 2004) que el clon ST125-MRSA-IVc habría derivado del clon Pediátrico (ST5-MRSA-IVc) (Sá-Leão, 1999), uno de los primeros clones pandémicos de SARM (Oliveira, 2002b). El clon ST125-IVc emergió por primera vez en España en 1996 siendo, a partir de 1998, el clon de SARM mayoritario en la inmensa mayoría de hospitales españoles. En los estudios multicéntricos del CNM, la prevalencia del clon ST125-IVc aumentó del 6,5% en 1996 al 58,8% en 2002 (Vindel, 2006).

También en junio de 1999, emergió en el HUSD el clon C, principalmente en pacientes de Traumatología y Medicina Interna, tipificado posteriormente como ST22-IVh. Este clon se encontró por primera vez en 1991, en varios hospitales del sudeste de Inglaterra. Se le denominó clon epidémico EMRSA-15 (Richardson, 1993), ya que previamente se habían definido en Inglaterra y Gales otros 14 clones epidémicos de SARM (Kerr, 1990). En diversos estudios retrospectivos, los primeros aislados de este clon fueron en 1990 en el sur de Inglaterra. Inicialmente las cepas de este clon eran sensibles al ciprofloxacino, pero a finales de 1991 se detectaron en la región inglesa

de West Midlands varios aislados resistentes a este antimicrobiano. El aumento de la administración hospitalaria de fluoroquinolonas durante la década de los 90 en el Reino Unido ([Livermore, 2002](#)) habría ofrecido una ventaja selectiva al EMRSA-15 sobre el resto de los clones sensibles a esta familia antibiótica ([Richardson, 1993](#); [Holden, 2013](#)). En el año 2000, el EMRSA-15 se extendió por todo el Reino Unido, desplazando rápidamente a los otros clones de SARM existentes ([Holden, 2013](#)). Actualmente, es el clon de SARM más frecuente en dicho país. Por ejemplo, en el Reino Unido el clon EMRSA-15 era el responsable del 60% de las bacteriemias por SARM en 1998-2000 ([Johnson, 2001](#)), del 76% en 2001 y del 85% en 2007 ([Ellington, 2010](#); [Reynolds, 2012](#)).

Posteriormente, el ERMSA-15 se ha detectado en otros muchos países. Así por ejemplo, se ha comunicado su aislamiento en Alemania desde 1996 ([Witte, 2001](#)), en Australia desde 1997 ([Pearman, 2001](#)), en Nueva Zelanda desde 1998 ([Smith, 2005](#)), en Portugal desde 2001 ([Aires-de-Sousa, 2005](#); [Amorim, 2007](#)). En cuanto a España, se observó por primera vez en 1999, en Tenerife (quizás al mismo tiempo o unos pocos meses antes que en nuestro centro), aunque sólo era el responsable durante 1999-2002 de menos del 2% de sus clones de SARM ([Pérez-Roth, 2004](#)). En la España peninsular, este clon era muy infrecuente hasta aproximadamente 2005. Así, en el estudio multicéntrico del CNM del 2002 (143 hospitales participantes), ninguno de los 134 aislados de SARM remitidos pertenecía a este clon ([Cuevas, 2007](#)).

El origen del clon EMRSA-15 en Mallorca, como en Tenerife, muy probablemente, podría estar relacionado con los movimientos turísticos, en concreto en los turistas británicos, o incluso alemanes, dado que en Alemania también el ERMSA-15 era bastante prevalente en 1999, aunque no tan frecuente como en el Reino Unido. Se podría hipotetizar que un turista o residente inglés, previamente colonizado por esta cepa, habría ingresado en el HUSD (posiblemente en Traumatología). Tras haber recibido tratamiento antibiótico, llevar dispositivos intravasculares (catéteres vasculares, sondas urinarias), o ser sometido a una intervención quirúrgica, desarrollaría una infección por SARM. A través de las manos del personal sanitario, se transmitiría al compañero de habitación y a otros enfermos de la planta. Este clon, al tener una mayor *fitness* que otros clones por su perfil genético ([Holden, 2013](#); [Knight, 2013](#)), se asentaría en nuestro hospital.

Por último, en enero de 2000 se detectó por primera vez en el HUSD el clon B (ST228-I), inicialmente limitado a pacientes en la UCI. Este clon ST228-I, como el ST125-IVc, pertenece al CC5. Se ha propuesto que el clon ST228-MRSA-I procedería

evolutivamente del clon ST5-MRSA-I (conocido en el Reino Unido como EMRSA-3) (Robinson, 2003). Fue descrito por primera vez en la ciudad de Würzburg, Baviera, en el suroeste de Alemania, en 1991 (Schwarzkopf, 1993), por lo que se le conoce como clon Alemán del sur. A partir de 1992, se produjo una rápida diseminación de este clon al norte y este de Alemania, produciendo diferentes brotes hospitalarios (Witte, 1994; Witte, 1999). En 1993, se extendió por la mayoría de hospitales italianos, por lo que también se le denominó clon Italiano (Campanile, 2009). Desde finales de la década de los 90, el ST228-I se ha diseminado por múltiples países europeos, constituyendo uno de los principales clones de SARM (Stefani, 2012).

En España, el clon ST228-I (clon E6, según la terminología de los patrones de bandas de la ECP del CNM) era el clon predominante de SARM durante 1997-1998, con el 23,3% de los aislados de SARM (según estudios multicéntricos). A partir de 1999, la frecuencia de este clon comenzó a disminuir (Vindel, 2006). Con todo, en el Hospital de Bellvitge este clon emergió en 2004, siendo el clon de SARM predominante a partir de 2006 (Mick, 2010).

Evolución clonal de SARM en Mallorca

Si se comparan los resultados obtenidos en los tres períodos comprendidos entre 1999 y 2008, el clon de SARM que predominaba en el HUSD ha sido distinto en cada uno de ellos. Así, durante el primer estudio de 1999-2000, el 63% de los aislados de SARM de nuestro hospital pertenecía al clon A (ST125-IVc), mientras que en el periodo 2002-2004 se detectó un moderado predominio del clon B (ST228-I), en el 43% de los aislados. Sin embargo, en 2008 el clon más frecuente de SARM era el clon C (EMRSA-15, ST22-IVh), con un 40%.

El predominio del clon ST125-IV hacia 1999-2000 era una característica común en la gran mayoría de hospitales españoles, como muestra los estudios multicéntricos del CNM (Vindel, 2006). Esta cifra alcanzaba el 93% en algunos hospitales, como en Logroño (Lozano, 2013b).

Respecto al clon ST228-I, el clon mayoritario de SARM del HUSD durante 2002-2004, existen varios trabajos que describen también un predominio de dicho clon en 1994-1998 en Alemania (Witte, 1999; Wisplinghoff, 2005) y durante 2000-2007 en Italia (Campanile, 2009), desplazando a los otros clones de SARM preexistentes, como de hecho ocurrió en nuestro hospital. Una situación similar se produjo en el

Hospital de Bellvitge, donde el clon ST228-I se diseminó a partir de 2004, reemplazando al ST125-IVc y haciéndose endémico (Mick, 2010; Gasch, 2011).

El clon de SARM predominante en el HUSD-HUSE en 2008-2013 fue el ST22-IVh (EMRSA-15). Este clon ha demostrado en numerosos estudios su capacidad para reemplazar a los otros clones de SARM que previamente se encontraban diseminados por un hospital. Así por ejemplo, en un hospital de Dresden (Alemania), en el año 2000 alrededor de la mitad de sus aislados de SARM pertenecían al clon ST228-I; sin embargo, la prevalencia del EMRSA-15 aumentó del 6% en 2001 al 59% en 2010 (Albrecht, 2011). Asimismo, en Portugal a partir del 2001, el clon EMRSA-15 ha ido reemplazando progresivamente al clon Brasileño (ST239-III) (Amorim, 2007; Aires-de-Sousa, 2008; Espadinha, 2013; Faria, 2013).

La drástica disminución del clon ST228-I que se constató en el HUSD entre los periodos 2002-2004 (43%) y 2008 (5%) se produjo también en un hospital de Valladolid, donde la prevalencia de este clon bajó de un 54% (en relación al conjunto de las cepas de SARM analizadas) en 2005 a un 14% en 2007 (Menegotto, 2012b).

Las razones por la desaparición del clon ST228-I en muchos hospitales y la diseminación de algunos clones portadores del SCCmec tipo IV (ST22-IVh y ST125-IVc en nuestro caso) son parcialmente conocidas. Una de ellas podría ser el mayor tamaño del SCCmec tipo I (34,3 kb) frente al SCCmec tipo IV (20,9-24,3 kb) (Deurenberg, 2008). Un estudio mostró que la transformación de un SCCmec tipo I en un aislado de SARM provocaba una reducción en su tasa de crecimiento (Ender, 2004), mientras que, la delección del SCCmec tipo IV en un aislado de SARM USA300 no afectaba a su *fitness* (Diep, 2008). Con todo, se ha sugerido que la diferencia en la *fitness* entre los SCCmec tipo I y tipo IV no se debería estrictamente al mayor tamaño del primero, sino a un consumo de glucosa más elevado en el SCCmec tipo I lo que provocaría una menor tasa de crecimiento (Lee, 2007). No obstante, el tipo de SCCmec no explica por si solo el éxito en la diseminación de un determinado clon de SARM (Albrecht, 2011; Knight, 2013).

Existen también otros estudios que intentan explicar el éxito de la elevada diseminación del EMRSA-15 frente a otros clones de SARM. Se ha comunicado que los aislados del clon EMRSA-15 tienen una mayor facilidad para sobrevivir y diseminarse por el medio hospitalario (Moore, 2002; Holden, 2013), una predisposición superior para colonizar las úlceras cutáneas (CDR, 1996), así como una mayor capacidad para sobrevivir a la desecación (Knight, 2013). Otro estudio concluía que el

principal determinante de la mejor *fitness* que presenta este clon es su perfil genético (*background*), diferente frente al resto de los clones (Knight, 2013).

Como es bien sabido, los hospitales no son instituciones cerradas. En el estudio de epidemiología molecular realizado en los cinco hospitales públicos existentes en 2003-2004 en la isla de Mallorca se encontraron los mismos tres clones mayoritarios en el HUSD en el resto de los hospitales, si bien la frecuencia de cada clon fue diferente en cada uno de los centros. Los hospitales General y Joan March son centros de larga estancia de pacientes crónicos. Por tanto, el origen del SARM en estos dos centros de larga estancia probablemente provendría de pacientes previamente ingresados en el HUSD, que en el momento del alta, fueron derivados a alguno de estos dos hospitales para una convalecencia.

El origen del SARM en los hospitales de Manacor y Son Llätzer (este último inaugurado en diciembre de 2001) podría haber ocurrido en pacientes ingresados en el HUSD y que se habrían ido de alta siendo portadores de SARM. Posteriormente, habrían ingresado en los otros hospitales, y tras procedimientos invasivos y tratamiento antibiótico, desarrollarían una infección por SARM.

Por otra parte, la isla de Mallorca es un lugar turístico importante, principalmente del resto de España, de Alemania y del Reino Unido. Los clones A (ST125-IVc), B (ST228-I) y C (ST22-IVh) son, respectivamente, los clones predominantes de SARM en el conjunto de España (Cuevas, 2007), Alemania (Monecke, 2008) y Reino Unido (Johnson, 2001). Por tanto, es plausible que estos tres clones se hayan reintroducido en Mallorca en múltiples ocasiones. Un dato indirecto a favor de esta hipótesis es la mayor frecuencia del clon EMRSA-15 en el Hospital de Manacor en 2003-2004, hospital muy próximo a zonas costeras frecuentadas por el turismo británico.

Infección asociada a los cuidados sanitarios: SARM sale del hospital

En el período 1999-2000, la gran mayoría (el 93%) de las muestras con SARM procedían de pacientes que estaban ingresados en el hospital, principalmente de UCI. Sin embargo, llama la atención que la proporción de aislados de SARM detectados en pacientes que acudieron a Urgencias o Consultas Externas haya aumentado progresivamente pasando del 7% en 1999-2000, al 13% en 2002-2004 y al 27% en 2008.

Se observó (datos no mostrados) que la mayoría de pacientes con SARM de 2008 detectado en Urgencias o en Consultas Externas tenían el antecedente de haber ingresado en los últimos 6 meses en algún centro hospitalario de Mallorca, o bien, de haber acudido en múltiples ocasiones a las Consultas Externas de nuestro hospital. Los clones de SARM encontrados en la práctica totalidad de estos pacientes no ingresados eran idénticos a los clones del hospital. Por tanto, la mayoría de estos pacientes no ingresados con SARM estarían incluidos en la categoría de SARM asociado a los cuidados sanitarios (SARM-ACS) o a la asistencia sanitaria, en inglés *health care-associated, community-onset* (Klevens, 2006).

Las infecciones asociadas a los cuidados sanitarios fueron reconocidas como una nueva categoría hace relativamente pocos años (Friedman, 2002). El número de pacientes en riesgo de dicha categoría está aumentando en los últimos años, especialmente en los países desarrollados (Gasink, 2008).

Cepas de SARM productoras de LPV: SARM comunitario

En España los primeros aislados de SARM productores de LPV se detectaron en 2003 en Madrid (Broseta, 2006; Cercenado, 2008) y Barcelona (Manzur, 2008a; Rodríguez-Baño, 2009). La mayoría de los casos ocurrían en población inmigrante procedente de América Latina, principalmente de Ecuador (Cercenado, 2008; Manzur, 2008a). A partir de 2007, se produce un aumento en nuestro país de las cepas de SARM que poseían los genes productores de LPV (Cobos-Trigueros, 2010; Cañas-Pedrosa, 2012; Marimón, 2012; Vindel, 2014).

A finales del año 2003, se detectaron en el HUSD dos cepas de SARM únicamente resistente a β -lactámicos, en dos exudados (uno de herida y otro de un absceso). Desconocemos el lugar exacto de nacimiento de estos pacientes, si bien al menos uno de ellos (por los datos demográficos) era de procedencia latinoamericana. El perfil de bandas de la ECP de las dos cepas era idéntico, y diferente al de los tres clones mayoritarios del HUSD. Lamentablemente estas cepas no se conservaron para posteriores estudios.

En 2007, se llevó a cabo en nuestro hospital una búsqueda activa de los genes productores de LPV en las cepas de SARM sensibles al ciprofloxacino. El primer caso en nuestro hospital confirmado de una cepa de SARM con LPV ocurrió en abril del 2007. Se detectó en un varón de 34 años, natural de la India aunque residente en España desde hacía 6 años. Ingresó en la UCI tras haber sufrido un traumatismo

craneoencefálico. El paciente desarrolló, a los 8 días de su ingreso, una neumonía por una cepa de SARM LPV+, únicamente resistente a los β -lactámicos. A pesar de que la neumonía era de adquisición nosocomial, era probable que este paciente estuviera previamente colonizado en la orofaringe y, tras la intubación y haber recibido tratamiento antibiótico, habría desarrollado una neumonía por aspiración (Ruiz de Gopegui, 2008). Esta cepa fue posteriormente tipificada y se correspondía con el ST8-IVc (USA300-*like*). A partir de junio del 2007, encontramos los primeros aislados de SARM estrictamente comunitarios productores de LPV, la mayoría procedentes de centros de salud.

En nuestro estudio del 2008, 9 de los 132 aislados de SARM hospitalarios (6,8%) eran productores de LPV. Este porcentaje es más alto que en otros trabajos publicados en España. Así por ejemplo, la proporción de LPV en aislados de SARM fue del 2,3% en Bilbao durante 2005-2008 (Blanco, 2011), del 4,4% en San Sebastián durante 2007-2009 (Marimón, 2012), del 1,8% en la Rioja en 2009 (Lozano, 2013b) y del 4,2% en Gran Canaria durante 2003-2010 (Cañas-Pedrosa, 2012). Ello se podría explicar a que la mayoría de estos trabajos han analizado cepas detectadas antes de 2008, cuando la prevalencia de LPV era menor (Rojo, 2010; Vindel, 2014).

Casi todos los aislados de SARM productores de LPV detectados en Mallorca en 2008 pertenecían al clon ST8-IV, coexistiendo dos variantes, el ST8-IVa (USA300) y el ST8-IVc (USA300-*like*). El USA300-*like* fue el primer clon de SARM productor de LPV que detectamos en Mallorca y también es el más frecuente en el conjunto de España (Vindel, 2014), en Madrid (Cercenado, 2008) y en Barcelona (Manzur, 2008a). Con todo, en otras ciudades coexistían estas dos variantes del ST8 con una frecuencia similar (Blanco, 2011; Cañas-Pedrosa, 2012; Marimón, 2012).

Respecto al lugar de procedencia geográfica de los pacientes, si bien en 2008 sólo uno de los cuatro pacientes de nuestro hospital con USA300-*like* era de procedencia latinoamericana (un niño de 2 años de padres ecuatorianos), en 2007 al menos, 3 de los 7 pacientes con USA300-*like* de centros de salud eran de Sudamérica (datos no mostrados). Ello sugiere que el origen de este clon en Mallorca, como ha sucedido en otras ciudades españolas (Cercenado, 2008; Manzur, 2008a; Cobos-Trigueros, 2010; Daskalaki, 2010; Cañas-Pedrosa, 2012), podría provenir de la población inmigrante latinoamericana.

El clon ST8-IVa productor de LPV (USA300) se describió por primera vez en el año 1999 en EE.UU. (CDC, 2001). Respecto a Europa, se ha encontrado en más de 15 países (Nimmo, 2012), como el Reino Unido (Ellington, 2008) o Italia (Baldan, 2009;

[Sanchini, 2013](#)). Por tanto, el origen del clon USA300 en Mallorca bien pudiera estar en relación con el turismo, de modo similar a lo sucedido con el clon EMRSA-15.

En cuanto al estudio de sensibilidad antibiótica, llama la atención la diferencia de sensibilidad que encontramos en 2008 entre las cepas del clon USA300-like (principalmente resistencia exclusiva a los antibióticos β -lactámicos) con las cepas del clon USA300 (resistencia a la eritromicina y, en ocasiones, también al ciprofloxacino). En EE.UU. durante el inicio de la explosión del clon USA300 ([McDougal, 2003](#)), la práctica totalidad de estas cepas eran únicamente resistentes a los β -lactámicos y a los macrólidos (mediada por el gen *msrA*, que se encuentra en el plásmido *rep16*) ([Tenover, 2009](#); [Strommenger, 2014](#)). Sin embargo, en los últimos años alrededor del 45% de los aislados USA300 de EE.UU. son también resistentes a las quinolonas ([McDougal, 2010](#)). De modo similar, el 83-100% de las cepas de USA300 en Gran Canaria y Bilbao eran también resistentes a la eritromicina y al ciprofloxacino ([Blanco, 2011](#); [Cañas-Pedrosa, 2012](#)).

Por el contrario, los aislados del clon USA300-like suelen ser exclusivamente resistentes a los β -lactámicos ([Cercenado, 2008](#); [Manzur, 2008a](#); [Daskalaki, 2010](#); [Marimón, 2012](#)), o en ocasiones también a la tetraciclina ([Cercenado, 2008](#); [Manzur, 2008a](#); [Marimón, 2012](#)). En nuestro caso, no se detectó ninguna cepa USA300-like con resistencia a la tetraciclina.

En nuestros dos últimos estudios, 12 de las 14 cepas de SARM productoras de LPV se habían aislado a partir de exudados, principalmente de abscesos. Ello concuerda con múltiples trabajos que muestran una fuerte asociación en *S. aureus* entre la producción de LPV y las infecciones de piel y partes blandas, especialmente abscesos ([Lina, 1999](#); [Kazakova, 2005](#); [Johnson, 2006](#); [Moran, 2006](#); [Cercenado, 2008](#); [Manzur, 2008a](#); [del Giudice, 2009](#); [Daskalaki, 2010](#); [Nimmo, 2012](#)).

Perfiles de resistencia antimicrobiana en los clones mayoritarios de SARM

El clon ST125-IVc (clon A) presentó en 2008 una gran diversidad de perfiles de resistencia antimicrobiana, siendo en la mayoría de las ocasiones resistente al ciprofloxacino, tobramicina y a la eritromicina. Este perfil de resistencia fue también el más frecuente a nivel nacional en 2006-2007 ([Pérez-Vázquez, 2009](#)). Se ha descrito para los aislados de este clon que la resistencia a las fluoroquinolonas se debe a las mutaciones Ser-80 a Phe del gen *griA* (topoisomerasa IV) y Ser-84 a Leu del gen *gyrA* (ADN-girasa). Asimismo, la resistencia a la tobramicina está mediada por el gen

ant(4')-Ia que codifica una adeniltransferasa; mientras que, la resistencia a la eritromicina se suele producir por una bomba de expulsión activa codificada por los genes *msrA/msrB* (Pérez-Vázquez, 2009; Lozano, 2013b).

En nuestro estudio, llama la atención el descenso de la resistencia a la clindamicina del tipo MLS_B constitutiva pasando de un 67% en 2002-2004 a un 23% de resistencia en 2008. Curiosamente, esta misma tendencia, si bien no tan marcada, también se ha constatado en un hospital de Logroño. Así, en dicho hospital el 28% de los aislados de este clon tenían resistencia MLS_B constitutiva en 2001, frente al 16% en 2009 (Lozano, 2013b).

El clon ST228-I (clon B) fue el más resistente entre los tres clones mayoritarios del HUSD. Todos los aislados de 2008 fueron resistentes al ciprofloxacino, tobramicina, eritromicina, clindamicina y gentamicina. Los genes de resistencia asociados a este fenotipo de resistencia descritos en este clon son: *ermA* (resistencia a la eritromicina y clindamicina), *msrA/msrB* (resistencia a la eritromicina), *aac(6')-Ie+aph(2'')-Ia* (resistencia a la gentamicina y tobramicina) y *ant(4')-Ia* (resistencia a la tobramicina) (Lozano, 2013b). Uno de nuestros aislados del St228-I fue también resistente a la rifampicina, como también se ha descrito en aislados de este clon del Hospital de Bellvitge que, en su caso, fue debida a la mutación 481His/Asn del gen *rpoB* (Mick, 2010).

El clon ST22-IVc (EMRSA-15, clon C) fue el más sensible de los tres. Llama la atención, a diferencia de los otros dos clones, la alta frecuencia de resistencia MLS_B inducible que presenta este clon (entre el 28% y el 47% en los tres periodos). Esta resistencia inducible se ha encontrado también en muchas cepas internacionales del EMRSA-15 y está determinada por el gen *ermC* (Melter, 2004; Holden, 2013).

6.2 Epidemiología de SARM en las residencias geriátricas

Prevalencia y factores de riesgo de SARM en los centros geriátricos

Durante el periodo inicial (octubre-noviembre 2005), entre los 465 residentes participantes en el estudio, el 8,0% de ellos fueron portadores nasales de SARM. La tasa de colonización por SARM aumentó ligeramente al 8,1% al incluir las cepas aisladas en los exudados de úlcera/herida. Este porcentaje de colonización nasal,

aunque importante, es relativamente bajo al compararlo con otros estudios similares. Así por ejemplo, en el estudio multicéntrico del que forma parte este trabajo, que incluía además varios centros geriátricos de Barcelona (5 residencias) y Sabadell (3 residencias), la tasa de colonización por SARM fue del 16,8% en los 1.377 residentes participantes, oscilando entre 6,7% y 35,8% ([Manzur, 2008b](#)). En otro trabajo parecido, realizado en nueve residencias geriátricas de Terrassa (Barcelona), en 483 residentes, la colonización nasal por SARM fue del 10,5% ([Espejo, 2006](#)). Por último, la prevalencia de portadores nasales de SARM en 17 centros de larga estancia de la provincia de Sevilla durante 2009-2010 fue del 10,6% ([García-García, 2011](#)).

Existen algunas razones que pueden explicar la menor tasa de prevalencia nasal del SARM observada en nuestro estudio. Una de ellas es que no utilizamos para los cultivos de portadores caldos de enriquecimiento (como el caldo BHI salado) ni medios de agar cromogénicos para SARM, a diferencia de los centros de Barcelona y Sabadell. Se ha descrito que estos caldos de enriquecimiento aumentan la recuperación de cepas de SARM en aproximadamente un 14% ([van Loo, 2007](#); [Lauderdale, 2010](#)). No obstante, otra de las posibles razones es que la Residencia Bonanova es un centro de gran tamaño, que disponía, en ese momento, de un servicio médico permanente mañana y tarde. El personal sanitario de dicha institución podría tener una mayor experiencia que en las residencias pequeñas. De hecho, en el estudio al que nos hemos referido, el tamaño de la residencia se asociaba inversamente con la probabilidad de estar colonizado con SARM (“factor de protección”). Las diferencias de las tasas de colonización dependen también de la prevalencia de SARM en el hospital de referencia de cada centro geriátrico ([Manzur, 2008b](#)).

Asimismo, la prevalencia de SARM que encontramos en los residentes geriátricos de La Bonanova no fue muy diferente a la de otros países europeos como Italia (13,2%; [March, 2014](#)), Alemania (7,6%; [Pfungsten-Würzburg, 2011](#)), Gran Bretaña (4,7%; [Cox, 1999](#)), o Israel (6,2%; [Mendelson, 2003](#)). Por el contrario, en Estados Unidos el porcentaje de portadores de SARM en las residencias geriátricas suele ser más alto, con una tasa de colonización nasal del 10-58% ([Mulhausen, 1996](#); [Stone, 2012](#)).

Una limitación de la mayoría de los estudios de colonización de SARM publicados es que únicamente se recogieron muestras de exudados nasales y, en algunos casos adicionales, de exudados cutáneos. Varios trabajos han detectado que el uso exclusivo de escobillones nasales para el aislamiento de SARM tiene una sensibilidad del 77-84%, comparada con la obtención de muestras para cultivo de

múltiples localizaciones anatómicas (Sewell, 1993; Girou, 1998; Lauderdale, 2010) por lo que, en caso de existir una colonización en otros lugares, no se hubiera detectado y se perderían portadores de SARM. Se ha sugerido que sería necesario obtener tres muestras para la detección de todos los pacientes geriátricos colonizados por SARM: un exudado nasal, un exudado faríngeo y otro en el caso de haber una herida o úlcera cutánea (O'Sullivan, 2000b). Otro estudio realizado en un hospital de agudos norteamericano recomendó, para la búsqueda de SARM, la recogida de dos muestras, un exudado nasal y otro inguinal (Mermel, 2011).

En nuestro trabajo, los factores de riesgo estadísticamente significativos para ser portador de SARM entre los residentes geriátricos fueron el tratamiento antibiótico previo en el último mes ($p=0,0003$), el tener como enfermedad de base una EPOC ($p=0,003$), una enfermedad vascular ($p=0,009$), o una neoplasia de órgano sólido ($p=0,03$) y, por último, el haber ingresado previamente en un hospital en los últimos 5 años ($p=0,03$). En la literatura, cinco han sido los factores que han mostrado un incremento en el riesgo de colonización por SARM ante un paciente que entra en contacto con este microorganismo: la hospitalización previa, el uso reciente de un antibiótico de amplio espectro, el estado funcional disminuido, el uso de algún dispositivo médico (tales como una sonda urinaria, una sonda nasogástrica o un catéter endovenoso) y las enfermedades crónicas que producen heridas o rupturas de la piel (McNeil, 2002). Curiosamente, en nuestro trabajo se han detectado los tres primeros factores de riesgo de colonización.

En el estudio multicéntrico, del cual forma parte este trabajo, los factores de riesgo para la colonización por SARM fueron: la edad igual o superior a 85 años, la existencia de úlceras de decúbito, el tratamiento antibiótico previo, la presencia de dispositivos invasivos, la comorbilidad, la hospitalización previa y las residencias geriátricas con menos de 150 camas (Manzur, 2008b). Respecto al estudio multicéntrico de centros de larga estancia sevillanos, los factores de riesgo fueron muy similares: la toma reciente de antibióticos, el ingreso hospitalario en los últimos 3 meses, la elevada comorbilidad, medida por el índice de Charlson y el ser portador de SARM previo conocido (García-García, 2011).

Llama la atención la fuerte asociación que se ha encontrado en nuestro estudio entre la presencia de EPOC y el estar colonizado por SARM. En la gran mayoría de trabajos publicados acerca de los factores de riesgo de colonización por esta bacteria no se suele evaluar de forma independiente esta variable de comorbilidad. No obstante, existen unos pocos trabajos que sí lo tienen en cuenta. Uno de ellos,

realizado en un centro de larga estancia italiano, encontró que el tener EPOC era un factor de riesgo independiente para la colonización por SARM (con una *odds ratio* de 11,7 y una $p=0,039$) (March, 2010). Otro trabajo, realizado en un centro de crónicos y larga estancia de Valencia, mostró que los pacientes con antecedente de diabetes (con una *odds ratio* de 1,9) y EPOC (con una *odds ratio* de 3,0) presentaron una prevalencia de colonización por SARM superior que los pacientes sin estos factores de riesgo (Salvatierra, 2014). Por último, un trabajo realizado en pacientes en hemodiálisis de Turquía reveló que la presencia de EPOC (con una *odds ratio* de 5,2 y una $p=0,006$) junto con el antecedente de hospitalización en el último año fueron los únicos factores independientes para la colonización por SARM (Köseoğlu, 2012).

Una posible explicación de la relación entre la EPOC y la colonización por SARM es que el tratamiento antibiótico, aunque controvertido, es frecuentemente prescrito en los episodios de exacerbación de los pacientes con EPOC, lo que pudiera condicionar la selección de microorganismos multirresistentes (Wilson, 2013). También se ha especulado que el tratamiento con quinolonas como el ciprofloxacino, un grupo de antibióticos muy utilizado en esta situación clínica, provocaría un aumento de la producción de adhesinas en *S. aureus*, especialmente de las proteínas de unión a la fibronectina, con lo que se facilitarían la adherencia de esta bacteria a la mucosa nasal (Bisognano, 2004).

Epidemiología molecular del SARM en las residencias geriátricas

De los 38 residentes con SARM, 26 (68,5%) estaban colonizados por una cepa perteneciente al clon ST22-IVh (EMRSA-15). Aunque el ERMSA-15 se ha convertido en el clon más frecuente en los residentes de nuestro estudio durante el periodo estudiado, su incorporación y asentamiento epidemiológico es relativamente reciente. Así, en el estudio retrospectivo realizado por nuestro grupo sobre aislamientos de SARM en úlceras cutáneas entre enero 2000 y junio 2002 en los residentes geriátricos de la Residencia Bonanova, el clon más frecuente durante dicho período fue el clon A (ST125-IVc), en el 47%, seguido del clon C2 (ST22-IVh) en el 30%. No se encontró en ese momento ningún otro subtipo del clon C diferente al C2 (Ruiz de Gopegui, 2004). En el estudio presente (octubre-noviembre 2005), se ha detectado una mayor prevalencia de este clon con cinco subtipos diferentes mediante ECP.

El origen de este clon en la Residencia Bonanova, muy probablemente, procedería del HUSD. Algún residente geriátrico, allá por el año 2000, ingresaría en el

HUSD y se colonizaría en las fosas nasales o en una úlcera, como de hecho se constató en el primer estudio realizado, en el que se detectaron 5 residentes colonizados en úlcera con el clon C2, de los cuales uno había ingresado previamente en el HUSD (Ruiz de Gopegui, 2004). Posteriormente, este residente volvería a la residencia y sería el foco de contagio para otros residentes. El hecho de haber cinco subtipos puede ser debido a adquisiciones de diferentes cepas de SARM por varios ingresos de otros residentes en el HUSD o en otros hospitales, o bien, por una diversificación del clon C2 original, debido a cambios genéticos (mutaciones puntuales, inserciones o deleciones) (Tenover, 1995).

El clon EMRSA-15 se ha detectado también, con una alta frecuencia, en diferentes centros geriátricos del Reino Unido (Fraise, 1997; Cox, 1999; Smith, 2008b; Horner, 2013), de Alemania (Woltering, 2008; Pfingsten-Würzburg, 2011) y curiosamente, también en tres centros de larga estancia de Chicago, EE.UU. (Das, 2013).

El otro clon encontrado en la residencia fue el ST125-IVc, en el 32% de los residentes. Este clon era, globalmente, el más frecuente en cinco hospitales de Mallorca durante 2003-2004 (Alcoceba, 2007) así como el clon más frecuente en España desde 1998 (Vindel, 2006; Cuevas, 2007; Pérez-Vázquez, 2009; Vindel 2009; Gasch, 2013). El origen del clon ST125-IVc en la residencia, de forma similar al clon ST22-IVh, procedería del HUSD.

A modo de resumen, los dos clones de SARM detectados en la Residencia Bonanova en 2005-2007 son también los dos clones más frecuentes del HUSD en 2008. En los escasos trabajos que analizan la epidemiología molecular en centros de larga estancia, los clones de SARM de los residentes geriátricos son los mismos que los hospitales de la zona, tanto en el Reino Unido (Fraise, 1997; Cox, 1999; Smith, 2008b; Horner, 2013), como en Francia (Eveillard, 2008), Alemania (von Baum, 2002; Woltering, 2008; Pfingsten-Würzburg, 2011), Finlandia (Kerttula, 2005) y EE.UU. (Mody, 2008; Stone, 2012). En el estudio multicéntrico del cual forma parte este trabajo (Manzur, 2010), el 88% de los aislados de SARM detectados en los cinco centros geriátricos dependientes del Hospital de Bellvitge pertenecían al clon ST146-IV, uno de los clones de SARM dominantes en dicho hospital (Gasch, 2011).

La sensibilidad antibiótica obtenida en las cepas de SARM procedentes de los residentes geriátricos es una muestra más de la oligoclonalidad y la interrelación con el medio hospitalario, el origen último de los SARM. En conjunto, en nuestro estudio no se apreció una asociación con la multirresistencia lo que, sin duda, se debe en primera

instancia al predominio relativo de dos clones poco resistentes, probablemente facilitado por una presión antibiótica moderada en el contexto de cuidados de salud adecuados en la población a estudio.

La tobramicina fue un buen marcador para diferenciar las cepas del clon A (ST125-IVc, resistentes) de las del clon C (ST22-IVh, sensibles). Hubo un paciente en el que se le aisló una cepa del clon A (ST125-IVc) con resistencia a la mupirocina y a la gentamicina. Desconocemos si había recibido tratamiento descolonizante con mupirocina aunque, según el formulario rellenado, no tenía antecedentes de SARM previo. Se ha descrito diversos plásmidos del clon ST125-MRSA-IVc que producen resistencia de alto nivel a la mupirocina y a la gentamicina ([Daskalaki, 2009](#); [Pérez-Roth, 2013](#)).

Riesgo de infección en los pacientes colonizados

Del grupo de los 38 residentes inicialmente colonizados por SARM, tres de ellos (dos portadores nasales de SARM y el tercero únicamente colonizado en la herida) desarrollaron una infección de herida por este microorganismo durante los primeros 8 meses. No se detectó ninguna infección por SARM entre los 8 y 18 meses. De los 36 residentes del grupo control, solamente uno desarrolló una infección de herida (úlceras de pie diabético) a los 13 meses. Es decir, la incidencia de infecciones por SARM en estos 18 meses ha sido baja, siendo todas las infecciones detectadas de herida/úlceras. Salvando la limitación del bajo número de casos de infección, ésta ha sido más frecuente en el grupo de residentes portadores (n=3) que en el grupo control no colonizado al inicio (n=1), lo que es coherente con el hecho de que la colonización previa asintomática por SARM es un factor de riesgo de infección ([Muder, 1991](#); [Stone, 2012](#)). Así, nuestros datos muestran que los residentes geriátricos, mientras estén residiendo en el centro geriátrico, no tienen un riesgo importante de desarrollar una infección grave por SARM.

Los estudios publicados indican que, si bien la colonización por SARM es relativamente frecuente en los residentes geriátricos, la tasa de infección es baja, tratándose en su mayoría de infecciones de herida/úlceras que no requieren ingreso hospitalario ([Bradley, 1999](#)). Así por ejemplo, en seis estudios recogidos en residencias geriátricas de EE.UU. con más de 1.000 camas en total y durante un período de tiempo superior a 10 años, solamente se documentaron 100 infecciones por SARM (más de la mitad de piel y tejidos blandos) y 5 muertes relacionadas

(Bradley, 1999; McNeil, 2002). En otro trabajo más reciente, únicamente el 1,2% de los residentes portadores nasales de SARM de tres residencias de veteranos de EE.UU. desarrollaron una infección por esta bacteria multirresistente a los 6 meses, mientras que, no se detectó ninguna infección por SARM en los residentes no portadores de SARM (Stone, 2012). Esta situación contrasta con lo que ocurre en los hospitales de agudos, en donde se calcula que un 20-30% de los pacientes ingresados colonizados desarrollarán una infección nosocomial por SARM (Huang, 2003; Davis, 2004).

En el estudio multicéntrico en el que participamos, con los datos globales de los nueve centros geriátricos de Barcelona y Sabadell, además del nuestro, 10 de 178 residentes inicialmente colonizados por SARM (4,6%) y 4 de 196 residentes no portadores (2,1%) desarrollaron una infección por SARM a lo largo de los 18 meses del estudio. De estos 14 episodios infecciosos, diez fueron infecciones de piel y partes blandas, dos infecciones respiratorias, una infección del tracto urinario y una otitis externa. Cuatro de estos 14 infectados murieron durante el período del estudio, pero esta mortalidad no fue atribuible a la infección por el SARM (Manzur, 2012).

En residentes que ya están colonizados por SARM, la comorbilidad es un predictor más importante de la infección por SARM que la edad *per se* (McNeil, 2002), especialmente la diabetes mellitus o enfermedad vascular periférica (Terpenning, 1994). En nuestro trabajo, de los tres residentes previamente colonizados que desarrollaron una infección, dos de ellos tenían EPOC (con un consumo frecuente de antibióticos) y el tercero una demencia avanzada. El residente del grupo control con una infección de herida a los 13 meses tenía diabetes y enfermedad vascular.

Dinámica poblacional de la colonización por SARM

Los clones de SARM que adquirieron los residentes del grupo control de nuestro trabajo durante el estudio longitudinal de 18 meses fueron los mismos que ya se detectaron en octubre de 2005 durante el estudio basal (ST22-IVh y ST125-IVc). Ello indica que, si bien el origen último de estos dos clones de SARM radicaba en el hospital de referencia, una vez introducidos en la residencia y adaptados a ese ambiente, la transmisión era básicamente intrainstitucional.

Diversos trabajos muestran conclusiones similares. Un estudio francés estimó que el 69% de los residentes geriátricos adquirieron su SARM durante la estancia en el centro (Talon, 2001). En un estudio irlandés, 34 de 689 residentes inicialmente no colonizados por SARM, se convirtieron en portadores de SARM a los 6 meses; de los

cuales 26 (76,5%) no ingresaron en ningún hospital, con lo que la transmisión había tenido lugar en la misma residencia geriátrica (O'Sullivan, 2000b). En un estudio similar de EE.UU., 25 de 254 (10%) residentes no colonizados inicialmente por SARM se colonizaron a los 5 meses, 13 de los cuales compartían habitación con un residente colonizado (Stone, 2012). En otro estudio norteamericano, el 62% de los residentes adquirieron el SARM en el mismo centro (Fisch, 2012).

La transmisión habitualmente se produce por contacto directo entre residentes, aunque también se han descrito brotes originados por la colonización de SARM en las manos de algún cuidador sanitario (McNeil, 2002). La contaminación del ambiente (como la habitación del paciente) probablemente juega un papel muy escaso en la diseminación de SARM en las residencias geriátricas. Sin embargo, un estudio norteamericano mostró que el 16% (78/500) de los objetos recogidos en diez residencias fueron positivos para SARM (Murphy, 2012a). No obstante, la medida más importante en controlar la diseminación de SARM es el lavado de manos, especialmente de los trabajadores sanitarios que están en contacto con los residentes colonizados (McNeil, 2002).

En nuestro estudio parece observarse una tendencia al aumento en la prevalencia de portadores de SARM en la residencia en el último control aunque, para confirmarlo, se tendría que recoger un exudado nasal a la mayoría de los 552 residentes que habitan en el centro (como hicimos en el estudio inicial). De cualquier forma, estos datos alertan sobre un riesgo potencial, de ahí la conveniencia de continuar con la vigilancia y con el mantenimiento de los elevados estándares en los cuidados geriátricos.

En cuanto a la duración de la colonización nasal por SARM, es variable entre los diferentes estudios (McNeil, 2002). Uno de ellos, realizado en un centro de veteranos estadounidense, estimó que los pacientes ancianos, una vez colonizados, son portadores de la misma cepa de SARM de 3 meses a 3 años (Bradley, 1991). En una reciente revisión, la mediana del aclaramiento de la colonización por SARM fue de 88 semanas (Shenoy, 2014).

En la literatura se han descrito clásicamente tres patrones distintos de colonización nasal por *S. aureus*: portadores persistentes (20%), intermitentes (30%) y no portadores (50%). Se sabe que los portadores persistentes tienen una mayor carga bacteriana, están colonizados en múltiples localizaciones anatómicas y pueden jugar un mayor papel en la transmisión que los portadores intermitentes (Wertheim, 2005). En nuestro estudio, siguiendo los criterios más estrictos de persistencia del CDC

(crecimiento de SARM en todos los cultivos nasales recogidos; [Stone, 2012](#)), el 30% de los residentes colonizados por SARM fueron portadores nasales persistentes y el 70% restante portadores intermitentes. El número limitado de escobillones recogidos (un máximo de cuatro exudados nasales en 18 meses) junto con una carga bacteriana baja que podrían presentar algunos residentes podrían haber producido resultados falsamente negativos con errores en la clasificación del estado de colonización nasal. Es posible que si hubiéramos utilizado un caldo de enriquecimiento (como el BHI salado), la proporción de portadores persistentes podría haber aumentado.

La clasificación para la persistencia de SARM y el diseño de los estudios es muy variable en los diferentes trabajos, con lo que es difícil la comparación entre sí. Un trabajo realizado en 65 centros de larga estancia de Leeds, Reino Unido, recogió un exudado nasal anual durante cuatro años (2006-2009) a 2.492 residentes. De ellos, un 36% fueron positivos para SARM en una sola muestra, un 21% en dos muestras, un 14% en tres y sólo un 3% fueron positivas en las cuatro muestras recogidas en dicho período. Los autores concluían que existía una amplia tasa de portadores transitorios de SARM entre los residentes ([Horner, 2013](#)). En un estudio realizado en un centro de veteranos de Pennsylvania, EE.UU., en los que se les recogió un exudado nasal mensual o bimensual durante 3 años, el 24,8% (32/129) de los portadores nasales de SARM fueron persistentes ([Muder, 1991](#)). En otro trabajo similar en tres residencias de veteranos norteamericanas de Georgia y Alabama a los que se les recogió un frotis nasal mensual durante seis meses, este porcentaje de persistencia nasal alcanzó el 34% (83/242) ([Stone, 2012](#)).

La adquisición de otra cepa distinta de SARM en portadores nasales ocurre con una baja frecuencia, si bien se ha constatado en algunos estudios ([Bradley, 1991](#); [Mody, 2006](#); [Horner, 2013](#)). En el estudio de Horner *et al*, de los 166 residentes con más de un cultivo positivo para SARM, un 46% tenían pulsotipos de ECP idénticos, un 43% tenían pulsotipos diferentes pero relacionados y un 11% tenían cepas diferentes ([Horner, 2013](#)). Otro trabajo mostró que en 4% de los residentes de un centro de veteranos de EE.UU. estaban colonizados en sus fosas nasales por dos tipos distintos de cepas de SARM ([Stone, 2008](#)).

Parece ser que la cepa de *S. aureus* inicial que está colonizando las fosas nasales impediría la adquisición de nuevas cepas por interferencia en el nicho ecológico. Además, en los pocos casos en los que sí se ha producido un cambio de clon, la nueva cepa suele estar colonizando de forma transitoria, coexistiendo con la cepa de SARM inicial ([Mody, 2006](#)). Esto es lo que ha pasado con las cepas de SARM

aisladas en la Residencia Bonanova. La mayoría de los residentes colonizados por SARM continuaban bien siendo portadores de la misma cepa de SARM, o bien, desaparecía esta colonización. Sólo cuatro residentes, inicialmente colonizados por el clon ST22-IVh, adquirieron una nueva cepa del clon ST125-IVc.

Se podría especular que este clon A2 (ST125-IVc) pudiera tener una mayor producción de alguna adhesina o algún otro factor de virulencia que facilitaría la adherencia a la mucosa nasal, inhibiendo a otras cepas de *S. aureus* que estaban colonizando previamente. En dos trabajos españoles, todos los aislados estudiados del clon ST125-IV poseían los genes de las adhesinas *fnbA* (*fibrinogen-binding protein A*), *fnbB* (*fibrinogen-binding protein B*), *clfA* (*clumping factor A*), *clfB* (*clumping factor B*) e *icaA* (*intracellular adhesin A*) (Gómez, 2009; Menegotto, 2012a). Respecto a los aislados del clon ST22-IV, si bien poseen también el gen *icaA* (Moore, 2002), presentan una delección de 2.268 pb en la proteína de unión a la fibronectina (FnBP), debido a una recombinación homóloga de la región C-terminal de *fnbA* y la región N-terminal de *fnbB*. Las consecuencias de esta delección son desconocidas (Holden, 2013).

6.3 Resistencia a la linezolida en estafilococos

Emergencia de la resistencia a la linezolida

La linezolida fue la primera oxazolidinona aprobada para el tratamiento de la neumonía y de las infecciones de piel y partes blandas por *S. aureus* (Shaw, 2011). Se aprobó en EE.UU. en abril del año 2000 (Barrett, 2000), en el Reino Unido en 2001 (Bouza, 2001), mientras que, en el resto de países de la Unión Europea su aprobación ocurrió en 2002 (Carmona, 2003).

Antes de su comercialización, nunca se encontraron aislados de cocos grampositivos resistentes a la linezolida en pacientes no tratados con este antimicrobiano y, además, la resistencia por mutación espontánea era difícil de seleccionar *in vitro* (Zurenko, 1996). No obstante, la resistencia a este compuesto ya se observó por primera vez en cepas de *Enterococcus faecium* aisladas de dos pacientes que habían recibido tratamiento con linezolida para uso compasivo, antes de su comercialización (Zurenko, 1999).

Respecto a los estafilococos, en el año 2001 se describió el primer caso de una cepa de SARM resistente a la linezolida. Se aisló en un líquido peritoneal de un paciente sometido a diálisis peritoneal en la ciudad de Boston, EE.UU, que había sido tratado previamente con linezolida durante 4 semanas. Todos los aislados resistentes a la linezolida detectados en este paciente tenían la mutación G2576T en el gen ARNr 23S (Tsiodras, 2001). El primer ECN resistente a la linezolida se trataba de una cepa de *S. epidermidis* detectada en EE.UU. en 2002, con la misma mutación (Mutnick, 2003).

Con todo, la resistencia a la linezolida en grampositivos continúa siendo infrecuente. Según los datos del Programa ZAAPS (Zyvox® Annual Appraisal of Potency and Spectrum), más del 99,9% de las cepas de *S. aureus* y el 99,1% de los ECN en Europa fueron sensibles a la linezolida en 2012 (Mendes, 2014).

En cuanto a España, la resistencia de los estafilococos a la linezolida es rara, siendo más alta en los aislados de los pacientes ingresados en la UCI. Así, el estudio ENVIN-HELICS (Estudio Nacional de Vigilancia de Infección Nosocomial en Servicios de Medicina Intensiva) mostró un incremento en la tasa de resistencia a la linezolida en cepas de *S. epidermidis*, aisladas de bacteriemias primarias y asociadas a catéter, pasando de un 4% en 2007 a un 24% en 2010, estabilizándose en los años sucesivos

en torno al 18% ([ENVIN-HELICS](#)). Esta mayor prevalencia de cepas de ECN resistentes a la linezolidina en pacientes de la UCI estaría relacionada a un mayor consumo de linezolidina y a una mayor duración del tratamiento con este antimicrobiano. Se han comunicado brotes de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* y *S. hominis* resistentes a la linezolidina en pacientes ingresados en UCI en Madrid en 2005-2009 ([Rodríguez-Aranda, 2009](#); [Morales, 2010](#); [Sánchez García, 2010](#); [Baos, 2013](#); [Quiles-Melero, 2013](#)), en Santiago de Compostela durante 2006-2007 ([Treviño, 2009](#)), en Granada en 2007-2008 ([Sorlozano, 2010](#)) y en Zaragoza durante 2008-2011 ([Seral, 2011](#); [Lozano, 2013a](#)).

Resistencia a la linezolidina en *S. hominis*

El primer aislado de estafilococo resistente a la linezolidina detectado en Mallorca ocurrió en marzo de 2008. Se trataba de una cepa de *S. hominis* subsp. *hominis* procedente de una paciente ingresada en la UCI del HSSL, que inició tratamiento con linezolidina 16 días antes del aislamiento de la cepa resistente. El segundo aislado del HSSL se observó en mayo 2008, en otra paciente de la misma UCI tratada con linezolidina. Sin embargo, en agosto del 2008, a pesar de las medidas de control implantadas (aislamiento de los pacientes infectados y administración de un tratamiento antibiótico efectivo), se estableció en la UCI del HSSL una situación endémica, que persiste actualmente. Además, en enero de 2009, se detectó en el HSSL el primer paciente infectado por *S. hominis* resistente a la linezolidina que estaba ingresado fuera de la UCI. Respecto al HUSD, los primeros aislados de estafilococos resistentes a la linezolidina detectados fueron también dos cepas de *S. hominis* de dos pacientes ingresados en UCI en noviembre del 2008.

En este trabajo, se estudiaron los primeros catorce aislados resistentes a la linezolidina de *S. hominis* detectados en los dos hospitales. En la mayoría de los pacientes, este microorganismo se aisló solamente en un vial de hemocultivo de un total de cuatro, por lo que podría considerarse como un contaminante de los hemocultivos. De modo similar, en otros brotes publicados, los estafilococos resistentes a la linezolidina frecuentemente se aislaron en un solo frasco de hemocultivo ([Potoski, 2006](#); [Mulanovich, 2010](#); [Sorlozano, 2010](#)). Sin embargo, en algunos casos detectamos *S. hominis* resistente a la linezolidina en líquidos corporales, aspirados bronquiales, o simultáneamente en catéter y hemocultivos. Una paciente falleció a causa de una posible endocarditis asociada al cable de marcapasos. Por lo tanto, no se trata de un problema banal, sino que justifica una vigilancia activa continua.

Llama poderosamente la atención la asociación, en nuestro caso, de la resistencia a la linezolidina con la especie *S. hominis*. La explicación para esta asociación no es conocida. *Staphylococcus hominis* es, tras *S. epidermidis*, la segunda especie de estafilococos más frecuentemente detectada en la mayoría de los hospitales, como muestran dos estudios multicéntricos españoles (Cuevas, 2008; Picazo, 2010). Esta especie de estafilococo es un comensal residente de la piel humana con baja virulencia (Queck, 2008; Zhang, 2013). No obstante, en ocasiones se ha implicado a *S. hominis* en infecciones de marcapasos (Sunbul, 2006), en bacteriemias (Ruhe, 2004) y en sepsis de neonatos (Chaves, 2005).

También hay que señalar que algunos de los pacientes infectados tuvieron, además, una colonización axilar e inguinal por la misma cepa resistente, pero no colonización nasal. Ello está en concordancia con el trabajo de Kloos, en el que se encontró un predominio de cepas de *S. hominis* en axilas, brazos y piernas, mientras que su aislamiento en las fosas nasales era infrecuente (Kloos, 1975).

En cuanto al mecanismo de resistencia, encontramos la mutación G2576T en el gen ARNr 23S en las cinco cepas de *S. hominis* resistentes a la linezolidina secuenciadas. La aparición de la resistencia a la linezolidina mediante este mecanismo se desarrolla por un proceso en dos pasos. Inicialmente tiene lugar una mutación en la posición T2576 de una de las copias del gen ARNr 23S (los estafilococos poseen cinco o seis copias de este gen) (Klappenbach, 2001). A continuación, se produce una recombinación intracromosómica (conversión de genes), con lo que esta mutación se distribuye al resto de las copias confiriendo la resistencia a la linezolidina (Woodford, 2009). Varios estudios han mostrado que a medida que aumenta el número de alelos del gen ARNr 23S con la mutación G2576T, se incrementa proporcionalmente los valores de la CMI para la linezolidina (Zhu, 2007). Asimismo, existe una correlación entre el número de copias con la mutación G2576T y la duración del tratamiento con este antimicrobiano (Wilson, 2003).

Los mecanismos de resistencia a la linezolidina en *S. hominis* se caracterizaron por primera vez en los aislados del brote de Granada (Sorlozano, 2010). Ese trabajo describió la presencia de dos «nuevas mutaciones» simultáneamente en aislados de *S. hominis* resistentes a la linezolidina: C2190T y G2603T. Sin embargo, no se usó la numeración de *E. coli* para nombrar las mutaciones, sino la de la cepa de *S. aureus* X68425 (disponible en: www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/X68425). De hecho, la mutación G2603T descrita en dicho artículo corresponde realmente a la clásica G2576T, como encontramos en nuestro estudio. Además, en el estudio de Granada no secuenciaron

aislados de *S. hominis* sensibles a la linezolidina, con lo que la mutación C2190T que encontraron en los aislados resistentes (C2163T con la numeración de *E. coli*) es de hecho un polimorfismo de la especie *S. hominis*, también presente uniformemente en los aislados sensibles a la linezolidina de esta especie.

La mutación G2576T en aislados de *S. hominis* resistentes a la linezolidina también se ha descrito en pacientes ingresados durante 2008-2009 en la UCI de dos hospitales de Sicilia ([Bongiorno, 2010](#)), en pacientes ingresados en 2005-2009 en la UCI del Hospital La Paz de Madrid ([Quiles-Melero, 2013](#)), en pacientes ingresados en 2009 en la UCI de un hospital de Vicenza, norte de Italia ([Mazzariol, 2012](#)) y en pacientes ingresados en 2010-2011 en la UCI de un hospital de Sao-Paulo, Brasil ([de Almeida, 2013](#)).

Ninguno de nuestros aislados de *S. hominis* resistentes a la linezolidina poseía el gen *cfr*. Ello es coherente con la sensibilidad al cloranfenicol que presentaban todas las cepas, que además, en su gran mayoría, manifestaban una sensibilidad intermedia a la clindamicina; mientras que, en caso de poseer el gen *cfr*, hubieran sido resistentes a estos dos antibióticos ([Long, 2006](#)). Con todo, se han descrito aislados de estafilococos que poseían ambos mecanismos de resistencia ([Baos, 2013](#); [Chen, 2013](#); [Quiles-Melero, 2013](#)).

Dos aspectos adicionales no quedan claros en nuestro brote. Uno de ellos es la diseminación de la cepa desde la UCI del HSSL a la UCI del HUSD. En 2008, no se produjo ninguna transferencia de pacientes entre las UCI de ambos hospitales y tampoco hubo ningún traslado de instrumental entre ellas. No obstante, dos enfermeras estaban trabajando en las dos UCI durante el mismo período. Sin embargo, lamentablemente no se pudo realizar un estudio de colonización del personal sanitario, por lo que nos movemos en el terreno de la hipótesis.

De modo similar, se desconocen los factores responsables de la persistencia de la cepa en la UCI del HSSL, produciendo 1-2 infecciones cada mes. La cepa podría transmitirse de paciente a paciente a través de las manos del personal sanitario colonizado ([Milisavljevic, 2005](#); [Squeri, 2012](#)), o bien, podría haber un reservorio en el ambiente de la UCI ([Squeri, 2012](#)). En un brote irlandés de *S. epidermidis* resistente a la linezolidina, los autores encontraron la misma cepa resistente en los alrededores de los pacientes colonizados y en un ordenador usado por el personal de la UCI ([Kelly, 2008](#)). Asimismo, en el brote de SARM portador del gen *cfr* de un hospital de Madrid, se detectó la cepa de SARM resistente a la linezolidina en un conector de catéteres intravenosos ([Sánchez García, 2010](#)).

Una larga duración del tratamiento con linezolid, una dosificación insuficiente y la administración repetida de linezolid son factores de riesgo para desarrollar resistencia a este antimicrobiano (Yoshida, 2009). Con todo, la resistencia a la linezolid también se ha observado en diversas ocasiones en pacientes sin exposición a este antimicrobiano (Potoski, 2006; Kelly, 2008; Rodríguez-Aranda, 2009; Treviño, 2009; Sorlozano, 2010; Seral, 2011; Lozano, 2013a). En nuestra serie, si bien la mayoría de los pacientes infectados (12 de 15 episodios infecciosos, el 80,0%) habían recibido ciclos de linezolid antes de la detección del aislado resistente, hubo 3 pacientes (20,0%) a los que no se les administró este compuesto, lo que indica que la transmisión cruzada entre pacientes es también un factor epidemiológico real.

Respecto a la resistencia a los glucopéptidos, todos los aislados de *S. hominis* resistentes a la linezolid fueron también resistentes a la teicoplanina y tuvieron por E-test® una CMI a la vancomicina de 4,0 µg/mL. Este valor de la CMI (4,0 µg/mL) es el límite superior del rango de sensibilidad a la vancomicina según el CLSI y el EUCAST para los ECN (CLSI, 2009; CLSI, 2012; EUCAST, 2012). Sin embargo, utilizando los puntos de corte del EUCAST en 2010 (que no hacía distinción entre *S. aureus* y ECN), estas cepas de *S. hominis* serían también resistentes a la vancomicina (EUCAST, 2010). Este perfil de resistencia a la teicoplanina está también presente en aislados resistentes a la linezolid de *S. epidermidis* (Potoski, 2006; Bongiorno, 2010), *S. haemolyticus* (Rodríguez-Aranda, 2009) y *S. hominis* (Sorlozano, 2009; Bongiorno, 2010), todos ellos con la mutación G2576T. La relación entre la mutación G2576T en el gen ARNr 23S y la resistencia a la teicoplanina es desconocida. Es sabido que la resistencia a los glucopéptidos en *Staphylococcus* spp. es multifactorial, siendo el engrosamiento de la pared celular una característica común (Cui, 2005), un mecanismo de difícil relación con el responsable de la resistencia a la linezolid.

En resumen, la incidencia creciente de infecciones causadas por aislados de estafilococos multirresistentes, incluyendo resistencia a la teicoplanina y a la linezolid, es preocupante. Es crucial hacer un uso racional de la linezolid y mantener un control activo de dicha resistencia para preservar la utilidad clínica de este antimicrobiano.

Plásmidos portadores del genes *cfr*

En agosto-septiembre de 2010 se detectaron en el HUSD dos cepas de SARM y una de *S. epidermidis* resistentes a la linezolid portadoras de un plásmido con cuatro genes de resistencia antibiótica: *cfr* (resistencia a la linezolid, cloranfenicol y

clindamicina, entre otros), *tet(L)* (resistencia a la tetraciclina), *ant(4')-Ia* (resistencia a la tobramicina) y *dfrK* (resistencia a la trimetoprima).

La primera de estas dos cepas se detectó a partir de un paciente de 72 años con EPOC, portador de un *Port-a-cath*® permanente, inmunodeprimido (padecía un déficit de inmunoglobulinas debido a una inmunodeficiencia variable común, y además, recibía múltiples ciclos de tratamiento corticoideo por su EPOC). Este paciente había ingresado en múltiples ocasiones en el HUSD (32 ingresos entre 2006-2010), recibiendo en cada ingreso tratamiento antimicrobiano. Todo ello son factores de riesgo para desarrollar infecciones por SARM ([González-Castillo, 2013](#)).

Se ha sugerido que el uso clínico de ciertos antimicrobianos como la linezolida o clindamicina podrían conducir a la selección de cepas con *cfr* ([Shaw, 2011](#)). En concreto, este paciente recibió desde junio 2009 (aislamiento de SARM sensible a la eritromicina y clindamicina) hasta agosto 2009 (aislamiento de *S. hominis* sensible a la eritromicina y resistente a la clindamicina) los siguientes antibióticos: linezolida, cotrimoxazol, ciprofloxacino, imipenem, meropenem, vancomicina, tigeciclina, colistina y tobramicina inhalada. De estos antibióticos, la linezolida, cotrimoxazol, tobramicina o la tigeciclina podrían teóricamente estar relacionados con la formación del plásmido de multiresistencia.

Los dos pacientes con SARM tenían el antecedente de SARM (y de otras bacterias multiresistentes en el caso del primero), por lo que fueron aislados desde el momento de su ingreso en Neumología. Sin embargo, en algún momento debió haber algún tipo de transmisión entre ellos, rompiéndose las medidas de aislamiento. Por el contrario, no se constató ninguna relación epidemiológica entre estos dos pacientes con el otro paciente ingresado en UCI al que se le detectó, un mes más tarde, una cepa de *S. epidermidis* resistente a la linezolida en un catéter. Asimismo, se desconoce si algún personal sanitario pudiera haber compartido trabajo durante dicho período en los dos servicios, si bien, no puede descartarse por completo.

En el estudio de sensibilidad de las tres cepas, llamó la atención dos características. Una de ellas era el perfil de resistencia que presentaban respecto a la eritromicina y clindamicina (sensibles a la eritromicina pero resistentes a la clindamicina). Y la segunda era la existencia de un doble halo de inhibición para la linezolida y el cotrimoxazol, tanto con disco-placa como con E-test®. La aparición de un doble halo de inhibición con un disco o tira de E-test® de linezolida se ha descrito en otros aislados de SARM portadores del gen *cfr*. Ello se debe a la presencia de una subpoblación de células que poseen diferente grado de resistencia a la linezolida

(Arias, 2008b), de modo similar a la resistencia heterogénea a la oxacilina o a la vancomicina (Hiramatsu, 1997a) que presentan algunas cepas de SARM. Para detectar este tipo de resistencia, Arias *et al.* aconsejaban incubar el disco o la tira de E-test® de linezolid en estufa durante 48 h (Arias, 2008b), mientras que el CLSI (CLSI, 2012) y el EUCAST (EUCAST, 2012) recomiendan observar detenidamente el disco de linezolid a contraluz.

La detección del gen *cfr* en cepas clínicas de estafilococos sigue siendo infrecuente, especialmente en *S. aureus* (Ross, 2011; Flamm, 2012; Flamm, 2013a; Jones, 2014; Mendes, 2014). En nuestro país, se han publicado la detección de cepas de *S. aureus* con el gen *cfr* en hospitales de Madrid en 2007-2008 (Morales, 2010; Quiles-Melero, 2013) y en un hospital de Barcelona en 2009 (Sierra, 2013).

El gen *tet(L)* se describió inicialmente en plásmidos de diversas especies de *Bacillus* (Shishido, 1984). En estafilococos, se detectó por primera vez en un plásmido porcino de *Staphylococcus hyicus* (Schwarz, 1992). En *S. aureus*, el gen *tet(L)* es mucho menos frecuente que los genes *tet(K)* y *tet(M)* (Jones, 2006). Así, en un estudio multicéntrico europeo, entre 400 aislados de SARM resistentes a la tetraciclina recogidos entre 1997 y 1999, el gen *tet(M)* estuvo presente en el 76%, el *tet(K)* en el 73%, mientras que el *tet(L)* sólo se detectó en el 1,5% de las cepas de SARM (Schmitz, 2001). Un estudio español, realizado en 52 aislados de SARM resistentes a la tetraciclina recogidos en un hospital de Zaragoza, mostró datos similares, siendo *tet(K)* y *tet(M)* mucho más frecuentes que el *tet(L)* (Lozano, 2012a).

El gen *ant(4)-Ia* (también conocido como *aadD*) codifica una adeniltransferasa descrita por primera vez en *S. aureus* en 1976 (Le Goffic, 1976). Se encuentra frecuentemente en plásmidos pequeños multicopia, como el pUB110, que están integrados en otros plásmidos más grandes conjugativos y en el cromosoma. Esta integración del pUB110 en los plásmidos conjugativos y el cromosoma está mediada por la secuencia de inserción IS257 (Byrne, 1991). La práctica totalidad de las cepas del clon ST125-IVc poseen este gen (Pérez-Vázquez, 2009; Menegotto, 2012a; Lozano, 2013b).

El gen *dfrK* se describió por primera vez en 2005, adyacente a *tet(L)*, en un plásmido de una cepa de SARM porcina del clon ST398 (Schwarz, 2008; Kadlec, 2009a). Este gen se encuentra ampliamente diseminado entre los aislados de SARM del clon ST398, tanto en Alemania (Feßler, 2010) como en España (Lozano, 2012a), pero es excepcional en el resto de los secuenciotipos de SARM.

Se podría especular que los numerosos regímenes antibióticos administrados al paciente 1 (principalmente linezolid y cotrimoxazol) habrían favorecido el desarrollo del plásmido de multirresistencia en un aislado de estafilococo. Probablemente se habría formado primero en un aislado de ECN y, mediante conjugación, este plásmido habría pasado a un aislado de SARM del clon ST125-IVc. Ello concuerda con la detección de dos cepas de ECN (*S. hominis* y *S. epidermidis*) sensibles a la eritromicina y resistentes a la clindamicina, lo que sugiere que podrían ser portadoras del gen *cfr*. En última instancia, la linezolid administrada a este paciente en múltiples ocasiones habría favorecido la selección de esta cepa multirresistente. La **tabla 37** muestra la secuencia temporal de aislamiento de estafilococos que sugiere la verosimilitud de esta hipótesis.

Tabla 37. Cepas de estafilococos detectadas en el paciente 1.

Fecha	Tipo de muestra	Identificación	Observaciones
Junio 2009	Espuito	SARM	Eritromicina S Clindamicina S
Agosto 2009	Hemocultivo y punta catéter	<i>S. hominis</i>	Eritromicina S Clindamicina R (No congelada)
Noviembre 2009	Espuito	SARM	Eritromicina S Clindamicina R (No congelada)
Febrero 2010	Espuito	SARM	Eritromicina S Clindamicina S
Febrero 2010	Punta catéter subclavia	SARM	Eritromicina S Clindamicina S
		<i>S. epidermidis</i>	Eritromicina S Clindamicina R (No congelada)
Julio 2010	Espuito	SARM	Eritromicina S y Clindamicina R (No congelada)
Agosto 2010	Espuito	SARM	Eritromicina S Clindamicina R Linezolid R
Septiembre 2010	Espuito	SARM	Eritromicina S Clindamicina R Linezolid R

Las dos cepas de SARM de nuestro hospital portadoras del gen *cfr* eran del clon ST125-IVc, perteneciente al CC5. Llama la atención el hecho de que la mayoría de los aislados de SARM con el gen *cfr* pertenezcan a este complejo clonal, como el ST5-I de Colombia (Arias, 2008b), el ST5-II de Ohio, EE.UU. (Mendes, 2013), el ST228-I de Madrid y Barcelona (Ruiz de Gopegui, 2012; Sierra, 2013) y el ST125-IV de Madrid (Quiles-Melero, 2013). Asimismo, los primeros aislados de SARM detectados a partir de 1960 (el clon Arcaico y el clon Ibérico) también pertenecían al CC5. Ello sugiere la facilidad de dicho complejo clonal para adquirir ciertos elementos genéticos móviles.

Nuestro trabajo muestra dos cepas de SARM del mismo clon, una de ellas sensible y la otra resistente a la linezolid, detectadas en el mismo paciente tras haber recibido tratamiento con linezolid y otros antimicrobianos. De modo similar, en un paciente ingresado en un hospital madrileño se aisló una cepa de SARM sensible a la linezolid y otra de idéntico clon resistente a este compuesto portadora de *cfr*, separadas por un intervalo de 32 días, tras habersele administrado linezolid seguida de clindamicina (Pérez-Jorge, 2012).

En cuanto a la conjugación, inicialmente se publicó que el plásmido pSCFS3, portador del gen *cfr*, no era conjugativo (Kehrenberg, 2009). Sin embargo, unos meses más tarde, Shore y colaboradores consiguieron la conjugación del plásmido pSCFS7, también con el gen *cfr* (Shore, 2010a). Nosotros, para realizar el experimento de conjugación, adaptamos el protocolo descrito por Shore, utilizando la cepa de *S. aureus* ATCC® 29213 resistente a la rifampicina como receptora. Inicialmente, usamos placas de agar BHI con rifampicina y cloranfenicol a una concentración de 30 µg/mL de cloranfenicol, sin obtener ninguna colonia transconjugante. Posteriormente, bajamos la concentración del cloranfenicol a la mitad (15 µg/mL), logrando obtener una única colonia transconjugante. Ello probablemente se debía a que el plásmido pSCFS7 poseía dos genes de resistencia al cloranfenicol (*cfr* y *fexA*), mientras que, nuestro plásmido únicamente contenía el gen *cfr*. Quizás bajando todavía más la concentración de cloranfenicol habríamos obtenido más colonias transconjugantes. Con posterioridad a nuestro trabajo, se han detectado otros plásmidos conjugativos portadores del gen *cfr*, tanto en SARM (Quiles-Melero, 2013) como en *S. epidermidis* (Lozano, 2012b).

En el estudio de sensibilidad realizado en el derivado transconjugativo, la CMI a la tigeciclina se encontraba un poco elevada en el transconjugante en comparación con la cepa receptora. Ello podría indicar que el gen *tet(L)*, que codifica una α -hélice

transmembrana (bomba de expulsión activa) (Kadlec, 2012), ejercería cierto efecto sobre la tigeciclina. Las CMI's a la linezolid, cotrimoxazol y tigeciclina eran algo más bajas en el derivado transconjugativo que en la cepa donante, como también ocurrió para la linezolid y cloranfenicol en los experimentos de conjugación de Shore y de Lozano (Shore, 2010a; Lozano, 2012b). La explicación de ello es desconocida.

La amplificación por PCR para los genes de resistencia *cfr*, *tet(L)*, *ant(4')-la* [*aadD*] y *dfrK* fueron positivas en el derivado transconjugante, indicando que todos estos genes están dentro del mismo plásmido conjugativo y que dicho plásmido era capaz de transferirse a otras cepas de estafilococos. El grupo de Schwarz caracterizó un plásmido en *S. epidermidis* con los genes *tet(L)* y *ant(4')-la* adyacentes (Schwarz, 1996), otro plásmido en una cepa de SARM ST398 con los genes *tet(L)* y *dfrK* adyacentes (Kadlec, 2009a), y otro plásmido en un SARM ST398 con los genes *ant(4')-la*, *tet(L)* y *dfrK* adyacentes (Kadlec, 2009b). Asimismo, se han encontrado en China diversos plásmidos veterinarios que compartían los genes *cfr* y *ant(4')-la* en diversas especies de ECN, *Jeotgalicoccus pinnipedialis* y *Macrococcus caseolyticus* (Wang, 2012b; He, 2014). Sin embargo hasta la fecha, para nuestro conocimiento, no se ha encontrado ningún plásmido que posea el gen *cfr* junto el gen *tet(L)* o el gen *dfrK*. Por tanto, el plásmido pERGB es el primer plásmido descrito y único con estos cuatro genes de resistencia.

El tamaño aproximado del plásmido pERGB, determinado mediante el análisis de los fragmentos de restricción por *EcoRI*, fue de 50 kb. Este tamaño es similar al de otros plásmidos portadores del gen *cfr* como el pSE1243 y el pSA737 (39,3 kb) (Mendes, 2013), el pSCFS6 (43 kb) (Kehrenberg, 2007), el pSCFS7 (45 kb) (Shore, 2010a), el plásmido del aislado C2826 (45 kb) (Lozano, 2012b) y el plásmido del aislado 4303A (66 kb) (Mendes, 2010).

En el análisis del fragmento secuenciado del pERGB, llama la atención la elevada similitud existente entre fragmentos del pERGB con partes de otros plásmidos detectados tanto en cepas clínicas como también en cepas de diferentes especies animales. Ello indica la elevada interrelación existente entre aislados de *Staphylococcus* spp. humanos y veterinarios, como se ha descrito ampliamente para el clon de SARM ST398 entre los cerdos y sus cuidadores y matarifes (van den Broek, 2009; Feßler, 2010; Lozano, 2011a); así como la necesidad de extender la vigilancia de la resistencia antibiótica estafilocócica más allá del ámbito exclusivamente humano.

La primera parte del fragmento secuenciado del pERGB contiene la IS21-558 junto con el gen *cfr* y una nueva estructura, compuesta por un gen *res* y por un gen

tnp. Curiosamente, la secuencia de nucleótidos de esta región es idéntica a la de tres plásmidos veterinarios detectados con posterioridad en China: el pJP1 de *J. pinnipedialis* aislado en 2010 en cerdos (Wang, 2012b), el pJP1-like de *S. lentus* aislado en 2011 en pollos (He, 2014) y el pJP2 de *Staphylococcus rostri* aislado en 2011 en un pato (He, 2014).

La segunda parte del fragmento secuenciado del pERGB contiene el gen *repU* truncado y los genes de resistencia *ant(4')-Ia*, *tet(L)* y *dfrK*. Es muy similar a dos plásmidos detectados en Alemania, el pKKS825 encontrado en 2004 en una cepa de SARM porcino (Schwarz, 2008; Kadlec, 2009b) y el pSWS47 en *S. epidermidis* procedente de dos gatos y en un empleado de su clínica veterinaria (Weiß, 2014).

La estructura mosaico del pERGB sugiere que éste se habría desarrollado a partir de fragmentos de diversos plásmidos y transposones. El pERGB, como muchos otros plásmidos con *cfr*, contiene la secuencia de inserción IS21-558 situada justo antes del *cfr*, mientras que los tres genes de resistencia *ant(4')-Ia*, *tet(L)* y *dfrK* se encuentran flanqueados a cada lado por una copia de la IS431, divergentemente orientadas, que es muy similar a la IS257. Las secuencias de inserción IS257 y IS431 median la integración de pequeños plásmidos en otros plásmidos de mayor tamaño, pudiendo interrumpir un gen *rep* (Werckenthin, 1996), como sucede en el pERGB.

Curiosamente, todos los plásmidos analizados que poseen la IS21-558 y el *cfr*, con la única excepción del pERGB, contienen también el gen *fexA*, codificante de una bomba de expulsión de cloranfenicol (Kehrenberg, 2007; Shen, 2013; He, 2014). Ello indica que, en todos estos plásmidos, la IS21-558 y el gen *cfr* se encontrarían integrados en el transposón Tn558, mientras que, en el pERGB, estos elementos no se habrían integrado en dicho transposón.

La coexistencia en este plásmido del *cfr* con otros tres genes adicionales de resistencia haría posible la persistencia y co-selección del gen *cfr* bajo una presión selectiva impuesta por el uso de agentes antimicrobianos diferentes a la linezolidina y clindamicina (que en el caso de este plásmido serían la tetraciclina, tobramicina y el cotrimoxazol).

En resumen, nosotros hemos descrito un nuevo plásmido (denominado pERGB) que combina varios determinantes de resistencia antimicrobiana relevantes y que es capaz de transferirse a otros estafilococos mediante conjugación. Es importante prevenir la diseminación de este elemento multirresistente.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

1. Dos de los tres clones mayoritarios de SARM del HUSD durante el período 1999-2004 (los clones ST125-MRSA-IVc y ST228-MRSA-I) eran también los predominantes en muchos hospitales españoles, constatando la oligoclonalidad del SARM.
2. Por el contrario, el otro clon mayoritario de nuestro hospital (el ST22-MRSA-IVh, EMRSA-15) era prácticamente inexistente en el territorio peninsular español durante dicho período, aunque muy frecuente en otros países como el Reino Unido. Por tanto, el origen de este clon en Mallorca pudiera estar relacionado con el turismo británico en la isla.
3. Los tres clones mayoritarios del HUSD durante 2003-2004 fueron también los predominantes en los otros hospitales públicos de Mallorca, mostrando la importancia de la transmisión interhospitalaria.
4. A partir de 2007, de modo similar a la mayoría de hospitales españoles, se ha constatado en Mallorca la aparición del SARM comunitario. En 2008, el 7% de las cepas de SARM de los pacientes atendidos en el HUSD poseían los genes codificantes de la LPV. En todos los casos se trataron de infecciones de piel y partes blandas.
5. La práctica totalidad de las cepas de SARM productoras de LPV, al igual que sucede en el resto de España, pertenecían a los clones ST8-IVc (*USA300-like*) y ST8-IVa (*USA300*).
6. La prevalencia de portadores de SARM en exudados nasales de los residentes de un centro geriátrico de Mallorca fue del 8,0%, similar a la de otros estudios europeos, aunque menor que la descrita para otros centros asistenciales españoles.
7. La colonización por SARM en los residentes geriátricos fue generalmente transitoria, sin requerir intervenciones para su control.

8. Los factores de riesgo asociados con la colonización nasal de SARM en los residentes geriátricos fueron el tratamiento antibiótico en el último mes, el ingreso hospitalario previo, el presentar EPOC, y el antecedente de enfermedad vascular, enfermedad renal o neoplasia.
9. La mayoría de los residentes geriátricos colonizados por SARM no desarrollaron una infección subsiguiente por esta bacteria multirresistente. En los pocos casos en los que se constató una infección, se trataba de infecciones de herida o de úlcera, lo que indica que la colonización por SARM es un problema clínico manejable dentro de los centros socio-sanitarios.
10. Los clones de SARM en la residencia geriátrica fueron los mismos que los de su hospital de referencia. Ello pone de manifiesto la importancia de políticas de control de la infección coordinadas entre ambos tipos de instituciones.
11. En este trabajo se ha descrito por primera vez un plásmido de multirresistencia conjugativo (pERGB) portador de cuatro genes de resistencia: *cfr*, *ant(4')-Ia*, *tet(L)* y *dfxK*, detectado en SARM y *S. epidermidis*. Los múltiples regímenes de antibióticos administrados a estos pacientes podrían haber favorecido la formación y persistencia de este plásmido de multirresistencia.
12. Todas las cepas de *S. hominis* resistentes a la linezolidina detectadas en dos hospitales de Mallorca pertenecían al mismo clon y presentaban la mutación G2576T en el gen ARNr 23S, lo cual sugiere la diseminación a través de pacientes transferidos entre los dos centros hospitalarios.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abraham EP, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*. 1940; 146: 837.

Aires de Sousa M, Sanches IS, Ferro ML, Vaz MJ, Saraiva Z, Tendeiro T, Serra J, de Lencastre H. Intercontinental spread of a multidrug-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone. *J Clin Microbiol*. 1998; 36: 2590-2596.

Aires-de-Sousa M, Conceição T, Simas C, de Lencastre H. Comparison of genetic backgrounds of methicillin-resistant and –susceptible *Staphylococcus aureus* isolates from Portuguese hospitals and the community. *J Clin Microbiol*. 2005; 43: 5150-5157.

Aires-de-Sousa M, Correia B, de Lencastre H; Multilaboratory Project Collaborators. Changing patterns in frequency of recovery of five methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Portuguese hospitals: surveillance over a 16-year period. *J Clin Microbiol*. 2008; 46: 2912-2917.

Albrecht N, Jatzwauk L, Slickers P, Ehricht R, Monecke S. Clonal replacement of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in a German university hospital over a period of eleven years. *PLoS One*. 2011; 6: e28189.

Albur MS, Bowker K, Weir I, MacGowan A. Factors influencing the clinical outcome of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012; 31: 295-301.

Alcoceba E, Mena A, Pérez MC, Ruiz de Gopegui E, Padilla E, Gil J, Ramírez A, Gallegos MC, Serra A, Pérez JL, Oliver A. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Majorcan hospitals: high prevalence of the epidemic clone EMRSA-15. *Clin Microbiol Infect*. 2007; 13: 599-605.

Alm RA, McLaughlin RE, Kos VN, Sader HS, Iaconis JP, Lahiri SD. Analysis of *Staphylococcus aureus* clinical isolates with reduced susceptibility to ceftaroline: an epidemiological and structural perspective. *J Antimicrob Chemother.* 2014; 69: 2065-2075.

Álvarez CA, Barrientes OJ, Leal AL, Contreras GA, Barrero L, Rincón S, Díaz L, Vanegas N, Arias CA. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Colombia. *Emerg Infect Dis.* 2006; 12: 2000-2001.

Álvarez-Lerma F, Palomar M, Olaechea P, Otal JJ, Insausti J, Cerdá E; Grupo de Estudio de Vigilancia de Infección Nosocomial en UCI. Estudio nacional de vigilancia de infección nosocomial en Unidades de Cuidados Intensivos. Informe evolutivo de los años 2003-2005. *Med Intensiva.* 2007; 31: 6-17.

Amorim ML, Faria NA, Oliveira DC, Vasconcelos C, Cabeda JC, Mendes AC, Calado E, Castro AP, Ramos MH, Amorim JM, de Lencastre H. Changes in the clonal nature and antibiotic resistance profiles of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with spread of the EMRSA-15 clone in a tertiary care Portuguese hospital. *J Clin Microbiol.* 2007; 45: 2881-2888.

Aparicio P, Richardson J, Martin S, Vindel A, Marples RR, Cookson BD. An epidemic methicillin-resistant strain of *Staphylococcus aureus* in Spain. *Epidemiol Infect.* 1992; 108: 287-298.

Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton JW, Leid JG, Powers ME, Shirtliff ME. *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence.* 2011; 2: 445-459.

Arias CA, Rincón S, Chowdhury S, Martínez E, Coronell W, Reyes J, Nallapareddy SR, Murray BE. MRSA USA300 clone and VREF--a U.S.-Colombian connection? *N Engl J Med.* 2008a; 359: 2177-2179.

Arias CA, Vallejo M, Reyes J, Panesso D, Moreno J, Castañeda E, Villegas MV, Murray BE, Quinn JP. Clinical and microbiological aspects of linezolid resistance mediated by the *cfr* gene encoding a 23S rRNA methyltransferase. *J Clin Microbiol.* 2008b; 46: 892-896.

Ayliffe GA, Brightwell KM, Collins BJ, Lowbury EJ, Goonatilake PC, Etheridge RA. Surveys of hospital infection in the Birmingham region. I. Effect of age, sex, length of stay and antibiotic use on nasal carriage of tetracycline-resistant *Staphylococcus aureus* and on post-operative wound infection. *J Hyg (Lond).* 1977; 79: 299-314.

Babouee B, Frei R, Schultheiss E, Widmer AF, Goldenberger D. 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.* 2011; 49: 1549-1555.

Baldan R, Tassan Din C, Semeraro G, Costa C, Cichero P, Scarpellini P, Moro M, Cirillo DM. Severe community-onset infections in healthy individuals caused by community-acquired MRSA in an Italian teaching hospital, 2006-2008. *J Hosp Infect.* 2009; 72: 271-273.

Baos E, Candel FJ, Merino P, Pena I, Picazo JJ. Characterization and monitoring of linezolid-resistant clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* in an intensive care unit 4 years after an outbreak of infection by *cfr*-mediated linezolid-resistant *Staphylococcus aureus*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013; 76: 325-329.

Barber M, Rozwadowska-Dowzenko M. Infection by penicillin-resistant staphylococci. *Lancet* 1948; 2: 641-644.

Barber M. Methicillin-resistant staphylococci. *J Clin Pathol* 1961; 14: 385-393.

Barr B, Wilcox MH, Brady A, Parnell P, Darby B, Tompkins D. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization among older residents of care homes in the United Kingdom. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2007; 28: 853-859.

Barrett FF, McGehee RF Jr, Finland M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at Boston City Hospital. Bacteriologic and epidemiologic observations. N Engl J Med. 1968; 279: 441-448.

Barrett JF. Linezolid Pharmacia Corp. Curr Opin Investig Drugs. 2000; 1: 181-187.

Bastos MC, Murphy E. Transposon Tn554 encodes three products required for transposition. EMBO J. 1988; 7: 2935-2941.

Becker K, Von Eiff C. *Staphylococcus, Micrococcus*, and other catalase-positive cocci. En Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW (ed.). Manual of Clinical Microbiology. 10^a ed. Washington, DC: ASM Press, 2011; 308-330.

Begier EM, Frenette K, Barrett NL, Mshar P, Petit S, Boxrud DJ, Watkins-Colwell K, Wheeler S, Cebelinski EA, Glennen A, Nguyen D, Hadler JL; Connecticut Bioterrorism Field Epidemiology Response Team. A high-morbidity outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among players on a college football team, facilitated by cosmetic body shaving and turf burns. Clin Infect Dis. 2004; 39: 1446-1453.

Berg T, Firth N, Apisiridej S, Hettiaratchi A, Leelaporn A, Skurray RA. Complete nucleotide sequence of pSK41: evolution of staphylococcal conjugative multiresistance plasmids. J Bacteriol. 1998; 180: 4350-4359.

Besier S, Ludwig A, Zander J, Brade V, Wichelhaus TA. Linezolid resistance in *Staphylococcus aureus*: gene dosage effect, stability, fitness costs, and cross-resistances. Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52: 1570-1572.

Biedenbach DJ, Farrell DJ, Mendes RE, Ross JE, Jones RN. Stability of linezolid activity in an era of mobile oxazolidinone resistance determinants: results from the 2009 Zyvox® Annual Appraisal of Potency and Spectrum program. Diagn Microbiol Infect Dis. 2010; 68: 459-467.

Bisognano C, Kelley WL, Estoppey T, Francois P, Schrenzel J, Li D, Lew DP, Hooper DC, Cheung AL, Vaudaux P. A RecA-LexA-dependent pathway mediates ciprofloxacin-induced fibronectin binding in *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem*. 2004; 279: 9064-9071.

Blanco R, Tristán A, Ezpeleta G, Larsen AR, Bes M, Etienne J, Cisterna R, Laurent F. Molecular epidemiology of Pantón-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus* in Spain: emergence of the USA300 clone in an autochthonous population. *J Clin Microbiol*. 2011; 49: 433-436.

Bocchini CE, Hulten KG, Mason EO Jr, Gonzalez BE, Hammerman WA, Kaplan SL. Pantón-Valentine leukocidin genes are associated with enhanced inflammatory response and local disease in acute hematogenous *Staphylococcus aureus* osteomyelitis in children. *Pediatrics*. 2006; 117: 433-440.

Bondi A Jr, Dietz C. Bacterial penicillinase; production, nature, and significance. *J Bacteriol*. 1946; 51: 125.

Bongiorno D, Campanile F, Mongelli G, Baldi MT, Provenzani R, Reali S, Lo Russo C, Santagati M, Stefani S. DNA methylase modifications and other linezolid resistance mutations in coagulase-negative staphylococci in Italy. *J Antimicrob Chemother*. 2010; 65: 2336-2340.

Bouza E, Martínez-Beltrán J, y Grupo de Trabajo para el Estudio de Estafilococos. Estudio multicéntrico sobre la prevalencia de estafilococos en España. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1988; 6: 68-79.

Bouza E, Muñoz P. Linezolid: pharmacokinetic characteristics and clinical studies. *Clin Microbiol Infect*. 2001; 7 (Suppl 4): 75-82.

Boyle-Vavra S, Daum RS. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Pantón-Valentine leukocidin. *Lab Invest*. 2007; 87: 3-9.

Bradley SF, Terpenning MS, Ramsey MA, Zarins LT, Jorgensen KA, Sottile WS, Schaberg DR, Kauffman CA. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: colonization and infection in a long-term care facility. *Ann Intern Med.* 1991; 115: 417-422.

Bradley SF. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: long-term care concerns. *Am J Med.* 1999; 106: 2S-10S.

Bradley SF. *Staphylococcus aureus* infections and antibiotic resistance in older adults. *Clin Infect Dis.* 2002; 34: 211-216.

Brakstad OG, Aasbakk K, Maeland JA. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* gene. *J Clin Microbiol.* 1992; 30: 1654-1660.

Broseta A, Chaves F, Rojo P, Otero JR. 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.* 2006; 24: 31-35.

Bulger RJ. A methicillin-resistant strain of *Staphylococcus aureus*. Clinical and laboratory experience. *Ann Intern Med.* 1967; 67: 81-89.

Bullock WO, Fernández JM, Short, JM. XL-1 Blue: a high-efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with β -galactosidase selection. *BioTechniques* 1987; 5: 376-378.

Byrne ME, Gillespie MT, Skurray RA. 4',4'' adenylyltransferase activity on conjugative plasmids isolated from *Staphylococcus aureus* is encoded on an integrated copy of pUB110. *Plasmid.* 1991; 25: 70-75.

Campanile F, Bongiorno D, Borbone S, Stefani S. Hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (HA-MRSA) in Italy. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2009; 8: 22.

Cañas-Pedrosa AM, Vindel A, Artiles F, Colino E, Lafarga B. Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of Panton-Valentine leukocidin-positive community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from Gran Canaria (Canary Islands, Spain). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012; 74: 432-434.

Carmona PM, Romá E, Monte E, García J, Gobernado M. Papel de linezolid en terapéutica antimicrobiana. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2003; 21: 30-41.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Four pediatric deaths from community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*--Minnesota and North Dakota, 1997-1999. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1999; 48: 707-710.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin or soft tissue infections in a state prison--Mississippi, 2000. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2001; 50: 919-922.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections among competitive sports participants--Colorado, Indiana, Pennsylvania, and Los Angeles County, 2000-2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2003a; 52: 793-795.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in correctional facilities---Georgia, California, and Texas, 2001-2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2003b; 52: 992-996.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). CDC reminds clinical laboratories and healthcare infection preventionists of their role in the search and containment of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA). 2010. http://www.cdc.gov/HAI/settings/lab/vrsa_lab_search_containment.html. Último acceso: 22/08/2012.

Cercenado E, Sánchez-Carrillo C, Alcalá L, Bouza E. Current status of resistance of *Staphylococcus* in Spain. 4th National Study (1996). Work Group on the Study of *Staphylococcus*. Rev Clin Esp. 1997; 197 (Suppl 2): 12-18.

Cercenado E, Cuevas O, Marín M, Bouza E, Trincado P, Boquete T, Padilla B, Vindel A. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Madrid, Spain: transcontinental importation and polyclonal emergence of Panton-Valentine leukocidin-positive isolates. Diagn Microbiol Infect Dis. 2008; 61: 143-149.

Cercenado E. Actualización en las resistencias de las bacterias grampositivas. Med Clin (Barc). 2010a; 135 (Suppl 3): 10-15.

Cercenado E, Marín M, Insa R, Bouza E. Emerging linezolid resistance: dissemination of the *cfr* gene among *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* and inability of the Etest method for detection. Abstract C2-1490. 50th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Boston, MA. USA. American Society for Microbiology. 2010b.

Chambers HF, Hartman BJ, Tomasz A. Increased amounts of a novel penicillin-binding protein in a strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* exposed to nafcillin. Clin Invest. 1985; 76: 325-331.

Chambers HF. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? Emerg Infect Dis. 2001; 7: 178-182.

Chang S, Sievert DM, Hageman JC, Boulton ML, Tenover FC, Downes FP, Shah S, Rudrik JT, Pupp GR, Brown WJ, Cardo D, Fridkin SK; Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Investigative Team. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. N Engl J Med. 2003; 348: 1342-1347.

Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie CR. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J Chronic Dis.* 1987; 40: 373-383.

Chaves F, García-Alvarez M, Sanz F, Alba C, Otero JR. Nosocomial spread of a *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* strain causing sepsis in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 4877-4879.

Chen FJ, Lauderdale TL, Huang IW, Lo HJ, Lai JF, Wang HY, Shiau YR, Chen PC, Ito T, Hiramatsu K. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Taiwan. *Emerg Infect Dis.* 2005; 11: 1760-1763.

Chen HJ, Hung WC, Tseng SP, Tsai JC, Hsueh PR, Teng LJ. Fusidic acid resistance determinants in *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54: 4985-4991.

Chen H, Wu W, Ni M, Liu Y, Zhang J, Xia F, He W, Wang Q, Wang Z, Cao B, Wang H. Linezolid-resistant clinical isolates of enterococci and *Staphylococcus cohnii* from a multicentre study in China: molecular epidemiology and resistance mechanisms. *Int J Antimicrob Agents.* 2013; 42: 317-321.

Chung M, de Lencastre H, Matthews P, Tomasz A, Adamsson I, Aires de Sousa M, Camou T, Cocuzza C, Corso A, Couto I, Dominguez A, Gniadkowski M, Goering R, Gomes A, Kikuchi K, Marchese A, Mato R, Melter O, Oliveira D, Palacio R, Sá-Leão R, Santos Sanches I, Song JH, Tassios PT, Villari P; Multilaboratory Project Collaborators. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis: comparison of results obtained in a multilaboratory effort using identical protocols and MRSA strains. *Microb Drug Resist.* 2000; 6: 189-198.

Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*; Nineteenth informational supplement. M100-S19. CLSI, Wayne, PA: CLSI document; 2009.

Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*; Twenty-second informational supplement. M100-S22. CLSI, Wayne, PA: CLSI document; 2012.

Cobos-Trigueros N, Pitart C, Marco F, Martínez JA, Almela M, López J, Ortega M, Soriano A, Mensa J. Epidemiología y forma de presentación clínica de las infecciones originadas por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina productor de leucocidina de Pantón-Valentine. *Rev Esp Quimioter.* 2010; 23: 93-99.

Collignon P, Gosbell I, Vickery A, Nimmo G, Stylianopoulos T, Gottlieb T. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Australia. Australian Group on Antimicrobial Resistance. *Lancet.* 1998; 352: 145-146.

Communicable Disease Report (CDR). Epidemic methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. (Annon). *Communicable Dis Rep. CDR Weekly* 1996; 6: 197.

Cookson BD, Robinson DA, Monk AB, Murchan S, Deplano A, de Ryck R, Struelens MJ, Scheel C, Fussing V, Salmenlinna S, Vuopio-Varkila J, Cuny C, Witte W, Tassios PT, Legakis NJ, van Leeuwen W, van Belkum A, Vindel A, Garaizar J, Haeggman S, Olsson-Liljequist B, Ransjö U, Müller-Premru M, Hryniewicz W, Rossney A, O'Connell B, Short BD, Thomas J, O'Hanlon S, Enright MC. Evaluation of molecular typing methods in characterizing a European collection of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains: the HARMONY collection. *J Clin Microbiol.* 2007; 45: 1830-1837.

Coombs GW, Monecke S, Pearson JC, Tan HL, Chew YK, Wilson L, Ehrlich R, O'Brien FG, Christiansen KJ. Evolution and diversity of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a geographical region. *BMC Microbiol.* 2011; 11: 215-227.

Corbella X, Domínguez MA, Pujol M, Ayats J, Sendra M, Pallarés R, Ariza J, Gudiol F. *Staphylococcus aureus* nasal carriage as a marker for subsequent staphylococcal infections in intensive care unit patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1997; 16: 351-357.

Cox RA, Bowie PE. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in nursing home residents: a prevalence study in Northamptonshire. *J Hosp Infect.* 1999; 43: 115-122.

Cribier B, Prévost G, Couppie P, Finck-Barbançon V, Grosshans E, Piémont Y. *Staphylococcus aureus* leukocidin: a new virulence factor in cutaneous infections? An epidemiological and experimental study. *Dermatology.* 1992; 185: 175-180.

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

Cuevas O, Cercenado E, Bouza E, Castellares C, Trincado P, Cabrera R, Vindel A; Spanish Group for the Study of *Staphylococcus*. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Spain: a multicentre prevalence study (2002). *Clin Microbiol Infect.* 2007; 13: 250-256.

Cuevas O, Cercenado E, Goyanes MJ, Vindel A, Trincado P, Boquete T, Marín M, Bouza E; Grupo Español para el Estudio de Estafilococo. *Staphylococcus* spp. en España: situación actual y evolución de la resistencia a antimicrobianos (1986-2006). *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2008; 26: 269-277.

Cui L, Wang Y, Li Y, He T, Schwarz S, Ding Y, Shen J, Lv Y. Cfr-mediated linezolid-resistance among methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococci* from infections of humans. *PLoS One.* 2013; 8: e57096.

da Silva Coimbra MV, Silva-Carvalho MC, Wisplinghoff H, Hall GO, Tallent S, Wallace S, Edmond MB, Figueiredo AM, Wenzel RP. Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a large geographic area of the United States. *J Hosp Infect.* 2003; 53: 103-110.

Dai L, Wu CM, Wang MG, Wang Y, Wang Y, Huang SY, Xia LN, Li BB, Shen JZ. First report of the multidrug resistance gene *cf*r and the phenicol resistance gene *fexA* in a *Bacillus* strain from swine feces. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54: 3953-3955.

Dale GE, Broger C, D'Arcy A, Hartman PG, DeHoogt R, Jolidon S, Kompis I, Labhardt AM, Langen H, Locher H, Page MG, Stüber D, Then RL, Wipf B, Oefner C. A single amino acid substitution in *Staphylococcus aureus* dihydrofolate reductase determines trimethoprim resistance. *J Mol Biol.* 1997; 266: 23-30.

Das S, Anderson CJ, Grayes A, Mendoza K, Harazin M, Schora DM, Peterson LR. Nasal Carriage of Epidemic Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* -15 (EMRSA-15) observed in three Chicago-area long term care facilities. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57: 4551–4553.

Daskalaki M, Otero JR, Chaves F. Molecular characterization of resistance to mupirocin in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in a tertiary hospital in Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2009; 63: 826-828.

Daskalaki M, Rojo P, Marin-Ferrer M, Barrios M, Otero JR, Chaves F. Panton-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus* skin and soft tissue infections among children in an emergency department in Madrid, Spain. *Clin Microbiol Infect.* 2010; 16: 74-77.

David MZ, Daum RS. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clin Microbiol Rev.* 2010; 23: 616-687.

Davis KA, Stewart JJ, Crouch HK, Florez CE, Hospenthal DR. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) nares colonization at hospital admission and its effect on subsequent MRSA infection. *Clin Infect Dis.* 2004; 39: 776-782.

de Almeida LM, de Araújo MR, Sacramento AG, Pavez M, de Souza AG, Rodrigues F, Gales AC, Lincopan N, Sampaio JL, Mamizuka EM. Linezolid resistance in Brazilian

Staphylococcus hominis strains is associated with L3 and 23S rRNA ribosomal mutations. Antimicrob Agents Chemother. 2013; 57: 4082-4083.

de Lencastre H, Tomasz A. Reassessment of the number of auxiliary genes essential for expression of high-level methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 1994; 38: 2590-2598.

de Vries LE, Christensen H, Skov RL, Aarestrup FM, Agersø Y. Diversity of the tetracycline resistance gene *tet(M)* and identification of Tn916- and Tn5801- like (Tn6014) transposons in *Staphylococcus aureus* from humans and animals. J Antimicrob Chemother. 2009; 64: 490-500.

del Giudice P, Blanc V, de Rougemont A, Bes M, Lina G, Hubiche T, Roudière L, Vandenesch F, Etienne J. Primary skin abscesses are mainly caused by Panton-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus* strains. Dermatology. 2009; 219: 299-302.

den Heijer CD, van Bijnen EM, Paget WJ, Pringle M, Goossens H, Bruggeman CA, Schellevis FG, Stobberingh EE; APRES Study Team. Prevalence and resistance of commensal *Staphylococcus aureus*, including methicillin-resistant *S. aureus*, in nine European countries: a cross-sectional study. Lancet Infect Dis. 2013; 13: 409-415.

Deurenberg RH, Stobberingh EE. The evolution of *Staphylococcus aureus*. Infect Genet Evol. 2008; 8: 747-763.

Diekema DJ, Richter SS, Heilmann KP, Dohrn CL, Riahi F, Tendolkar S, McDanel JS, Doern GV. Continued emergence of USA300 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States: results from a nationwide surveillance study. Infect Control Hosp Epidemiol. 2014; 35: 285-292.

Diep BA, Carleton HA, Chang RF, Sensabaugh GF, Perdreau-Remington F. Roles of 34 virulence genes in the evolution of hospital- and community-associated strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Infect Dis. 2006a; 193: 1495-1503.

Diep BA, Gill SR, Chang RF, Phan TH, Chen JH, Davidson MG, Lin F, Lin J, Carleton HA, Mongodin EF, Sensabaugh GF, Perdreau-Remington F. Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet. 2006b; 367: 731-739.

Diep BA, Stone GG, Basuino L, Graber CJ, Miller A, des Etages SA, Jones A, Palazzolo-Ballance AM, Perdreau-Remington F, Sensabaugh GF, DeLeo FR, Chambers HF. The arginine catabolic mobile element and staphylococcal chromosomal cassette *mec* linkage: convergence of virulence and resistance in the USA300 clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Infect Dis. 2008; 197: 1523-1530.

Diep BA, Chan L, Tattevin P, Kajikawa O, Martin TR, Basuino L, Mai TT, Marbach H, Braughton KR, Whitney AR, Gardner DJ, Fan X, Tseng CW, Liu GY, Badiou C, Etienne J, Lina G, Matthay MA, DeLeo FR, Chambers HF. Polymorphonuclear leukocytes mediate *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin-induced lung inflammation and injury. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010; 107: 5587-5592.

Domínguez MA, de Lencastre H, Liñares J, Tomasz A. Spread and maintenance of a dominant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone during an outbreak of MRSA disease in a Spanish hospital. J Clin Microbiol. 1994; 32: 2081-2087.

ECDC. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Interactive database. Disponible en: http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial_resistance/database/Pages/map_reports.aspx. Consultada el: 13/07/2014.

Ellington MJ, Yearwood L, Ganner M, East C, Kearns AM. Distribution of the ACME-*arcA* gene among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from England and Wales. J Antimicrob Chemother. 2008; 61: 73-77.

Ellington MJ, Hope R, Livermore DM, Kearns AM, Henderson K, Cookson BD, Pearson A, Johnson AP. Decline of EMRSA-16 amongst methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

causing bacteraemias in the UK between 2001 and 2007. *J Antimicrob Chemother.* 2010; 65: 446-448.

Emori TG, Banerjee SN, Culver DH, Gaynes RP, Horan TC, Edwards JR, Jarvis WR, Tolson JS, Henderson TS, Martone WJ, et al. Nosocomial infections in elderly patients in the United States, 1986-1990. National Nosocomial Infections Surveillance System. *Am J Med.* 1991; 91: 289S-293S.

Ender M, McCallum N, Adhikari R, Berger-Bächli B. Fitness cost of SCC*mec* and methicillin resistance levels in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48: 2295-2297.

Endimiani A, Blackford M, Dasenbrook EC, Reed MD, Bajaksouszian S, Hujer AM, Rudin SD, Hujer KM, Perreten V, Rice LB, Jacobs MR, Konstan MW, Bonomo RA. Emergence of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* after prolonged treatment of cystic fibrosis patients in Cleveland, Ohio. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55: 1684-1692.

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

Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99: 7687-7692.

Enright MC. The population structure of *Staphylococcus aureus*. En: Lindsay JA (ed.). *Staphylococcus*, Molecular genetics. Norfolk: Caister Academic Press, 2008; 29-43.

ENVIN-HELICS. Estudio nacional de vigilancia de infección nosocomial en servicios de Medicina Intensiva. Sociedad Española de Medicina Intensiva Crítica y Unidades Coronarias (SEMICYUC). Grupo de trabajo de Enfermedades Infecciosas. Disponible en: <http://hws.vhebron.net/envin-helics/>.

EPINE. Estudio de Prevalencia de las Infecciones Nosocomiales en España. Informe 2011. 22º Estudio. Sociedad Española de Medicina Preventiva, Salud Pública e Higiene.

EPINE-EPPS. Estudio de Prevalencia de las Infecciones Nosocomiales en España. Informe 2013. Sociedad Española de Medicina Preventiva, Salud Pública e Higiene.

Espadinha D, Faria NA, Miragaia M, Lito LM, Melo-Cristino J, de Lencastre H; Médicos Sentinela Network. Extensive dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) between the hospital and the community in a country with a high prevalence of nosocomial MRSA. PLoS One. 2013; 8: e59960.

Espejo E, Pons J, Riera A, Boada N, Simó M, Rueda J, Mérida D, Soler A, García Restoy E, Morera MA, Bella F. Prevalencia y características de la colonización por *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (SARM) en residencias de larga estancia. XII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Valencia, 10-13 de mayo de 2006. Comunicación 621.

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Versión 1.1. Abril 2010.

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Versión 2.0. Enero 2012.

Euzéby JP. List of prokaryotic names with standing in nomenclature. Disponible en: <http://www.bacterio.net/s/staphylococcus.html> (consultada el 18/04/2012).

Eveillard M, Leroy C, Teissiere F, Lancien E, Branger C, de Lassence A, Joly-Guillou ML, Brun P. Impact of selective screening in the emergency department on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* control programmes. J Hosp Infect. 2006a; 63: 380-384.

Eveillard M, Mortier E, Lancien E, Lescure FX, Schmit JL, Barnaud G, Lenfant N, Vinceneux P, Joly-Guillou ML. Consideration of age at admission for selective screening to identify methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriers to control dissemination in a medical ward. *Am J Infect Control.* 2006b; 34: 108-113.

Eveillard M, Charru P, Rufat P, Hippeaux MC, Lancien E, Benselama F, Branger C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage in a long-term care facility: hypothesis about selection and transmission. *Age Ageing.* 2008; 37: 294-299.

Faria NA, Oliveira DC, Westh H, Monnet DL, Larsen AR, Skov R, de Lencastre H. Epidemiology of emerging methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Denmark: a nationwide study in a country with low prevalence of MRSA infection. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 1836-1842.

Faria NA, Miragaia M, de Lencastre H; Multi Laboratory Project Collaborators. Massive dissemination of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in bloodstream infections in a high MRSA prevalence country: establishment and diversification of EMRSA-15. *Microb Drug Resist.* 2013; 19: 483-490.

Feßler A, Scott C, Kadlec K, Ehricht R, Monecke S, Schwarz S. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from cases of bovine mastitis. *J Antimicrob Chemother.* 2010; 65: 619-625.

Fisch J, Lansing B, Wang L, Symons K, Cherian K, McNamara S, Mody L. New acquisition of antibiotic-resistant organisms in skilled nursing facilities. *J Clin Microbiol.* 2012; 50: 1698-1703.

Flamm RK, Farrell DJ, Mendes RE, Ross JE, Sader HS, Jones RN. ZAAPS Program results for 2010: an activity and spectrum analysis of linezolid using clinical isolates from 75 medical centres in 24 countries. *J Chemother.* 2012; 24: 328-337.

Flamm RK, Mendes RE, Ross JE, Sader HS, Jones RN. An international activity and spectrum analysis of linezolid: ZAAPS Program results for 2011. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013a; 76: 206-213.

Flamm RK, Mendes RE, Ross JE, Sader HS, Jones RN. Linezolid surveillance results for the United States: LEADER surveillance program 2011. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013b; 57: 1077-1081.

Forbes BA, Sahn DF, Weissfeld, AS. Bacterial genetics, metabolism, and structure. En: Bailey & Scott's. *Diagnostic Microbiology.* 12^a ed. Philadelphia: Mosby Elsevier, 2007; 10-12.

Fossum AE, Bukholm G. Increased incidence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST80, novel ST125 and SCC_{medV} in the south-eastern part of Norway during a 12-year period. *Clin Microbiol Infect.* 2006; 12: 627-633.

Fournier B. Global regulators of *Staphylococcus aureus* virulence genes. En: Lindsay JA (ed.). *Staphylococcus*, Molecular genetics. Norfolk: Caister Academic Press, 2008; 131-137.

Fraise AP, Mitchell K, O'Brien SJ, Oldfield K, Wise R. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in nursing homes in a major UK city: an anonymized point prevalence survey. *Epidemiol Infect.* 1997; 118: 1-5.

Frénay HM, Theelen JP, Schouls LM, Vandenbroucke-Grauls CM, Verhoef J, van Leeuwen WJ, Mooi FR. Discrimination of epidemic and non-epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains on the basis of protein A gene polymorphism. *J Clin Microbiol.* 1994; 32: 846-847.

Friedman ND, Kaye KS, Stout JE, McGarry SA, Trivette SL, Briggs JP, Lamm W, Clark C, MacFarquhar J, Walton AL, Reller LB, Sexton DJ. Health care--associated bloodstream infections in adults: a reason to change the accepted definition of community-acquired infections. *Ann Intern Med.* 2002; 137: 791-797.

Garazi M, Edwards B, Caccavale D, Auerbach C, Wolf-Klein G. Nursing homes as reservoirs of MRSA: myth or reality? *J Am Med Dir Assoc.* 2009; 10: 414-418.

García-Álvarez L, Holden MT, Lindsay H, Webb CR, Brown DF, Curran MD, Walpole E, Brooks K, Pickard DJ, Teale C, Parkhill J, Bentley SD, Edwards GF, Girvan EK, Kearns AM, Pichon B, Hill RL, Larsen AR, Skov RL, Peacock SJ, Maskell DJ, Holmes MA. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *Lancet Infect Dis.* 2011; 11: 595-603.

García-Castellanos R, Mallorquí-Fernández G, Marrero A, Potempa J, Coll M, Gomis-Rüth FX. On the transcriptional regulation of methicillin resistance: Mecl repressor in complex with its operator. *J Biol Chem.* 2004; 279: 17888-17896.

García-García JA, Santos-Morano J, Castro C, Bayoll-Serradilla E, Martín-Ponce ML, Vergara-López S, Martín-Rodríguez LM, Mateos-Gómez A, de la Cueva J, Martín-Mazuelos E, Gómez-Mateos JM, Corzo-Delgado JE. Prevalencia y factores asociados a la colonización por *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina en centros de larga estancia en el sur de España. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011; 29: 405-410.

García-Garrote F, Cercenado E, Marín M, Bal M, Trincado P, Corredoira J, Ballesteros C, Pita J, Alonso P, Vindel A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the *mecC* gene: emergence in Spain and report of a fatal case of bacteraemia. *J Antimicrob Chemother.* 2014; 69: 45-50.

Gasch O, Ayats J, Angeles Dominguez M, Tubau F, Liñares J, Peña C, Grau I, Pallarés R, Gudiol F, Ariza J, Pujol M. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) bloodstream infection: secular trends over 19 years at a university hospital. *Medicine (Baltimore).* 2011; 90: 319-327.

Gasch O, Camoez M, Dominguez MA, Padilla B, Pintado V, Almirante B, Molina J, Lopez-Medrano F, Ruiz de Gopegui E, Martinez JA, Bereciartua E, Rodriguez-Lopez F, Fernandez-Mazarrasa C, Goenaga MA, Benito N, Rodriguez-Baño J, Espejo E, Pujol M; REIPI/GEIH Study Groups. Predictive factors for mortality in patients with methicillin-resistant

Staphylococcus aureus bloodstream infection: impact on outcome of host, microorganism and therapy. Clin Microbiol Infect. 2013; 19: 1049-1057.

Gasink LB, Lautenbach E. Prevention and treatment of health care-acquired infections. Med Clin North Am. 2008; 92: 295-313, viii.

Genestier AL, Michallet MC, Prévost G, Bellot G, Chalabreysse L, Peyrol S, Thivolet F, Etienne J, Lina G, Vallette FM, Vandenesch F, Genestier L. *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of human neutrophils. J Clin Invest. 2005; 115: 3117-3127.

Giannella M, Pinilla B, Capdevila JA, Martínez Alarcón J, Muñoz P, López Álvarez J, Bouza E; Estudio de Neumonía En Medicina Interna study Group from the Sociedad Española de Medicina Interna. Pneumonia treated in the internal medicine department: focus on healthcare-associated pneumonia. Clin Microbiol Infect. 2012; 18: 786-794.

Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, Fournet JC, Lina G, Bes M, Vandenesch F, Piémont Y, Brousse N, Floret D, Etienne J. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. Lancet. 2002; 359: 753-759.

Girou E, Pujade G, Legrand P, Cizeau F, Brun-Buisson C. Selective screening of carriers for control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in high-risk hospital areas with a high level of endemic MRSA. Clin Infect Dis. 1998; 27: 543-550.

Goering RV, McDougal LK, Fosheim GE, Bonnstetter KK, Wolter DJ, Tenover FC. Epidemiologic distribution of the arginine catabolic mobile element among selected methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates. J Clin Microbiol. 2007; 45: 1981-1984.

Gómez Rodríguez N, Ibáñez Ruán J, González M, Pintado A, Penelas Cortés Y. Artritis sépticas periféricas en adultos: Estudio epidemiológico en un área sanitaria gallega. *An Med Interna.* 2001; 18: 573-577.

Gómez MI, Lee A, Reddy B, Muir A, Soong G, Pitt A, Cheung A, Prince A. *Staphylococcus aureus* protein A induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNFR1. *Nat Med.* 2004; 10: 842-848.

Gómez C, Daskalaki M, Otero JR, Chaves F. Factores de virulencia asociados a la cepa epidémica de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) ST125-SCCmec tipo IV. XIII Reunión de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Sevilla, 3-5 de junio de 2009. Comunicación nº 221.

Gómez González C, Larrosa N, Ruiz de Gopegui E, Fernández A, Palacios A, Moraga F, Dueñas J, Suárez F, Barrios M, Chaves F, y Grupo de Infección por SARM en Pediatría. Infecciones por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina asociado a la comunidad en población pediátrica: estudio multicéntrico. XIV Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Barcelona, 19-22 de mayo de 2010. Comunicación 479.

Gómez-Sanz E, Torres C, Lozano C, Zarazaga M. High diversity of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* lineages and toxigenic traits in healthy pet-owning household members. Underestimating normal household contact? *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2013; 36: 83-94.

González-Castillo J, Cenci C, Rodriguez-Adrada E, Candel FJ, de la Torre-Misiego F, Fernández C, Martín-Sánchez FJ. *Staphylococcus aureus* infections and factors associated with resistance to methicillin in a hospital emergency department. *Rev Esp Quimioter.* 2013; 26: 337-345.

Gorwitz RJ, Kruszon-Moran D, McAllister SK, McQuillan G, McDougal LK, Fosheim GE, Jensen BJ, Killgore G, Tenover FC, Kuehnert MJ. Changes in the prevalence of nasal

colonization with *Staphylococcus aureus* in the United States, 2001-2004. *J Infect Dis.* 2008; 197: 1226-1234.

Gosbell IB, Mercer JL, Neville SA, Chant KG, Munro R. Community-acquired, non-multiresistant oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* (NORSA) in South Western Sydney. *Pathology.* 2001; 33: 206-210.

Gosbell IB, Barbagiannakos T, Neville SA, Mercer JL, Vickery AM, O'Brien FG, Coombs GW, Malkowski MJ, Pearson JC. Non-multiresistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia in Sydney, Australia: emergence of EMRSA-15, Oceania, Queensland and Western Australian MRSA strains. *Pathology.* 2006; 38: 239-244.

Gould IM, David MZ, Esposito S, Garau J, Lina G, Mazzei T, Peters G. New insights into methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) pathogenesis, treatment and resistance. *Int J Antimicrob Agents.* 2012; 39: 96-104.

Grove TL, Benner JS, Radle MI, Ahlum JH, Landgraf BJ, Krebs C, Booker SJ. A radically different mechanism for S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *Science.* 2011; 332: 604-607.

Grundmann H, Aanensen DM, van den Wijngaard CC, Spratt BG, Harmsen D, Friedrich AW; European Staphylococcal Reference Laboratory Working Group. Geographic distribution of *Staphylococcus aureus* causing invasive infections in Europe: a molecular-epidemiological analysis. *PLoS Med.* 2010; 7: e1000215.

Guignard B, Entenza JM, Moreillon P. Beta-lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Curr Opin Pharmacol.* 2005; 5: 479-489.

He T, Wang Y, Schwarz S, Zhao Q, Shen J, Wu C. Genetic environment of the multi-resistance gene *cf* in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from chickens, ducks, and pigs in China. *Int J Med Microbiol.* 2014; 304: 257-261.

Herold BC, Immergluck LC, Maranan MC, Lauderdale DS, Gaskin RE, Boyle-Vavra S, Leitch CD, Daum RS. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children with no identified predisposing risk. *JAMA*. 1998; 279: 593-598.

Hidalgo-García FI, Galarraga-Gay MC, Gómez-Fontanil M, Sáez-Nieto JA. *Staphylococcus aureus* subespecie *aureus* catalasa negativa: un nuevo caso en España. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011; 29: 708-709.

Hill RL, Kearns AM, Nash J, North SE, Pike R, Newson T, Woodford N, Calver R, Livermore DM. Linezolid-resistant ST36 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with prolonged linezolid treatment in two paediatric cystic fibrosis patients. *J Antimicrob Chemother*. 2010; 65: 442-445.

Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, Kawasaki S, Hosoda Y, Hori S, Fukuchi Y, Kobayashi I. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet*. 1997a; 350: 1670-1673.

Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother*. 1997b; 40: 135-136.

Hirano N, Muroi T, Takahashi H, Haruki M. Site-specific recombinases as tools for heterologous gene integration. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011; 92: 227-239.

Holden MT, Feil EJ, Lindsay JA, Peacock SJ, Day NP, Enright MC, Foster TJ, Moore CE, Hurst L, Atkin R, Barron A, Bason N, Bentley SD, Chillingworth C, Chillingworth T, Churcher C, Clark L, Corton C, Cronin A, Doggett J, Dowd L, Feltwell T, Hance Z, Harris B, Hauser H, Holroyd S, Jagels K, James KD, Lennard N, Line A, Mayes R, Moule S, Mungall K, Ormond D, Quail MA, Rabinowitsch E, Rutherford K, Sanders M, Sharp S, Simmonds M, Stevens K, Whitehead S, Barrell BG, Spratt BG, Parkhill J. Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101: 9786-9791.

Holden MT, Lindsay JA. Whole genomes: sequence, microarray and systems biology. En: Lindsay JA (ed.). *Staphylococcus*, Molecular genetics. Norfolk: Caister Academic Press, 2008; 6-10.

Holden MT, Lindsay JA, Corton C, Quail MA, Cockfield JD, Pathak S, Batra R, Parkhill J, Bentley SD, Edgeworth JD. Genome sequence of a recently emerged, highly transmissible, multi-antibiotic- and antiseptic-resistant variant of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, sequence type 239 (TW). *J Bacteriol.* 2010; 192: 888-892.

Holden MT, Hsu LY, Kurt K, Weinert LA, Mather AE, Harris SR, Strommenger B, Layer F, Witte W, de Lencastre H, Skov R, Westh H, Zemlicková H, Coombs G, Kearns AM, Hill RL, Edgeworth J, Gould I, Gant V, Cooke J, Edwards GF, McAdam PR, Templeton KE, McCann A, Zhou Z, Castillo-Ramírez S, Feil EJ, Hudson LO, Enright MC, Balloux F, Aanensen DM, Spratt BG, Fitzgerald JR, Parkhill J, Achtman M, Bentley SD, Nübel U. A genomic portrait of the emergence, evolution, and global spread of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pandemic. *Genome Res.* 2013; 23: 653-664.

Holmes NE, Turnidge JD, Munckhof WJ, Robinson JO, Korman TM, O'Sullivan MV, Anderson TL, Roberts SA, Gao W, Christiansen KJ, Coombs GW, Johnson PD, Howden BP. Antibiotic choice may not explain poorer outcomes in patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia and high vancomycin minimum inhibitory concentrations. *J Infect Dis.* 2011; 204: 340-347.

Horner C, Parnell P, Hall D, Kearns A, Heritage J, Wilcox M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in elderly residents of care homes: colonization rates and molecular epidemiology. *J Hosp Infect.* 2013; 83: 212-218.

Hsu CC, Macaluso CP, Special L, Hubble RH. High rate of methicillin resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from hospitalized nursing home patients. *Arch Intern Med.* 1988; 148: 569-570.

Huang SS, Platt R. Risk of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection after previous infection or colonization. *Clin Infect Dis.* 2003; 36: 281-285.

Huijsdens XW, van Dijke BJ, Spalburg E, van Santen-Verheuve MG, Heck ME, Pluister GN, Voss A, Wannet WJ, de Neeling AJ. Community-acquired MRSA and pig-farming. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2006; 5: 26.

International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC). Classification of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*): guidelines for reporting novel SCC*mec* elements. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53: 4961-4967.

Ito T, Katayama Y, Hiramatsu K. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43: 1449-1458.

Ito T, Katayama Y, Asada K, Mori N, Tsutsumimoto K, Tiensasitorn C, Hiramatsu K. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45: 1323-1336.

Ito T, Hiramatsu K, Tomasz A, de Lencastre H, Perreten V, Holden MT, Coleman DC, Goering R, Giffard PM, Skov RL, Zhang K, Westh H, O'Brien F, Tenover FC, Oliveira DC, Boyle-Vavra S, Laurent F, Kearns AM, Kreiswirth B, Ko KS, Grundmann H, Sollid JE, John JF Jr, Daum R, Soderquist B, Buist G; International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC). Guidelines for reporting novel *mecA* gene homologues. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56: 4997-4999.

Jessen O, Rosendal K, Bülow P, Faber V, Eriksen KR. Changing staphylococci and staphylococcal infections. A ten-year study of bacteria and cases of bacteremia. *N Engl J Med.* 1969; 281: 627-635.

Jevons MP. "Celbenin"-resistant staphylococci. *BMJ* 1961; i: 124-125.

Johnson AP, Aucken HM, Cavendish S, Ganner M, Wale MC, Warner M, Livermore DM, Cookson BD; UK EARSS participants. Dominance of EMRSA-15 and -16 among MRSA causing nosocomial bacteraemia in the UK: analysis of isolates from the European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS). *J Antimicrob Chemother.* 2001; 48: 143-144.

Johnson AP, Pearson A, Duckworth G. Surveillance and epidemiology of MRSA bacteraemia in the UK. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 56: 455-462.

Johnson LB, Saeed S, Pawlak J, Manzor O, Saravolatz LD. Clinical and laboratory features of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: is it really new? *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2006; 27: 133-138.

Jones CH, Tuckman M, Howe AY, Orlowski M, Mullen S, Chan K, Bradford PA. Diagnostic PCR analysis of the occurrence of methicillin and tetracycline resistance genes among *Staphylococcus aureus* isolates from phase 3 clinical trials of tigecycline for complicated skin and skin structure infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50: 505-510.

Jones RN, Kohno S, Ono Y, Ross JE, Yanagihara K. ZAAPS International Surveillance Program (2007) for linezolid resistance: results from 5591 Gram-positive clinical isolates in 23 countries. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009a; 64: 191-201.

Jones RN, Ross JE, Bell JM, Utsuki U, Fumiaki I, Kobayashi I, Turnidge JD. Zyvox Annual Appraisal of Potency and Spectrum program: linezolid surveillance program results for 2008. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009b; 65: 404-413.

Jones RN, Flonta M, Gurler N, Cepparulo M, Mendes RE, Castanheira M. Resistance surveillance program report for selected European nations (2011). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2014; 78: 429-436.

Kadlec K, Schwarz S. Identification of a novel trimethoprim resistance gene, *dfrK*, in a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 strain and its physical linkage to the tetracycline resistance gene *tet(L)*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009a; 53: 776-778.

Kadlec K, Schwarz S. Novel ABC transporter gene, *vga(C)*, located on a multiresistance plasmid from a porcine methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 strain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009b; 53: 3589-3591.

Kadlec K, Fessler AT, Hauschild T, Schwarz S. Novel and uncommon antimicrobial resistance genes in livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect.* 2012; 18: 745-755.

Kaminska KH, Purta E, Hansen LH, Bujnicki JM, Vester B, Long KS. Insights into the structure, function and evolution of the radical-SAM 23S rRNA methyltransferase Cfr that confers antibiotic resistance in bacteria. *Nucleic Acids Res.* 2010; 38: 1652-1663.

Kaneko J, Kimura T, Kawakami Y, Tomita T, Kamio Y. Panton-valentine leukocidin genes in a phage-like particle isolated from mitomycin C-treated *Staphylococcus aureus* V8 (ATCC 49775). *Biosci Biotechnol Biochem* 1997; 61: 1960-1962.

Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44: 1549-1555.

Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. Genetic organization of the chromosome region surrounding *mecA* in clinical staphylococcal strains: role of IS431-mediated *mecl* deletion in expression of resistance in *mecA*-carrying, low-level methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45: 1955-1963.

Katayama Y, Robinson DA, Enright MC, Chambers HF. Genetic background affects stability of *mecA* in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 2380-2383.

Kazakova SV, Hageman JC, Matava M, Srinivasan A, Phelan L, Garfinkel B, Boo T, McAllister S, Anderson J, Jensen B, Dodson D, Lonsway D, McDougal LK, Arduino M, Fraser VJ, Killgore G, Tenover FC, Cody S, Jernigan DB. A clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among professional football players. *N Engl J Med.* 2005; 352: 468-475.

Kehrenberg C, Ojo KK, Schwarz S. Nucleotide sequence and organization of the multiresistance plasmid pSCFS1 from *Staphylococcus sciuri*. *J Antimicrob Chemother.* 2004a; 54: 936-939.

Kehrenberg C, Schwarz S. *fexA*, a novel *Staphylococcus lentus* gene encoding resistance to florfenicol and chloramphenicol. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004b; 48: 615-618.

Kehrenberg C, Schwarz S, Jacobsen L, Hansen LH, Vester B. A new mechanism for chloramphenicol, florfenicol and clindamycin resistance: methylation of 23S ribosomal RNA at A2503. *Mol Microbiol.* 2005; 57: 1064-1073.

Kehrenberg C, Schwarz S. Distribution of florfenicol resistance genes *fexA* and *cfr* among chloramphenicol-resistant *Staphylococcus* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50: 1156-1163.

Kehrenberg C, Aarestrup FM, Schwarz S. IS21-558 insertion sequences are involved in the mobility of the multiresistance gene *cfr*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51: 483-487.

Kehrenberg C, Cuny C, Strommenger B, Schwarz S, Witte W. Methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* strains of clonal lineages ST398 and ST9 from swine carry the multidrug resistance gene *cfr*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53: 779-781.

Kelly S, Collins J, Maguire M, Gowing C, Flanagan M, Donnelly M, Murphy PG. An outbreak of colonization with linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* in an intensive therapy unit. *J Antimicrob Chemother.* 2008; 61: 901-907.

Kennedy AD, DeLeo FR. Epidemiology and virulence of community-associated MRSA. Clin Microb Newsl. 2009; 31: 153-160.

Kerr S, Kerr GE, Mackintosh CA, Marples RR. A survey of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* affecting patients in England and Wales. J Hosp Infect. 1990; 16: 35-48.

Kerttula AM, Lyytikäinen O, Vuopio-Varkila J, Ibrahim S, Agthe N, Broas M, Jägerroos H, Virolainen A. Molecular epidemiology of an outbreak caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a health care ward and associated nursing home. J Clin Microbiol. 2005; 43: 6161-6163.

Kirby WM. Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant *Staphylococci*. Science. 1944; 99: 452-453.

Klappenbach JA, Saxman PR, Cole JR, Schmidt TM. rrndb: the Ribosomal RNA Operon Copy Number Database. Nucleic Acids Res. 2001; 29: 181-184.

Klevens RM, Morrison MA, Fridkin SK, Reingold A, Petit S, Gershman K, Ray S, Harrison LH, Lynfield R, Dumyati G, Townes JM, Craig AS, Fosheim G, McDougal LK, Tenover FC; Active Bacterial Core Surveillance of the Emerging Infections Program Network. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and healthcare risk factors. Emerg Infect Dis. 2006; 12: 1991-1993.

Klevens RM, Morrison MA, Nadle J, Petit S, Gershman K, Ray S, Harrison LH, Lynfield R, Dumyati G, Townes JM, Craig AS, Zell ER, Fosheim GE, McDougal LK, Carey RB, Fridkin SK; Active Bacterial Core surveillance (ABCs) MRSA Investigators. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. JAMA. 2007; 298: 1763-1771.

Kloos WE, Musselwhite MS. Distribution and persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species and other aerobic bacteria on human skin. Appl Microbiol. 1975; 30: 381-385.

Kluytmans J, Van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev.* 1997; 10: 505-520.

Knight GM, Budd EL, Lindsay JA. Large mobile genetic elements carrying resistance genes that do not confer a fitness burden in healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiology.* 2013; 159: 1661-1672.

Kobayashi N, Urasawa S, Uehara N, Watanabe N. Distribution of insertion sequence-like element IS1272 and its position relative to methicillin resistance genes in clinically important *Staphylococci*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43: 2780-2782.

Köseoğlu O, Sayın Kutlu S, Cevahir N. Prevalence and risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization among outpatients undergoing hemodialysis treatment. *Mikrobiyol Bul.* 2012; 46: 106-112.

Kreiswirth B, Kornblum J, Arbeit RD, Eisner W, Maslow JN, McGeer A, Low DE, Novick RP. Evidence for a clonal origin of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Science.* 1993; 259: 227-230.

Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, Baba T, Yuzawa H, Kobayashi I, Cui L, Oguchi A, Aoki K, Nagai Y, Lian J, Ito T, Kanamori M, Matsumaru H, Maruyama A, Murakami H, Hosoyama A, Mizutani-Ui Y, Takahashi NK, Sawano T, Inoue R, Kaito C, Sekimizu K, Hirakawa H, Kuhara S, Goto S, Yabuzaki J, Kanehisa M, Yamashita A, Oshima K, Furuya K, Yoshino C, Shiba T, Hattori M, Ogasawara N, Hayashi H, Hiramatsu K. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet.* 2001; 357: 1225-1240.

Lane DJ. 16S/23S rRNA sequencing. En: Stackebrandt E, Goodfellow M, editors. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics.* Chichester: Wiley. 1991; 115-175.

Larsen A, Stegger M, Goering R, Sorum M, Skov R. Emergence and dissemination of the methicillin resistant *Staphylococcus aureus* USA300 clone in Denmark (2000-2005). *Euro Surveill.* 2007; 12: 22-24.

Lasseter G, Charlett A, Lewis D, Donald I, Howell-Jones R, McNulty CA. *Staphylococcus aureus* carriage in care homes: identification of risk factors, including the role of dementia. *Epidemiol Infect.* 2010; 138: 686-696.

Lauderdale TL, Wang JT, Lee WS, Huang JH, McDonald LC, Huang IW, Chang SC. Carriage rates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) depend on anatomic location, the number of sites cultured, culture methods, and the distribution of clonotypes. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2010; 29: 1553-1559.

Lazarevic V, Beaume M, Corvaglia A, Hernandez D, Schrenzel J, François P. Epidemiology and virulence insights from MRSA and MSSA genome analysis. *Future Microbiol.* 2011; 6: 513-532.

Le Goffic F, Martel A, Capmau ML, Baca B, Goebel P, Chardon H, Soussy CJ, Duval J, Bouanchaud DH. New plasmid-mediated nucleotidylation of aminoglycoside antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1976; 10: 258-264.

Leach KL, Brickner SJ, Noe MC, Miller PF. Linezolid, the first oxazolidinone antibacterial agent. *Ann N Y Acad Sci.* 2011; 1222: 49-54.

Lee SM, Ender M, Adhikari R, Smith JM, Berger-Bächli B, Cook GM. Fitness cost of staphylococcal cassette chromosome *mec* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by way of continuous culture. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51: 1497-1499.

Li S, Skov RL, Han X, Larsen AR, Larsen J, Sørnum M, Wulf M, Voss A, Hiramatsu K, Ito T. Novel types of staphylococcal cassette chromosome *mec* elements identified in clonal complex 398 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55: 3046-3650.

Lim TT, Chong FN, O'Brien FG, Grubb WB. Are all community methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* related? A comparison of their *mec* regions. *Pathology*. 2003; 35: 336-343.

Lina G, Piémont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, Vandenesch F, Etienne J. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis*. 1999; 29: 1128-1132.

Lindsay JA, Moore CE, Day NP, Peacock SJ, Witney AA, Stabler RA, Husain SE, Butcher PD, Hinds J. Microarrays reveal that each of the ten dominant lineages of *Staphylococcus aureus* has a unique combination of surface-associated and regulatory genes. *J Bacteriol*. 2006; 188: 669-676.

Lindsay JA. *S. aureus* evolution: lineages and mobile genetic elements (MGEs). En: Lindsay JA (ed.). *Staphylococcus*, Molecular genetics. Norfolk: Caister Academic Press, 2008; 46-69.

Lindsay JA. *Staphylococcus aureus* genomics and the impact of horizontal gene transfer. *Int J Med Microbiol*. 2014; 304: 103-109.

Lipinska U, Hermans K, Meulemans L, Dumitrescu O, Badiou C, Duchateau L, Haesebrouck F, Etienne J, Lina G. Panton-Valentine leukocidin does play a role in the early stage of *Staphylococcus aureus* skin infections: a rabbit model. *PLoS One*. 2011; 6: e22864.

Liu GY, Essex A, Buchanan JT, Datta V, Hoffman HM, Bastian JF, Fierer J, Nizet V. *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. *J Exp Med*. 2005; 202: 209-215.

Liu L, Li Y, Zhang J, Zou W, Zhou Z, Liu J, Li X, Wang L, Chen J. Complete genome sequence of the industrial strain *Bacillus megaterium* WSH-002. *J Bacteriol*. 2011; 193: 6389-6390.

Livermore DM, James D, Reacher M, Graham C, Nichols T, Stephens P, Johnson AP, George RC. Trends in fluoroquinolone (ciprofloxacin) resistance in enterobacteriaceae from bacteremias, England and Wales, 1990-1999. *Emerg Infect Dis.* 2002; 8: 473-478.

Locke JB, Hilgers M, Shaw KJ. Mutations in ribosomal protein L3 are associated with oxazolidinone resistance in staphylococci of clinical origin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53: 5275-5278.

Locke JB, Morales G, Hilgers M, G C K, Rahawi S, Picazo JJ, Shaw KJ, Stein JL. Elevated linezolid resistance in clinical *cfr*-positive *Staphylococcus aureus* isolates is associated with co-occurring mutations in ribosomal protein L3. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54: 5352-5355.

Locke JB, Rahawi S, LaMarre J, Mankin AS, Shaw KJ. Genetic environment and stability of *cfr* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CM05. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56: 332-340.

Locke JB, Zuill DE, Scharn CR, Deane J, Sahn DF, Denys GA, Goering RV, Shaw KJ. Linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* strain 1128105, the first known clinical isolate possessing the *cfr* multidrug resistance gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58: 6592-6598.

Löffler B, Hussain M, Grundmeier M, Brück M, Holzinger D, Varga G, Roth J, Kahl BC, Proctor RA, Peters G. *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin is a very potent cytotoxic factor for human neutrophils. *PLoS Pathog.* 2010; 6: e1000715.

Long KS, Poehlsgaard J, Kehrenberg C, Schwarz S, Vester B. The Cfr rRNA methyltransferase confers resistance to phenicols, lincosamides, oxazolidinones, pleuromutilins, and streptogramin A antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50: 2500-2505.

Lowy FD. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. J Clin Invest. 2003; 111: 1265-1273.

Lozano C, Aspiroz C, Ara M, Gómez-Sanz E, Zarazaga M, Torres C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 in a farmer with skin lesions and in pigs of his farm: clonal relationship and detection of *Inu(A)* gene. Clin Microbiol Infect. 2011a; 17: 923-927.

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

Lozano C, Rezusta A, Gómez P, Gómez-Sanz E, Báez N, Martín-Saco G, Zarazaga M, Torres C. High prevalence of *spa* types associated with the clonal lineage CC398 among tetracycline-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in a Spanish hospital. J Antimicrob Chemother. 2012a; 67: 330-334.

Lozano C, Ruiz-García M, Gómez-Sanz E, López-García P, Royo-García G, Zarazaga M, Torres C. Characterization of a *cfr*-positive methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain of the lineage ST22 implicated in a life-threatening human infection. Diagn Microbiol Infect Dis. 2012b; 73: 380-382.

Lozano C, Aspiroz C, Gómez-Sanz E, Tirado G, Fortuño B, Zarazaga M, Torres C. Caracterización de cepas de *Staphylococcus epidermidis* y *S. haemolyticus* resistentes a metilicina y linezolid en un hospital español. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2013a; 31: 136-141.

Lozano C, Porres-Osante N, Crettaz J, Rojo-Bezares B, Benito D, Olarte I, Zarazaga M, Sáenz Y, Torres C. Changes in genetic lineages, resistance, and virulence in clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Spanish hospital. J Infect Chemother. 2013b; 19: 233-242.

Lyon BR, Skurray R. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetic basis. Microbiol Rev. 1987; 51: 88-134.

Mahoney FI, Barthel DW. Functional evaluation: the Barthel index. *Md State Med J.* 1965; 14: 61-65.

Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95: 3140-3145.

Malachowa N, Sabat A, Gniadkowski M, Krzyszton-Russjan J, Empel J, Miedzobrodzki J, Kosowska-Shick K, Appelbaum PC, Hryniewicz W. Comparison of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis with pulsed-field gel electrophoresis, *spa* typing, and multilocus sequence typing for clonal characterization of *Staphylococcus aureus* isolates. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 3095-3100.

Malachowa N, DeLeo FR. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cell Mol Life Sci.* 2010; 67: 3057-3071.

Mandell GL, Moorman DR. Treatment of experimental staphylococcal infections: effect of rifampin alone and in combination on development of rifampin resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 1980; 17: 658-662.

Manzur A, Vidal M, Pujol M, Cissal M, Hornero A, Masuet C, Peña C, Gudiol F, Ariza J. Predictive factors of methicillin resistance among patients with *Staphylococcus aureus* bloodstream infections at hospital admission. *J Hosp Infect.* 2007; 66: 135-141.

Manzur A, Domínguez MA, Pujol M, González MP, Limon E, Hornero A, Martín R, Gudiol F, Ariza J. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: an emerging threat in Spain. *Clin Microbiol Infect.* 2008a; 14: 377-380.

Manzur A, Gavalda L, Ruiz de Gopegui E, Mariscal D, Domínguez MA, Pérez JL, Segura F, Pujol M; Group of the Spanish Network for Research in Infectious Diseases. Prevalence of

methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and factors associated with colonization among residents in community long-term-care facilities in Spain. *Clin Microbiol Infect.* 2008b; 14: 867-872.

Manzur A, Pujol M. Impacto y control de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) en los centros de larga estancia. *Rev Esp Geriatr Gerontol.* 2008c; 43: 235-238.

Manzur A, Domínguez MA, Ruiz de Gopegui E, Mariscal D, Gavaldà L, Segura F, Pérez JL, Pujol M; Spanish Network for Research in Infectious Diseases. Natural history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonisation among residents in community long term care facilities in Spain. *J Hosp Infect.* 2010; 76: 215-219.

Manzur A, Ruiz de Gopegui E, Domínguez M, Mariscal D, Gavaldà L, Pérez JL, Segura F, Pujol M; Spanish Network for Research in Infectious Diseases. Clinical significance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in residents in community long-term-care facilities in Spain. *Epidemiol Infect.* 2012; 140: 400-406.

March A, Aschbacher R, Dhanji H, Livermore DM, Böttcher A, Sleghe F, Maggi S, Noale M, Larcher C, Woodford N. Colonization of residents and staff of a long-term-care facility and adjacent acute-care hospital geriatric unit by multiresistant bacteria. *Clin Microbiol Infect.* 2010; 16: 934-44.

March A, Aschbacher R, Pagani E, Sleghe F, Soelva G, Hopkins KL, Doumith M, Innocenti P, Burth J, Piazzani F, Woodford N. Changes in colonization of residents and staff of a long-term care facility and an adjacent acute-care hospital geriatric unit by multidrug-resistant bacteria over a four-year period. *Scand J Infect Dis.* 2014; 46: 114-122.

Marimón JM, Villar M, García-Arenzana JM, Caba Ide L, Pérez-Trallero E. Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* carrying the Pantone-Valentine leucocidin genes in northern Spain. *J Infect.* 2012; 64: 47-53.

Marples RR, Reith S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in England and Wales. Commun Dis Rep CDR Rev. 1992; 2: R25-29.

Masaki H, Watanabe H, Degawa S, Yoshimine H, Asoh N, Rikitomi N, Matsumoto K, Ahmed K, Watanabe K, Oishi K, Nagatake T. Significant reduction of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia in geriatric wards after introduction of infection control measures against nosocomial infections. Intern Med. 2001; 40: 214-220.

Mazzariol A, Kocsis E, Bragagnolo L, Pellizzer G, Rattu M, Cornaglia G. Co-infection by two linezolid-resistant coagulase-negative staphylococci with two different resistance determinants. Scand J Infect Dis. 2012; 44: 978-981.

McDougal LK, Steward CD, Killgore GE, Chaitram JM, McAllister SK, Tenover FC. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. J Clin Microbiol. 2003; 41: 5113-5120.

McDougal LK, Fosheim GE, Nicholson A, Bulens SN, Limbago BM, Shearer JE, Summers AO, Patel JB. Emergence of resistance among USA300 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates causing invasive disease in the United States. Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54: 3804-3811.

McKenzie T, Hoshino T, Tanaka T, Sueoka N. Correction. A revision of the nucleotide sequence and functional map of pUB110. Plasmid. 1987; 17: 83-85.

McNeil SA, Mody L, Bradley SF. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Management of asymptomatic colonization and outbreaks of infection in long-term care. Geriatrics. 2002; 57: 16-27.

Melter O, Aires de Sousa M, Laskafeldová K, Urbásková P, Wünschová M, de Lencastre H. Delineation of the endemic and sporadic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in a Czech hospital. Microb Drug Resist. 2004; 10: 218-223.

Mendelson G, Yearmack Y, Granot E, Ben-Israel J, Colodner R, Raz R. *Staphylococcus aureus* carrier state among elderly residents of a long-term care facility. J Am Med Dir Assoc. 2003; 4: 125-127.

Mendes RE, Deshpande LM, Castanheira M, DiPersio J, Saubolle MA, Jones RN. First report of *cfr*-mediated resistance to linezolid in human staphylococcal clinical isolates recovered in the United States. Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52: 2244-2246.

Mendes RE, Deshpande LM, Farrell DJ, Spanu T, Fadda G, Jones RN. Assessment of linezolid resistance mechanisms among *Staphylococcus epidermidis* causing bacteraemia in Rome, Italy. J Antimicrob Chemother. 2010; 65: 2329-2335.

Mendes RE, Deshpande LM, Bonilla HF, Schwarz S, Huband MD, Jones RN, Quinn JP. Dissemination of a pSCFS3-like *cfr*-carrying plasmid in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates recovered from hospitals in Ohio. Antimicrob Agents Chemother. 2013; 57: 2923-2928.

Mendes RE, Hogan PA, Streit JM, Jones RN, Flamm RK. Zyvox(R) Annual Appraisal of Potency and Spectrum (ZAAPS) Program: report of linezolid activity over 9 years (2004-12). J Antimicrob Chemother. 2014; 69: 1582-1588.

Menegotto F, González-Cabrero S, Cubero Á, Cuervo W, Muñoz M, Gutiérrez MP, Simarro M, Bratos MÁ, Orduña A. Clonal nature and diversity of resistance, toxins and adhesins genes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* collected in a Spanish hospital. Infect Genet Evol. 2012a; 12: 1751-1758.

Menegotto F, González-Cabrero S, Lorenzo B, Cubero Á, Cuervo W, Gutiérrez MP, Simarro M, Orduña A, Bratos MÁ. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Spanish hospital over a 4-year period: clonal replacement decreased antimicrobial resistance, and identification of community-acquired and livestock-associated clones. Diagn Microbiol Infect Dis. 2012b; 74: 332-337.

Mermel LA, Cartony JM, Covington P, Maxey G, Morse D. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization at different body sites: a prospective, quantitative analysis. J Clin Microbiol. 2011; 49: 1119-1121.

Messing J, Gronenborn B, Müller-Hill B, Hans Hopschneider P. Filamentous coliphage M13 as a cloning vehicle: insertion of a *Hind*II fragment of the *lac* regulatory region in M13 replicative form *in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1977; 74: 3642-3646.

Mick V, Domínguez MA, Tubau F, Liñares J, Pujol M, Martín R. Molecular characterization of resistance to rifampicin in an emerging hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone ST228, Spain. BMC Microbiol. 2010; 10: 68.

Milheiriço C, Oliveira DC, de Lencastre H. Multiplex PCR strategy for subtyping the staphylococcal cassette chromosome *mec* type IV in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: 'SCC*mec* IV multiplex'. J Antimicrob Chemother. 2007a; 60: 42-48.

Milheiriço C, Oliveira DC, de Lencastre H. Update to the multiplex PCR strategy for assignment of *mec* element types in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 2007b; 51: 3374-3377.

Milisavljevic V, Wu F, Cimmotti J, Haas J, Della-Latta P, Larson E, Saiman L. Genetic relatedness of *Staphylococcus epidermidis* from infected infants and staff in the neonatal intensive care unit. Am J Infect Control. 2005; 33: 341-347.

Mitchell JM, MacCulloch D, Morris AJ. MRSA in the community. N Z Med J. 1996; 109: 411.

Mody L, Flannery E, Bielaczyc A, Bradley SF. Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* colonization in 2 long-term care facilities. Infect Control Hosp Epidemiol. 2006; 27: 212-214.

Moet GJ, Jones RN, Biedenbach DJ, Stilwell MG, Fritsche TR. Contemporary causes of skin and soft tissue infections in North America, Latin America, and Europe: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998-2004). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 57: 7-13.

Monecke S, Jatzwauk L, Weber S, Slickers P, Ehricht R. DNA microarray-based genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from Eastern Saxony. *Clin Microbiol Infect*. 2008; 14: 534-545.

Monecke S, Ehricht R, Slickers P, Tan HL, Coombs G. The molecular epidemiology and evolution of the Panton-Valentine leukocidin-positive, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300 in Western Australia. *Clin Microbiol Infect*. 2009; 15: 770-776.

Monecke S, Stieber B, Roberts R, Akpaka PE, Slickers P, Ehricht R. Population structure of *Staphylococcus aureus* from Trinidad & Tobago. *PLoS One*. 2014; 9: e89120.

Montgomery CP, Boyle-Vavra S, Daum RS. The arginine catabolic mobile element is not associated with enhanced virulence in experimental invasive disease caused by the community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 genetic background. *Infect Immun*. 2009; 77: 2650-2656.

Moore PC, Lindsay JA. Molecular characterisation of the dominant UK methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains, EMRSA-15 and EMRSA-16. *J Med Microbiol*. 2002; 51: 516-521.

Morales G, Picazo JJ, Baos E, Candel FJ, Arribi A, Peláez B, Andrade R, de la Torre MA, Fereres J, Sánchez-García M. Resistance to linezolid is mediated by the *cfr* gene in the first report of an outbreak of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis*. 2010; 50: 821-825.

Moran GJ, Krishnadasan A, Gorwitz RJ, Fosheim GE, McDougal LK, Carey RB, Talan DA; EMERGENCY ID Net Study Group. Methicillin-resistant *S. aureus* infections among patients in the emergency department. *N Engl J Med*. 2006; 355: 666-674.

Morgan M, Evans-Williams D, Salmon R, Hosein I, Looker DN, Howard A. The population impact of MRSA in a country: the national survey of MRSA in Wales, 1997. *J Hosp Infect.* 2000; 44: 227-239.

Morosini MI, Cantón R. Tolerancia y heterorresistencia en microorganismos grampositivos. *Med Clin (Barc).* 2010; 135 (Suppl 3): 16-22.

Morrison MA, Hageman JC, Klevens RM. Case definition for community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Hosp Infect.* 2006; 62: 241.

Muder RR, Brennen C, Wagener MM, Vickers RM, Rihs JD, Hancock GA, Yee YC, Miller JM, Yu VL. Methicillin-resistant staphylococcal colonization and infection in a long-term care facility. *Ann Intern Med.* 1991; 114: 107-112.

Mulanovich VE, Huband MD, McCurdy SP, Lemmon MM, Lescoe M, Jiang Y, Rolston KV, LaSala PR. Emergence of linezolid-resistant coagulase-negative *Staphylococcus* in a cancer centre linked to increased linezolid utilization. *J Antimicrob Chemother.* 2010; 65: 2001-2004.

Mulhausen PL, Harrell LJ, Weinberger M, Kochersberger GG, Feussner JR. Contrasting methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in Veterans Affairs and community nursing homes. *Am J Med.* 1996; 100: 24-31.

Murchan S, Kaufmann ME, Deplano A, de Ryck R, Struelens M, Zinn CE, Fussing V, Salmenlinna S, Vuopio-Varkila J, El Solh N, Cuny C, Witte W, Tassios PT, Legakis N, van Leeuwen W, van Belkum A, Vindel A, Laconcha I, Garaizar J, Haeggman S, Olsson-Liljequist B, Ransjo U, Coombes G, Cookson B. Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its application for tracing the spread of related strains. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 1574-1585.

Murphy E, Lin SL, Nunez L, Andrew L, Fink PS, Dilts DA, Hoiseth SK, Jansen KU, Anderson AS. Challenges for the evaluation of *Staphylococcus aureus* protein based vaccines: monitoring antigenic diversity. Hum Vaccin. 2011; 7 (Suppl): 51-59.

Murphy CR, Eells SJ, Quan V, Kim D, Peterson E, Miller LG, Huang SS. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* burden in nursing homes associated with environmental contamination of common areas. J Am Geriatr Soc. 2012a; 60: 1012-1018.

Murphy CR, Quan V, Kim D, Peterson E, Whealon M, Tan G, Evans K, Meyers H, Cheung M, Lee BY, Mukamel DB, Huang SS. Nursing home characteristics associated with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) burden and transmission. BMC Infect Dis. 2012b; 12: 269.

Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Staphylococcus* y cocos grampositivos relacionados. En: Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA (ed.). Microbiología médica. 7ª edición. Barcelona: Elsevier Saunders, 2013; 177.

Musser JM, Kapur V. Clonal analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from intercontinental sources: association of the *mec* gene with divergent phylogenetic lineages implies dissemination by horizontal transfer and recombination. J Clin Microbiol. 1992; 30: 2058-2063.

Mutnick AH, Enne V, Jones RN. Linezolid resistance since 2001: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Ann Pharmacother. 2003; 37: 769-774.

Ng EY, Trucksis M, Hooper DC. Quinolone resistance mutations in topoisomerase IV: relationship to the *flqA* locus and genetic evidence that topoisomerase IV is the primary target and DNA gyrase is the secondary target of fluoroquinolones in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 1996; 40: 1881-1888.

Nimmo GR, Coombs GW, Pearson JC, O'Brien FG, Christiansen KJ, Turnidge JD, Gosbell IB, Collignon P, McLaws ML. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the Australian community: an evolving epidemic. *Med J Aust.* 2006; 184: 384-388.

Nimmo GR. USA300 abroad: global spread of a virulent strain of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect.* 2012; 18: 725-734.

Nissen M, Marshall H, Richmond P, Shakib S, Jiang Q, Cooper D, Rill D, Baber J, Eiden J, Gruber W, Jansen KU, Emini EA, Anderson AS, Zito ET, Girgenti D. A randomized phase I study of the safety and immunogenicity of three ascending dose levels of a 3-antigen *Staphylococcus aureus* vaccine (SA3Ag) in healthy adults. *Vaccine.* 2015; 33: 1846-1854.

Nouwen JL, Ott A, Kluytmans-Vandenberg MF, Boelens HA, Hofman A, van Belkum A, Verbrugh HA. Predicting the *Staphylococcus aureus* nasal carrier state: derivation and validation of a "culture rule". *Clin Infect Dis.* 2004; 39: 806-811.

Nouwen J, Schouten J, Schneebergen P, Snijders S, Maaskant J, Koolen M, van Belkum A, Verbrugh HA. *Staphylococcus aureus* carriage patterns and the risk of infections associated with continuous peritoneal dialysis. *J Clin Microbiol.* 2006; 44: 2233-2236.

Novick RP. Analysis by transduction of mutations affecting penicillinase formation in *Staphylococcus aureus*. *J Gen Microbiol.* 1963; 33: 121-136.

Nübel U, Dordel J, Kurt K, Strommenger B, Westh H, Shukla SK, Zemlicková H, Leblois R, Wirth T, Jombart T, Balloux F, Witte W. A timescale for evolution, population expansion, and spatial spread of an emerging clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathog.* 2010; 6: e1000855.

O'Brien L, Kerrigan SW, Kaw G, Hogan M, Penadés J, Litt D, Fitzgerald DJ, Foster TJ, Cox D. Multiple mechanisms for the activation of human platelet aggregation by *Staphylococcus aureus*: roles for the clumping factors ClfA and ClfB, the serine-aspartate repeat protein SdrE and protein A. *Mol Microbiol.* 2002; 44: 1033-1044.

Ogston A. *Micrococcus* poisoning. J Anat Physiol 1883; 17: 24-58.

Oliveira DC, de Lencastre H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 2002a; 46: 2155-2161.

Oliveira DC, Tomasz A, de Lencastre H. Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet Infect Dis. 2002b; 2: 180-189.

Olsen RH, DeBusscher G, McCombie WR. Development of broad-host-range vectors and gene banks: self-cloning of the *Pseudomonas aeruginosa* PAO chromosome. J Bacteriol. 1982; 150: 60-69.

O'Sullivan NP, Keane CT. Risk factors for colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among nursing home residents. J Hosp Infect. 2000a; 45: 206-210.

O'Sullivan NP, Keane CT. The prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among the residents of six nursing homes for the elderly. J Hosp Infect. 2000b; 45: 322-329.

Oteo J, Cruchaga S, Campos J, Sáez JA, Baquero F, y miembros españoles del Grupo del European Antimicrobial Resistance System (EARSS). Resistencia a antibióticos en *Staphylococcus aureus* aislados de sangre en 31 hospitales españoles de la Red Europea de Vigilancia de Resistencia a Antibióticos (2000). Med Clin (Barc). 2002; 119: 361-365.

Otter JA, French GL. The emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a London teaching hospital, 2000-2006. Clin Microbiol Infect. 2008; 14: 670-676.

Pang Y, Bosch T, Roberts MC. Single polymerase chain reaction for the detection of tetracycline-resistant determinants Tet K and Tet L. *Mol Cell Probes*. 1994; 8: 417-422.

Panton P, Valentine F. Staphylococcal toxins. *Lancet*. 1932; 222: 506-508.

Park C, Shin HH, Kwon EY, Choi SM, Kim SH, Park SH, Choi JH, Yoo JH, Lee DG, Shin WS. Two variants of staphylococcal cassette chromosome *mec* type IVA in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in South Korea. *J Med Microbiol*. 2009; 58: 1314-1321.

Parker MT, Jevons MP. A survey of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Postgrad Med J*. 1964; 40 (Suppl): 170-178.

Parras F, Rodríguez M, Bouza E, Muñoz P, Cercenado E, Guerrero C, Zancada G. Brote epidémico de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) en un hospital general. Informe preliminar. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 1991; 9: 200-207.

Pastagia M, Kleinman LC, Lacerda de la Cruz EG, Jenkins SG. Predicting risk for death from MRSA bacteremia. *Emerg Infect Dis*. 2012; 18: 1072-1080.

Pearman JW, Coombs GW, Grubb WB, O'Brien F. A British epidemic strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (UK EMRSA-15) in Western Australia. *Med J Aust*. 2001; 174: 662.

Pérez-Jorge C, Isea-Peña MC, Heili S, Esteban J. Spread of *cfr* gene among staphylococci conferring resistance to linezolid in a patient under treatment. *J Antibiot (Tokyo)*. 2012; 65: 151-152.

Pérez-Roth E, Lorenzo-Díaz F, Batista N, Moreno A, Méndez-Alvarez S. Tracking methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones during a 5-year period (1998 to 2002) in a Spanish hospital. *J Clin Microbiol*. 2004; 42: 4649-4656.

Pérez-Roth E, Potel-Alvarellos C, Espartero X, Constela-Caramés L, Méndez-Álvarez S, Alvarez-Fernández M. Molecular epidemiology of plasmid-mediated high-level mupirocin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in four Spanish health care settings. *Int J Med Microbiol.* 2013; 303: 201-204.

Pérez-Trallero E, García Arenzana J, Castañeda AA, Grisolia LP. Unusual multiresistant *Staphylococcus aureus* in a newborn nursery. *Am J Dis Child.* 1981; 135: 689-692.

Pérez-Trallero E, García Arenzana JM, Cilla Eguiluz G, Cisterna Cáncer R. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Spanish hospital. *Rev Infect Dis.* 1988; 10: 627-628.

Pérez-Vázquez M, Vindel A, Marcos C, Oteo J, Cuevas O, Trincado P, Bautista V, Grundmann H, Campos J; EARSS Spain spa-typing Group. Spread of invasive Spanish *Staphylococcus aureus* spa-type t067 associated with a high prevalence of the aminoglycoside-modifying enzyme gene *ant(4')-Ia* and the efflux pump genes *msrA/msrB*. *J Antimicrob Chemother.* 2009; 63: 21-31.

Pfingsten-Würzburg S, Pieper DH, Bautsch W, Probst-Kepper M. Prevalence and molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in nursing home residents in northern Germany. *J Hosp Infect.* 2011; 78: 108-112.

Picazo JJ, Betriu C, Rodríguez-Avial I, Culebras E, Gómez M; Grupo VIRA. Vigilancia de resistencias a los antimicrobianos: estudio VIRA 2004. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2004; 22: 517-525.

Picazo JJ, Betriu C, Rodríguez-Avial I, Culebras E, Gómez M, López F; Grupo VIRA. Vigilancia de resistencias a los antimicrobianos: estudio VIRA 2006. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2006; 24: 617-628.

Picazo JJ, Betriu C, Rodríguez-Avial I, Culebras E, López F, Gómez M; Grupo VIRA. Actividad comparativa de la daptomicina frente a *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y frente a estafilococos coagulasa negativa. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010; 28: 13-16.

Picazo JJ, Betriu C, Rodríguez-Avial I, Culebras E, López-Fabal F, Gómez M; VIRA Study Group. Comparative activities of daptomycin and several agents against staphylococcal blood isolates. Glycopeptide tolerance. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011; 70: 373-379.

Pinho MG. Mechanisms of β -lactam and glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus*. En: Lindsay JA (ed.). *Staphylococcus*, Molecular genetics. Norfolk: Caister Academic Press, 2008; 216-226.

Plata K, Rosato AE, Wegrzyn G. *Staphylococcus aureus* as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. *Acta Biochim Pol.* 2009; 56: 597-612.

Porrero MC, Valverde A, Fernández-Llario P, Díez-Guerrier A, Mateos A, Lavín S, Cantón R, Fernández-Garayzabal JF, Domínguez L. *Staphylococcus aureus* carrying *mecC* gene in animals and urban wastewater, Spain. *Emerg Infect Dis.* 2014; 20: 899-901.

Potoski BA, Adams J, Clarke L, Shutt K, Linden PK, Baxter C, Pasculle AW, Capitano B, Peleg AY, Szabo D, Paterson DL. Epidemiological profile of linezolid-resistant coagulase-negative staphylococci. *Clin Infect Dis.* 2006; 43:165-171.

Prévost G, Pottecher B, Dahlet M, Bientz M, Mantz JM, Piémont Y. Pulsed field gel electrophoresis as a new epidemiological tool for monitoring methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an intensive care unit. *J Hosp Infect.* 1991; 17: 255-269.

Prieto-Pérez L, Pérez-Tanoira R, Petkova-Saiz E, Pérez-Jorge C, López-Rodríguez C, Álvarez-Álvarez B, Polo-Sabau J, Esteban J. Osteomyelitis: a descriptive study. *Clin Orthop Surg.* 2014; 6: 20-25.

Proctor RA. Role of folate antagonists in the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. Clin Infect Dis. 2008; 46: 584-593.

Pujol M. Importancia de los centros geriátricos o de las instituciones sanitarias de estancia prolongada en la persistencia de la endemia por SARM. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2011; 29: 403-404.

Que YA, Moreillon P. *Staphylococcus aureus* (incluido el síndrome del shock tóxico). En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (ed.). Enfermedades Infecciosas, Principios y Práctica. 7ª ed. Barcelona: Elsevier, 2012; 2543-2582.

Queck SY, Otto M. *Staphylococcus epidermidis* and other Coagulase-Negative Staphylococci. En: Lindsay JA (ed.). *Staphylococcus*, Molecular genetics. Norfolk: Caister Academic Press, 2008; 227-254.

Quiles-Melero I, Gómez-Gil R, Romero-Gómez MP, Sánchez-Díaz AM, de Pablos M, García-Rodríguez J, Gutiérrez A, Mingorance J. Mechanisms of linezolid resistance among Staphylococci in a tertiary hospital. J Clin Microbiol. 2013; 51: 998-1001.

Rammelkamp CH, Maxon T. Resistance of *Staphylococcus aureus* of the action of penicillin. Proc. Royal Soc. Exper. Biol. Med. 1942; 51: 386-389.

Renzone A, Andrey DO, Jousselin A, Barras C, Monod A, Vaudaux P, Lew D, Kelley WL. Whole genome sequencing and complete genetic analysis reveals novel pathways to glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus*. PLoS One. 2011; 6: e21577.

Reyes J, Rincón S, Díaz L, Panesso D, Contreras GA, Zurita J, Carrillo C, Rizzi A, Guzmán M, Adachi J, Chowdhury S, Murray BE, Arias CA. Dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 sequence type 8 lineage in Latin America. Clin Infect Dis. 2009; 49: 1861-1867.

Reynolds R, Hope R, Warner M, Macgowan AP, Livermore DM, Ellington MJ; on behalf of the BSAC Extended Working Party on Resistance Surveillance. Lack of upward creep of glycopeptide MICs for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated in the UK and Ireland 2001-07. *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67: 2912-2918.

Rice LB, Bonomo RA. Mechanisms of resistance to antibacterial agents. En: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW (ed.). *Manual of Clinical Microbiology.* 10ª ed. Washington, DC: ASM Press, 2011; 1082-1114.

Richardson JF, Reith S. Characterization of a strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (EMRSA-15) by conventional and molecular methods. *J Hosp Infect.* 1993; 25: 45-52.

Robinson DA, Enright MC. Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47: 3926-3934.

Rodríguez-Aranda A, Daskalaki M, Villar J, Sanz F, Otero JR, Chaves F. Nosocomial spread of linezolid-resistant *Staphylococcus haemolyticus* infections in an intensive care unit. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009; 63: 398-402.

Rodríguez-Baño J, Bischofberger C, Alvarez-Lerma F, Asensio A, Delgado T, García-Arcal D, García-Ortega L, Hernández MJ, Molina-Cabrillana J, Pérez-Canosa C, Pujol M; M. Pujol and Grupos de Estudio de Infección Hospitalaria (GEIH) and de Infección en el Paciente Crítico (GEIPC) of Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) and Sociedad Española de Medicina Preventiva, Salud Pública e Higiene (SEMPSPH). Vigilancia y control de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en hospitales españoles. Documento de consenso GEIH-SEIMC y SEMPSPH. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2008; 26: 285-298.

Rodríguez-Baño J, Domínguez MA, Millán AB, Borraz C, González MP, Almirante B, Cercenado E, Padilla B, Pujol M; GEIH/GEMARA (SEIMC); REIPI. Clinical and molecular epidemiology of community-acquired, healthcare-associated and nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Spain. *Clin Microbiol Infect.* 2009; 15: 1111-1118.

Rodríguez-Baño J, López-Prieto MD, Portillo MM, Retamar P, Natera C, Nuño E, Herrero M, del Arco A, Muñoz A, Téllez F, Torres-Tortosa M, Martín-Aspas A, Arroyo A, Ruiz A, Moya R, Corzo JE, León L, Pérez-López JA; SAEI/SAMPAC Bacteraemia Group. Epidemiology and clinical features of community-acquired, healthcare-associated and nosocomial bloodstream infections in tertiary-care and community hospitals. *Clin Microbiol Infect.* 2010; 16: 1408-1413.

Roghmann MC, Siddiqui A, Plaisance K, Standiford H. MRSA colonization and the risk of MRSA bacteraemia in hospitalized patients with chronic ulcers. *J Hosp Infect.* 2001; 47: 98-103.

Rojas L, Bunsow E, Muñoz P, Cercenado E, Rodríguez-Crélix M, Bouza E. Vancomycin MICs do not predict the outcome of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream infections in correctly treated patients. *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67: 1760-1768.

Rojo P, Barrios M, Palacios A, Gomez C, Chaves F. Community-associated *Staphylococcus aureus* infections in children. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2010; 8: 541-554.

Rolain JM, François P, Hernandez D, Bittar F, Richet H, Fournous G, Mattenberger Y, Bosdure E, Stremier N, Dubus JC, Sarles J, Reynaud-Gaubert M, Boniface S, Schrenzel J, Raoult D. Genomic analysis of an emerging multiresistant *Staphylococcus aureus* strain rapidly spreading in cystic fibrosis patients revealed the presence of an antibiotic inducible bacteriophage. *Biol Direct.* 2009; 4: 1.

Rolo J, Miragaia M, Turlej-Rogacka A, Empel J, Bouchami O, Faria NA, Tavares A, Hryniewicz W, Fluit AC, de Lencastre H; CONCORD Working Group. High genetic diversity among community-associated *Staphylococcus aureus* in Europe: results from a multicenter study. *PLoS One.* 2012; 7: e34768.

Rosenbach FJ. Microorganismen bei den Wund-Infektions-Krankheiten des Menschen. J.F. Bergmann, Wiesbaden, 1884; 1-122.

Ross JI, Eady EA, Cove JH, Cunliffe WJ, Baumberg S, Wootton JC. Inducible erythromycin resistance in staphylococci is encoded by a member of the ATP-binding transport super-gene family. *Mol Microbiol.* 1990; 4: 1207-1214.

Ross JE, Farrell DJ, Mendes RE, Sader HS, Jones RN. Eight-year (2002-2009) summary of the linezolid (Zyvox® Annual Appraisal of Potency and Spectrum; ZAAPS) program in European countries. *J Chemother.* 2011; 23: 71-76.

Rossney AS, Shore AC, Morgan PM, Fitzgibbon MM, O'Connell B, Coleman DC. The emergence and importation of diverse genotypes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) harboring the Panton-Valentine leukocidin gene (PVL) reveal that PVL is a poor marker for community-acquired MRSA strains in Ireland. *J Clin Microbiol.* 2007; 45: 2554-2563.

Rountree PM, Freeman BM. Infections caused by a particular phage type of *Staphylococcus aureus*. *Med J Aust.* 1955; 42: 157-161.

Rountree PM, Beard MA. Hospital strains of *Staphylococcus aureus*, with particular reference to methicillin-resistant strains. *Med J Aust.* 1968; 2: 1163-1168.

Ruhe J, Menon A, Mushatt D, Dejace P, Hasbun R. Non- *epidermidis* coagulase-negative staphylococcal bacteremia: clinical predictors of true bacteremia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2004; 23: 495-498.

Ruiz de Gopegui E, Oliver A, Ramírez A, Gutiérrez O, Andreu C, Pérez JL. Epidemiological relatedness of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from a tertiary hospital and a geriatric institution in Spain. *Clin Microbiol Infect.* 2004; 10: 339-342.

Ruiz de Gopegui E, Oliver A, Galmés MI, Hidalgo O, Pérez JL. Consolidación de un clon multirresistente de *Staphylococcus aureus* no relacionado con el clon Ibérico en un hospital de Mallorca. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2005; 23: 140-144.

Ruiz de Gopegui E, Oliver A, Herrero J, Pérez JL. Neumonía nosocomial por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina de origen comunitario productor de leucocidina de Panton-Valentine. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2008; 26: 533-534.

Ruiz de Gopegui E, Oliver A, Pérez JL. Epidemiología molecular de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina en un hospital de Mallorca. XIII Reunión de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Sevilla, 3-5 de junio de 2009. Comunicación 222.

Ruiz de Gopegui E, Marinescu CI, Díaz P, Socías A, Garau M, Ayestarán JI, Pareja A, Gallegos MC, Pérez JL, Oliver A. Diseminación nosocomial de *Staphylococcus hominis* resistente al linezolid en dos hospitales de Mallorca. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011; 29: 339-344.

Ruiz de Gopegui E, Juan C, Zamorano L, Pérez JL, Oliver A. Transferable multidrug resistance plasmid carrying *cfp* associated with *tet(L)*, *ant(4')-Ia*, and *dfpK* genes from a clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST125 strain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56: 2139-2142.

Ryffel C, Bucher R, Kayser FH, Berger-Bächli B. The *Staphylococcus aureus mec* determinant comprises an unusual cluster of direct repeats and codes for a gene product similar to the *Escherichia coli* Sn-glycerophosphoryl diester phosphodiesterase. *J Bacteriol.* 1991; 173: 7416-7422.

Sá-Leão R, Santos Sanches I, Dias D, Peres I, Barros RM, de Lencastre H. Detection of an archaic clone of *Staphylococcus aureus* with low-level resistance to methicillin in a pediatric hospital in Portugal and in international samples: relics of a formerly widely disseminated strain? *J Clin Microbiol.* 1999; 37: 1913-1920.

Sader HS, Rhomberg PR, Jones RN. Nine-hospital study comparing broth microdilution and Etest method results for vancomycin and daptomycin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53: 3162-3165.

Salvatierra E, Mariscal L, Céspedes V, González C, Castellano E, Nogueira JM. Evaluación de un programa de cribado de SAMR en un hospital de crónicos y larga estancia (HACLE). XVIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Valencia, 9-11 abril 2014. Comunicación nº 076.

Sambrook J, Russell DW. Preparation and transformation of competent *E. coli* using calcium chloride. CSH Protoc. 2006.

Sanches IS, Ramírez M, Troni H, Abecassis M, Padua M, Tomasz A, de Lencastre H. Evidence for the geographic spread of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone between Portugal and Spain. J Clin Microbiol. 1995; 33: 1243-1246.

Sánchez García M, De la Torre MA, Morales G, Peláez B, Tolón MJ, Domingo S, Candel FJ, Andrade R, Arribi A, García N, Martínez Sagasti F, Fereres J, Picazo J. Clinical outbreak of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* in an intensive care unit. JAMA. 2010; 303: 2260-2264.

Sanchini A, Spitoni MG, Monaco M, Raglio A, Grigis A, Petrò W, Menchini M, Pesenti A, Goglio A, Pantosti A. Outbreak of skin and soft tissue infections in a hospital newborn nursery in Italy due to community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 clone. J Hosp Infect. 2013; 83: 36-40.

Saravolatz LD, Markowitz N, Arking L, Pohlod D, Fisher E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Epidemiologic observations during a community-acquired outbreak. Ann Intern Med. 1982; 96: 11-16.

Schleifer KH. Gram-positive cocci. En: Holt JG, Sneath PHA, Mair NS, Sharpe MS (ed.). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986; 999-1002.

Schmitz FJ, Fluit AC, Gondolf M, Beyrau R, Lindenlauf E, Verhoef J, Heinz HP, Jones ME. The prevalence of aminoglycoside resistance and corresponding resistance genes in clinical

isolates of staphylococci from 19 European hospitals. *J Antimicrob Chemother.* 1999; 43: 253-259.

Schmitz FJ, Krey A, Sadurski R, Verhoef J, Milatovic D, Fluit AC; European SENTRY Participants. Resistance to tetracycline and distribution of tetracycline resistance genes in European *Staphylococcus aureus* isolates. *J Antimicrob Chemother.* 2001; 47: 239-240.

Schwarz S, Cardoso M, Wegener HC. Nucleotide sequence and phylogeny of the *tet(L)* tetracycline resistance determinant encoded by plasmid pSTE1 from *Staphylococcus hyicus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992; 36: 580-588.

Schwarz S, Gregory PD, Werckenthin C, Curnock S, Dyke KG. A novel plasmid from *Staphylococcus epidermidis* specifying resistance to kanamycin, neomycin and tetracycline. *J Med Microbiol.* 1996; 45: 57-63.

Schwarz S, Werckenthin C, Kehrenberg C. Identification of a plasmid-borne chloramphenicol-florfenicol resistance gene in *Staphylococcus sciuri*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44: 2530-2533.

Schwarz S, Kadlec K, Strommenger B. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* detected in the BfT-GermVet monitoring programme 2004-2006 in Germany. *J Antimicrob Chemother.* 2008; 61: 282-285.

Schwarzkopf A, Karch H, Schmidt H, Lenz W, Heesemann J. Phenotypical and genotypical characterization of epidemic clumping factor-negative, oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 1993; 31: 2281-2285.

Seral C, Sáenz Y, Algarate S, Durán E, Luque P, Torres C, Castillo FJ. Nosocomial outbreak of methicillin- and linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* associated with catheter-related infections in intensive care unit patients. *Int J Med Microbiol.* 2011; 301: 354-358.

Sewell DL, Potter SA, Jacobson CM, Strausbaugh LJ, Ward TT. Sensitivity of surveillance cultures for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a nursing-home-care unit. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1993; 17: 53-56.

Seybold U, Kourbatova EV, Johnson JG, Halvosa SJ, Wang YF, King MD, Ray SM, Blumberg HM. Emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 genotype as a major cause of health care-associated blood stream infections. *Clin Infect Dis.* 2006; 42: 647-656.

Shaw KJ, Barbachyn MR. The oxazolidinones: past, present, and future. *Ann N Y Acad Sci.* 2011; 1241: 48-70.

Shen J, Wang Y, Schwarz S. Presence and dissemination of the multiresistance gene *cfr* in Gram-positive and Gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 2013; 68: 1697-1706.

Shenoy ES, Paras ML, Noubary F, Walensky RP, Hooper DC. Natural history of colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and vancomycin-resistant *Enterococcus* (VRE): a systematic review. *BMC Infect Dis.* 2014; 14: 177.

Shishido K, Tanaka Y. A restriction map of *Bacillus subtilis* tetracycline-resistance plasmid pNS1981. *Plasmid.* 1984; 12: 65-66.

Shore AC, Brennan OM, Ehricht R, Monecke S, Schwarz S, Slickers P, Coleman DC. Identification and characterization of the multidrug resistance gene *cfr* in a Pantone-Valentine leukocidin-positive sequence type 8 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* IVa (USA300) isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010a; 54: 4978-4984.

Shore AC, Rossney AS, Kinnevey PM, Brennan OM, Creamer E, Sherlock O, Dolan A, Cunney R, Sullivan DJ, Goering RV, Humphreys H, Coleman DC. Enhanced discrimination of highly clonal ST22-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* IV isolates achieved by combining *spa*, *dru*, and pulsed-field gel electrophoresis typing data. *J Clin Microbiol.* 2010b; 48: 1839-1852.

Shore AC, Deasy EC, Slickers P, Brennan G, O'Connell B, Monecke S, Ehricht R, Coleman DC. Detection of staphylococcal cassette chromosome *mec* type XI carrying highly divergent *mecA*, *mecl*, *mecR1*, *blaZ*, and *ccr* genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55: 3765-3773.

Shore AC, Brennan OM, Deasy EC, Rossney AS, Kinnevey PM, Ehricht R, Monecke S, Coleman DC. DNA microarray profiling of a diverse collection of nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates assigns the majority to the correct sequence type and staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) type and results in the subsequent identification and characterization of novel SCC*mec*-SCCM1 composite islands. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56: 5340-5355.

Sierra JM, Camoez M, Tubau F, Gasch O, Pujol M, Martín R, Domínguez MA. Low prevalence of *cfr*-mediated linezolid resistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Spanish hospital: case report on linezolid resistance acquired during linezolid therapy. *PLoS One.* 2013; 8: e59215.

Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL, Zervos MJ. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Clin Microbiol Rev.* 2006; 19: 512-530.

Sivapalasingam S, Steigbigel, NH. Macrólidos, clindamicina y cetólidos. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (ed.). *Enfermedades Infecciosas, Principios y Práctica.* 7ª ed. Barcelona: Elsevier, 2012; 427-449.

Skinner D, Keefer CS. Significance of bacteremia caused by *Staphylococcus aureus*. *Arch Intern Med.* 1941; 68: 851-875.

Smith JM, Cook GM. A decade of community MRSA in New Zealand. *Epidemiol Infect.* 2005; 133: 899-904.

Smith LK, Mankin AS. Transcriptional and translational control of the *mlr* operon, which confers resistance to seven classes of protein synthesis inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008a; 52: 1703-1712.

Smith CS, Parnell P, Hodgson G, Darby B, Barr B, Tompkins D, Heritage J, Wilcox MH. Are methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* that produce Panton-Valentine leucocidin (PVL) found among residents of care homes? *J Antimicrob Chemother.* 2008b; 62: 968-972.

Sobral D, Schwarz S, Bergonier D, Brisabois A, Feßler AT, Gilbert FB, Kadlec K, Lebeau B, Loisy-Hamon F, Treilles M, Pourcel C, Vergnaud G. High throughput multiple locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) of *Staphylococcus aureus* from human, animal and food sources. *PLoS One.* 2012; 7: e33967.

Solberg CO. A study of carriers of *Staphylococcus aureus* with special regard to quantitative bacterial estimations. *Acta Med Scand* 1965; 436 (Suppl): 1-96.

Sompolinsky D, Samra Z, Karakawa WW, Vann WF, Schneerson R, Malik Z. Encapsulation and capsular types in isolates of *Staphylococcus aureus* from different sources and relationship to phage types. *J Clin Microbiol.* 1985; 22: 828-834.

Song MD, Wachi M, Doi M, Ishino F, Matsubishi M. Evolution of an inducible penicillin-target protein in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by gene fusion. *FEBS Lett.* 1987; 221: 167-171.

Soriano A, Marco F, Martínez JA, Pisos E, Almela M, Dimova VP, Álamo D, Ortega M, López J, Mensa J. Influence of vancomycin minimum inhibitory concentration on the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Infect Dis.* 2008; 46: 193-200.

Sorlozano A, Gutiérrez J, Martínez T, Yuste ME, Pérez-López JA, Vindel A, Guillén J, Boquete T. Detection of new mutations conferring resistance to linezolid in glycopeptide-intermediate susceptibility *Staphylococcus hominis* subspecies *hominis* circulating in an intensive care unit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2010; 29: 73-80.

Spaan AN, Henry T, van Rooijen WJ, Perret M, Badiou C, Aerts PC, Kemmink J, de Haas CJ, van Kessel KP, Vandenesch F, Lina G, van Strijp JA. The staphylococcal toxin Panton-Valentine Leukocidin targets human C5a receptors. *Cell Host Microbe*. 2013; 13: 584-594.

Squeri R, Grillo OC, La Fauci V. Surveillance and evidence of contamination in hospital environment from meticillin and vancomycin-resistant microbial agents. *J Prev Med Hyg*. 2012; 53: 143-145.

Stefani S, Chung DR, Lindsay JA, Friedrich AW, Kearns AM, Westh H, Mackenzie FM. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods. *Int J Antimicrob Agents*. 2012; 39: 273-282.

Stewart GT, Holt RJ. Evolution of natural resistance to the newer penicillins. *Br Med J*. 1963; 1: 308-311.

Stone ND, Lewis DR, Lowery HK, Darrow LA, Kroll CM, Gaynes RP, Jernigan JA, McGowan JE Jr, Tenover FC, Richards CL Jr. Importance of bacterial burden among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriers in a long-term care facility. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2008; 29: 143-148.

Stone ND, Lewis DR, Johnson TM 2nd, Hartney T, Chandler D, Byrd-Sellers J, McGowan JE Jr, Tenover FC, Jernigan JA, Gaynes RP; Southeast Veterans Affairs Long-Term Care Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Cooperative. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) nasal carriage in residents of Veterans Affairs long-term care facilities: role of antimicrobial exposure and MRSA acquisition. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2012; 33: 551-557.

Strommenger B, Braulke C, Heuck D, Schmidt C, Pasemann B, Nübel U, Witte W. spa typing of *Staphylococcus aureus* as a frontline tool in epidemiological typing. *J Clin Microbiol*. 2008; 46: 574-581.

Strommenger B, Bartels MD, Kurt K, Layer F, Rohde SM, Boye K, Westh H, Witte W, De Lencastre H, Nübel U. Evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* towards increasing resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2014; 69: 616-622.

Sunbul M, Demirag MK, Yilmaz O, Yilmaz H, Ozturk R, Leblebicioglu H. Pacemaker lead endocarditis caused by *Staphylococcus hominis*. *Pacing Clin Electrophysiol.* 2006; 29: 543-545.

Swaney SM, Aoki H, Ganoza MC, Shinabarger DL. The oxazolidinone linezolid inhibits initiation of protein synthesis in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998; 42: 3251-3255.

Talon DR, Bertrand X. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in geriatric patients: usefulness of screening in a chronic-care setting. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2001; 22: 505-509.

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995; 33: 2233-2239.

Tenover FC. Community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: It's not just in communities anymore. *Clin Microbiol Newsletter.* 2006; 28: 33-36.

Tenover FC, Goering RV. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300: origin and epidemiology. *J Antimicrob Chemother.* 2009; 64: 441-446.

Terpenning MS, Bradley SF, Wan JY, Chenoweth CE, Jorgensen KA, Kauffman CA. Colonization and infection with antibiotic-resistant bacteria in a long-term care facility. *J Am Geriatr Soc.* 1994; 42: 1062-1069.

Toh SM, Xiong L, Arias CA, Villegas MV, Lolans K, Quinn J, Mankin AS. Acquisition of a natural resistance gene renders a clinical strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* resistant to the synthetic antibiotic linezolid. *Mol Microbiol.* 2007; 64: 1506-1514.

Tortora GL, Funke BR, Case CL. Genética microbiana. En: Tortora GL, Funke BR, Case CL. Introducción a la Microbiología. 9ª ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 2007; 225-227.

Treviño M, Martínez-Lamas L, Romero-Jung PA, Giráldez JM, Alvarez-Escudero J, Regueiro BJ. Endemic linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* in a critical care unit. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2009; 28: 527-533.

Tsakris A, Pillai SK, Gold HS, Thauvin-Eliopoulos C, Venkataraman L, Wennersten C, Moellering RC Jr, Eliopoulos GM. Persistence of rRNA operon mutated copies and rapid re-emergence of linezolid resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Chemother. 2007; 60: 649-651.

Tsiodras S, Gold HS, Sakoulas G, Eliopoulos GM, Wennersten C, Venkataraman L, Moellering RC, Ferraro MJ. Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. Lancet. 2001; 358: 207-208.

Tsubakishita S, Kuwahara-Arai K, Sasaki T, Hiramatsu K. Origin and molecular evolution of the determinant of methicillin resistance in staphylococci. Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54: 4352-4359.

Turlej A, Hryniewicz W, Empel J. Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) classification and typing methods: an overview. Pol J Microbiol. 2011; 60: 95-103.

Udo EE, Pearman JW, Grubb WB. Genetic analysis of community isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Western Australia. J Hosp Infect. 1993; 25: 97-108.

van Belkum A, van Leeuwen W, Kaufmann ME, Cookson B, Forey F, Etienne J, Goering R, Tenover F, Steward C, O'Brien F, Grubb W, Tassios P, Legakis N, Morvan A, El Solh N, de Ryck R, Struelens M, Salmenlinna S, Vuopio-Varkila J, Kooistra M, Talens A, Witte W, Verbrugh H. Assessment of resolution and intercenter reproducibility of results of genotyping

Staphylococcus aureus by pulsed-field gel electrophoresis of *Sma*I macrorestriction fragments: a multicenter study. J Clin Microbiol. 1998; 36: 1653-1659.

van Belkum A, Verkaik NJ, de Vogel CP, Boelens HA, Verveer J, Nouwen JL, Verbrugh HA, Wertheim HF. Reclassification of *Staphylococcus aureus* nasal carriage types. J Infect Dis. 2009; 199: 1820-1826.

van Cleef BA, Monnet DL, Voss A, Krziwanek K, Allerberger F, Struelens M, Zemlickova H, Skov RL, Vuopio-Varkila J, Cuny C, Friedrich AW, Spiliopoulou I, Pászti J, Hardardottir H, Rossney A, Pan A, Pantosti A, Borg M, Grundmann H, Mueller-Premru M, Olsson-Liljequist B, Widmer A, Harbarth S, Schweiger A, Unal S, Kluytmans JA. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in humans, Europe. Emerg Infect Dis. 2011; 17: 502-505.

van den Broek IV, Van Cleef BA, Haenen A, Broens EM, van der Wolf PJ, van den Broek MJ, Huijsdens XW, Kluytmans JA, van de Giessen AW, Tiemersma EW. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in people living and working in pig farms. Epidemiol Infect. 2009; 137: 700-708.

van de Velde H. Étude sur la mécanisme de la virulence du staphylocoque pyogène. Cellule. 1894; 10: 402-460.

VandenBergh MF, Yzerman EP, van Belkum A, Boelens HA, Sijmons M, Verbrugh HA. Follow-up of *Staphylococcus aureus* nasal carriage after 8 years: redefining the persistent carrier state. J Clin Microbiol. 1999; 37: 3133-3340.

van Gils EJ, Hak E, Veenhoven RH, Rodenburg GD, Bogaert D, Bruin JP, van Alphen L, Sanders EA. Effect of seven-valent pneumococcal conjugate vaccine on *Staphylococcus aureus* colonisation in a randomised controlled trial. PLoS One. 2011; 6: e20229.

van Hal SJ, Lodise TP, Paterson DL. The clinical significance of vancomycin minimum inhibitory concentration in *Staphylococcus aureus* infections: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis.* 2012; 54: 755-771.

Vanhoof R, Godard C, Content J, Nyssen HJ, Hannecart-Pokorni E. Detection by polymerase chain reaction of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates of epidemic phage types. Belgian Study Group of Hospital Infections (GDEPIH/GOSPIZ). *J Med Microbiol.* 1994; 41: 282-290.

van Loo IH, van Dijk S, Verbakel-Schelle I, Buiting AG. Evaluation of a chromogenic agar (MRSASelect) for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with clinical samples in The Netherlands. *J Med Microbiol.* 2007; 56: 491-494.

Verhoeven PO, Grattard F, Carricajo A, Lucht F, Cazorla C, Garraud O, Pozzetto B, Berthelot P. An algorithm based on one or two nasal samples is accurate to identify persistent nasal carriers of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect.* 2012; 18: 551-557.

Verhoeven PO, Gagnaire J, Botelho-Nevers E, Grattard F, Carricajo A, Lucht F, Pozzetto B, Berthelot P. Detection and clinical relevance of *Staphylococcus aureus* nasal carriage: an update. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2014; 12: 75-89.

Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 1991; 19: 6823-6831.

Vindel A, Trincado P, Gómez E, Cabrera R, Boquete T, Solá C, Valdezate S, Saez-Nieto JA. Prevalence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Spanish hospitals between 1996 and 2002. *J Clin Microbiol.* 2006; 44: 266-270.

Vindel A, Cuevas O, Cercenado E, Marcos C, Bautista V, Castellares C, Trincado P, Boquete T, Pérez-Vázquez M, Marín M, Bouza E; Spanish Group for the Study of *Staphylococcus*. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Spain: molecular epidemiology and utility of different typing methods. *J Clin Microbiol.* 2009; 47: 1620-1627.

Vindel A, Trincado P, Cuevas O, Ballesteros C, Bouza E, Cercenado E. Molecular epidemiology of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Spain: 2004-12. *J Antimicrob Chemother.* 2014; 69: 2913-2919.

von Baum H, Schmidt C, Svoboda D, Bock-Hensley O, Wendt C. Risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage in residents of German nursing homes. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2002; 23: 511-515.

von Eiff C, Becker K, Machka K, Stammer H, Peters G. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Study Group. *N Engl J Med.* 2001; 344: 11-16.

Voyich JM, Otto M, Mathema B, Braughton KR, Whitney AR, Welty D, Long RD, Dorward DW, Gardner DJ, Lina G, Kreiswirth BN, DeLeo FR. Is Panton-Valentine leukocidin the major virulence determinant in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease? *J Infect Dis.* 2006; 194: 1761-1770.

Wang SC, Frey PA. S-adenosylmethionine as an oxidant: the radical SAM superfamily. *Trends Biochem Sci.* 2007; 32: 101-110.

Wang Y, Wang Y, Wu CM, Schwarz S, Shen Z, Zhang W, Zhang Q, Shen JZ. Detection of the staphylococcal multiresistance gene *cfr* in *Proteus vulgaris* of food animal origin. *J Antimicrob Chemother.* 2011; 66: 2521-2526.

Wang Y, He T, Schwarz S, Zhou D, Shen Z, Wu C, Wang Y, Ma L, Zhang Q, Shen J. Detection of the staphylococcal multiresistance gene *cfr* in *Escherichia coli* of domestic-animal origin. *J Antimicrob Chemother.* 2012a; 67: 1094-1098.

Wang Y, Schwarz S, Shen Z, Zhou N, Lin J, Wu C, Shen J. Detection of the staphylococcal multiresistance gene *cfr* in *Macrococcus caseolyticus* and *Jeotgalicoccus pinnipedialis*. *J Antimicrob Chemother.* 2012b; 67: 1824-1827.

Wang Y, Zhang W, Wang J, Wu C, Shen Z, Fu X, Yan Y, Zhang Q, Schwarz S, Shen J. Distribution of the multidrug resistance gene *cf*r in *Staphylococcus* species isolates from swine farms in China. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012c; 56: 1485-1490.

Wannet WJ, Spalburg E, Heck ME, Pluister GN, Tiemersma E, Willems RJ, Huijsdens XW, de Neeling AJ, Etienne J. Emergence of virulent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains carrying Panton-Valentine leucocidin genes in The Netherlands. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 3341-3345.

Watkins RR, David MZ, Salata RA. Current concepts on the virulence mechanisms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol.* 2012; 61: 1179-1193.

Wei S, Kadlec K, Feßler AT, Schwarz S. Complete sequence of a multiresistance plasmid from a methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* ST5 isolated in a small animal clinic. *J Antimicrob Chemother.* 2014; 69: 847-859.

Weidenmaier C, Kokai-Kun JF, Kristian SA, Chanturiya T, Kalbacher H, Gross M, Nicholson G, Neumeister B, Mond JJ, Peschel A. Role of teichoic acids in *Staphylococcus aureus* nasal colonization, a major risk factor in nosocomial infections. *Nat Med.* 2004; 10: 243-245.

Werckenthin C, Schwarz S, Roberts MC. Integration of pT181-like tetracycline resistance plasmids into large staphylococcal plasmids involves IS257. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996; 40: 2542-2544.

Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, Nouwen JL. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis.* 2005; 5: 751-762.

Wertheim HF, van Kleef M, Vos MC, Ott A, Verbrugh HA, Fokkens W. Nose picking and nasal carriage of *Staphylococcus aureus*. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2006; 27: 863-867.

Wielders CL, Vriens MR, Brisse S, de Graaf-Miltenburg LA, Troelstra A, Fleer A, Schmitz FJ, Verhoef J, Fluit AC. In-vivo transfer of *mecA* DNA to *Staphylococcus aureus* [corrected]. Lancet. 2001; 357: 1674-1675.

Williams REO. Healthy carriage of *Staphylococcus aureus*: its prevalence and importance. Bacteriol Rev. 1963; 26: 56–71.

Wilson P, Andrews JA, Charlesworth R, Walesby R, Singer M, Farrell DJ, Robbins M. Linezolid resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother. 2003; 51: 186-188.

Wilson DN, Schluenzen F, Harms JM, Starosta AL, Connell SR, Fucini P. The oxazolidinone antibiotics perturb the ribosomal peptidyl-transferase center and effect tRNA positioning. Proc Natl Acad Sci USA. 2008; 105: 13339-13344.

Wilson R, Sethi S, Anzueto A, Miravittles M. Antibiotics for treatment and prevention of exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. J Infect. 2013; 67: 497-515.

Wisplinghoff H, Rosato AE, Enright MC, Noto M, Craig W, Archer GL. Related clones containing SCC*mec* type IV predominate among clinically significant *Staphylococcus epidermidis* isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2003; 47: 3574-3579.

Wisplinghoff H, Ewertz B, Wisplinghoff S, Stefanik D, Plum G, Perdreau-Remington F, Seifert H. Molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the metropolitan area of Cologne, Germany, from 1984 to 1998. J Clin Microbiol. 2005; 43: 5445-5451.

Witte W, Cuny C, Braulke C, Heuck D. Clonal dissemination of two MRSA strains in Germany. Epidemiol Infect. 1994; 113: 67-73.

Witte W. Antibiotic resistance in gram-positive bacteria: epidemiological aspects. *J Antimicrob Chemother.* 1999; 44 (Suppl A): 1-9.

Witte W, Enright M, Schmitz FJ, Cuny C, Bräulke C, Heuck D. Characteristics of a new epidemic MRSA in Germany ancestral to United Kingdom EMRSA 15. *Int J Med Microbiol.* 2001; 290: 677-682.

Witte W, Cuny C. Emergence and spread of *cfr*-mediated multiresistance in staphylococci: an interdisciplinary challenge. *Future Microbiol.* 2011; 6: 925-931.

Woltering R, Hoffmann G, Daniels-Hardt I, Gastmeier P, Chaberny IF. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in patients in long-term care in hospitals, rehabilitation centers and nursing homes of a rural district in Germany. *Dtsch Med Wochenschr.* 2008; 133: 999-1003.

Woodford N, Livermore DM. Infections caused by Gram-positive bacteria: a review of the global challenge. *J Infect.* 2009; 59 (Suppl 1): S4-16.

Wu S, Piscitelli C, de Lencastre H, Tomasz A. Tracking the evolutionary origin of the methicillin resistance gene: cloning and sequencing of a homologue of *mecA* from a methicillin susceptible strain of *Staphylococcus sciuri*. *Microb Drug Resist.* 1996; 2: 435-441.

Yao JDC, Moellerig RC, Jr. Antibacterial agents. En: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW (ed.). *Manual of Clinical Microbiology.* 10^a ed. Washington, DC: ASM Press, 2011; 1043-1081.

Yoshida K, Shoji H, Hanaki H, Yanagisawa C, Ikeda-Dantsuji Y, Fukuchi K, Adachi M, Niki Y. Linezolid-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated after long-term, repeated use of linezolid. *J Infect Chemother.* 2009; 15: 417-419.

Yu VL, Goetz A, Wagener M, Smith PB, Rihs JD, Hanchett J, Zuravleff JJ. *Staphylococcus aureus* nasal carriage and infection in patients on hemodialysis. Efficacy of antibiotic prophylaxis. N Engl J Med. 1986; 315: 91-96.

Zhang K, McClure JA, Elsayed S, Louie T, Conly JM. 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. 2005; 43: 5026-5033.

Zhang L, Thomas JC, Miragaia M, Bouchami O, Chaves F, d'Azevedo PA, Aanensen DM, de Lencastre H, Gray BM, Robinson DA. Multilocus sequence typing and further genetic characterization of the enigmatic pathogen, *Staphylococcus hominis*. PLoS One. 2013; 8: e66496.

Zhu W, Tenover FC, Limor J, Lonsway D, Prince D, Dunne WM Jr, Patel JB. Use of pyrosequencing to identify point mutations in domain V of 23S rRNA genes of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2007; 26: 161-165.

Zong Z, Lü X. Characterization of a new SCC*mec* element in *Staphylococcus cohnii*. PLoS One. 2010; 5: e14016.

Zurenko GE, Yagi BH, Schaadt RD, Allison JW, Kilburn JO, Glickman SE, Hutchinson DK, Barbachyn MR, Brickner SJ. In vitro activities of U-100592 and U-100766, novel oxazolidinone antibacterial agents. Antimicrob Agents Chemother. 1996; 40: 839-845.

Zurenko GE, Todd WM, Hafkin BA. Development of linezolid-resistant *Enterococcus faecium* in two compassionate use program patients treated with linezolid. Proceedings of the 39th Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC); San Francisco, EEUU; 26–29 septiembre de 1999.

ANEXO 1: SOLUCIONES Y REACTIVOS

9. ANEXO 1: SOLUCIONES Y REACTIVOS

9.1 Electroforesis en campo pulsado

9.1.1 Soluciones de trabajo

Solución TE (TRIS, EDTA).

Reactivo en stock	Volumen para 1 L	Concentración en la solución final
EDTA (pH 7,6) 0,5 M	2 mL	1 mM
TRIS-HCl (pH 7,6) 2 M	5 mL	10 mM
Agua destilada	Hasta 1 L	

Solución TBE (TRIS, ácido bórico, EDTA) 5X.

Reactivo en stock	Volumen para 1 L
Ácido bórico	27,5 g
TRIS	54 g
EDTA (pH 7,6) 0,5 M	20 mL
Agua destilada	Hasta 1 L

Solución PIV.

Reactivo en stock	Volumen para 30 mL	Concentración en la solución final
TRIS-HCl (pH 7,6) 2 M	0,15 mL	10 mM
NaCl 5 M	6 mL	1 M
Agua destilada	24 mL	

Solución de lisis EC.

Reactivo en <i>stock</i>	Volumen para 30 mL	Concentración en la solución final
TRIS-HCl (pH 7,6) 2 M	90 µL	6 mM
NaCl 5 M	6 mL	1 M
EDTA (pH 7,6) 0,5 M	6 mL	100 mM
Brij® 58 5%	3 mL	0,5%
Desoxicolato Na 10%	600 µL	0,2%
Sarcosil 20%	750 µL	0,5%
RNAasa 10 mg/mL	60 µL	20 mg/mL
Lisozima 10 mg/mL	300 µL	100 mg/mL
Lisostafina 10 mg/mL	150 µL	50 mg/mL
Agua destilada	Hasta 30 mL	

Solución ESP.

Reactivo en <i>stock</i>	Volumen para 30 mL	Concentración en la solución final
EDTA (pH 9-9,5) 0,5 M	28,5 mL	0,5 mM
Proteinasa K 50 µg/mL	1,5 mg	50 µg/mL
Sarcosil 20%	1500 µL	1%

9.1.2 Reactivos, material e instrumental**Reactivos.**

- Almacenados a temperatura ambiente:
 - TRIS-HCl (pH 7,6) 2 M.
 - NaCl 5 M.
 - EDTA 0,5 M (pH 7,6).
 - EDTA 0,5 M (pH 9-9,5).
 - Brij58® 5%.
 - Desoxicolato sódico 10%.
 - Sarcosil 20%.
 - Agarosa *low-melt*.
 - Agarosa Megabase®.
 - Bromuro de etidio 500 µg/mL.
- Almacenados a -20°C:
 - RNAasa 10 mg/mL.
 - Lisozima 10 mg/mL.

- Lisostafina 10 mg/mL.
- Proteinasa K.
- Enzimas de restricción *Sma*I y *Ap*aI, con sus tampones correspondientes.

Materiales.

- Tubos cónicos tipo *ependorf* de 1,5 mL.
- Puntas de pipeta adaptadas al volumen necesario.
- Pipetas estériles desechables de 10 mL.
- Pipetas *Pasteur* de plástico estériles.
- Moldes para los bloques de agarosa (Bio-Rad).
- Tubos cónicos de tapón de rosca de 10 mL.
- Tubos cónicos de tapón de rosca de 50 mL (tipo *Falcon*).
- Gradillas para los tubos anteriores.
- Portaobjetos de vidrio.
- Cubreobjetos.
- Frascos de vidrio de 250 mL.
- Peine para gel de agarosa.
- Soporte para gel de agarosa.
- Probeta para un volumen total de 2 L.

Instrumental.

- Pipetas automáticas.
- Microcentrífuga.
- Microondas.
- Balanza.
- Baño de agua.
- Estufa de 37°C.
- Estufa de 30 °C.

- Equipo de campo pulsado (*Chef-DR® III System*, Bio-Rad).

9.1.3 Protocolo de trabajo

Preparación de los bloques de agarosa y lisis celular:

Día 0

- Descongelar cada cepa de estafilococo en una placa de agar sangre. La siembra se debe hacer por agotamiento, de forma que queden colonias bien aisladas.
- Incubar las placas en estufa a 37°C durante 16-18 h.

Día 1

- Preparar en una gradilla un tubo cónico de 10 mL por cada cepa.
- Introducir en cada tubo cónico 5 mL de caldo BHI (*brain-heart infusion*, caldo cerebro-corazón).
- Inocular una colonia aislada de estafilococo de cada cepa en un tubo cónico, previamente rotulado, que contiene el medio líquido.
- Incubar los tubos en la estufa a 35-37°C durante 16-20 h.

Día 2

- En un tubo de tapón de rosca de 50 mL, preparar la solución PIV.
- Poner en una gradilla un tubo cónico tipo *ependorf* estéril por cada cepa. Rotularlos.
- Depositar 1 mL del cultivo en medio líquido (suspensión de la colonia en caldo BHI) en su tubo *ependorf* correspondiente.
- Centrifugar los tubos *ependorf* durante 2 min, a 11.000 rpm.
- Decantar el sobrenadante.
- Inocular en cada *ependorf* 1 mL de la solución PIV. Resuspender con la pipeta.
- Centrifugar otra vez los tubos tipo *ependorf* durante 2 min en las condiciones anteriores.

- Decantar el sobrenadante dejando la menor cantidad de líquido posible.
- Inocular en cada tubo *ependorf* 200 μ L de solución PIV. Mezclar con la pipeta.
- Encender el baño de agua a 42°C.
- Calentar el frasco de vidrio, que contiene la agarosa de bajo peso molecular (*low melt*) al 1,6%, previamente preparada, en el microondas hasta que comience a hervir. En este momento, comprobar que la agarosa esté bien disuelta (debe estar transparente). En caso de no haber agarosa *low melt* preparada, diluir en un frasco 0,8 g de agarosa *low melt* en 50 mL de tampón TBE 0,5X; calentar en el microondas hasta su completa disolución.
- Depositar el frasco de la agarosa *low melt* (una vez que esté bien disuelta) en el interior del baño de agua a 42°C.
- Preparar las tiras de los moldes de agarosa, teniendo en cuenta que usaremos dos bloques de agarosa por cada cepa. Puesto que cada tira tiene 10 pocillos, cada una nos servirá para 5 cepas.
- Preparar al lado del baño de agua: una pipeta para un volumen de 200 μ L, puntas de pipeta estériles para este volumen, las tiras de los moldes para la agarosa y la gradilla que contiene los tubos cónicos *ependorf* con 200 μ L de cada cultivo líquido resuspendido en la solución PIV.
- Con una pipeta, tomar 200 μ L de la agarosa *low melt* y depositarla en el tubo *ependorf* correspondiente. Mezclar varias veces con la pipeta la agarosa con el cultivo líquido.
- Rellenar dos moldes con la suspensión resultante (agarosa + cultivo líquido) por cada tubo *ependorf*. Desechar el tubo usado.
- Repetir el mismo proceso para cada cepa.
- Dejar enfriar las tiras con los moldes de agarosa en nevera durante, al menos, 15 min.
- Preparar, en un tubo cónico tipo *Falcon* de 50 mL, la solución de lisis EC.
- Colocar en una gradilla un tubo cónico de 10 mL para cada cepa. Rotularlos con el número de la cepa.
- Inocular en cada tubo 1 mL de solución de lisis EC.
- Retirar el protector del adhesivo de la primera tira de los moldes. No tocar los bloques de agarosa con la mano.

- Transferir los dos bloques de agarosa de la cepa a su tubo de 10 mL correspondiente. Para ello empujar, con la ayuda de un asa de siembra de plástico, el bloque de agarosa (desde la parte contraria al adhesivo) hasta que el bloque caiga dentro de la solución de lisis EC del tubo.
- Repetir el mismo proceso para los demás bloques de agarosa.
- Incubar los tubos en la estufa de 35-37°C durante un mínimo de 5 h y un máximo de 18 h.

Día 3

- Encender el baño de agua a 50°C.
- Preparar, en un tubo cónico tipo *Falcon* de 50 mL, la solución ESP.
- Aspirar la solución de lisis EC de cada tubo con la ayuda de una pipeta *Pasteur* de plástico estéril.
- Añadir 1 mL de solución ESP a cada tubo.
- Incubar los tubos en el baño de agua a 50°C durante 16-20 h.

Día 4

- Aspirar la solución ESP en cada tubo, utilizando una pipeta de plástico estéril.
- Realizar 5 lavados con 5 mL del tampón TE, con un intervalo aproximado de 30 min entre cada lavado.

Restricción del ADN y electroforesis de los fragmentos de restricción:

Día 1

- Preparar en una gradilla un tubo *ependorf* por cada cepa de la que se vaya a realizar la restricción (con un máximo de 30). Rotularlos.
- Añadir a cada tubo 1 mL de agua destilada estéril.
- Sacar cuidadosamente, con la ayuda de un asa de siembra, uno de los dos bloques de agarosa de su tubo correspondiente por cada una de las cepas.
- Depositar el bloque de agarosa sobre un portaobjetos.

- Cortar con un cubreobjetos un fragmento de cada bloque de aprox. 1 mm de espesor.
- Transferir el fragmento a su tubo correspondiente.
- Volver a dejar el resto del bloque de agarosa en su tubo cónico correspondiente de 10 mL. Dejar los tubos otra vez en nevera.
- Incubarlos en estufa de 37°C durante un mínimo de 10 min.
- Preparar la mezcla de restricción en un tubo de plástico de 10 mL, utilizando *SmaI* como enzima de restricción para *S. aureus*, o bien, *ApaI* para *S. hominis*.
- Retirar el agua destilada de cada uno de los tubos *ependorf*.
- Transferir 200 µL de la mezcla de restricción a cada tubo.
- Incubarlos durante 16-20 h en estufa de 30°C (para *SmaI*) o en estufa de 35-37°C (para *ApaI*).

Día 2

- Eliminar con una pipeta la mezcla de restricción.
- Añadir a cada tubo *ependorf* 1 mL de tampón TE.
- Incubarlos a 35-37°C durante 1 h.
- Preparar 100 mL de agarosa megabase al 1% (*Certified Megabase Agarose*). Para ello, en un frasco de vidrio, introducir 1 g de agarosa megabase y luego 100 mL de TBE 0,5X.
- Calentar la mezcla en el microondas hasta su completa disolución.
- Montar el soporte del gel y depositarlo sobre una superficie plana.
- Colocar el peine de forma que quede recto.
- Añadir la agarosa megabase al molde cuando esté atemperada (aprox 50°C).
- Dejar enfriar la agarosa durante 30 min hasta que solidifique.
- Añadir a la cubeta de electroforesis 2 L de agua destilada. Apretar los dos interruptores de la fuente de alimentación (*Power* y *Pump*). No encender todavía el refrigerador. Dejar el agua, al menos, unos 10 min para limpiar el sistema.

- Transcurrido este tiempo, apagar los dos botones de la cubeta de electroforesis. Eliminar toda el agua de la cubeta, colocando el grifo extraíble sobre la cubeta de electroforesis.
- Preparar, en una probeta de 2 L, el tampón TBE 0,5X. Añadir 200 mL del tampón TBE 5X sobre 1.800 mL de agua destilada.
- Añadir a la cubeta los 2 L del tampón TBE 0,5X. Encender los dos botones de la cubeta (*Power* y *Pump*) y el del refrigerador (*Cooling Module*).
- Pulsar el botón del refrigerador *Actual Temp* para ver la temperatura actual del tampón (el botón *Set Temp* indica la temperatura que se debe alcanzar, mientras que el botón *Actual Temp* indica la temperatura actual). El tampón debe alcanzar la temperatura de 14°C (tarda unos 30 min en enfriarse).
- Calentar el frasco que contiene agarosa convencional al 0,8% en el microondas para disolverla. Dejarlo enfriar.
- Una vez que la agarosa megabase del molde se ha solidificado, retirar con cuidado el peine.
- Eliminar, con una pipeta *Pasteur*, el tampón TE del primer tubo *ependorf*, que contiene el fragmento del bloque de agarosa.
- Golpear el tubo cónico sobre un portaobjetos para que el bloque de agarosa se levante del fondo.
- Introducir con cuidado (ayudándose con dos asas de plástico) el bloque de agarosa en el pocillo correspondiente. Repetir lo mismo para el resto de los bloques.
- Sellar los pocillos con agarosa convencional al 0,8% (utilizando una pipeta).
- Comprobar que el tampón de la cubeta de electroforesis haya alcanzado los 14°C.
- Desmontar con muchísimo cuidado, al lado de la cubeta, el soporte del gel.
- Colocar el gel (con el soporte negro) en el marco de la cubeta.
- Ajustar las condiciones del campo pulsado, usando los botones de la cubeta de electroforesis rotulados como:
 - “*INITIAL SW. TIME*” (pulso inicial): 1 segundo para *S. aureus*, 0,1 segundos para *S. hominis*.
 - “*FINAL SW. TIME*” (pulso final): 30 segundos para *S. aureus* y *S. hominis*.

- “*RUN TIME*” (duración): 23 h para *S. aureus*, 24 h para *S. hominis* (Sorlozano, 2010).
- Pulsar el botón de “*PAUSE. START RUN*”, para iniciar la electroforesis.

Día 3

- Esperar hasta que acabe de correr el gel (23-24 h para *Staphylococcus*).
- Preparar en una bandeja la solución de bromuro de etidio: 300 µL de bromuro de etidio (0,5 µg/mL) en 300 mL de agua destilada.
- Sacar con cuidado el gel de la cubeta de electroforesis.
- Depositar el gel en la bandeja con bromuro de etidio.
- Mantener el gel en la bandeja (tapado con otra bandeja) durante un mínimo de 30 min.
- Colocar el gel sobre la bandeja, encender el transiluminador ultravioleta y poner el protector de plástico. Apretar el botón de la luz ultravioleta “*Trans UV*”.
- Si se observan bandas, poner el gel en otra bandeja conteniendo unos 300 mL de agua destilada. Tapar también esta bandeja. Dejar el gel en la bandeja con agua unos 5-10 min.
- Volver a poner el gel sobre el transiluminador ultravioleta.
- Realizar la fotografía del gel. Guardar el archivo de imagen en el ordenador o en una memoria externa.

Resultados e interpretación:

- Cada cepa viene definida por un perfil o patrón de bandas de restricción.
- La comparación entre los diferentes patrones de bandas obtenidos establece la asociación epidemiológica entre las distintas cepas. Con ello determinaremos los diversos clones. Los criterios utilizados se basan en los descritos por Tenover (Tenover, 1995).

Controles utilizados en las ECP y nomenclatura:

Las cepas controles de SARM utilizadas fueron: tres cepas de los clones mayoritarios del HUSD (clones A, B, C) detectadas en estudios previos ([Ruiz de Gopegui, 2005](#); [Alcoceba, 2007](#)), posteriormente tipificadas mediante MLST y PCR del SCC*mec* como ST125-MRSA-IVc (clon A), ST228-MRSA-I (clon B) y ST22-MRSA-IVh (EMRSA-15, clon C). También se emplearon dos cepas tipificadas del clon ST22-MRSA-IVh (EMRSA-15): DEN4561 ([Faria, 2005](#)) y HAR22 ([Murchan, 2003](#)). La cepa de referencia *S. aureus* NCTC 8325 ([Tenover, 1995](#)) se utilizó como marcador de peso molecular.

La nomenclatura de los clones de SARM se ha basado en la utilizada en nuestro primer estudio de ECP realizado en el Hospital de Bellvitge con aislados de SARM detectados en 1999-2000, junto con la nomenclatura estandarizada según el MLST y tipado del SCC*mec* ([Enright, 2002](#)).

9.2 Mezclas de reacción para PCR

Mezcla de reacción para MLST.

Reactivo	Reacción	Volumen (µL)
<i>Buffer</i> 10X (New England BioLabs)	1X	10,0
Mezcla dNTPs 100 mM (Bioline)	400 µM	0,4
<i>arcC</i> -Up 100 µM ^a	0,6 µM	0,6
<i>arcC</i> -Dn 100 µM ^a	0,6 µM	0,6
<i>Taq</i> DNA polimerasa 5 U/µL (New England BioLabs)	3 U	0,6
Agua destilada		85,8
ADN		2,0

^aLa composición de la mezcla es idéntica para las otras seis parejas de cebadores.

Mezcla de reacción para el complejo *ccr* tipos 1-3 del SCC*mec*.

Reactivo	Reacción	Volumen (µL)
<i>Buffer</i> II 10X (Applied Biosystems)	1X	5,0
MgCl ₂ 25 mM (Applied Biosystems)	1,5 mM	3,0
Mezcla dNTPs 10 mM (Invitrogen)	300 µM	1,5
cA1 100 µM	0,6 µM	0,3
cA2 100 µM	0,6 µM	0,3
cA3 100 µM	1,0 µM	0,5
cB 100 µM	0,6 µM	0,3
Ampli <i>Taq</i> Gold DNA polimerasa 5 U/µL (Applied)	2,5 U	0,5
Agua destilada		36,6
ADN		2,0

Mezcla de reacción para el complejo *mec* de clase B.

Reactivo	Reacción	Volumen (µL)
<i>Buffer</i> II 10X (Applied Biosystems)	1X	5,0
MgCl ₂ 25 mM (Applied Biosystems)	1,5 mM	3,0
Mezcla dNTPs 10 mM (Invitrogen)	300 µM	1,5
mA 100 µM	0,6 µM	0,3
ROrf2 100 µM	0,6 µM	0,3
Ampli <i>Taq</i> Gold DNA polimerasa 5 U/µL (Applied)	2,5 U	0,5
Agua destilada		37,4
ADN		2,0

Mezcla de reacción para el complejo *ccr5* del SCCmec tipo V.

Reactivo	Reacción	Volumen (µL)
<i>Buffer</i> II 10X (Applied Biosystems)	1X	5,0
MgCl ₂ 25 mM (Applied Biosystems)	1,5 mM	3,0
Mezcla dNTPs 10 mM (Invitrogen)	300 µM	1,5
<i>ccrC</i> F2 100 µM	0,6 µM	0,3
<i>ccrC</i> R2 100 µM	0,6 µM	0,3
Ampli <i>Taq</i> Gold DNA polimerasa 5 U/µL (Applied)	2,5 U	0,5
Agua destilada		37,4
ADN		2,0

Mezcla de reacción para el subtipo del SCCmec tipo IV.

Reactivo	Reacción	Volumen (µL)
<i>Buffer</i> 10X (Bioline)	1X	5,0
MgCl ₂ 50 mM (Bioline)	1,5 mM	1,5
Mezcla dNTPs 100 mM (Bioline)	1400 µM	0,7
J-IVa-F 100 µM	0,4 µM	0,2
J-IVa-R 100 µM	0,4 µM	0,2
J-IVc-F 100 µM	0,4 µM	0,2
J-IVc-R 100 µM	0,4 µM	0,2
J-IVh-F 100 µM	1,0 µM	0,5
J-IVh-R 100 µM	1,0 µM	0,5
Bio <i>Taq</i> DNA polimerasa 5 U/µL (Bioline)	2,5 U	0,5
Agua destilada		38,5
ADN		2,0

Mezcla de reacción para la detección de la LPV.

Reactivo	Reacción	Volumen (µL)
<i>Buffer</i> II 10X (Applied Biosystems)	1X	5,0
MgCl ₂ 25 mM (Applied Biosystems)	1,5 mM	3,0
Mezcla dNTPs 10 mM (Invitrogen)	300 µM	1,5
<i>mecA</i> -F 100 µM	0,4 µM	0,2
<i>mecA</i> -R 100 µM	0,4 µM	0,2
<i>nuc</i> -1 100 µM	0,4 µM	0,2
<i>nuc</i> -2 100 µM	0,4 µM	0,2
<i>luk</i> -PV-1 100 µM	1,2 µM	0,6
<i>luk</i> -PV-2 100 µM	1,2 µM	0,6
Ampli <i>Taq</i> Gold DNA polimerasa 5 U/µL	3 U	0,6
Agua destilada		35,9
ADN		2,0

Mezcla de reacción para la detección del ACME.

Reactivo	Reacción	Volumen (µL)
<i>Buffer</i> 10X (Bioline)	1X	5,0
MgCl ₂ 50 mM (Bioline)	1,5 mM	1,5
Mezcla dNTPs 100 mM (Bioline)	400 µM	0,2
arcA-F 100 µM	0,6 µM	0,3
arcA-R 100 µM	0,6 µM	0,3
BioTaq DNA polimerasa 5 U/µL (Bioline)	2,5 U	0,5
Agua destilada		40,2
ADN		2,0

Mezcla de reacción para los genes *cfr*, *fexA*, *tet(K)*, *tet(M)*, *tet(L)*, *ant(4')-Ia*, *dfrK*, *vga(C)*.

Reactivo	Reacción	Volumen (µL)
<i>Buffer</i> 10X (Bioline)	1X	5,0
MgCl ₂ 50 mM (Bioline)	1,5 mM	1,5
Mezcla dNTPs 100 mM (Bioline)	400 µM	0,2
Cebador-F 100 µM	0,6 µM	0,3
Cebador-R 100 µM	0,6 µM	0,3
BioTaq DNA polimerasa 5 U/µL (Bioline)	2,5 U	0,5
Agua destilada		40,2
ADN		2,0

Mezcla de reacción para el gen ARNr 23S.

Reactivo	Reacción	Volumen (µL)
<i>Buffer</i> 10X (Bioline)	1X	10,0
MgCl ₂ 50 mM (Bioline)	1,5 mM	3,0
Mezcla dNTPs 100 mM (Bioline)	400 µM	0,4
23S-F 100 µM	0,6 µM	0,6
23S-R 100 µM	0,6 µM	0,6
BioTaq DNA polimerasa 5 U/µL (Bioline)	3 U	0,6
Agua destilada		82,8
ADN		2,0

ANEXO 2: ARTÍCULOS PUBLICADOS

10. ANEXO 2: ARTÍCULOS PUBLICADOS

Research Note 339

infrequent dosage interval that permitted a longer time of virus replication in the absence of an adequate virus-static ganciclovir blood concentration. However, the goal of CMV prophylaxis is not to suppress CMV reactivation, but to avoid the development of CMV disease until a patient's specific T-cells are capable of coping with the virus [5]. As ganciclovir was administered only three times a week by a peripheral vein, outpatient treatment was possible. This allows cost savings and, in contrast to an oral virus-static therapy, is independent of the patient's compliance. The suggested targeted prophylactic approach is efficient, safe and easy to perform in an outpatient clinic setting. Future prophylactic therapies using new oral formulations of antiviral agents [14] should be compared to the regimen described in the present study.

REFERENCES

1. Rondeau E, Bourgeon B, Peraldi MN *et al.* Effect of prophylactic ganciclovir on cytomegalovirus infection in renal transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant* 1993; 8: 858–862.
2. Hibberd PL, Tolkoff-Rubin NE, Cosimi AB *et al.* Symptomatic cytomegalovirus disease in the cytomegalovirus antibody seropositive renal transplant recipient treated with OKT3. *Transplantation* 1992; 53: 68–72.
3. Bailey TC, Powderly WG, Storch GA *et al.* Symptomatic cytomegalovirus infection in renal transplant recipients given either Minnesota antilymphoblast globulin (MALG) or OKT3 for rejection prophylaxis. *Am J Kidney Dis* 1993; 21: 196–201.
4. Cathomas G, Bienz K. Cytomegalovirus diagnosis in immunocompromised patients: detection of early viral protein and viral nucleic acids in shell vial culture. *Schweiz Med Wochenschr* 1989; 119: 75–80.
5. Reusser P, Cathomas G, Attenhofer R, Tamm M, Thiel G. Cytomegalovirus (CMV)-specific T cell immunity after renal transplantation mediates protection from CMV disease by limiting the systemic virus load. *J Infect Dis* 1999; 180: 247–253.
6. Ljungman P, Griffiths P. Definitions of cytomegalovirus infection and disease. In: Michelson, S, Plotkin, SA, eds. *Multidisciplinary approach to understanding cytomegalovirus disease*. Amsterdam: Elsevier, 1993; 233–253.
7. Ljungman P, Griffiths P, Paya C. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 1094–1097.
8. Tamm M, Traenkle P, Grilli B *et al.* Pulmonary cytomegalovirus infection in immunocompromised patients. *Chest* 2001; 119: 838–843.
9. Rubin RH. Infection disease complications of renal transplantation. *Kidney Int* 1993; 44: 221–236.
10. Dickenmann MJ, Cathomas G, Steiger J, Mihatsch MJ, Thiel G, Tamm M. Cytomegalovirus infection and graft rejection in renal transplantation. *Transplantation* 2001; 71: 764–767.
11. Conti DJ, Freed BM, Singh TP, Gallichio M, Gruber SA, Lempert N. Preemptive ganciclovir therapy in cytomegalovirus-seropositive renal transplant recipients. *Arch Surg* 1995; 130: 1217–1221.
12. Hibberd PL, Tolkoff-Rubin NE, Conti D *et al.* Preemptive ganciclovir therapy to prevent cytomegalovirus disease in cytomegalovirus antibody-positive renal transplant recipients: a randomized controlled trial. *Ann Intern Med* 1995; 123: 18–26.
13. Kletzmayr J, Kreuzwieser E, Watkins-Riedel T, Berlakovich G, Kovarik J, Klausner R. Long-term oral ganciclovir prophylaxis for prevention of cytomegalovirus infection and disease in cytomegalovirus high-risk renal transplant recipients. *Transplantation* 2000; 70: 1174–1180.
14. Martin D, Sierra-Madero J, Walmsley S *et al.* A controlled trial of valganciclovir as induction therapy for cytomegalovirus retinitis. *N Engl J Med* 2002; 346: 1119–1126.

RESEARCH NOTE

Epidemiological relatedness of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from a tertiary hospital and a geriatric institution in Spain

E. Ruiz de Gopegui¹, A. Oliver¹, A. Ramírez¹, O. Gutiérrez¹, C. Andreu² and J. L. Pérez¹

¹Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Son Dureta and ²Residencia de Pensionistas 'La Bonanova', Palma de Mallorca, Balearic Islands, Spain

ABSTRACT

From January 2000 to June 2002, 24 *Staphylococcus aureus* isolates were recovered from decubitus ulcers of patients in a geriatric institution, of which 17 (70.8%) were methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA). Antibiotic resistance and DNA macrorestriction (pulsed-field gel electrophoresis; PFGE) patterns of the MRSA isolates were compared with a collection of 161 MRSA isolates from patients admitted to the institution's reference hospital. PFGE revealed the presence of

Corresponding author and reprint requests: E. Ruiz de Gopegui, Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Son Dureta, C. Andrea Doria N°55, 07014 Palma de Mallorca, Spain
E-mail: eruiz@pontosoft.com

340 *Clinical Microbiology and Infection*, Volume 10 Number 4, April 2004

five clonal types (found also in hospitalised patients) among the 17 MRSA isolates. The findings suggest nosocomial acquisition of the MRSA strains by five patients, with subsequent dissemination of the strains within the institution. The high rate of MRSA highlights the need for epidemiological analysis to control the dissemination of MRSA in long-term care facilities.

Keywords Epidemiology, methicillin resistance, MRSA, PFGE, *Staphylococcus aureus*, typing

Original Submission: 12 June 2003; **Revised Submission:** 13 August 2003; **Accepted:** 23 September 2003

Clin Microbiol Infect 2004; 10: 339–342
10.1111/j.1198-743X.2004.00867.x

The introduction of methicillin into clinical practice was followed almost immediately by the first report in 1961 of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains [1]. MRSA soon disseminated through hospitals around the world and, in the 1980s, became one of the most important challenges in the treatment of nosocomial infections [2]. In Europe, the proportion of MRSA increased from <1% in 1980 to 30% in 1991 [3]. In Spain, the first MRSA outbreaks were detected simultaneously in 1988 in certain hospitals in Madrid and Barcelona [4,5]. However, MRSA was isolated seldom in Palma de Mallorca until the first outbreak was detected in June 1999, followed by endemicity.

The epidemiology of MRSA infections has shown changes recently in both clinical and microbiological aspects. The reservoir of MRSA is apparently shifting from the hospital setting to nursing homes [6,7], chronic-care facilities [8,9] and spinal cord injury units [10]. The present paper describes a molecular epidemiological study of MRSA isolates recovered from decubitus ulcers of geriatric patients in a large chronic-care facility in Mallorca. The epidemiological relatedness between these MRSA strains and those isolated in the reference hospital for this geriatric institution was also assessed.

The Hospital Universitario Son Dureta (HUSD) is the reference tertiary hospital of the Balearic Islands and has 980 beds. The Residencia de Pensionistas La Bonanova has 552 beds and is the main chronic-care facility of Mallorca. As part of an epidemiological surveillance study, MRSA isolates from geriatric patients with decubitus

ulcers admitted to the geriatric institution from January 2000 to June 2002 were studied. Specimens were collected with sterile swabs and sent to the microbiology laboratory. *S. aureus* isolates were identified by conventional methods [11].

Antimicrobial susceptibility testing was performed by disk diffusion according to the guidelines of the National Committee for Clinical Laboratory Standards [12]. Antibiotic disks (Rosco Laboratories, Taastrup, Denmark) tested were oxacillin, penicillin, gentamicin, erythromycin, clindamycin, ciprofloxacin, rifampicin, trimethoprim-sulphamethoxazole, mupirocin, fusidic acid, teicoplanin and vancomycin. Additionally, latex agglutination was performed to confirm the presence of PBP2a (Slidex MRSA Detection kit; bioMérieux, Marcy l'Etoile, France).

Clonal relatedness of MRSA isolates was determined by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Genomic DNA embedded in agarose blocks was digested after bacterial lysis with *Sma*I. Chromosomal DNA fragments were separated using the Chef-DR III system (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA), with 23 h at 6 V/cm², and initial and final pulse times of 1 s and 30 s, respectively. PFGE band patterns were interpreted as described previously [13]. For comparative purposes, a collection of 161 previously typed MRSA isolates from patients admitted to HUSD during 1999 and 2000 was used. Nomenclature for MRSA clones in the present study was based on that established for the previous collection.

During the 30-month study period, 24 *S. aureus* isolates were recovered from the decubitus ulcers of 24 different patients admitted to the chronic care facility, of which 17 (70.8%) were MRSA. The demographics and clinical characteristics of patients with MRSA are shown in Table 1. Ten patients had been admitted previously to HUSD, of whom five had been admitted since 1999 (the date when the outbreak of MRSA began in HUSD). MRSA was isolated in pure culture from seven patients, and was associated with other pathogens from ten patients. Associated pathogens comprised *Pseudomonas aeruginosa* (five patients), *Escherichia coli* (three patients) and *Proteus mirabilis* (two patients).

PFGE revealed the presence of four different clones among the 17 MRSA isolates, one of which had two subtypes. Clone A was found in eight (47%) patients, clone B in one (6%) patient, clone C2 in five (29.5%) patients, and clone E in three

Table 1. Characteristics of patients with decubitus ulcers infected by MRSA

Characteristic	n
Demographics	
Mean age in years (range)	83 (75–94)
Sex (male/female)	5:12
Previous HUSD admissions	
Never	7 (42%)
Before 1999	5 (29%)
Since 1999	5 (29%)
Underlying disease	
Mobility limitation ^a	17 (100%)
Arterial hypertension	10 (59%)
Heart disease ^b	6 (35%)
Diabetes mellitus type 2	4 (23%)
Fever	8 (47%)
Number of ulcers	
Sole	15 (88%)
Multiple	2 (12%)
Location	
Foot	10 (59%)
Sacrum	7 (42%)
Hip	3 (18%)
Stage	
Stage II (epidermis, dermis)	4 (23%)
Stage III (subcutaneous tissue)	8 (47%)
Stage IV (muscle, bone)	2 (12%)
Unknown	3 (18%)
Therapy	
Topical ^c	15 (88%)
Systemic ^d	10 (59%)
No treatment	2 (12%)

^aIncluding dementia, ischaemic stroke, osteoarthritis, hip fracture and Parkinson's disease.

^bIncluding heart failure, coronary artery disease, and atrial fibrillation.

^cMupirocin (13 patients) or fusidic acid (two patients).

^dTrimethoprim-sulphamethoxazole (five patients), gentamicin (two patients), vancomycin (two patients), and teicoplanin (one patient).

HUSD, Hospital Universitario Son Dureta.

(17.5%) patients. Two subtypes of clone E were found: clone E2 in two (11.5%) patients and clone E1 in one (6%) patient (Fig. 1). All of these clones were represented in the previous collection of 161 MRSA isolates from patients admitted to HUSD, although in different proportions (clone A, 63%; clone B, 20%; clone C2, 2.5%; and clone E, 1%). None of these clones was related to the Iberian clone described previously [14]. Interestingly, the five different clonal types of MRSA were detected in the five patients admitted to HUSD since 1999 (the time of the original outbreak).

All MRSA isolates were susceptible to vancomycin, teicoplanin, trimethoprim-sulphamethoxazole, rifampicin and fusidic acid, but were resistant to ciprofloxacin and erythromycin (except one isolate). Resistance to clindamycin (10.4%) and gentamicin (14.8%) was variable, even among isolates from the same clone. Six of the seven clindamycin-susceptible isolates showed an MLS_B-inducible phenotype. Clone A had four different patterns of susceptibility, with the most frequent (four patients) being characterised by resistance to erythromycin and clindamycin, and susceptibility to gentamicin. Clone C2

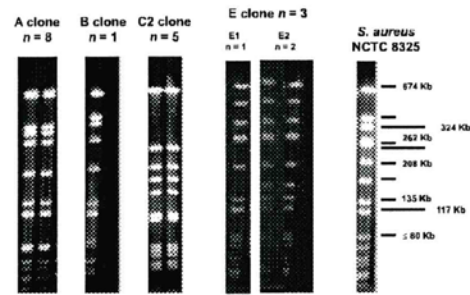


Fig. 1. *Sma*I PFGE macrorestriction patterns of the different MRSA clonal types. *Staphylococcus aureus* NCTC 8325 was used as a molecular size marker. Lanes were obtained from two different gels and normalised using the bands produced by the NCTC control strain.

had two different patterns, with the most frequent (four patients) showing resistance to erythromycin, and susceptibility to gentamicin and clindamycin (with an MLS_B-inducible phenotype).

S. aureus infection is a significant cause of morbidity and mortality in elderly persons in hospitals, in geriatric institutions, and in the community [6]. *S. aureus* is the fourth most common hospital-acquired pathogen in older adults, following *E. coli*, *P. aeruginosa* and enterococci, and it accounts for 9% of all nosocomial infections in these patients [15]. In chronic care facilities, rates of infection are similar to those seen in hospitals [16]. Areas of chronic skin breakdown, such as decubitus ulcers, are common in hospitalised patients and nursing home residents. *S. aureus* is the microorganism isolated most frequently in aspirates from such ulcers [17]. Age-related changes in skin, together with an increased prevalence of peripheral vascular disease, diabetes mellitus and conditions that lead to diminished mobility, are associated with risk of skin infection in the elderly [16], as occurred in the patients in the present study. MRSA colonisation is common among nursing home residents (8–46% of residents), although reports of documented MRSA infection are relatively uncommon [16]. Limited studies suggest that most nursing home residents acquire MRSA during a hospital stay rather than in the nursing home [6]. It is thought that transmission of MRSA between nursing home residents is less frequent than in hospitalised patients [6].

The present study found an unexpectedly high rate of MRSA (70.8%) among *S. aureus* isolates

342 *Clinical Microbiology and Infection*, Volume 10 Number 4, April 2004

from decubitus ulcers of patients in this geriatric institution. Before 1999, no MRSA was detected in residents of this facility, and only a few sporadic cases were found in patients admitted to HUSD. Five different clonal types of MRSA were detected among the 17 patients of the geriatric institution, with the five patients who had been admitted to HUSD since 1999 each being infected by a different clonal type of MRSA. Since all these clones had been documented previously in patients admitted to HUSD, it seems reasonable to conclude that these patients acquired MRSA strains during their hospitalisation period. The fact that the other 12 patients had not been hospitalised previously in HUSD suggests that these MRSA clones may have spread subsequently between different patients within the geriatric institution. The high rate of MRSA found highlights the importance of epidemiological analysis in controlling the dissemination of MRSA in chronic care facilities, as in tertiary hospitals.

REFERENCES

1. Barber M. Methicillin-resistant staphylococci. *J Clin Pathol* 1961; **14**: 385–393.
2. Ayliffe GA. The progressive intercontinental spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 1997; **24**(suppl 1): S74–S79.
3. Voss A, Milatovic D, Wallrauch-Schwarz C, Rosdahl VT, Braveny I. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; **13**: 50–55.
4. Parras F, Rodríguez M, Bouza E *et al*. Epidemic outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a general hospital. Preliminary report. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1991; **9**: 200–207.
5. Trilla A, Marco F, Moreno A, Prat A, Soriano E, Jiménez de Anta MT. Clinical epidemiology of an outbreak of nosocomial infection caused by *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin and aminoglycosides: efficacy of control measures. *Comité de Control de Infecciones. Med Clin (Barc)* 1993; **100**: 205–209.
6. Bradley SF. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in nursing homes. *Epidemiology, prevention and management. Drugs Aging* 1997; **10**: 185–198.
7. O'Sullivan NP, Keane CT. Risk factors for colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among nursing home residents. *J Hosp Infect* 2000; **45**: 206–210.
8. Talon DR, Bertrand X. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in geriatric patients: usefulness of screening in a chronic-care setting. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2001; **22**: 505–509.
9. Capitano B, Leshem OA, Nightingale CH, Nicolau DP. Cost effect of managing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a long-term care facility. *J Am Geriatr Soc* 2003; **51**: 10–16.
10. Olona-Cabases M, Tico-Falguera N, Ramírez-Garcerán L, Del Valle-Ortiz O, Castello-Verdu T, García-Fernández L. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a four-year experience in a spinal cord injury unit in Spain. *Spinal Cord* 1996; **34**: 315–319.
11. Kloos WE, Bannerman TL. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, eds. *Manual of clinical microbiology*. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1999; 271–276.
12. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests*, 7th edn. Approved Standard M2-A7. Wayne, PA: NCCLS, 2002.
13. Tenover F, Arbeit R, Goering R *et al*. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; **33**: 2233–2239.
14. Dominguez MA, de Lencastre H, Liñares J, Tomasz A. Spread and maintenance of a dominant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone during an outbreak of MRSA disease in a Spanish hospital. *J Clin Microbiol* 1994; **32**: 2081–2087.
15. Emori TG, Banerjee SN, Culver DH *et al*. Nosocomial infections in elderly patients in the United States, 1986–1990. National Nosocomial Infections Surveillance System. *Am J Med* 1991; **91**(suppl 3B): 289S–293S.
16. Bradley SF. *Staphylococcus aureus* infections and antibiotic resistance in older adults. *Clin Infect Dis* 2002; **34**: 211–216.
17. Nicolle LE, Strausbaugh LJ, Garibaldi RA. Infections and antibiotic resistance in nursing homes. *Clin Microbiol Rev* 1996; **9**: 1–17.

RESEARCH NOTE

False synergy between vancomycin and β -lactams against glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus* (GISA) caused by inappropriate testing methods

F. W. Goldstein, R. Atoui, A. Ben Ali, J. C. Nguyen, A. Ly and M. D. Kitzis

Fondation Hospital Saint-Joseph, 185 rue Raymond Losserand, 75014 Paris, France

ABSTRACT

The combination of vancomycin and β -lactams is often considered synergistic and has been recommended for the treatment of glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus* (GISA) infections. In this study, the combination of vancomycin or

Corresponding author and reprint requests: F. W. Goldstein, Fondation Hospital Saint-Joseph, 185 rue Raymond Losserand, 75014 Paris, France
E-mail: fgoldstein@hopital-saint-joseph.org

ORIGINALES

Consolidación de un clon multirresistente de *Staphylococcus aureus* no relacionado con el clon Ibérico en un hospital de Mallorca

Enrique Ruiz de Gopegui^a, Antonio Oliver^a, Margarita Isabel Galmés^a, Olga Hidalgo^b y José L. Pérez^a

Servicios de ^aMicrobiología y ^bMedicina Preventiva. Hospital Universitario Son Dureta. Palma de Mallorca. Baleares. España.

INTRODUCCIÓN. El primer brote de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) en nuestro hospital se detectó en 1999. Recientemente se ha observado un incremento de la multirresistencia asociada a SARM, lo que ha motivado la realización de un estudio de epidemiología molecular para averiguar las bases de esta tendencia.

MÉTODOS. Se documentaron todos los pacientes con aislamiento de SARM en muestras clínicas ingresados entre julio de 2002 y junio de 2003. El perfil de sensibilidad antibiótica se determinó mediante difusión con discos. El estudio de epidemiología molecular se realizó por electroforesis de campo pulsado (PFGE). Se han comparado los resultados obtenidos con datos históricos de 1999-2000.

RESULTADOS. Se aisló SARM en 110 pacientes (30% de los pacientes con aislamiento de *S. aureus*). Mediante PFGE se detectaron tres clones mayoritarios (93% de pacientes). Estos clones estaban ya presentes en el estudio previo realizado en 1999-2000, aunque con un cambio en su distribución. Mientras que en 1999-2000 el mayoritario fue el clon A (clon A, 63%; clon B, 20%), actualmente ha sido desplazado por el clon B (clon B, 58%; clon A, 19%). Ninguno de los clones mayoritarios está relacionado con los cinco clones pandémicos (incluido el Ibérico) pero dos de ellos parecen relacionados con los dos clones más frecuentemente encontrados actualmente en España. El nuevo clon mayoritario presentó de forma uniforme resistencia a ciprofloxacino, eritromicina, clindamicina y gentamicina.

CONCLUSIÓN. En los últimos años se ha producido un desplazamiento de un clon de SARM inicialmente predominante por otro multirresistente no relacionado con el clon Ibérico.

Palabras clave: Epidemiología molecular. *Staphylococcus aureus*. Resistencia a la meticilina.

Consolidation of a *Staphylococcus aureus* multiresistant clone not related to the Iberian in a hospital from Mallorca

INTRODUCTION. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) was seldom isolated in our hospital until the first outbreak in 1999. A recently documented increase in antibiotic multiresistance in MRSA strains in our setting prompted the design of this molecular epidemiology study to investigate the basis for this tendency.

METHODS. All MRSA isolates from clinical samples of patients admitted from July 2002 to June 2003 were studied. Susceptibility testing was performed by disk diffusion. Clonal relatedness of MRSA isolates was determined by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Results were compared with data from MRSA isolates from patients admitted to the hospital in 1999-2000.

RESULTS. MRSA was isolated in 110 patients (30% of patients with *S. aureus*-positive cultures). PFGE detected three major clones (in 93% of patients), all of which had been present in 1999-2000, although in different proportions. Whereas the predominant clone in 1999 was clone A (clone A 63%, clone B 20%), clone B was now found to predominate (clone B 58%, clone A 19%). None of these major clones were related to the five pandemic clones, including the Iberian clone, but two of them seemed to be related to the two most prevalent clones in Spain at this time. The new predominant clone was more resistant than the others, and showed uniform resistance to ciprofloxacin, erythromycin, clindamycin, and gentamicin.

CONCLUSION. In recent years, a formerly predominant MRSA clone has been replaced by a multiresistant *S. aureus* clone that is unrelated to the Iberian clone.

Key words: Molecular epidemiology. *Staphylococcus aureus*. Methicillin resistance.

Introducción

En 1961, pocos meses después de la introducción de la meticilina en la práctica clínica, se detectaron en el Reino Unido las primeras cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (SARM)¹. A principios de la década de 1960, las cepas de SARM se diseminaron rápidamente a lo largo de varios hospitales europeos, y se

Correspondencia: Dr. E. Ruiz de Gopegui.
Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Son Dureta.
Andrea Doria, 55. 07014 Palma de Mallorca. Baleares. España.
Correo electrónico: eruiz@hsd.es

Manuscrito recibido el 29-7-2004; aceptado el 24-11-2004.

convirtieron, a partir de los años 1980, en uno de los principales patógenos responsables de infecciones nosocomiales, sobre todo en las unidades quirúrgicas o de cuidados intensivos^{2,3}.

En España, el primer brote intrahospitalario por este microorganismo se describió en 1981 en un hospital de San Sebastián^{4,5}. La mayoría de los brotes de SARM entre 1989-1995 estaban producidos por el llamado clon Ibérico, detectado por primera vez en el Hospital Universitario de Bellvitge de Barcelona en 1989⁶. Dicho clon se diseminó a otros países, como Portugal, Escocia, Italia, Bélgica, Alemania, y a un hospital de Nueva York^{7,8}. Las cepas de este clon se caracterizaron por presentar resistencia a múltiples grupos de antibióticos: macrólidos, tetraciclinas, aminoglicósidos y quinolonas, y ser sensibles a los glucopéptidos y al cotrimoxazol. A partir de mediados de la década de 1990, en el conjunto de España, ha ido disminuyendo el predominio del clon Ibérico, siendo sustituido por otros clones de SARM sensibles a más antibióticos, como muestran los datos de un reciente estudio de ámbito nacional realizado conjuntamente por el Grupo de Estudio de Infección Hospitalaria (GEIH), Grupo de Estudio de Mecanismos de Acción y Resistencia a Antimicrobianos (GEMARA) y la Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI)⁹.

En el Hospital Universitario Son Dureta de Palma de Mallorca, el SARM fue rara vez aislado hasta junio de 1999, cuando se detectó el primer brote de SARM, seguido de una epidemia moderada.

Recientemente se ha constatado un aumento en la frecuencia de cepas de SARM multirresistentes, lo que motivó la realización de un estudio de epidemiología molecular de los aislados recuperados en muestras clínicas de los pacientes ingresados en nuestro hospital entre el 1 de julio de 2002 y el 30 de junio de 2003. Además, los resultados obtenidos se han comparado con datos históricos de 1999-2000.

Métodos

El Hospital Son Dureta es un hospital terciario con aproximadamente 900 camas, de referencia para toda la Comunidad de las Islas Baleares. Está compuesto por dos pabellones de hospitalización separados, aunque situados en el mismo recinto: el hospital general y el hospital materno-infantil.

A partir de los registros microbiológicos se han documentado todos los pacientes con aislamiento de SARM en muestras clínicas que han ingresado en nuestro hospital entre el 1 de julio de 2002 hasta el 30 de junio de 2003. No se incluyeron en el estudio las cepas aisladas de cultivos de vigilancia del estado de portador (exudados nasales, axilares y/o inguinales). La identificación de los aislados de *S. aureus* se realizó por métodos convencionales¹⁰.

El perfil de sensibilidad antibiótica (oxacilina, penicilina, eritromicina, clindamicina, ciprofloxacino, gentamicina, cotrimoxazol, vancomicina, teicoplanina, rifampicina, mupirocina y ácido fusídico) se determinó mediante el método de difusión con discos (Rosco, Taastруп, Dinamarca) siguiendo los criterios del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)¹¹. Además, se realizó aglutinación con látex de los aislados de SARM para confirmar la presencia de PBP2' (Slidex MRSA Detection, bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia).

La relación clonal de los aislados de SARM se determinó mediante electroforesis en campo pulsado (PFGE), utilizando SmaI como enzima de restricción. La electroforesis se realizó utilizando el aparato Chef-DR® III (Bio-Rad, Richmond, EE.UU.) con las siguientes con-

TABLA 1. Distribución de los aislados de SARM por tipo de muestra

Tipo de muestra	Número (%)
Secreciones respiratorias	51 (46,4)
Exudados	36 (32,7)
Hemocultivo	19 (17,3)
Catéter	14 (12,7)
Líquidos estériles	7 (6,4)
PAAF, biopsia	3 (2,7)
Total	130 (100,0)

SARM: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina; PAAF: punción-aspiración por aguja fina.

diciones: pulso inicial de 1 s, pulso final de 30 s, tiempo de electroforesis 23 h a 6 V/cm. Los patrones de bandas de la PFGE se interpretaron según los criterios de Tenover¹². Como controles se utilizaron los clones de SARM predominantes en un estudio multicéntrico nacional P₁ y Q₁⁹ y los clones pandémicos Ibérico (ATTC BAA-44)⁷, Brasileño (ATTC BAA-43)¹³, Húngaro (ATTC-BAA 39)¹⁴, Nueva York/Japón (ATTC BAA-41)¹⁵ y Pediátrico (ATTC BAA-42)¹⁶. La cepa de *S. aureus* NCTC 8325¹² se utilizó como marcador de peso molecular.

Para el estudio comparativo se utilizó una colección de 161 cepas de SARM, previamente tipificadas, de pacientes ingresados en nuestro hospital durante los años 1999 y 2000 (datos no publicados). La nomenclatura de los clones de SARM de nuestro trabajo se basó en la utilizada en este estudio.

Resultados

Durante el período del estudio (julio de 2002-junio de 2003), el porcentaje de aislados de SARM en muestras clínicas con respecto al total de los aislados de *S. aureus* fue del 38%; este porcentaje descendió al 30% al referirlo al número de pacientes distintos con *S. aureus* en una muestra clínica. Se aisló SARM en 110 pacientes distintos: en 86 de ellos (78%) se detectó en una única muestra, mientras que en 24 (22%) se aisló en más de una. Las muestras más frecuentes fueron las secreciones respiratorias (51 pacientes; 46%), exudados (36 pacientes; 33%), hemocultivos (19 pacientes; 17%), y catéteres (14 pacientes; 13%) (tabla 1).

Mediante PFGE se detectaron tres clones mayoritarios denominados A, B y C, que comprendían el 93% de los pacientes, así como ocho clones minoritarios, cada uno de éstos en el único paciente. El clon A se encontró en 21 (19,1%) pacientes, el clon B en 63 (57,3%) pacientes y el clon C en 18 (16,4%) pacientes, cada uno de ellos con varios subtipos. El patrón de bandas del campo pulsado en los tres clones más frecuentes se muestra en la figura 1.

La distribución por servicios de los clones de SARM se resume en la figura 2. El clon B fue el más frecuente en pacientes de unidades de cuidados intensivos (76%) y de áreas quirúrgicas (69%), mientras que en los servicios médicos la frecuencia de los clones A y B fue similar.

Estos tres clones mayoritarios estaban ya presentes en el estudio previo de 1999-2000, aunque en menos de 2 años ha habido un importante cambio en su distribución. Mientras que en 1999-2000 predominaba el clon A (63% de los aislados), actualmente éste ha sido desplazado por el clon B (57% de los aislados) (fig. 3). Este desplazamiento coincide con un aumento del porcentaje de resistencia a

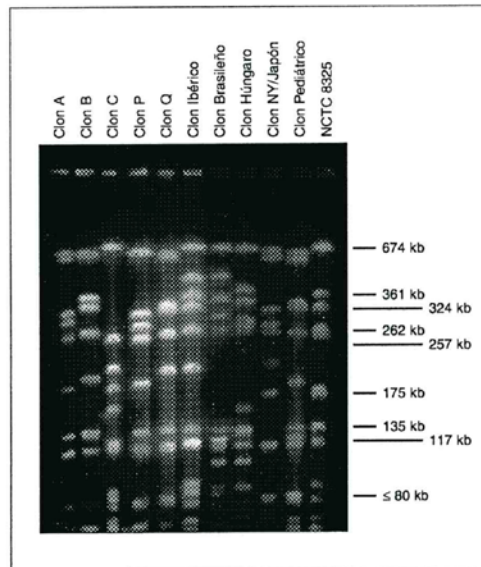
Ruiz de Gopegui E, et al. Consolidación de un clon multirresistente de *Staphylococcus aureus* no relacionado con el clon Ibérico en un hospital de Mallorca

Figura 1. Comparación de los patrones de macrorestricción con SmaI de los tres clones mayoritarios con diferentes clones de SARM representativos a nivel nacional y mundial. Carriles 1 a 11: clon A, clon B, clon C, clon P, clon Q, clon Ibérico, clon Brasileño, clon Húngaro, clon Nueva York/Japón, clon Pediátrico, *Staphylococcus aureus* NCTC 8325 (utilizado como marcador de peso molecular).

meticilina que pasó del 21% (por pacientes distintos) en el estudio previo (1999-2000) al 30% en el estudio actual (2002-2003).

Ninguno de los tres clones mayoritarios está aparentemente relacionado genéticamente con los cinco clones de SARM pandémicos descritos¹⁷: los clones Ibérico^{6,7}, Brasileño¹³, Húngaro¹⁴, Nueva York/Japón¹⁵ y Pediátrico¹⁶ (fig. 1). Asimismo, ninguno de los tres clones está directamente relacionado con los dos más frecuentemente encontrados en el estudio de ámbito nacional, aunque los clones A y B presentan cierta similitud con los clones P y Q, respectivamente.

La resistencia general de todos los aislados de SARM del estudio y de los tres clones mayoritarios se muestra en la tabla 2. Ninguna cepa de SARM fue resistente a la vancomicina, teicoplanina o rifampicina. Únicamente el 4,5% fueron resistentes a cotrimoxazol, mupirocina y a ácido fusídico. La mayoría fueron resistentes a ciprofloxacino (98%) y a eritromicina (90%). La resistencia a la gentamicina fue variable (61%). Con respecto a la clindamicina, 87 aislados (79%) presentaban una resistencia MLS_B (*macrolide, lincosamide, streptogramin B*) constitutiva, mientras que 11 (10%) mostraban un fenotipo MLS_B inducible, la mayoría de los cuales (10 de los 11) pertenecían al clon C. El nuevo clon mayoritario (clon B) fue significativamente más resistente que los otros, presentando de forma uniforme resistencia a la eritromicina, clindamicina, ciprofloxacino y gentamicina.

TABLA 2. Resistencia antibiótica general y por clones de los aislados de SARM

Antibiótico	Número de aislados de SARM resistentes (%)			
	SARM totales (n = 110)	Clon A (n = 21)	Clon B (n = 63)	Clon C (n = 18)
Eritromicina	99 (90)	15 (71)	62 (98)	16 (89)
Clindamicina				
MLS _B constitutivo	87 (79)	15 (71)	61 (97)	5 (28)
MLS _B inducible	11 (10)	0 (0)	1 (2)	10 (56)
Ciprofloxacino	108 (98)	21 (100)	63 (100)	18 (100)
Gentamicina	67 (61)	2 (10)	61 (97)	1 (6)
Cotrimoxazol	5 (5)	0 (0)	3 (5)	0 (0)
Vancomicina	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Rifampicina	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Mupirocina	5 (5)	2 (10)	3 (5)	0 (0)
Ácido fusídico	5 (5)	2 (10)	1 (2)	1 (6)

SARM: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina; MLS_B: *macrolide, lincosamide, streptogramin B*.

Discusión

Staphylococcus aureus resistente a la meticilina continúa siendo uno de los principales patógenos nosocomiales. Una vez que se introduce en el hospital, por lo general se llega a situaciones de endemicidad, a pesar de las medidas de control de la infección⁸. En los últimos años, el reservorio de SARM ha pasado de detectarse inicialmente en los grandes hospitales, a las residencias geriátricas y centros de larga estancia, suponiendo un riesgo de transmisión a la comunidad. Un estudio realizado por nuestro grupo en *S. aureus* procedentes de úlceras de decúbito de pacientes ingresados en una residencia geriátrica para la que nuestro hospital es el centro de referencia mostró el 70% de resistencia a la oxacilina en los aislados de *S. aureus*. El análisis de PFGE reveló, entre los 17 aislados de SARM de pacientes distintos, la presencia de cuatro clones, todos ellos encontrados también en pacientes ingresados en nuestro hospital¹⁸.

En el Hospital Son Dureta, el primer brote de SARM se detectó en junio de 1999, 10 años más tarde que en otros hospitales de Madrid y Barcelona. Inicialmente se aisló en pacientes ingresados en las unidades de cuidados intensivos y traumatología, extendiéndose después a la mayoría de las plantas del pabellón de hospitalización general. Curiosamente, hasta la fecha, no se ha encontrado ningún aislado de SARM en pacientes del pabellón materno-infantil. La situación epidémica inicial de nuestro hospital se transformó en una endemia moderada.

Durante el período del estudio (julio de 2002-junio de 2003), el porcentaje de SARM con respecto al total de los aislados de *S. aureus* fue del 38%, mientras que el porcentaje de SARM en relación al número de pacientes con aislamiento de *S. aureus* fue del 30%. Este porcentaje es superior al encontrado en 36 hospitales españoles en el año 2002 según el European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS)¹⁹, que fue del 23%, y también al del estudio español de los grupos GEIH/GEMARA/REIPI realizado en junio de 2003 en el que participaron 66 hospitales, con una frecuencia media de SARM del 21,8%²⁰. Nuestra tasa de SARM es similar a la encontrada en otros países mediterráneos como Italia (38%) y Francia (33%) y algo inferior a la del Reino Unido (44%)¹⁹.

Documento descargado de <http://www.doyma.cs> el 29/08/2007. Copia para uso personal, se prohíbe la transmisión de este documento por cualquier medio o formato.

Ruiz de Gopegui E, et al. Consolidación de un clon multirresistente de *Staphylococcus aureus* no relacionado con el clon Ibérico en un hospital de Mallorca

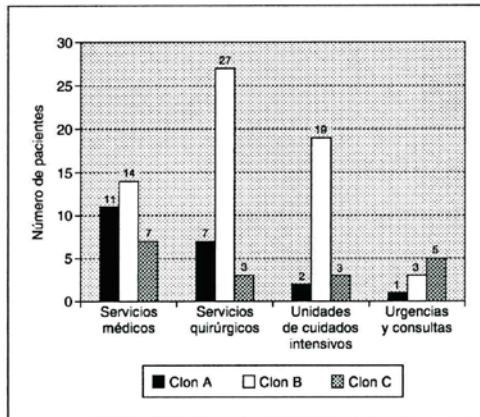


Figura 2. Distribución de los distintos clones de SARM del Hospital Universitario Son Dureta por servicios.

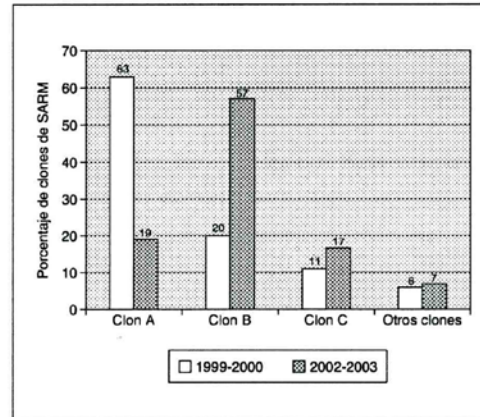


Figura 3. Comparación de la distribución de los clones de SARM del HUSD en los períodos 1999-2000 y 2002-2003.

En este trabajo, la gran mayoría de SARM (93%) detectados recientemente pertenecían únicamente a tres clones. En este sentido, concuerda con otros que señalan que las cepas de SARM hospitalarias corresponden a unos pocos clones. Así, por ejemplo, en un estudio realizado en más de 3.000 aislados de SARM procedentes de hospitales de Europa y América, casi el 70% de los aislados pertenecía a uno de los cinco clones pandémicos¹⁷. En otro trabajo realizado en 217 aislados de SARM de 12 hospitales de varios estados de Estados Unidos, el 79% pertenecía a dos únicos clones. Por último, en el estudio español de GEIH/GEMARA/REIPI el 80% de las cepas pertenecía a dos clones mayoritarios, que llamaron clon P y clon Q⁹.

En el estudio de la sensibilidad antibiótica, nuestros aislados tenían una alta resistencia al ciprofloxacino (98%), eritromicina (90%), clindamicina (79%) y gentamicina (61%). La resistencia a la mupirocina (5%) fue más baja que la informada en otros centros (22% en el estudio español⁹) probablemente debido al uso del ácido fusídico en vez de la mupirocina como primera elección en el tratamiento de la descontaminación de los portadores de SARM. La cifra de resistencia al ácido fusídico es baja (5%), pero se desconocen los datos de resistencia a este antibiótico a nivel nacional.

Si se comparan los resultados de 2002-2003 con el estudio previo de 1999-2000, se puede observar que en los últimos años se ha producido un acusado desplazamiento del clon inicialmente predominante (clon A) por otro con mayores resistencias asociadas (clon B). El nuevo clon mayoritario presenta resistencia uniforme al ciprofloxacino, eritromicina, clindamicina y especialmente a gentamicina, característica que le diferencia del resto de los clones mayoritarios en los que el porcentaje de resistencia a este antibiótico únicamente fue del 10 y del 6% para los clones A y C, respectivamente.

Ninguno de los tres clones mayoritarios está aparentemente relacionado genéticamente con los cinco clones de SARM pandémicos descritos. No obstante, si bien el clon C es completamente distinto del resto, los clones A y B de

este estudio presentan importantes similitudes con los clones P y Q, respectivamente (fig. 1), quizá reflejando la presencia de una línea ancestral común que debe evaluarse con técnicas con mayor capacidad para establecer relaciones clonales a largo plazo como el MLST (*multilocus sequence typing*). El clon C parece sin embargo mostrar un perfil de restricción similar al clon EMRSA-15 común en hospitales británicos²¹.

Mientras que la tendencia nacional es una clara disminución de las resistencias asociadas en las cepas de SARM⁹, en nuestro hospital ha ocurrido justamente lo contrario: el desplazamiento de un clon moderadamente resistente por otro multirresistente (no relacionado con el clon Ibérico) en un período de tiempo relativamente corto. Este desplazamiento determina el hecho preocupante de que las resistencias asociadas a SARM en nuestro medio sean muy superiores a la media nacional. En este sentido destacan las resistencias a la clindamicina y la gentamicina que doblan la media nacional (79% frente a 38% y 61% frente a 26% para la clindamicina y la gentamicina, respectivamente)⁹.

Agradecimientos

Agradecemos a la Dra. Herminia de Lencastre del Instituto de Tecnología Química e Biológica da Universidade Nova de Lisboa, Oeiras, Portugal y al Dr. Alexander Tomasz de The Rockefeller University, Nueva York, el envío de las cinco cepas de los clones pandémicos de SARM; y también a las Dras. M.ª Ángeles Domínguez y Carmen Borraz del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario de Bellvitge por el envío de las dos cepas de los clones P y Q. Este trabajo ha sido parcialmente financiado por la Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI) del Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS C03/014).

Bibliografía

1. Barber M. Methicillin-resistant *Staphylococci*. *J Clin Pathol* 1961;14:385-93.
2. Wenzel RP. The emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Ann Intern Med* 1982;97:440-2.

Documento descargado de <http://www.doyma.es> el 29/08/2007. Copia para uso personal, se prohíbe la transmisión de este documento por cualquier medio o formato.

Ruiz de Gopegui E, et al. Consolidación de un clon multirresistente de *Staphylococcus aureus* no relacionado con el clon Ibérico en un hospital de Mallorca

3. Voss A, Milatovic D, Wallrauch-Schwarz C, Rosdahl VT, Braveny I. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994;13:50-5.
4. Trallero EP, Arenzana JG, Castaneda AA, Grisolia LP. Unusual multiresistant *Staphylococcus aureus* in a newborn nursery. *Am J Dis Child* 1981; 135:689-92.
5. Pérez-Trallero E, García-Arenzana JM, Cilla-Eguiluz G, Cisterna-Cáncer R. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Spanish hospital. *Rev Infect Dis* 1988;10:627-8.
6. Domínguez MA, De Lencastre H, Liñares J, Tomasz A. Spread and maintenance of a dominant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone during an outbreak of MRSA disease in a Spanish hospital. *J Clin Microbiol* 1994;32:2061-7.
7. Sanches IS, Ramfrez M, Troni H, Abecassis M, Padua M, Tomasz A, et al. Evidence for the geographic spread of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone between Portugal and Spain. *J Clin Microbiol* 1995;33:1243-5.
8. Da Silva Coimbra MV, Silva-Carvalho MC, Wisplinghoff H, Hall GO, Tallent S, Wallace S, et al. Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a large geographic area of the United States. *J Hosp Infect* 2003; 53:103-10.
9. Domínguez MA, Borraz C, González MP, Rodríguez Baño J, Martín R y REIP/GIEM/GEMARA (Red Española de Investigación en Patología Infecciosa -REIPI-, y Grupos de Estudio de Infección Hospitalaria -GEIH- y de Mecanismos de Acción y Resistencia a Antimicrobianos -GEMARA- de la SEIMC. Sensibilidad antibiótica y características genotípicas de *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (SARM) en España (Proyecto SARM 2003 REIP/GIEM/GEMARA). XI Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Bilbao, 16-19 de mayo de 2004. Comunicación 218. p. 78-9.
10. Bannerman TL. *Staphylococcus, Micrococcus, and other catalase-positive cocci that grow aerobically*. En: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 8th ed. Washington: American Society for Microbiology, 2003; p. 391-2.
11. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). M2-A7 Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard. 7th ed. Wayne: Pennsylvania, 2002.
12. Tenover F, Arbeit R, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995;33:2233-9.
13. Aires de Sousa M, Sanches IS, Ferro ML, Vaz MJ, Saraiva Z, Tendeiro T, et al. Intercontinental spread of a multidrug-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone. *J Clin Microbiol* 1998;36:2590-6.
14. De Lencastre H, Severina EP, Milch H, Thege MK, Tomasz A. Wide geographic distribution of a unique methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone in Hungarian hospitals. *Clin Microbiol Infect* 1997;3:289-96.
15. Chung M, De Lencastre H, Matthews P, Tomasz A, Adamsson I, Aires de Sousa M, et al; Multilaboratory Project Collaborators. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis: comparison of results obtained in a multilaboratory effort using identical protocols and MRSA strains. *Microb Drug Resist* 2000;6:189-98.
16. Sa-Leao R, Santos Sanches I, Dias D, Peres I, Barros RM, De Lencastre H. Detection of an archaic clone of *Staphylococcus aureus* with low-level resistance to methicillin in a pediatric hospital in Portugal and in international samples: relics of a formerly widely disseminated strain? *J Clin Microbiol* 1999;37:1913-20.
17. Oliveira DC, Tomasz A, De Lencastre H. Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet Infect Dis* 2002;2:180-9.
18. Ruiz de Gopegui E, Oliver A, Ramírez A, Gutiérrez O, Andreu C, Pérez JL. Epidemiological relatedness of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from a tertiary hospital and a geriatric institution in Spain. *Clin Microbiol Infect* 2004;10:339-42.
19. European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS). Annual Report 2002. Disponible en: <http://www.earss.rivm.nl>.
20. Rodríguez-Baño J, Millán A, Domínguez MA, Almirante B, Cercenado E, Padilla B, et al, y grupo GEIH/GEMARA/REIPI. Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI), y Grupos de Estudio de Infección Hospitalaria (GEIH) y de Mecanismos de Acción y Resistencia a Antimicrobianos (GEMARA) de la SEIMC. *Staphylococcus aureus* en España: características clínicas y epidemiológicas (Proyecto SARM 2003 GEIH/GEMARA/REIPI). XI Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Bilbao, 16-19 de mayo de 2004. Comunicación 217; p. 78.
21. Murchan S, Kaufmann ME, Deplano A, De Ryck R, Struelens M, Zinn CE, et al. Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its application for tracing the spread of related strains. *J Clin Microbiol* 2003;41:1574-85.

ORIGINAL ARTICLE

10.1111/j.1469-0691.2007.01703.x

Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Majorcan hospitals: high prevalence of the epidemic clone EMRSA-15*E. Alcoceba*¹, *A. Mena*¹, *M. Cruz Pérez*², *E. Ruiz de Gopegui*¹, *E. Padilla*³, *J. Gil*¹, *A. Ramírez*¹, *C. Gallegos*², *A. Serra*³, *J. L. Pérez*¹ and *A. Oliver*¹¹Hospital Universitari Son Dureta, ²Hospital Son Llàtzer and ³Hospital Manacor, Mallorca, Balears, Spain

ABSTRACT

Clinical isolates ($n = 389$) of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) recovered from 371 patients between January 2003 and June 2004 at the three major public hospitals on the island of Majorca, Spain were studied. The clonal relatedness of MRSA isolates was determined by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) after digestion with *Sma*I. During the study period, MRSA was found in 31% of patients with *S. aureus*-positive cultures. PFGE analysis identified three predominant clones, affecting 94% of the patients. The three clones had been detected since 1999 in one hospital, and were designated as clones A, B and C. Whereas clones A and B (multidrug-resistant) were related to the two most prevalent clones in Spain at this time, clone C was identical to EMRSA-15, currently one of the most common MRSA clones in UK hospitals and also detected in other countries, but rarely in Spanish hospitals. This imported epidemic clone was detected in c. 10% of patients admitted to one of the three hospitals in 2002, but its prevalence has increased significantly (32% of the patients investigated in the three hospitals in the present study), and this clone also accounted for 44% of the isolates from non-hospitalised patients. Even though EMRSA-15 showed the least multidrug resistance of the three major clones, it was apparently more virulent, since it was associated significantly ($p < 0.001$) with bacteraemia, and positive blood cultures were documented for 21% of the patients infected by this clone, compared with only 10% and 7% of patients infected with clones A and B, respectively.

Keywords Clones, epidemiology, Majorca, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, pulsed-field gel electrophoresis, virulence

Original Submission: 30 August 2006; **Revised Submission:** 16 November 2006; **Accepted:** 19 December 2006

Clin Microbiol Infect 2007; **13**: 599–605

INTRODUCTION

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains were identified soon after the introduction of methicillin into clinical practice [1,2]. Since the first outbreaks of infection caused by MRSA in Europe during the early 1960s [3], this pathogen has spread worldwide, not only throughout the hospital environment, but also among community patients without exposure to healthcare systems. Furthermore, the incidence of MRSA is increasing, despite the development of infection control programmes in many countries. Molecular

epidemiology studies have shown that the current MRSA pandemic is the result of the global dissemination of a few highly successful clones [4,5].

In Spain, the first nosocomial outbreak of this pathogen was detected in 1981 [6,7], but MRSA was not a serious problem until the first outbreaks were detected in major Spanish cities at the end of 1989 [8,9]. Most MRSA outbreaks in Spain between 1989 and 1995 were caused by the 'Iberian' clone, which was first detected in 1989 in Barcelona [10], and which showed resistance to most antibiotic groups (i.e., macrolides, tetracyclines, aminoglycosides and quinolones). However, in the mid-1990s, this clone was progressively supplanted by other MRSA clones associated with less multidrug resistance [11,12]. A Spanish surveillance study performed in 2002

Corresponding author and reprint requests: E. Alcoceba, Servicio de Microbiología, Hospital Universitari Son Dureta, C. Andrea Doria No. 55, 07014 Palma de Mallorca, Spain
E-mail: eacruixent@hotmail.com

600 *Clinical Microbiology and Infection*, Volume 13 Number 6, June 2007

showed a progressive increase in the proportion of MRSA isolates (from 1.5% in 1986 to 31.2% in 2002), and an alarming number of methicillin-resistant isolates were recovered from outpatients; thus, while <5% of community-acquired *S. aureus* isolates in 1994 were methicillin-resistant, 17.8% were methicillin-resistant in 2002 [13].

The first MRSA outbreak on the island of Majorca was described in June 1999; since then the epidemiology of MRSA infections has changed in terms of both clinical and microbiological aspects. The aims of the present work were to analyse recent data concerning the molecular epidemiology and susceptibility of the different MRSA clonal types circulating in Majorcan hospitals, and to compare these results with those of previous local and national studies in Spain, in order to describe the evolution of the epidemiology of this pathogen on Majorca in recent years.

MATERIALS AND METHODS

Patients and clinical isolates

The study was carried out between January 2003 and June 2004 in the three main public hospitals that serve nearly all the population of the island of Majorca, Spain: Hospital Universitari Son Dureta (HUSD; 800 beds), which is the tertiary reference hospital of the Balearic Islands; Hospital Son Llàtzer (330 beds); and Hospital de Manacor (200 beds). Only the first clinical isolate of MRSA (isolates from colonisation studies were not included) from each patient was included in the molecular epidemiology study, except for 18 patients who were admitted to two different hospitals at different times, for whom the first isolate from each admission was included. Types of clinical sample and hospital wards were recorded for MRSA-positive patients. Isolates were identified as *S. aureus* by standard microbiological procedures [14].

Antimicrobial susceptibility testing

Susceptibilities to oxacillin, vancomycin, teicoplanin, ciprofloxacin, erythromycin, clindamycin, gentamicin, mupirocin, fusidic acid, rifampicin and trimethoprim-sulphamethoxazole were determined by disk-diffusion according to CLSI recommendations [15]. The breakpoints used for fusidic acid (susceptible (S) ≥ 28 mm, intermediately-susceptible (I) 24–27 mm, resistant (R) ≤ 23 mm) and mupirocin (S ≥ 14 mm, R ≤ 13 mm) were those recommended by the disk manufacturer (Rosco Diagnostica, Taastrup, Denmark). The classical phenotypes of macrolide-lincosamide-streptogramin B (MLS_B) resistance were defined as follows: constitutive (c)MLS_B, erythromycin- and clindamycin-resistant; inducible (i)MLS_B, erythromycin-resistant, with clindamycin resistance inducible by erythromycin (presence of antagonism between the two disks); M phenotype, erythromycin-resistant and clindamycin-susceptible (absence of antagonism).

Molecular epidemiology studies

All MRSA isolates were characterised by macrorestriction analysis of chromosomal DNA after *Sma*I digestion and separation of the fragments by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) using a CHEF-DR III contour-clamped homogeneous electric field apparatus (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA), programmed at 200 V (6 V/cm) for 23 h, with switching times ramped from 1 to 3 s. DNA fragments were visualised by staining with ethidium bromide and photographed under UV illumination, and were then interpreted following criteria recommended previously [16]. Control MRSA strains comprised: the three major clones (designated A, B and C) detected in previous studies at HUSD [17]; the two predominant MRSA clones, designated P₁ and Q₁, found in a multicentre Spanish study in 2004 [12]; the pandemic Iberian clone (ATCC BAA-44) [18]; the Brazilian clone (ATCC BAA-43) [19]; the Hungarian clone (ATCC BAA-39) [20]; the New York-Japan clone (ATCC BAA-41) [21]; the paediatric clone (ATCC BAA-42) [22]; and two isolates of EMRSA-15 (DEN4561 and HAR22) [23,24]. The reference strain *S. aureus* NCTC 8325 [16] was used as a molecular size standard to normalise the PFGE profiles. The nomenclature for MRSA clones in the present study was based on that established for previous collections [17].

Data analysis

Statistical analysis of the categorical variables was performed using Fisher's exact test and SPSS software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), with $p < 0.05$ considered to be statistically significant.

RESULTS

During the period of the study, 389 sequential MRSA isolates (202 from HUSD, 154 from Hospital Son Llàtzer, 33 from Hospital de Manacor) were recovered from 371 patients in the three participating hospitals, representing 31% of the patients with *S. aureus*-positive cultures. For 170 (46%) of the 371 patients, MRSA was isolated from only one sample type, whereas it was isolated from two or more sample types for 201 (54%) patients. The most frequent source of MRSA was exudates, mainly wound infections, ulcers and abscesses (49% of the patients), followed by the respiratory tract (37%). MRSA-positive blood cultures and intravenous catheters were documented for 14% and 7% of the patients, respectively.

Analysis of the PFGE patterns of the 389 MRSA isolates revealed that 366 (94%) belonged to three main clonal types (A, B and C) (Fig. 1). The remaining 23 (6%) MRSA isolates had different PFGE patterns, each being detected in <1.5% of the patients, and were therefore considered to be sporadic clones. Clone A accounted for 132 (34%) isolates, clone B for 109 (28%) isolates, and clone

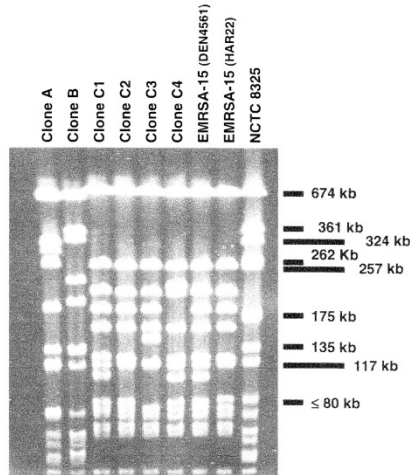


Fig. 1. *Smal* macrorestriction patterns of clone A, clone B and the four subtypes of clone C (C1–C4). Two isolates of EMRSA-15 are included for comparison. Reference strain NCTC 8325 was used as the molecular size standard.

Table 1. Distribution of the major methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clones, grouped according to the hospital, hospital department and source of isolation

	Total MRSA n (%)	Clone A n (%)	Clone B n (%)	Clone C n (%)	Others n (%)
Overall	389 (100)	132 (34)	109 (28)	125 (32)	23 (6)
Hospital					
HUSD	202 (52)	63 (31)	70 (35)	57 (28)	12 (6)
Son Llàtzer	154 (40)	64 (42)	34 (22)	51 (33)	5 (3)
Manacor	33 (8)	5 (15)	5 (15)	17 (52)	6 (18)
Department ^a					
Medical wards	182 (46)	69 (38)	42 (23)	61 (33)	10 (6)
Surgical wards	75 (19)	22 (29)	30 (40)	17 (23)	6 (8)
ICU	43 (11)	14 (32)	18 (42)	11 (26)	0 (0)
Non-hospitalised	66 (16)	17 (26)	14 (21)	29 (44)	6 (9)
Source of isolation ^b					
Blood	51 (13)	13 (25)	8 (15)	27 (52)	3 (5)
Respiratory tract	137 (35)	53 (38)	43 (31)	36 (26)	4 (2)
Exudates	190 (48)	61 (32)	53 (27)	64 (33)	12 (6)

^aData for isolates from other or unknown departments (n = 23) and sources of isolation (n = 11) not shown.
^bHUSD, Hospital Universitari Son Dureta; ICU, intensive care unit.

C for 125 (32%) isolates (Table 1). These major clones were not related to any of the five previously described pandemic clones, including the Iberian clone, but clones A and B have been shown previously to be related to the two most prevalent clones (clones P₁ and Q₁) found in Spain at the present time. Clone C had a PFGE

pattern identical to that of the EMRSA-15 epidemic clone (Fig. 1). Four subtypes of this clone (C1–C4) were detected (Fig. 1); the C1 subtype showed a PFGE pattern identical to that of one of the known EMRSA-15 control isolates (DEN4561), and the C2 subtype was identical to the other control isolate (HAR22).

All three major clones were detected in all three participating hospitals, although with slight differences among the different institutions (Table 1). In HUSD, the most frequent clone was clone B, isolated from 35% of patients with MRSA-positive cultures (p 0.002 compared with the other hospitals, 21%). In contrast, clone A, detected in 42% of patients, was the most frequent clone in Hospital Son Llàtzer (p <0.001 compared with the other hospitals, 29%), and clone C (52%) was the most frequent clone in Hospital Manacor (p <0.001 compared with the other hospitals, 30%).

Several interesting differences were observed when the distributions of MRSA clones from patients on different wards were compared (Table 1). The prevalence of MRSA clone B was significantly higher among patients admitted to intensive care units (ICUs) and surgical wards, being isolated from 42% of all patients with MRSA-positive cultures in ICUs, compared with 26% in non-ICU wards (p 0.003), and from 40% of all patients with MRSA-positive cultures in surgical units (p <0.001). No significant differences were observed in terms of the distribution of clone B in the ICUs of the three participating hospitals, although most (93%) MRSA isolates from ICUs were recovered from just two hospitals. Moreover, the overall high prevalence (47%) of clone B among patients in surgical wards was caused largely by the contribution from a single hospital.

In contrast, clone C (EMRSA-15) was isolated more frequently from non-hospitalised patients (emergency room and outpatient departments), being isolated from 44% of patients with MRSA-positive cultures in these departments, compared with 30% of hospitalised patients (p <0.001), suggesting that this clone is widespread in the community.

Interesting differences were also observed when the different sources of infection were compared (Table 1). Remarkably, the proportion of clone C (EMRSA-15) among blood specimens (52%) was significantly higher (p <0.001) than among other specimens (29%). Moreover, positive

602 *Clinical Microbiology and Infection*, Volume 13 Number 6, June 2007

Table 2. Antibiotic resistance rates among 389 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates from Majorca, Spain

Antibiotic	Total MRSA (n = 389) n (%)	Clone A (n = 132) n (%)	Clone B (n = 109) n (%)	Clone C (n = 125) n (%)	Others (n = 23) n (%)
Ciprofloxacin	373 (96)	128 (97)	109 (100)	122 (98)	14 (61)
Gentamicin	128 (33)	17 (13)	101 (93)	6 (5)	4 (17)
Trimethoprim-sulphamethoxazole	4 (1%)	0	3 (3%)	0	1 (4%)
Vancomycin	0	0	0	0	0
Teicoplanin	0	0	0	0	0
Rifampicin	9 (2)	5 (4)	3 (3)	1 (1)	0
Mupirocin	21 (5)	10 (8)	11 (10)	0	0
Fusidic acid	16 (4)	6 (4)	2 (2)	7 (6)	1 (4)
Erythromycin	272 (70)	83 (63)	104 (95)	75 (60)	10 (43)
Clindamycin					
cMLS _B	212 (55)	78 (59)	100 (92)	25 (20)	9 (39)
iMLS _B	60 (15)	5 (4)	4 (4)	50 (40)	1 (4)

cMLS_B, constitutive macrolide-licosamide-streptogramin B (MLS_B) resistance; iMLS_B, inducible MLS_B resistance.

blood cultures were documented for 21% of the patients who were positive for this clone, compared with 9% of patients positive for other clones ($p < 0.001$). The percentages of patients with positive blood cultures who were infected by the two other major clones (A or B) were only 10% and 7%, respectively.

Table 2 shows the antimicrobial resistance rates among all 389 MRSA isolates, as well as for the different clonal types. Overall, the MRSA isolates were uniformly susceptible to vancomycin and teicoplanin, and showed low rates of resistance to mupirocin (5%), fusidic acid (4%), rifampicin (2%) and trimethoprim-sulphamethoxazole (1%). However, since disk-diffusion was used to test susceptibility, the presence of isolates with low-level glycopeptide resistance cannot be ruled out. Most (96%) isolates were resistant to ciprofloxacin, whereas resistance to erythromycin (70%), clindamycin (55% with cMLS_B; 15% with iMLS_B) and gentamicin (33%) was more variable. Clone B was associated with the highest rates of multi-resistance, showing 100% resistance to ciprofloxacin ($p < 0.004$ compared with other clones), 95% to erythromycin ($p < 0.001$), 92% to clindamycin, plus an additional 3% with the iMLS_B phenotype ($p < 0.001$), and 93% to gentamicin ($p < 0.001$). In contrast, clone C (EMRSA-15) showed the lowest rates of multi-resistance among the three major clones, and a significantly lower level (5%) of resistance to gentamicin ($p < 0.001$). Interestingly, clone C frequently showed the iMLS_B phenotype (40% of all clone C isolates, including 67% of those resistant to erythromycin), whereas this phenotype was infrequent among

the other clonal types (4% of all the non-clone C isolates, including 5% of those resistant to erythromycin) ($p < 0.001$).

DISCUSSION

During the last four decades, methicillin resistance in *S. aureus* has been a problem of global dimensions, affecting mainly hospitalised patients, although MRSA has also emerged as a community-acquired pathogen in recent years. The prevalence of MRSA in Europe follows a north-to-south gradient, being lowest in Scandinavian countries (<2%) and highest in southern Europe, e.g., Greece, Italy, France, Spain and Portugal (30–60%) [25]. In Spain, the prevalence of MRSA has increased continuously since 1986 (1.5%), reaching 31% in 2002 [13]. Also, as in other countries, MRSA infections originating in the community are no longer infrequent, accounting for 18% of community-acquired *S. aureus* infections during 2002 [13].

Although the prevalence (31%) of MRSA revealed in Majorcan hospitals by this study is very similar to that reported in the rest of Spain, the molecular studies revealed remarkable differences concerning the epidemiology of this pathogen on the island. In addition to the two predominant MRSA clones found in Spanish hospitals, a high prevalence (32%) of the epidemic clone EMRSA-15 was found. Clone C, now classified as EMRSA-15, was already present in Majorca in 1999 (10% of MRSA-positive patients), but its prevalence has increased dramatically in recent years, so that it accounted for almost one-third of patients with MRSA who attended Majorcan hospitals in the present study. EMRSA-15 is the most frequent clone isolated in UK hospitals [26], and has also been detected in Germany [27], Finland, Sweden, Belgium [28], Portugal [29], Australia [30] and New Zealand [31]. This clone was reported for the first time in Spain at a teaching hospital in Tenerife (Canary Islands) [32], but the overall prevalence of EMRSA-15 in Spanish hospitals was found to be low (0.7%) in a large study involving >2000 MRSA isolates recovered between 1996 and 2002 from 110 Spanish hospitals [11].

The differential high prevalence of EMRSA-15 in Majorcan hospitals may be linked to the fact that the island is a frequent tourism destination (as is the Canary Islands) for individuals from countries with a high prevalence of this clone,

which perhaps highlights the importance of travel in the international spread of multiresistant pathogens. The prevalence of EMRSA-15 was even higher among non-hospitalised patients (44% vs. 30%), suggesting that, particularly for this clone, the flux was mainly from the community to the hospital setting, and not the other way around (as might be expected). The increase in MRSA infections in healthcare institutions other than hospitals could also contribute to this inverted flux. A study of patients with decubitus ulcers in a geriatric institution in Majorca between January 2000 and June 2002 revealed a very high prevalence of MRSA (70%), and the proportion of clone C (EMRSA-15) was already high (30%) during that period compared with 10% in the hospital setting [33].

A further interesting finding associated with EMRSA-15 is that, despite showing the lowest frequency of multidrug resistance among the three major clones, it was apparently more virulent, since it was associated significantly with bacteraemia. Positive blood cultures were documented for 21% of the patients infected by this clone, compared with <10% for the other major clones. Analysis of the interplay among pathogenicity, epidemicity and antibiotic resistance is a key element in understanding the evolution of microbial pathogens [34]. Several lines of evidence support the hypothesis of an inverse relationship between antibiotic resistance and epidemicity and pathogenicity in MRSA. Displacement of multidrug-resistant MRSA clones by more susceptible lineages has been described in recent years and, particularly for gentamicin resistance, has been found to be linked with increased fitness of the susceptible lineages and a reduction in the use of gentamicin [12,35–38]. The type of staphylococcal chromosomal cassette (SCC) *mec* complex could also play a role, since the SCC*mec*IV type showing the most efficient dissemination (SCC*mec*IV) is also associated with reduced antimicrobial resistance [39,40]. Both gentamicin susceptibility (as shown in this study) and the presence of SCC*mec*IV [5] are characteristics of EMRSA-15. Nevertheless, the possible association between EMRSA-15 and bacteraemia, and whether this is related to reduced antimicrobial resistance, needs to be confirmed in clinical studies designed with this specific aim. There are important clinical implications, in that bacteraemia caused by MRSA is

associated with increased mortality compared with that caused by methicillin-susceptible strains [41].

In conclusion, widespread dissemination of the epidemic EMRSA-15 clone was found throughout Majorca, and this clearly differs from the situation documented in mainland Spanish hospitals. In addition, a statistically significant association was found between this clone and lower antimicrobial resistance rates, non-hospitalised patients and bacteraemia.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to H. de Lencastre and A. Tomasz for providing the five pandemic MRSA clones and the two isolates of the EMRSA-15 clone, and to M. Á. Domínguez and C. Borraz for the control strains of clones P and Q. We would also like to thank A. Vindel for sharing unpublished information concerning the epidemiology of MRSA in Spain. This work was supported, in part, by the Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI) from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS C03/014), Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain.

REFERENCES

1. Barber M. Methicillin resistant staphylococci. *J Clin Pathol* 1961; **14**: 385–393.
2. Jevons MP. 'Celbenin'-resistant staphylococci. *BMJ* 1961; **i**: 124–125.
3. Stewart GT, Holt RJ. Evolution of natural resistance to the newer penicillins. *BMJ* 1963; **i**: 308–311.
4. Oliveira DC, Tomasz A, de Lencastre H. Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet Infect Dis* 2002; **2**: 180–189.
5. Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 7687–7692.
6. Pérez-Trallero E, García-Arenzana J, Castañeda AA, Grisolia LP. Unusual multiresistant *Staphylococcus aureus* in a newborn nursery. *Am J Dis Child* 1981; **135**: 689–692.
7. Pérez-Trallero E, García Arenzana JM, Cilla-Eguituz G, Cisterna-Cáncer R. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Spanish hospital. *Rev Infect Dis* 1988; **10**: 627–628.
8. Parras F, Rodríguez M, Bouza E *et al.* Epidemic outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a general hospital. Preliminary report. *Enferm Inf Microb Clin* 1991; **9**: 200–207.
9. Trilla A, Marco F, Moreno A *et al.* Clinical epidemiology of an outbreak of nosocomial infection caused by *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin and aminoglycosides: efficacy of control measures. *Med Clin (Barc)* 1993; **100**: 205–209.
10. Domínguez MA, De Lencastre H, Liñares J, Tomasz A. Spread and maintenance of a dominant methicillin-

604 *Clinical Microbiology and Infection*, Volume 13 Number 6, June 2007

- resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone during an outbreak of MRSA disease in a Spanish hospital. *J Clin Microbiol* 1994; **32**: 2081–2087.
11. Vindel A, Trincado P, Gómez E *et al*. Prevalence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Spanish hospitals between 1996 and 2002. *J Clin Microbiol* 2006; **44**: 266–270.
 12. Domínguez MA, Borraz C, González MP *et al*. Sensibilidad antibiótica y características genotípicas de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (SARM) en España (Proyecto SARM 2003 REIPI/GEIH/GEMARA). *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004; **22** (suppl 1): 78–79.
 13. Cuevas O, Cercenado E, Vindel A *et al*. Evolution of the antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. in Spain: five nationwide prevalence studies, 1986–2002. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 4240–4245.
 14. Kloos WE, Bannerman TL. *Staphylococcus* and *Micrococcus* spp. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, eds. *Manual of clinical microbiology*, 7th edn. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1999; 264–282.
 15. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests*, approved standard M2-A9. Wayne, PA: CLSI, 2006.
 16. Tenover F, Arbeit R, Goering RV *et al*. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; **33**: 2233–2239.
 17. Ruiz de Gopegui E, Oliver A, Galmés MI, Hidalgo O, Pérez JL. Consolidación de un clon multiresistente de *Staphylococcus aureus* no relacionado con el clon Ibérico en un hospital de Mallorca. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2005; **23**: 140–144.
 18. Sanches IS, Ramírez M, Troni H *et al*. Evidence for the geographic spread of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone between Portugal and Spain. *J Clin Microbiol* 1995; **33**: 1243–1246.
 19. Aires de Sousa M, Sanches IS, Ferro ML *et al*. Intercontinental spread of a multidrug-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone. *J Clin Microbiol* 1998; **36**: 2590–2596.
 20. De Lencastre H, Severina EP, Milch H, Thege MK, Tomasz A. Wide geographic distribution of a unique methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone in Hungarian hospitals. *Clin Microbiol Infect* 1997; **3**: 289–296.
 21. De Lencastre H, Severina EP, Roberts RB, Kreiswirth BN, Tomasz A. Testing the efficacy of a molecular surveillance network: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VREF) genotypes in six hospitals in the metropolitan New York City area. The BARG Initiative Pilot Study Group. Bacterial Antibiotic Resistance Group. *Microb Drug Resist* 1996; **2**: 343–351.
 22. Sa-Leao R, Santos Sánchez I, Dias D, Peres I, Barros RM, De Lencastre H. Detection of an archaic clone of *Staphylococcus aureus* with low-level resistance to methicillin in a paediatric hospital in Portugal and in international samples: relics of a formerly widely disseminated strain? *J Clin Microbiol* 1999; **37**: 1913–1920.
 23. Richardson JF, Reith S. Characterization of a strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (EMRSA-15) by conventional and molecular methods. *J Hosp Infect* 1993; **25**: 45–52.
 24. Gomes AR, Vinga S, Zavolan M, De Lencastre H. Analysis of the genetic variability of virulence-related loci in epidemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 366–379.
 25. Stefani S, Varaldo PE. Epidemiology of methicillin-resistant staphylococci in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2003; **9**: 1179–1186.
 26. Johnson AP, Aucken HM, Cavendish S *et al*. Dominance of EMRSA-15 and -16 among MRSA causing nosocomial bacteraemia in the UK: analysis of isolates from the European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS). *J Antimicrob Chemother* 2001; **48**: 143–144.
 27. Witte W, Enright M, Schmitz FJ, Cuny C, Braulke C, Heuk D. Characteristics of new epidemic MRSA in Germany ancestral to United Kingdom EMRSA-15. *Int J Med Microbiol* 2001; **290**: 677–682.
 28. Denis O, Deplano A, Nonhoff C *et al*. National surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Belgian hospitals indicates rapid diversification of epidemic clones. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 3625–3629.
 29. Aires de Sousa M, Conceição T, Simas S, De Lencastre H. Comparison of genetic backgrounds of methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* isolates from Portuguese hospitals and the community. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 5150–5157.
 30. Pearman JW, Coombs GW, Grubb WB, O'Brien F. A British epidemic strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (UK EMRSA-15) in Western Australia. *Med J Aust* 2001; **174**: 662.
 31. Briggs S, McGuinness C, Foster M, Roberts S. A reservoir for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the Auckland community? *NZ Med J* 2002; **115**: U182.
 32. Pérez-Roth E, Lorenzo-Díaz F, Batista N, Moreno A, Méndez-Álvarez S. Tracking methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones during a 5-year period (1998–2002) in a Spanish hospital. *J Clin Microbiol* 2004; **42**: 4649–4656.
 33. Ruiz de Gopegui E, Oliver A, Ramírez A, Gutiérrez O, Andreu C, Pérez JL. Epidemiological relatedness of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from a tertiary hospital and a geriatric institution in Spain. *Clin Microbiol Infect* 2004; **10**: 339–342.
 34. Martínez JL, Baquero F. Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. *Clin Microbiol Rev* 2002; **15**: 647–679.
 35. Oteo J, Baquero F, Vindel A, Campos J *et al*. Antibiotic resistance in 3113 blood isolates of *Staphylococcus aureus* in 40 Spanish hospitals participating in the European Antimicrobial Resistance Surveillance System (2000–2002). *J Antimicrob Chemother* 2004; **53**: 1033–1038.
 36. Frédéric L, Lelièvre H, Cornu M *et al*. Fitness and competitive growth advantage of new gentamicin-susceptible MRSA clones spreading in French hospitals. *J Antimicrob Chemother* 2001; **47**: 277–283.
 37. Sopena N, García-Núñez M, Prats R *et al*. Appearance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) sensitive to gentamicin in a hospital with a previous endemic distinct MRSA. *Eur J Epidemiol* 2001; **17**: 317–321.
 38. Asensio A, Cantón R, Vaqué J *et al*. Antimicrobial use in Spanish hospitals (EPINE, 1990–1999). *Med Clin (Barc)* 2002; **118**: 731–736.

Alcoceba *et al.*. MRSA in Majorcan hospitals 605

39. Okuma K, Iakawa K, Turnidge JD *et al.* Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community. *J Clin Microbiol* 2002; **40**: 4289–4294.
40. Baba T, Takeuchi F, Kuroda M *et al.* Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet* 2002; **359**: 1819–1827.
41. Cosgrove S, Sakoulas G, Perencevich E, Schwaber M, Karchmer A, Carmeli Y. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2003; **36**: 53–59.

ORIGINAL ARTICLE

10.1111/j.1469-0691.2008.02060.x

Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and factors associated with colonization among residents in community long-term-care facilities in Spain

A. Manzur¹, L. Gavalda², E. Ruiz de Gopegui³, D. Mariscal⁴, M. A. Dominguez⁵, J. L. Perez³, F. Segura⁶, M. Pujol¹ and the group of the Spanish Network for Research in Infectious Diseases*

¹Infectious Diseases Service, ²Preventive Medicine, Hospital Universitari de Bellvitge, Barcelona,

³Microbiology Service Hospital Universitari Son Dureta, Balearic Islands, ⁴Microbiology Service Corporació Sanitària Parc Tauli, Barcelona, ⁵Microbiology Service Hospital, Universitari de Bellvitge, Barcelona and ⁶Infectious Diseases Service, Corporació Sanitària Parc Tauli, Barcelona, Spain

ABSTRACT

Hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains are no longer limited to acute-care hospitals but have now spread to other healthcare settings such as long-term-care facilities (LTCFs), in most of which they are endemic. In Europe, few studies have addressed the MRSA situation in LTCFs. A cross-sectional study to determine MRSA prevalence and factors associated with *S. aureus* carriage in community LTCF residents is reported here. Nasal and decubitus ulcer cultures were performed for residents of nine community LTCFs. Residents were classified as MRSA carriers, methicillin-susceptible *S. aureus* carriers and non-carriers. Overall, 1377 nasal swabs and 82 decubitus ulcer cultures were performed. MRSA was isolated from 15.5% and 59.0% of the former and latter, respectively. The prevalence of MRSA colonization was 16.8% (95% CI 14.9–18.8), varying from 6.7% to 35.8% ($p < 0.001$) among LTCFs. Several independent variables were related to MRSA colonization. It is noteworthy that residents in an LTCF with fewer than 150 beds had at least a two-fold higher probability of being MRSA carriers. Modifiable factors were medical devices, decubitus ulcers and previous antibiotic treatment. An age of 85 years or older, a Charlson index ≥ 2 and transfer from an acute-care facility were non-modifiable factors also related to MRSA colonization. A high MRSA prevalence among residents in community LTCFs in Spain, with great variability among facilities, was found. The factors identified as being associated with MRSA colonization could be prevented by the implementation of several measures. Control strategies need to be coordinated between LTCFs and acute-care hospitals.

Keywords Epidemiology, geriatrics, long-term care, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA

Original Submission: 1 October 2007; **Revised Submission:** 5 December 2007; **Accepted:** 4 April 2008

Edited by J. Van Eldere

Clin Microbiol Infect 2008; **14**: 867–872

INTRODUCTION

The introduction and successful dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

in acute-care hospitals in Spain was reported two decades ago [1,2], and it has become the major problem related to multiresistant microorganisms in the healthcare system. Furthermore, MRSA strains have spread into facilities related to the healthcare setting, such as long-term-care facilities (LTCFs), and are endemic in the majority of them [3,4]. Control measures to limit MRSA spread in LTCFs are controversial [5]. Most studies on the prevalence of MRSA colonization in LTCFs have been performed in Veterans' Affairs facilities in the USA; however, the epidemiology of MRSA in community LTCFs should be differentiated from those facilities [6]. In Europe, some studies have

Corresponding author and reprint requests: A. Manzur, Infectious Disease Service, Hospital Universitari de Bellvitge, Feixa Llargà s/n. L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona 08907, Spain
E-mail: admanzur@yahoo.com.ar

*Members of the Spanish Network for Research in Infectious Diseases who participated in the study: R. Fernández, D. Herrero, R. Casas, F. Eulalia, M. Bota, R. Iniesta, J. Alburquerque, C. Andreu, E. Campos, M. Vaquero, E. Antón, J. Trelis, A. Esteve, M. Canals, A. Diaz, E. Penelo, J. Ariza, and F. Gudiol.

868 *Clinical Microbiology and Infection*, Volume 14 Number 9, September 2008

recently evaluated the prevalence of MRSA colonization in these facilities [7–10]. In Spain, only a few studies have addressed the interaction of MRSA strains between hospitals and other health-care facilities [11–14]. An interesting finding is that patients with *S. aureus* bloodstream infection diagnosed at hospital admission following referral from an LTCF were associated with the presence of methicillin resistance [14]. Patients in whom MRSA carriage acquired during a previous hospital admission or stay in a LTCF was persistent were found to be at high risk of MRSA infection, although a low prevalence of these infections has been reported in LTCF residents [15,16]. Transfer of patients from acute-care hospitals to LTCFs is often delayed because of MRSA carriage. To determine the extent of this situation, a cross-sectional study was conducted in a large number of residents in community LTCFs for the elderly. The aims were to determine the prevalence of MRSA colonization and to define factors associated with *S. aureus* carriage in this population.

MATERIALS AND METHODS

Study design

This was a cross-sectional prevalence survey.

Study population and characteristics of community LTCFs

The study was performed in November 2005, in residents of community LTCFs for the elderly, located in two communities in Spain (Catalonia and the Balearic Islands).

Nine LTCFs with a total of 1586 beds (median 120; range 72–552 beds) were included in the study. Five of these are allocated to the geographical area of influence of a 900-bed acute-care hospital (Hospital Universitari de Bellvitge), three to that of a 490-bed hospital (Corporació Sanitària Parc Taulí) and one to that of an 800-bed acute-care hospital (Hospital Universitari Son Dureta). These facilities provide care for elderly permanent residents who may be disabled or infirm. All of these facilities have their own medical services, and most include a dementia ward. Residents are accommodated in rooms with one, two or three beds.

These LTCFs do not use active surveillance cultures to detect MRSA carriage, and decolonization procedures are not routinely performed. All facilities take standard precautions for patient care, and contact precautionary measures are occasionally applied for those patients colonized or infected by MRSA. A common policy of all the facilities is that known MRSA carriers are not denied admission.

Data collected

Medical charts were reviewed for basic clinical and epidemiological information. The following data were obtained for all residents: age, sex, facility and date of admission, underlying

diseases (Charlson index) [17], functional status (Barthel index) [18], prior MRSA isolation, presence of decubitus ulcers, previous antibiotic treatment in the last 3 months, use of invasive devices (peripheral venous catheter, nasogastric tube and urinary catheter) in the last 7 days, and the presence of current infections.

Microbiological methods

To assess MRSA colonization, samples for cultures were obtained from anterior nares and third-degree or higher-degree decubitus ulcers, when applicable. These areas were swabbed with sterile cotton-tipped applicator sticks, which were immediately placed into Stuart transport medium. Nasal and decubitus ulcer swabs were first plated onto coagulase-mannitol agar plates and selective MRSA agar medium (MRSA Select; Bio-Rad Laboratories, Madrid, Spain). Swabs were then inoculated into staphylococcal enrichment broth composed of brain-heart infusion plus 7% NaCl. After 24 h of incubation at 35°C, the broth was subcultured onto coagulase-mannitol and MRSA Select plates. All plates were incubated for 48 h and inspected daily. Suspected *S. aureus* colonies were identified by the latex agglutination test (Pastorex® Staph-plus; Bio-Rad Laboratories) and DNase production (DNase Test Agar; Biomedics, Madrid, Spain). Methicillin resistance was determined by the ceftioxin disk diffusion method following CLSI recommendations. Testing for antimicrobial susceptibility to penicillin, oxacillin, ceftioxin, erythromycin, clindamycin, gentamicin, tobramycin, rifampin, tetracycline, trimethoprim-sulphamethoxazole, chloramphenicol, ciprofloxacin, vancomycin, teicoplanin, mupirocin, fusidic acid, quinupristin-dalfopristin and linezolid was performed by the disk diffusion method. [19].

Statistical analysis

For the purpose of this study and on the basis of the results, residents were classified as MRSA carriers, methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) carriers and non-carriers. Following the methodology suggested by Harris *et al.* [20], two separate analyses were performed to compare, first, MSSA carriers with non-carriers, and second, MRSA carriers with non-carriers. Results were interpreted as follows: significant variables in the former analysis were considered to represent unique factors associated with MSSA colonization, and those in the second were considered to be factors associated with MRSA colonization. Variables with statistical significance in both analyses were considered to be factors related to *S. aureus* carriage.

Categorical variables were analyzed with chi-square tests or Fisher's exact test, as appropriate. Continuous variables were analyzed with Student's *t*-test or non-parametric tests. Variables associated with MRSA carriage with a probability equal to or less than 0.1 were further examined using advanced multivariable logistic regression modelling. All statistical tests were two-tailed, and *p*-values <0.05 were considered to be significant. *spss* package version 12.0 was used.

Approval for the study was obtained from the Research Ethics Committee of the Hospital Universitari Bellvitge. No written informed consent was obtained, because the study met the criteria for a waiver of this requirement.

Table 1. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) colonization and clinical characteristics of residents in different community long-term-care facilities included in the study

	Centres (number of beds)									Total (1586)
	1 (220)	2 (120)	3 (552)	4 (72)	5 (101)	6 (94)	7 (121)	8 (124)	9 (182)	
Residents, n	195	115	466	72	95	89	109	73	163	1377
Male sex (%)	35.4	21.7	31.8	18.1	22.1	15.7	39.4	26.0	25.8	28.6
Mean age (years)	76.1	82.9	82.2	83.9	83.2	83.9	77.2	83.0	81.3	81.2
Charlson index ≥ 2	73.1	47.0	35.2	47.2	67.4	58.0	70.4	40.3	66.7	52.8
Barthel index < 30	55.4	23.5	22.2	27.8	44.2	40.9	75.2	19.4	14.2	33.4
Decubitus ulcers (%)	12.3	6.1	5.8	2.8	8.4	8.0	30.2	1.4	1.8	8.1
Invasive devices use (%)	9.2	2.6	1.7	1.4	3.2	2.3	27.6	5.6	0	5.0
Prior antibiotic treatment (%)	29.7	22.6	10.3	12.5	23.2	18.2	44.0	40.8	36.2	22.5
Prior MRSA carriage (%)	21.8	1.7	1.3	6.9	6.3	0	2.8	0	8.0	5.6
Stay ≥ 6 months (%)	72.4	92.2	91.8	93.1	90.4	93.0	60.2	54.9	94.4	85.1
MSSA colonization (%)	16.9	8.7	24.3	16.7	15.8	24.7	29.4	27.4	11.8	16.7
MRSA colonization (%)	22.6	24.3	8.4	15.3	28.4	6.7	35.8	27.4	10.4	16.8

MSSA, methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*.

RESULTS

Characteristics of patients

All residents present on the day of the study (1377) were included in the analyses. Characteristics of residents as ascribed by community LTCFs are shown in Table 1. Among them, 71.4% were women; the mean age was 81.2 years (SD 9.9 years). Underlying conditions were present in 1138 (82.6%) residents. The most frequent of these conditions were dementia in 548 (39.8%) residents, diabetes mellitus in 321 (23.3%), chronic obstructive pulmonary disease in 206 (15%), solid tumours in 194 (14.1%), and hemiplegia in 169 (12.3%). The median Charlson index was 2 (interquartile range: 1–3) points, and the mean Barthel index was 54.16 (SD 38.3) points.

Prevalence of MRSA colonization

Cultures were performed from a total of 1377 nasal swabs and 82 decubitus ulcer swabs. *S. aureus* carriage was observed in 33.5% of the residents; 50.0% showed methicillin resistance. Overall, 231 (16.8%) residents were colonized by MRSA, 230 (16.7%) were colonized by MSSA, and the remaining 916 (66.5%) were non-carriers. The prevalence of MRSA colonization among residents was 16.8% (95% CI 14.9–18.8), varying from 6.7% to 35.8% ($p < 0.001$) among the LTCFs (Table 1). MRSA was isolated from 213 (15.5%) nasal swabs and from 49 (59.0%) decubitus ulcers. Eighteen residents with decubitus ulcers colonized by MRSA had a concomitant negative nasal swab, and in 31 residents both sites were colonized. Prior MRSA carriage was known in 77

(33.3% of the residents colonized by MRSA). No MRSA infection was recorded during the cross-sectional study.

Factors associated with *S. aureus* colonization in community LTCF residents

Table 2 shows bivariate and multivariate analysis comparing MRSA carriers with non-MRSA carriers. MSSA carriers had a higher Charlson index, more often had invasive devices, and more often had been transferred from hospitals and resided in facilities with < 150 beds, as compared with non-carriers (data not shown). Variables associated with MRSA colonization were age of 85 years or more, existence of decubitus ulcers, previous antibiotic treatment, presence of invasive devices, comorbidity, transfer from an acute-care hospital, and residence in facilities with < 150 beds. Multivariate analysis to identify independent factors associated with MSSA and MRSA colonization are shown in Tables 3 and 4, respectively. A comparison of the two models showed that for MSSA carriers, a Charlson index ≥ 2 points and residence in a facility with < 150 beds remained independent factors. On the other hand, several independent variables were related to MRSA colonization. It is noteworthy that residents of a facility with < 150 beds had at least a two-fold higher probability of being MRSA carriers (OR 2.10; 95% CI 1.52–2.92). Other modifiable factors were medical devices, presence of decubitus ulcers, and previous antibiotic treatment. Age of 85 years or more, a Charlson index ≥ 2 points and transfer from an acute-care hospital were non-modifiable factors also related to MRSA colonization.

870 *Clinical Microbiology and Infection*, Volume 14 Number 9, September 2008

	MRSA carriers, n = 231 n (%)	Non-MRSA carriers, n = 1146 n (%)	Univariate OR MRSA/non-MRSA carriers (95% CI)	Multivariate OR MRSA/non-MRSA carriers (95% CI)
Sex (male)	72 (31.2)	322 (28.1)	1.15 (0.85-1.57)	
Age ≥85 years	95 (41.3)	380 (33.4)	1.41 (1.05-1.88)	1.60 (1.16-2.21)
Charlson index ≥2 [17]	148 (64.6)	567 (50.4)	1.79 (1.33-2.41)	1.50 (1.09-2.08)
Barthel index <30 [18]	98 (43.0)	344 (31.4)	1.65 (1.23-2.21)	1.02 (0.72-1.43)
Decubitus ulcers	46 (20.1)	65 (5.7)	4.17 (2.77-6.28)	2.56 (1.58-4.17)
Previous antibiotic	97 (42.9)	207 (18.4)	3.33 (2.13-4.42)	2.44 (1.75-3.39)
Medical devices	31 (13.5)	37 (3.2)	4.67 (2.83-7.71)	2.47 (1.35-4.52)
Transferral from acute-care centre	55 (24.1)	103 (9.4)	3.07 (2.13-4.42)	2.15 (1.39-3.31)
Stay ≥6 months	176 (77.9)	943 (86.6)	0.54 (0.38-0.78)	0.80 (0.53-1.22)
Centre with <150 beds	131 (56.7)	422 (36.8)	2.25 (1.69-2.99)	1.77 (1.29-2.41)

Comparison of patients colonized by MRSA with a control group of non-MRSA carriers.

Table 2. Bivariate and multivariate analysis of associated factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) colonization**Table 3.** Associated factors for methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* carriage vs. no *S. aureus* carriage

	OR	95% CI	P
Age ≥85 years	0.84	0.61-1.17	0.31
Charlson index ≥2	1.95	1.31-2.90	0.001
Barthel index <30	1.07	0.76-1.50	0.70
Decubitus ulcers	1.24	0.65-2.36	0.51
Previous antibiotic use	0.77	0.52-1.15	0.20
Medical devices	1.50	0.66-3.39	0.33
Transferral from acute-care centre	1.45	0.88-2.40	0.14
Stay ≥6 months	0.73	0.48-1.12	0.16
Centre with <150 beds	1.69	1.24-2.31	0.001

Logistic regression model.

Table 4. Associated factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage vs. no *S. aureus* carriage

	OR	95% CI	P
Age ≥85 years	1.56	1.13-2.19	0.009
Charlson index ≥2	2.36	1.57-3.55	<0.001
Barthel index <30	1.08	0.76-1.55	0.64
Decubitus ulcers	2.92	1.73-4.93	<0.001
Previous antibiotic	2.20	1.56-3.13	<0.001
Medical devices	3.05	1.56-5.97	0.001
Transferral from acute-care centre	2.52	1.59-4.02	<0.001
Stay ≥6 months	0.80	0.51-1.26	0.34
Centre with <150 beds	2.10	1.52-2.92	<0.001

Logistic regression model.

DISCUSSION

In Europe, there is little information on the prevalence of MRSA colonization among LTCF residents. Recent studies have reported prevalences of 22% in the UK [7], 9.3% in Slovenia [8], 8.6% in Ireland [10] and 1.1% in Germany [9]. These figures are lower than those reported in studies of Veterans' Affairs facilities in the USA, where the colonization rate can reach 45% [6,21]. To our knowledge, this is the first report on the prevalence of MRSA colonization in community LTCFs in Spain.

In a previous study, the clinical epidemiology of patients with *S. aureus* bloodstream infections upon hospital admission was analyzed, and the

major risk factors for methicillin resistance were prior MRSA isolation and having been transferred from an LTCF [14]. Given the increasing rate of exchange of patients between facilities in the healthcare setting and acute-care hospitals, it seems pertinent to determine the magnitude of MRSA colonization in LTCFs, as the extent of this problem could influence the infection control practices implemented by hospitals [22]. In Spain, guidelines for the prevention of MRSA transmission in acute-care hospitals are well established [23], even though there is a lack of such recommendations for LTCFs. The policy of most facilities is to admit MRSA carriers, although transfer of these patients from acute-care centres is often limited. This is because healthcare personnel have not been instructed on the measures for handling MRSA-colonized patients, and contact precaution measures are costly.

We analyzed a large number of patients from a homogeneous type of LTCF, i.e. community LTCFs, and performed cultures from nasal swabs and decubitus ulcers, which has been reported to be a valid and efficient method for the detection of MRSA carriage [24,25]. It is worthy of note that 18 residents in this study had decubitus ulcers colonized by MRSA and a concomitant negative nasal swab. No prior decolonization was recorded in their medical records, and intestinal MRSA carriage was not ruled out [26]. A high prevalence of MRSA colonization was found among patients within these institutions. This study allows an appreciation with further detail of the MRSA situation in the healthcare system. However, it is important to emphasize that active surveillance within LTCFs is not recommended in the absence of surveillance of suspected outbreaks of infection; thus, this study is not reproducible in daily clinical practice. In LTCFs, clinical samples and medical

records from hospitals should be considered, to define the baseline rate of MRSA colonization within a facility [21]. In the present study, approximately one-third of the residents colonized by MRSA were previously recognized as MRSA carriers by the facility; this indicates irregular application of the aforementioned recommendations. An outstanding finding is the wide variation in the prevalence of MRSA colonization among facilities, something that has been pointed out in other reports [21]. Differences in colonization rates may depend on several factors, such as the prevalence of MRSA in the referral hospital and infection control practices at the LTCF.

To determine factors associated with MRSA colonization, two separate models using multivariate analysis were built. This is an effective method for identifying factors associated with resistant pathogens, particularly for studies on infection control [20,27]. In this analysis, only the size of facilities was considered as a specific factor related to MRSA colonization; thus, it is difficult to interpret the differences found in the prevalence of MRSA colonization among LTCFs. A limitation of this point-prevalence study is the absence of a second sample to confirm the residents' carrier status; consequently, it was not possible to detect intermittent MRSA carriage. In LTCFs, the rate of intermittent carriage of MRSA is approximately 15% [26]. The study design makes it difficult to determine the exact risk of MRSA colonization; therefore, only associated factors are referred to. Independent factors associated with *S. aureus* carriage in community LTCF residents were comorbidity and the size of the facilities. Independent factors associated with MRSA colonization among this population were presence of decubitus ulcers, previous antibiotic treatment, age of 85 years or more, use of invasive devices, and transfer from an acute-care hospital. Limited data are available concerning risk factors for MRSA colonization in LTCFs in Europe. Vovko *et al.* [28] found previous antibiotic treatment and hospital admission to be risk factors in an LTCF with a low number of MRSA carriers. Interestingly, in other studies, care facility-specific risk factors for MRSA colonization, e.g. low ratio of nurses to beds, have been associated with MRSA carriage [7,29]. In our model, there is no variable that could explain why centres with <150 beds constitute an independent factor associated with *S. aureus* colonization, but we have observed

that some of these facilities are deficient in application of standard measures to limit cross-transmission. A stay of more than 6 months in an LTCF has been found to be associated with the rate of MRSA colonization [29], in contrast to the findings of other authors [9,10]. In the present study, a stay of fewer than 6 months in an LTCF was associated with MRSA colonization only in the bivariate analysis; this should be interpreted as a survival bias due to the study design.

These observations show that factors related to methicillin resistance among residents in community LTCFs are similar to those described in hospitalized patients [30]. It is noteworthy that modifiable factors could be prevented by the introduction of only a few infection control measures. Appropriate, individualized and easy-to-implement infection control precautions, together with the promotion of a healthy lifestyle for residents, should be observed in LTCFs. Hand washing (alcohol-based gel) protocols, educational programmes for healthcare personnel, guidelines for antibiotic use and enhanced efforts to prevent the development of decubitus ulcers would all be suitable measures for community LTCFs.

To conclude, this study reports a large reservoir of MRSA among community LTCFs in Spain. The results indicate that restriction of referral of MRSA carriers from acute-care hospitals to community LTCFs would not be effective, because there is a high prevalence of silent carriers. Patients transferred from LTCFs to hospitals should be considered at high risk for MRSA colonization and should be included in a screening programme at admission. We therefore recommend that control strategies be coordinated between LTCFs and acute-care hospitals. Further studies are necessary to define the clinical impact of MRSA colonization among residents in community LTCFs.

TRANSPARENCY DECLARATION

This study was supported by the Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III, Spanish Network for the Research in Infectious Diseases (REIPI RD06/0008). The authors declare no conflict of interest with respect to this article.

REFERENCES

1. Pujol M, Peña C, Pallares R, Ayats J, Ariza J, Gudiol F. Risk factors for nosocomial bacteremia due to

872 *Clinical Microbiology and Infection*, Volume 14 Number 9, September 2008

- methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; **13**: 96–102.
2. Dominguez MA, De Lencastre H, Liñares J, Tomasz A. Spread and maintenance of a dominant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone during an outbreak of MRSA disease in a Spanish hospital. *J Clin Microbiol* 1994; **32**: 2081–2087.
 3. Johnson L, Bhan A, Pawlak J, Manzor O, Saravolatz L. Changing epidemiology of community-onset methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2003; **24**: 431–435.
 4. Friedman N, Kaye K, Stout J *et al*. Health-care associated bloodstream infections in adults: a reason to change the accepted definition of community-acquired infections. *Ann Intern Med* 2002; **137**: 791–797.
 5. Kreman T, Hu J, Pottinger J, Herwaldt LA. Survey of long-term-care facilities in Iowa for policies and practices regarding residents with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* or vancomycin-resistant enterococci. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2005; **26**: 811–815.
 6. Mulhausen PL, Harrell LJ, Weinberger M, Kochersberger GG, Feussner JR. Contrasting methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in veterans affairs and community nursing homes. *Am J Med* 1996; **100**: 24–31.
 7. Barr B, Wilcox MH, Brady A, Parnell P, Darby B, Tompkins D. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization among older residents of care homes in the United Kingdom. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2007; **28**: 853–859.
 8. Zohar T, Vovko P, Retelj M *et al*. Prevalence and nosocomial spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a long-term-care facility in Slovenia. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2005; **26**: 184–190.
 9. von Baum H, Schmidt C, Svoboda D, Bock-Hensley O, Wendt C. Risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage in residents of German nursing homes. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2002; **23**: 511–515.
 10. O'Sullivan NP, Keane CT. The prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among the residents of six nursing homes for the elderly. *J Hosp Infect* 2000; **45**: 322–329.
 11. Ruiz de Gopegui E, Oliver A, Ramirez A, Gutierrez O, Andreu C, Perez JL. Epidemiological relatedness of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from a tertiary hospital and a geriatric institution in Spain. *Clin Microbiol Infect* 2004; **10**: 339–342.
 12. Gavalda L, Masuet C, Beltran J *et al*. Comparative cost of selective screening to prevent transmission of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), compared with the attributable costs of MRSA infection. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2006; **27**: 1264–1266.
 13. Olona-Cabases M, Tico-Falguera N, Ramirez-Garceran L, Del de Gopegui O, Castello-Verdu T, Garcia-Fernandez L. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a four-year experience in a spinal cord injury unit in Spain. *Spinal Cord* 1996; **34**: 315–319.
 14. Manzur A, Vidal M, Pujol M *et al*. Predictive factors of methicillin resistance among patients with *Staphylococcus aureus* bloodstream infection at hospital admission. *J Hosp Infect* 2007; **66**: 135–141.
 15. McNeil SA, Mody L, Bradley SF. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Management of asymptomatic colonization and outbreaks of infection in long-term care. *Geriatrics* 2002; **57**: 16–27.
 16. Mody L, Kauffman CA, McNeil SA, Galecki AT, Bradley SF. Mupirocin-based decolonization of *Staphylococcus aureus* carriers in residents of 2 long-term-care facilities: a randomized, double blind, placebo-control trial. *Clin Infect Dis* 2003; **37**: 1467–1474.
 17. Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie CR. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J Chronic Dis* 1987; **40**: 373–383.
 18. Mahoney F, Barthel DW. Functional evaluation: the Barthel index. *Md State Med J* 1965; **14**: 61–65.
 19. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*; 16th Informational Supplement. CLSI document M100-S16. Wayne, PA: CLSI, 2006.
 20. Harris A, Samore MH, Lipsitch M, Kaye KS, Perencevich E, Carmeli Y. Control-group selection importance in studies of antimicrobial resistance: examples applied to *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococci* and *Escherichia coli*. *Clin Infect Dis* 2004; **34**: 1558–1563.
 21. Bradley SF. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: long-term care concerns. *Am J Med* 1999; **106**: 2S–10S.
 22. Cooper BS, Medley GF, Stone SP *et al*. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitals and the community: stealth dynamics and control catastrophes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 10223–10228.
 23. Rodriguez-Baños J, Millán A, Dominguez MA *et al*. GEIH/GEMARA/REIPI. Medidas de control de *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina en los hospitales españoles. Encuesta del proyecto SARM 2003 GEIH/GEMARA/REIPI. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006; **24**: 149–156.
 24. Sanford MD, Widemer AR, Bale MJ, Jones RN, Wenzel RP. Efficient detection and long-term persistence of the carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 1994; **19**: 1123–1128.
 25. Bradley SF, Terpenning MS, Ramsey MA *et al*. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: colonization and infection in a long-term-care facility. *Ann Intern Med* 1991; **115**: 417–422.
 26. Bradley SF. Eradication or decolonization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage: what are we doing and why are we doing it? *Clin Infect Dis* 2007; **44**: 186–189.
 27. Kaye KS, Harris AD, Samore M, Carmeli Y. The case-control study design: addressing the limitations of risk factor studies for antimicrobial resistance. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2005; **26**: 346–351.
 28. Vovko P, Retelj M, Zohar T *et al*. Risk factors for colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a long-term-care facility in Slovenia. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2005; **26**: 191–195.
 29. Wendt C, Svoboda D, Schmidt C, Bock-Hensley O, von Baum H. Characteristics that promote transmission of *Staphylococcus aureus* in German nursing homes. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2005; **26**: 816–821.
 30. Santos KR, Teixeira LM, Leal GS, Fonseca LS, Gontijo Filho PP. DNA typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: isolates and factors associated with nosocomial acquisition in two Brazilian hospitals. *J Med Microbiol* 1999; **48**: 17–23.

cuenta que ambos métodos utilizan anticuerpos de una misma procedencia. Aunque la confirmación definitiva de algunos serotipos precisa ser efectuada mediante el test de Quellung, nuestros resultados coinciden con los de otros autores² y apuntan a que el empleo de Pneumotest-Latex resulta muy útil como método inicial de tipificación. Si bien no debe considerarse una alternativa excluyente respecto al test de Quellung, dada su comodidad y accesibilidad a personal menos entrenado y su capacidad para la correcta identificación de serogrupos, su uso puede reducir enormemente el número de determinaciones que realizar por esta técnica de referencia. Entre sus limitaciones hay que destacar, además de la falta de poder discriminativo dentro de determinados serogrupos, su elevado precio.

Agradecimientos

A los servicios de microbiología de los hospitales públicos y privados de la Comunidad de Madrid que colaboran en el Sistema de Vigilancia de la Enfermedad Invasora por *Streptococcus pneumoniae* en esta región.

Juan Carlos Sanz^a, Isabel Wilhelm^b,
Nazaret Méndez^a y Asunción Fenoll^c

^aLaboratorio Regional de Salud Pública. Instituto de Salud Pública de la Comunidad de Madrid. Madrid. ^bServicio de Microbiología, Hospital Severo Ochoa. Leganés, Madrid. ^cCentro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda. Madrid, España.

Bibliografía

1. Austrian R. The quellung reaction, a neglected microbiologic technique. *Mt Sinai J Med.* 1976;43:699-709.
2. Slotved HC, Kalløft M, Skovsted IC, Kerrn MB, Espersen F. Simple, rapid latex agglutination test for serotyping of pneumococci (Pneumotest-Latex). *J Clin Microbiol.* 2004;42:2518-22.
3. Comité Asesor de Vacunas de la Asociación Española de Pediatría. Calendario de vacunación de la Asociación Española de Pediatría: Recomendaciones 2007. Disponible en: http://www.vacunasep.org/pdf/2007/calendario_vacunas_CAV_AEP_2007.pdf
4. Fenoll A, Jado I, Vicioso D, Pérez A, Casal J. Evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and antibiotic resistance in Spain: update (1990 to 1996). *J Clin Microbiol.* 1998;36:3447-54.
5. Slotved HC, Kerrn MB. The effect of broth media on pneumococcal growth and the latex serotyping result. *J Microbiol Methods.* 2005;61:181-6.
6. Kyaw MH, Lynfield R, Schaffner W, Craig AS, Hadler J, Reingold A, et al. Active Bacterial Core Surveillance of the Emerging Infections Program Network. Effect of introduction of the pneumococcal conjugate vaccine on drug-resis-

tant *Streptococcus pneumoniae*. *N Engl J Med.* 2006;354:1455-63.

7. Orden 1869/2006, de 10 de octubre, del consejero de Sanidad y Consumo, por la que se actualiza el calendario de vacunaciones sistemáticas infantiles de la Comunidad de Madrid. BOCM. Núm. 253. Martes 24 de octubre de 2006. Disponible en: <http://www.infodocor.org/gijp/pdf/bocm20061024.pdf>
8. Jefferson T, Ferroni E, Curtale F, Giorgi Rossi P, Borgia P. *Streptococcus pneumoniae* in western Europe: serotype distribution and incidence in children less than 2 years old. *Lancet Infect Dis.* 2006;6:405-10.

Neumonía nosocomial por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina de origen comunitario productor de leucocidina de Pantón-Valentine

Sr. Editor: La leucocidina de Pantón-Valentine (LPV), identificada en 1932¹, es una exotoxina específica de *Staphylococcus aureus* con propiedades leucotóxicas en polimorfonucleares y macrófagos humanos. Está producida por menos del 1% de los aislados de *S. aureus*². Las cepas de *S. aureus* productoras de LPV están relacionadas con infecciones piógenas de la piel (como los forúnculos) y, con menor frecuencia, con la neumonía necrosante grave³. También se ha asociado con el recientemente conocido *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) comunitario⁴. A continuación presentamos el caso de un paciente con una neumonía nosocomial por SARM productor de LPV.

Varón de 34 años, natural de la India aunque residente en España desde hace 6 años, trabajador en la hostelería en Mallorca, fumador y bebedor importante (con dependencia alcohólica). Fue traído a urgencias en abril de 2007 por un traumatismo craneoencefálico con hematoma subdural. El paciente ingresó en la unidad de cuidados intensivos (UCI) intubado y conectado a ventilación mecánica, y recibió tratamiento antibiótico empírico con amoxicilina-ácido clavulánico. La cifra de leucocitos en sangre era de $12,05 \times 10^9/\mu\text{l}$. En el primer día del ingreso se realizó un broncoaspirado (BAS). En el cultivo creció una flora mixta respiratoria. A los 8 días del ingreso presentó fiebre y secreciones purulentas espesas, y en la radiografía de tórax se objetivó una neumonía en el lóbulo inferior izquierdo complicada con atelectasias bibasales. La concentración de leucocitos en sangre era en ese momento de $4,10 \times 10^9/\mu\text{l}$. Se recogió una nueva muestra de BAS en la

que se aislaron más de 10^6 unidades formadoras de colonia (ufc) de *S. aureus*. En el antibiograma, realizado con el método de difusión con discos siguiendo los criterios del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), este aislado (cepa 05015862) era únicamente resistente a todos los antibióticos betalactámicos (incluyendo la oxacilina), y sensible a la eritromicina, clindamicina, ciprofloxacino, cotrimoxazol, vancomicina, teicoplanina, rifampicina, linezolid, gentamicina, tobramicina, tetraciclina, cloranfenicol, mupirocina y ácido fusídico. Se suspendió el tratamiento antibiótico anterior y se administró vancomicina. En el posterior estudio de colonización de SARM (cultivo de exudados nasal, axilar e inguinal), realizado a los 10 días del ingreso, se aisló este microorganismo en el exudado nasal con el mismo patrón de resistencia. El paciente recibió tratamiento con ácido fusídico intranasal y lavados con clorhexidina en axilas e ingles durante 5 días. A los 15 días del ingreso se volvió a aislar SARM en el cultivo del BAS con el mismo antibiograma. A los 17 días se le retiró la intubación. La cifra de leucocitos a partir de este momento y hasta el alta se mantuvo entre 9 y $13 \times 10^9/\mu\text{l}$. A los 22 días, se aisló en el BAS más de 10^6 ufc de *Pseudomonas aeruginosa* sin aislarse SARM, por lo que se asoció ceftazidima y tobramicina a la vancomicina, y se administraron los tres antibióticos durante 18 días. A los 30 días, el paciente ingresó en planta. En un estudio de colonización, realizado a los 35 días, se aisló SARM en el exudado axilar con el mismo antibiograma, por lo que se repitieron los lavados con clorhexidina en axilas e ingles durante 5 días. Los siguientes tres estudios de colonización fueron negativos para SARM, la evolución fue buena y el paciente fue dado de alta y derivado a un centro de rehabilitación.

Se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple en las dos primeras cepas de SARM del paciente (la del BAS y la del exudado nasal) para los genes *mecA* (resistencia a la meticilina), *nuc* (específico de *S. aureus*) y *luk-PV* (producción de LPV)⁵. En ambas cepas, la PCR fue positiva a los tres genes. Se utilizó como control positivo la cepa de SARM comunitario 3922-04, aislada en un absceso glúteo de un niño de origen ecuatoriano y proporcionada por la doctora Emilia Cerenado, del Hospital Gregorio Marañón de Madrid⁶. Se efectuó otra PCR múltiple para la tipificación del complejo del gen de la recombinasa del casete cromosómico (*ccr*)⁶, en la que presentaron el casete cromosómico estafilocócico *mec*

Cartas científicas

(SCC_{mec}) de tipo IV. En el estudio de epidemiología molecular por electroforesis en campo pulsado (ECP), usando *Sma*I como enzima de restricción, las dos cepas del paciente fueron idénticas entre sí, diferentes de los tres clones intrahospitalarios mayoritarios en Mallorca (clones A, B, C)⁷, e interesantemente presentaron un patrón de bandas idéntico al de la cepa de referencia 3922-04 (fig. 1).

La neumonía producida por cepas de *S. aureus* productoras de LPV se caracteriza por ser más frecuente en adultos jóvenes previamente sanos y se suele manifestar con fiebre alta, hemoptisis, elevada frecuencia cardíaca y leucocitopenia, con una elevada mortalidad⁸. Recientemente, se están detectando en nuestro país algunas neumonías causadas por cepas de SARM productoras de LPV en localizaciones geográficas diversas como Tenerife⁹ (clon ST125-MRSA-IV) y Galicia¹⁰ (clon ST80-MRSA-IV), aunque, actualmente, el genotipo predominante en España entre las cepas de SARM productoras de LPV es el ST8-MRSA-IV, relacionado con el clon USA300, que es la cepa de SARM comunitaria más prevalente en los Estados Unidos¹¹.

El patrón de ECP de nuestra cepa, así como el de la cepa 3922-04, es idéntico al del clon (D1) descrito por primera vez en Madrid en 2003, responsable de varias infecciones cutáneas de origen extrahospitalario, particularmente en la población pe-

diátrica¹². Aunque no se ha realizado tipificación mediante *multilocus sequence typing* (MLST) de nuestra cepa, este clon parece pertenecer al ST8-MRSA-IV (Fernando Chaves, comunicación personal).

A pesar de ser la neumonía de adquisición nosocomial, lo más probable es que el paciente estuviera previamente colonizado por esta cepa en la orofaringe, puesto que la colonización por SARM puede durar de meses a años. Posteriormente, el paciente, tras la intubación y el tratamiento antibiótico con amoxicilina-ácido clavulánico como factores predisponentes, desarrollaría la neumonía por la aspiración de las secreciones orofaríngeas. Un estudio estima que hasta en el 80% de los casos globales de infección nosocomial por *S. aureus*, el paciente estaba colonizado por este microorganismo antes del ingreso¹³. Además, hasta el momento, esta cepa no se ha detectado en ningún otro paciente ingresado en nuestro hospital, incluyendo un estudio de colonización de SARM efectuado en los pacientes ingresados en la misma unidad de UCI, lo que va más a favor de la adquisición extrahospitalaria de dicha cepa. En cualquier caso, la emergente diseminación de clones de SARM productores de LPV en España obliga a mantener una vigilancia activa de este fenómeno por sus notables consecuencias clínicas y terapéuticas.

Agradecimientos

Agradecemos a la doctora Emilia Cercenado el proporcionarnos la cepa de SARM comunitaria productora de LPV 3922-04 utilizada como control y al doctor Fernando Chaves el compartir con nosotros datos no publicados.

Enrique Ruiz de Gopegui^a,
Antonio Oliver^a, Jaime Herrero^b
y José L. Pérez^a

^aServicio de Microbiología,
^bUnidad de Cuidados Intensivos,
Hospital Universitario Son Dureta,
Palma de Mallorca, España.

Bibliografía

- Panton P, Valentine F. Staphylococcal toxins. *Lancet*. 1932;222:506-8.
- Von Eiff C, Friedrich AW, Peters G, Becker K. Prevalence of genes encoding for members of the staphylococcal leukotoxin family among clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2004;49:157-62.
- Lina G, Piémont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, et al. Involvement of Pantón-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis*. 1999; 29:1128-32.
- Dufour P, Gillet Y, Bes M, Lina G, Vandenesch F, Floret D, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in France: emergence of a single clone that produces Pantón-Valentine leukocidin. *Clin Infect Dis*. 2002;35: 819-24.
- Cercenado E, Cuevas O, Marín M, Bouza E, Trincado P, Boquete T, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Madrid (Spain): transcontinental importation and polyclonal emergence. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008;61:143-9.
- Ito T, Katayama Y, Asada K, Mori N, Tsutsumimoto K, Tiensasitorn C, et al. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome mec integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45:1323-36.
- Ruiz de Gopegui E, Oliver A, Galmés MI, Hidalgo O, Pérez JL. Consolidación de un clon multiresistente de *Staphylococcus aureus* no relacionado con el clon ibérico en un hospital de Mallorca. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2005;23:140-4.
- Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, Fournet JC, Lina G, Bes M, et al. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Pantón-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet*. 2002;359: 753-9.
- López-Agüilar C, Pérez-Roth E, Méndez-Alvarez S, Moreno A, Durán MC, Casanova C, et al. Association between the presence of the Pantón-Valentine leukocidin-encoding gene and a lower rate of survival among hospitalized pulmonary patients with staphylococcal disease. *J Clin Microbiol*. 2007;45: 274-6.
- Pérez S, Torres E, Treviño M, Fernández B, Otero I, Barbeyto L, et al. Complejos clonales de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina predominantes en Galicia. Caracterización de los aislados comunitarios detectados. XII Reunión de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). A Coruña, 9-11 de mayo de 2007. Comunicación 043, p. 16-7.
- Domínguez MA, Pujol M, Tubau F, García A, Manzur A, Fernández R, et al. Caracterización microbiológica de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina (SARM) productoras de leucocidina de Pantón-Valentine (LPV). XII Reunión de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). A Coruña, 9-11 de mayo de 2007. Comunicación 029, p. 12.
- Brosseta A, Chaves F, Rojo P, Otero JR. Emergencia de un clon de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina de origen comunitario en la población pediátrica del sur de Madrid. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2006; 24:31-5.
- Von Eiff C, Becker K, Machka K, Stammer H, Peters G. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Study Group*. *N Engl J Med*. 2001;344:11-6.

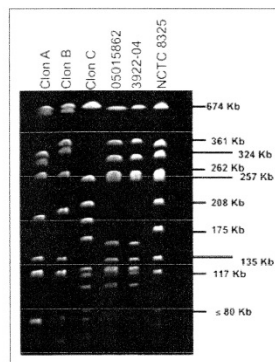


Figura 1. Electroforesis en campo pulsado de cepas de SARM usando *Sma*I como enzima de restricción. Carriles: 1 Clon A, 2 Clon B, 3 Clon C (EMRSA-15), 4 cepa 05015862, 5 cepa 3922-04 productora de LPV (proporcionada por la doctora Cercenado), 6 cepa control de *Staphylococcus aureus* NCTC 8325 utilizada como marcador de peso molecular.

PROGRAMA EXTERNO DE CONTROL DE CALIDAD SEIMC. AÑO 2007

Staphylococcus aureus resistente a la meticilina de origen comunitario

Emilia Cercenado^a y Enrique Ruiz de Gopegui^b

^aServicio de Microbiología, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, España.

^bServicio de Microbiología, Hospital Universitario Son Dureta, Palma de Mallorca, España.

Recientemente, las cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) han aparecido como una causa de infecciones adquiridas en la comunidad (CO) en pacientes sin los factores de riesgo establecidos para la infección por dichos patógenos. En niños y pacientes jóvenes previamente sanos producen, principalmente, infecciones leves de piel y partes blandas, pero también pueden causar fascitis y neumonía necrosante grave. Las cepas de SARM-CO se diferencian de las hospitalarias en su sensibilidad a múltiples clases de antimicrobianos y en sus características genéticas. La mayoría de ellas comparten el *cassette* cromosómico estafilocócico (SCC*mec*) de tipo IV y producen la leucocidina de Pantón-Valentine (LPV), una citotoxina que provoca destrucción de los leucocitos y necrosis tisular. Actualmente, el clon predominante es el USA300, que se ha diseminado por Estados Unidos, Europa y Australia. En España, el clon predominante está relacionado con el USA300. El principal mecanismo de transmisión es por contacto directo entre personas, aunque también se han implicado en la transmisión algunos animales domésticos y de granjas. En los pacientes con infecciones purulentas de piel y partes blandas, la incisión y el drenaje constituyen el tratamiento fundamental, que se debe asociar a la administración de antibióticos si la respuesta es inadecuada. Se puede administrar clindamicina, cotrimoxazol o tetraciclinas y se debe evitar la utilización de fluoroquinolonas por su facilidad para desarrollar resistencia. En el caso de infecciones graves, la vancomicina sigue siendo el tratamiento de elección, si bien hay otras alternativas como el linezolid y la daptomicina (excepto en las neumonías). Las normas de higiene general son la medida más eficaz para evitar su diseminación.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM). Infecciones en la comunidad. SARM-CO. Leucocidina de Pantón-Valentine.

Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Recently, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) has emerged as a cause of community-acquired (CA) infections among patients without established risk factors for MRSA. CA-MRSA strains mainly cause mild skin and soft tissue infections in otherwise healthy children and young adults, but can also cause severe necrotizing fasciitis and pneumonia. In contrast to nosocomial MRSA, CA-MRSA are, in general, susceptible to multiple antimicrobials and present a different genotype. Most CA-MRSA strains share the staphylococcal chromosomal *cassette* (SCC*mec*) type IV and produce Pantón-Valentine leukocidin (PVL), a cytotoxin that causes leukocyte destruction and tissue necrosis.

At present, the predominant clone is the USA300 clone, which is widely disseminated in the United States, Europe and Australia. In Spain, the predominant clone is related to the USA300 clone. The main mechanism of transmission is close person-to-person contact, although household pets and farm animals have also been implicated. In patients with purulent skin and soft tissue infections, the mainstay of treatment is incision and drainage. Antimicrobials are indicated in patients not responding to appropriate drainage. Clindamycin, trimethoprim-sulfamethoxazole or tetracyclines can be administered, while the use of fluoroquinolones should be avoided due to the rapid emergence of resistance. For severe infections, vancomycin should be used. Other alternatives are linezolid or daptomycin (only if there is no pulmonary involvement). Adequate hygiene practices are the most efficient measure to prevent spread.

Key words: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Community-acquired infections. CA-MRSA. Pantón-Valentine leukocidin.

Introducción

Las cepas de *Staphylococcus aureus* con resistencia a la meticilina (SARM) son una de las principales causas de infecciones hospitalarias y, en general, de infecciones asociadas a los cuidados sanitarios (ACS)¹. A pesar del aumento de la prevalencia de SARM en los hospitales, es-

Correspondencia: Dra. E. Cercenado.
Servicio de Microbiología.
Hospital General Universitario Gregorio Marañón.
Dr. Esquerdo, 46. 28007 Madrid, España.
Correo electrónico: ecercenado@terra.es

tas 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. 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^{2,3}. 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^{4,5}. Estas cepas son las denominadas SARM de origen comunitario (SARM-CO) que producen infecciones en pacientes que no presentan los factores de riesgo establecidos para la infección por SARM: por ejemplo, no tienen una historia previa de infección o colonización por SARM; no han sido hospitalizados en el año previo al aislamiento ni han recibido asistencia en centros sociosanitarios ni de diálisis; no han sido sometidos a cirugía o implantación de catéteres permanentes u otros dispositivos médicos, y no son familiares de trabajadores sanitarios^{6,7}. No obstante, una definición de SARM-CO que incluya únicamente los SARM aislados de personas sin factores de riesgo de adquisición hospitalaria puede excluir a pacientes infectados con cepas que genéticamente son SARM-CO, por lo que también se debe tener en cuenta las características genéticas de los aislados para definirlos como comunitarios⁸. Actualmente, el rápido aumento de la prevalencia de SARM-CO en algunos países, así como su reciente introducción y diseminación en los hospitales, ha difuminado las fronteras entre cepas de adquisición comunitaria y hospitalaria, y ha creado la necesidad de realizar una detección precoz y de reconsiderar nuevas estrategias terapéuticas^{8,9}.

Epidemiología

En los últimos 10 años la epidemiología de SARM ha cambiado. Los SARM-CO difieren de los hospitalarios en el espectro de la enfermedad y en la epidemiología. Estas cepas parecen tener un reservorio fuera del hospital, son causa principalmente de infecciones de piel y partes blandas, generalmente forúnculos y abscesos y, en ocasiones, de neumonía necrosante grave en niños y adultos jóvenes y sanos, y suelen producir pequeños brotes que se han descrito en determinados grupos de población, como en los aborígenes australianos, indios americanos, nativos de Alaska, reclusos, soldados en cuarteles, homosexuales, usuarios de drogas por vía parenteral, tatuados, equipos de deportistas (principalmente de deportes de contacto) y guarderías⁹⁻¹¹. Se ha indicado que la exposición previa a antimicrobianos puede ser un factor de riesgo para la adquisición de SARM-CO, aunque no con tanta frecuencia como ocurre en los aislados nosocomiales⁹, y que estas cepas también se pueden transmitir a partir de animales de compañía¹² y de algunos animales de granja (caballos

y cerdos)^{13,14}. En España se han descrito infecciones por SARM-CO principalmente en niños y en pacientes de origen sudamericano¹⁵⁻¹⁷.

Los clones de SARM-CO difieren notablemente de los SARM hospitalarios o SARM-ACS, y presentan genotipos distintos de los de aislados hospitalarios de la misma comunidad. Actualmente, la mayor incidencia de SARM-CO se ha observado en Estados Unidos, donde los clones más frecuentes son los denominados USA400 y USA300, pertenecientes a las secuencias tipo ST1 y ST8 de MLST (*multilocus sequence typing*), respectivamente^{4,8}. Estos 2 clones son los responsables de la mayoría de las infecciones causadas por SARM-CO, principalmente el USA300 (cepa tipo denominada USA300-0114) que actualmente ha desplazado al USA400, y que posteriormente se ha diseminado por los hospitales de Estados Unidos y también por Europa y Australia^{8,16,19}. En otros continentes los ST más frecuentes de SARM-CO son el ST30 (Pacífico sur), el ST59 (Taiwán) y el ST80 (Europa). En Europa también se han descrito el ST8 y el ST30^{6,20}. En España el clon más frecuente de SARM-CO pertenece al ST8 y está relacionado con el clon USA300; con menor frecuencia también se han detectado otros clones pertenecientes al ST80 y al ST5 (pediátrico)^{16,17}. El ST398, que históricamente no se ha asociado a infección en humanos (clon de animales), es actualmente el SARM-CO más frecuente en granjeros en contacto con cerdos, e incluso en la población general en algunas regiones de Europa¹³.

Características genéticas

Las características genéticas y fenotípicas de SARM-CO difieren de las de SARM-ACS. Todos los aislados de SARM presentan una isla genética móvil denominada el *cassette* cromosómico estafilocócico (SCC*mec*), en el que se localiza el gen *mecA*, determinante genético necesario para la expresión de la resistencia a la oxacilina y, en consecuencia, a todos los betalactámicos. Se han descrito distintos tipos de SCC*mec* con diferentes tamaños moleculares¹¹. Los SCC*mec* de tipo IV (21-24 kb) y V (28 kb) son más pequeños que los de los tipos I, II y III (34, 53 y 67 kb, respectivamente) y, teóricamente, más fácilmente transferibles. Los SCC*mec* de los tipos I, II y III, además del gen *mecA*, contienen otros genes que codifican la resistencia a diferentes antimicrobianos no betalactámicos y se asocian a las cepas hospitalarias, de ahí el fenotipo de multiresistencia característico de las cepas nosocomiales. Por el contrario, los tipos IV y V generalmente sólo presentan el gen *mecA* y se asocian a las cepas de SARM-CO que son sensibles a múltiples antibióticos¹¹. Recientemente, se ha descrito en Taiwán un nuevo tipo de SCC*mec* relacionado con SARM-CO, el SCC*mec* V_T²¹. Una hipótesis que podría explicar el origen de SARM-CO es que el gen *mecA* o el SCC*mec* se transfirieran horizontalmente a una o a más cepas de *S. aureus* sensibles a oxacilina que ocupaban nichos tradicionalmente comunitarios. Esta posibilidad explica las diferentes características genotípicas y fenotípicas del SARM-CO. El relativamente largo tiempo pasado entre la aparición de los SARM en los hospitales y su aparición en la comunidad puede ser debido, en parte, a la baja tasa de transferencia genética cromosómica horizontal²².

En España, hasta el momento actual, todos los SARM-CO 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 SARM-CO y SARM-ACS^{15-17,23}. No obstante, las cepas de SARM-CO, en comparación con las cepas de SARM-ACS, presentan diferentes patrones de bandas en la electroforesis en campo pulsanter y diferentes tipos de secuencia en el MLST. De este modo, en España, el genotipo de SARM-ACS más frecuente es el ST125-MRSA-IV²³, mientras que el de SARM-CO más frecuente es el ST8-MRSA-IV^{16,17}. Aunque como se indicó anteriormente, el SCCmec de tipo IV no contiene otros determinantes de resistencia salvo el *mecA*, las cepas de SARM-CO pueden 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*⁴.

Toxinas y patogenia

Se ha indicado que el repertorio de genes que codifican las toxinas presentes en las cepas de SARM-CO puede contribuir a la diferencia en el espectro de enfermedad entre los SARM-CO y los SARM-ACS⁶. Hay 6 genes de exotoxinas que se han encontrado significativamente más en los SARM-CO, y 7 que son más frecuentes entre los SARM-ACS. Los más frecuentes entre los SARM-CO son: *lukS-PV/lukF-PV*, *sea*, *seb*, *sec*, *seh* y *sek*. No obstante, todavía no está claro si algunos de ellos confieren especiales características de virulencia a los SARM-CO¹¹. Los 2 genes *lukS-PV/lukF-PV*, que codifican la producción de la leucocidina de Pantón-Valentine (LPV), son particularmente frecuentes en SARM-CO, y tienen un papel importante en su virulencia. La LPV es una citotoxina que destruye la integridad de los leucocitos polimorfonucleares y produce necrosis tisular. Se cree que la toxina causa neutropenia y daño tisular, debido a la liberación de productos tóxicos por parte de los neutrófilos. Los genes de la toxina LPV se transfieren de una cepa a otra mediante bacteriófagos¹¹ y se insertan en un lugar específico del cromosoma distinto del lugar de inserción del SCCmec. La presencia de LPV en SARM-CO no parece ser necesaria para la colonización ni, por tanto, para la diseminación. Sin embargo, hay una gran correlación entre la presencia de los genes LPV y los aislados de SARM-CO productores de enfermedad. Los aislados de pacientes con fascitis y miositis necrosante y con neumonía necrosante, generalmente, presentan la toxina LPV, y el 77-100% de los aislados de SARM-CO productores de enfermedad contienen los genes de la toxina LPV^{5,6,11}. Actualmente se considera que la LPV es un factor de virulencia implicado en infecciones de piel y partes blandas, neumonía necrosante e infecciones de huesos y articulaciones por SARM-CO, si bien la relación entre LPV y virulencia es independiente de la resistencia a la meticilina^{11,24}. Los genes de la LPV se han encontrado en múltiples entornos genéticos de SARM-CO en todos los continentes, por lo que el incremento de la enfermedad por SARM-CO se de-

be a la diseminación de múltiples y diversos entornos genéticos de *S. aureus* más que a la diseminación de un único clon. Además, la unión del SCCmec y la LPV en una misma cepa parece conferir una ventaja selectiva para la patogenicidad⁵. Las cepas de SARM-CO productoras de LPV pertenecen a clones epidémicos que no están relacionados con los SARM-ACS, y probablemente por este motivo estos últimos no presentan la toxina LPV. Aunque la presencia de LPV es en general un marcador de SARM-CO, ésta no es una característica estrictamente necesaria, ya que algunos clones de SARM-CO no la producen¹¹. Además de la toxina LPV, otro mecanismo de patogenicidad que presentan algunos clones de SARM-CO es la isla de patogenicidad denominada ACME (*arginine catabolic mobile element*). Este elemento está presente en el clon USA300 y contribuye a su patogenicidad, aumentando el crecimiento y la supervivencia de este clon²⁵.

Características clínicas

El espectro clínico de SARM-CO es similar al de *S. aureus* sensible a la meticilina (SASM), e incluye la colonización asintomática, las infecciones de piel y partes blandas, y las infecciones invasivas²⁶. No hay datos publicados acerca de la prevalencia de la colonización por SARM en la población general española, pero sí de Estados Unidos, donde se ha pasado del 0,8% en 2001-2002 al 1,5% en 2003-2004²⁷. La colonización por SARM-CO, como ocurre también con el SARM-ACS, constituye un factor de riesgo para el desarrollo posterior de una infección, principalmente de piel y partes blandas¹¹. La mayoría de las infecciones producidas por SARM-CO son leves, y se limitan a piel y partes blandas, principalmente forúnculos, carbunco (ántrax) y abscesos, que constituyen la presentación clínica más común. Las lesiones necróticas cutáneas se confunden con cierta frecuencia con picaduras de araña, debido a que presentan centros necrosados. En ocasiones, estas lesiones progresan a celulitis e incluso a infecciones invasivas y fatales como la fascitis necrosante^{9,26}. La neumonía necrosante está asociada a cepas de SARM-CO productoras de LPV. Se produce más frecuentemente en niños y jóvenes, y se caracteriza por fiebre alta, hemoptisis, hipotensión, leucopenia e infiltrados alveolares difusos que evolucionan a abscesos. La mortalidad es extremadamente alta y, en muchas ocasiones, la neumonía necrosante se produce como complicación de una infección viral previa, principalmente gripe¹¹. Otras presentaciones clínicas descritas son bacteriemia, shock séptico acompañado del síndrome de Waterhouse-Friedrichsen, tromboflebitis, endocarditis, artritis, osteomielitis, endoftalmitis y mediastinitis⁹.

Diagnóstico microbiológico

Las cepas de SARM-CO presentan, típicamente, una serie de características microbiológicas que las diferencian de los aislados de SARM-ACS: ser resistentes sólo a los antibióticos betalactámicos (generalmente con una expresión heterogénea de la resistencia a la oxacilina, lo que en ocasiones dificulta su detección en el laboratorio); ser portadoras del SCCmec de tipo IV o V, contener los

genes *lukF-PV* y *lukS-PV* que codifican la toxina LPV, y poseer patrones genotípicos diferenciados en la electroforesis en campo pulsante y en el MLST⁶. No obstante, es preciso matizar algunas de estas peculiaridades. En la práctica habitual del laboratorio, una cepa de *S. aureus* será con gran probabilidad un SARM-CO cuando en el antibiograma se observe una resistencia exclusiva a los betalactámicos, generalmente con heterorresistencia a la oxacilina (crecimiento de colonias de *S. aureus* en el interior del halo de la oxacilina), y con sensibilidad a múltiples clases de antimicrobianos, especialmente a ciprofloxacino, ya que la casi totalidad de las cepas de SARM-ACS en España son resistentes a este fármaco. Ahora bien, el clon de SARM-CO predominante en Estados Unidos, USA300 (ST8-MRSA-IV), presenta una elevada tasa de resistencia a los macrólidos⁷, pero no a la clindamicina. Sin embargo, muchas cepas sensibles *in vitro* a este último compuesto contienen genes que codifican la resistencia inducible a los macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B y que confieren el potencial de desarrollar resistencia a la clindamicina durante el tratamiento. Por lo tanto, ante la sensibilidad a la clindamicina, siempre se debe realizar en el laboratorio la técnica de difusión con doble disco (*D-zone test*) para detectar la posible presencia de resistencia inducible. El clon europeo (ST80-MRSA-IV) es resistente a la tetraciclina, la kanamicina y al ácido fusídico²⁶. Además, mediante la adquisición de plásmidos también se produce con cierta frecuencia la resistencia a otros antimicrobianos⁷. En España es frecuente que los aislados de SARM-CO sean resistentes a la tetraciclina y a la doxiciclina, resistencia mediada por el gen *tet(M)*¹⁷. Respecto a la presencia del SCCmec de tipo IV en los SARM-CO, ya se indicó anteriormente que esta característica apenas tiene utilidad para diferenciarlos de los SARM-ACS, debido a que la mayoría de las cepas hospitalarias en nuestro país presenta este tipo de *cassette*²³.

En cuanto a la toxina LPV, hay una asociación entre las cepas de SARM-CO aisladas de forúnculos, abscesos cutáneos y neumonías necrosantes y la producción de dicha toxina²⁴, pero no todos los aislados de SARM-CO la producen. En un estudio reciente, los genes de la LPV se detectaron en el 98% de aislados de pacientes con infecciones de piel y partes blandas en Estados Unidos⁷. Ya se ha indicado anteriormente que las cepas de SARM-CO, en comparación con las cepas de SARM-ACS, presentan un patrón diferente de bandas en la electroforesis en campo pulsante y una secuencia tipo diferente en el MLST. No obstante, en los últimos años, muchos de estos aislados de SARM-CO se han introducido en los hospitales y se detectan también en pacientes ingresados, con lo que la distinción entre SARM-ACS y SARM-CO, en un futuro, será cada vez más difícil⁸.

Tratamiento

Tradicionalmente, los glucopéptidos (vancomicina y teicoplanina) han sido el tratamiento de elección en las infecciones por SARM, debido a las escasas alternativas terapéuticas existentes por la multiresistencia de este microorganismo. Sin embargo, las cepas de SARM-CO suelen ser sensibles a otros muchos antimicrobianos, con

lo que hay más opciones terapéuticas. En los pacientes ingresados con una infección grave por SARM-CO, la vancomicina continúa siendo el tratamiento de primera elección²⁵, con la excepción de las neumonías, en las que no se debería administrar vancomicina como tratamiento antibiótico único por su limitada penetración en el tejido pulmonar. Se desconoce si en estos casos la adición de clindamicina o linezolid (que pueden disminuir la producción de la LPV), o de inmunoglobulina intravenosa (que contiene anticuerpos frente a la LPV), tiene algún efecto en la evolución²⁰. No obstante, la mayoría de cepas de SARM-CO se detectan en pacientes ambulatorios con una infección leve de piel y partes blandas, que no requieren ingreso hospitalario. El tratamiento único con incisión y drenaje puede ser adecuado en niños y pacientes jóvenes con abscesos cutáneos no complicados y sin signos de infección sistémica. En situaciones en las que el paciente no responde a un drenaje adecuado, el tratamiento consiste en la administración de antibióticos orales, con o sin incisión más drenaje. La administración de un antibiótico, junto con el drenaje, está recomendada en casos de gravedad de los síntomas locales, presencia de signos o síntomas de infección sistémica, comorbilidad asociada, inmunosupresión y en los extremos de edad²⁶. Las cefalosporinas orales y las penicilinas antiestafilocócicas, que han sido la base del tratamiento de las infecciones de piel y partes blandas en la comunidad, son inactivas frente a SARM-CO; por lo tanto, el principal reto en el tratamiento empírico es sospechar la presencia de este microorganismo y utilizar diferentes alternativas terapéuticas. Entre éstas, la clindamicina constituye probablemente el tratamiento empírico de elección y se ha mostrado eficaz para el tratamiento de las infecciones causadas por aislados de SARM-CO²¹. Penetra adecuadamente en los tejidos, incluyendo pulmón, líquido pleural, tejido subcutáneo y hueso, y tiene la ventaja adicional de que, al actuar en el ribosoma bacteriano, inhibe la producción de toxinas, como la LPV. Se han descrito fracasos en pacientes que recibieron clindamicina para el tratamiento de infecciones causadas por aislados con resistencia inducible²¹. En consecuencia, en las cepas resistentes a la eritromicina y sensibles a la clindamicina, se debe realizar el *D-zone test*. La combinación trimetoprima-sulfametoxazol (cotrimoxazol) tiene una excelente actividad bactericida frente cepas de SARM-CO¹¹ y constituye una buena alternativa, pero no se han realizado ensayos clínicos amplios. Las tetraciclinas (doxiciclina o minociclina) son una opción razonable para el tratamiento de las infecciones de piel y partes blandas, pero no en infecciones sistémicas, ya que hay una tasa de fracasos inaceptable¹¹. Además, hay que tener en cuenta que, en el caso de resistencia mediada por *tet(M)*, hay resistencia a la doxiciclina, y que este hecho es relativamente frecuente en los SARM-CO aislados en España¹⁷. La utilización de rifampicina en monoterapia genera resistencia¹¹, por lo que, en caso de utilizarse, se debe asociar con otro antimicrobiano. En cuanto a las fluoroquinolonas, en los últimos años se ha producido un incremento en la resistencia al ciprofloxacino en cepas de SARM-CO en Estados Unidos⁷, y actualmente no deben constituir una elección prioritaria. Habitualmente se desarrolla resistencia a las quinolonas durante el tratamiento, por mutaciones en la ADN girasa, si bien las nuevas quinolonas, como el moxi-

floxacin, tienen una menor capacidad de inducir resistencias. Por otra parte, varios estudios indican que el tratamiento previo con ciprofloxacino o levofloxacino puede favorecer la colonización por SARM³². El linezolid tiene una eficacia superior a la vancomicina en la neumonía nosocomial por SARM y su uso debería limitarse a infecciones graves por SARM-CO, especialmente neumonías, debido a su elevado coste y a su toxicidad con el uso prolongado³³. Al igual que la clindamicina, tiene la ventaja de disminuir la producción de la LPV. Entre los nuevos antimicrobianos, la daptomicina se ha mostrado eficaz para el tratamiento de infecciones por SARM-CO³³, aunque no se puede utilizar en el tratamiento de la neumonía, y la tigeciclina presenta actividad frente a aislados de SARM-CO pero no hay experiencia clínica³⁴.

Colonización y prevención

El cultivo nasal para el estudio de la colonización por SARM se realiza ampliamente en los hospitales para el control de la infección por este microorganismo, pero en el caso de SARM-CO, la infección no está necesariamente precedida de la colonización nasal, por lo que es más difícil identificar y controlar poblaciones que están en riesgo de desarrollar una infección por este microorganismo. La colonización también puede ser gastrointestinal, lo que representaría una forma diferente de diseminación, y además los animales de compañía pueden ser también reservorios adicionales^{12,35}. En el momento actual, el conocimiento de la epidemiología de SARM-CO es incompleto, y el reto más importante es controlar la infección. En nuestro medio, dado que la incidencia de infecciones por SARM-CO es actualmente muy baja, lo más importante es su reconocimiento mediante la realización de cultivo y antibiograma de todos los abscesos e infecciones de piel adquiridos en la comunidad y no asumir que se pueda tratar de un aislado de *S. aureus* sensible a la meticilina. Por otra parte, como el contacto de piel con piel es el principal mecanismo de transmisión de una cepa colonizadora o productora de infección entre un huésped y otro, las medidas de prevención deben dirigirse a recalcar la importancia de las medidas de higiene general para reducir la transmisión. Éstas incluyen minimizar el riesgo de traumatismos cutáneos (como el uso de protectores tipo rodillera y calcetines durante algunas actividades deportivas), mantener las heridas limpias y tapadas con vendajes secos, lavado de manos e higiene corporal frecuentes, evitar compartir toallas o ropas que se hayan puesto en contacto directo con la piel y la eliminación adecuada de los objetos contaminados^{11,26}. En las personas no ingresadas, el tratamiento descolonizador de los pacientes o de sus contactos sólo está recomendado en dos situaciones: en pacientes con infecciones recurrentes por SARM-CO y ante un brote por SARM-CO en una comunidad bien definida (p. ej., en una familia)²⁹. El tratamiento descolonizador con mupirocina nasal y clorhexidina corporal durante 5 días se ha mostrado eficaz para el control de un brote de SARM-CO en Dinamarca en 22 de 23 pacientes²⁸ pero, en general, no hay suficientes datos que apoyen la utilización de agentes antimicrobianos o antisépticos para eliminar la colonización. Actualmente no hay ninguna vacuna frente a *S. aureus* disponible,

aunque hay varias en investigación con resultados prometedores³⁶.

Conclusiones

En la última década se ha producido un aumento de las infecciones por SARM en la comunidad cuyo origen no está relacionado con el hospital o con los cuidados sanitarios. Estas infecciones producidas por SARM-CO en pacientes que no presentan los factores de riesgo establecidos para la infección por SARM constituyen actualmente una epidemia en países como Estados Unidos. Aunque estos microorganismos generalmente producen infecciones leves de piel y partes blandas, también son agentes causales de neumonía necrosante, sepsis y otras enfermedades invasivas. Las cepas de SARM-CO tienen elementos genéticos y toxinas distintos de los de SARM-ACS, y estas diferencias se consideran las causas de las variaciones en la epidemiología y en la enfermedad. La detección precoz de la enfermedad por SARM-CO es crucial, pero también difícil. En España, donde la presencia de SARM-CO es todavía poco frecuente, lo más importante es su reconocimiento mediante la realización de cultivo y antibiograma de todos los abscesos e infecciones de piel adquiridos en la comunidad, con objeto de conocer la etiología y guiar el tratamiento. Actualmente, las medidas de higiene y el estricto cumplimiento de las precauciones de contacto son las medidas más eficaces para evitar la diseminación de SARM-CO.

Declaración de conflicto de intereses

Los autores han declarado no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Stefani S, Varaldo PE. Epidemiology of methicillin-resistant staphylococci in Europe. *Clin Microbiol Infect*. 2003;9:1179-86.
2. King MD, Humphrey BJ, Wang YF, Kourbatova EV, Ray SM, Blumberg HM. Emergence of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 clone as the predominant cause of skin and soft-tissue infections. *Ann Intern Med*. 2006;144:309-17.
3. Tristan A, Bes M, Meunier H, Lina G, Boudoghan B, Courvalin P, et al. Community-acquired MRSA in Europe. *Emerg Infect Dis*. 2007;13:594-600.
4. Tenover FC, McDougal LK, Goering RV, Killgore G, Projan SJ, Patel JB, et al. Characterization of a strain of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* widely disseminated in the United States. *J Clin Microbiol*. 2006;44:108-18.
5. Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, Lina G, Nimmo GR, Heffernan H, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg Infect Dis*. 2003;9:978-84.
6. Naimi TS, LeDell KH, Como-Sabetti K, Borchardt SM, Boxrud DJ, Etienne J, et al. Comparison of community- and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *JAMA*. 2003;290:2976-84.
7. Moran GJ, Krishnadasan A, Gorwitz RJ, Fosheim GE, McDougal LK, Carey RB, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections among patients in the emergency department. *N Engl J Med*. 2006;355:666-74.
8. Tenover F. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: It's not just in communities anymore. *Clin Microbiol Newslett*. 2006;28:33-6.
9. Moellering RC Jr. The growing menace of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Ann Intern Med*. 2006;144:368-70.
10. Chambers HF. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emerg Infect Dis*. 2001;7:178-82.

11. Crawford SE, Boyle-Vavra S, Daum RS. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. En: Scheld WM, Hooper DC, Hughes JM, editors. *Emerging Infections 7*. Washington: ASM Press, 2007.
12. van Duikeren E, Wollhagen MJ, Heck ME, Wannet WJ. Transmission of a Pantone-Valentine leukocidin-positive, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain between humans and a dog. *J Clin Microbiol*. 2005;43:6209-11.
13. Khanna T, Friendship R, Dewey C, Weese JS. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in pigs and pig farmers. *Vet Microbiol*. 2008;128:298-303.
14. Anderson ME, Lefebvre SL, Weese JS. Evaluation of prevalence and risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in veterinary personnel attending an international equine veterinary conference. *Vet Microbiol*. 2008;129:410-7.
15. Broseta A, Chaves F, Rajo P, Otero JR. Emergence of a single clone of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in southern Madrid children. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2006;24:31-5.
16. Manzur A, Domínguez AM, Pujol M, González MP, Limón E, Hornero A, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: an emerging threat in Spain. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14:377-80.
17. Cercenado E, Cuevas O, Marín M, Bouza E, Tincado P, Boquete T, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Madrid, Spain: transcontinental importation and polyclonal emergence of Pantone-Valentine leukocidin-positive isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008;61:143-9.
18. Faria NA, Oliveira DC, Westh H, Monnet DL, Larsen AR, Skov R, et al. Epidemiology of emerging methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Denmark: a nationwide study in a country with low prevalence of MRSA infection. *J Clin Microbiol*. 2005;43:1836-42.
19. Nimmo GR, Coombs GW. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Australia. *Int J Antimicrob Agents*. 2008;31:401-10.
20. Takano T, Higuchi W, Otsuka T, Baranovich T, Enany S, Saito K, et al. Novel characteristics of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains belonging to multilocus sequence type 59 in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52:837-45.
21. Boyle-Vavra S, Ereshefsky B, Wang CC, Daum RS. Successful multiresistant community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineage from Taipei, Taiwan, that carries either the novel staphylococcal chromosome cassette *mec* (SCC*mec*) type VT or SCC*mec* type IV. *J Clin Microbiol*. 2005;43:4719-30.
22. Eady EA, Cove JH. Staphylococcal resistance revisited: community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* – an emerging problem for the management of skin and soft tissue infections. *Curr Opin Infect Dis*. 2003;16:103-24.
23. Cuevas O, Cercenado E, Bouza E, Castellares C, Trincado P, Cabrera R, et al. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Spain: a multicentre prevalence study (2002). *Clin Microbiol Infect*. 2007;13:250-6.
24. Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, Fournet JC, Lina G, Bes M, et al. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying the gene for Pantone-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonias in young immunocompetent patients. *Lancet*. 2002;359:753-9.
25. Diep BA, Stone GG, Basuino L, Graber CJ, Miller A, Etages SA, et al. The arginine catabolic mobile element and staphylococcal cassette *mec* linkage: convergence of virulence and resistance in the USA300 clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis*. 2008;197:1523-30.
26. Gorwitz RJ. A review of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin and soft tissue infections. *Pediatr Infect Dis J*. 2008;27:1-7.
27. Gorwitz RJ, Kruszon-Moran D, McAllister SK, McQuillan G, McDougal LK, Fosheim GE, et al. Changes in the prevalence of nasal colonization with *Staphylococcus aureus* in the United States, 2001-2004. *J Infect Dis*. 2008;197:1226-34.
28. Urth T, Juul G, Skov R, Schanheyder HC. Spread of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST80-IV clone in a Danish community. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2005;26:144-9.
29. Gorwitz RJ, Jernigan DB, Powers JH, Jernigan JA. Strategies for clinical management of MRSA in the community: Summary of an experts' meeting convened by the Centers for Disease Control and Prevention. 2006. Disponible en: www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/ar/CAMRSA_ExpMtgStrategies.pdf
30. Gauduchon V, Cozon G, Vandenesch F, Genestier AL, Eyssade N, Peyrol S, et al. Neutralization of *Staphylococcus aureus* Pantone-Valentine leukocidin by intravenous immunoglobulin in vitro. *J Infect Dis*. 2004;189:346-53.
31. Frank AL, Marcinak JF, Mangat PD, Tjio JT, Kelkar S, Schreckenberger PC, et al. Clindamycin treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in children. *Pediatr Infect Dis J*. 2002;21:530-4.
32. Weber SG, Gold HS, Hooper DC, Karchmer AW, Carmeli Y. Fluoroquinolones and the risk for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitalized patients. *Emerg Infect Dis*. 2003;9:1415-22.
33. Katz DE, Martone WJ. Community-phenotype-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: a retrospective chart review of outcomes after treatment with daptomycin. *Clin Ther*. 2007;29:2440-7.
34. Mendes RE, Sader HS, Deshpande L, Jones RN. Antimicrobial activity of tigecycline against community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates recovered from North American medical centers. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008;60:433-6.
35. Boyce JM, Havill NL, Maria B. Frequency and possible infection control implications of gastrointestinal colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 2005;43:5992-5.
36. Otto M. Targeted immunotherapy for staphylococcal infections: Focus on Anti-MSCRAMM Antibodies. *BioDrugs*. 2008;22:27-36.



Natural history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonisation among residents in community long term care facilities in Spain

A. Manzur^{a,*}, M.A. Dominguez^b, E. Ruiz de Gopegui^c, D. Mariscal^d, L. Gavalda^e, F. Segura^f, J.L. Perez^c, M. Pujol^a and the Spanish Network for Research in Infectious Diseases[†]

^a Infectious Diseases Service, Hospital Universitari de Bellvitge, Barcelona, Spain

^b Microbiology Service, Hospital Universitari de Bellvitge, Barcelona, Spain

^c Microbiology Service, Hospital Universitari Son Dureta, Balearic Islands, Spain

^d Microbiology Service, Corporació Sanitària Parc Taulí, Barcelona, Spain

^e Preventive Medicine, Hospital Universitari de Bellvitge, Barcelona, Spain

^f Infectious Diseases Service, Corporació Sanitària Parc Taulí, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 November 2009

Accepted 20 May 2010

Available online 6 August 2010

Keywords:

Epidemiology

Geriatrics

Long term care

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

SUMMARY

The spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a major problem for both acute care hospitals and among residents in long term care facilities (LTCFs). We performed a cohort study to assess the natural history of MRSA colonisation in LTCF residents. Two cohorts of residents (231 MRSA carriers and 196 non-carriers) were followed up for an 18 month period, with cultures of nasal and decubitus ulcers performed every six months. In the MRSA carrier cohort, 110 (47.8%) residents had persistent MRSA colonisation for six months or longer, 44 (19.0%) had transient colonisation and nine (3.9%) were intermittently colonised. No risk factors for persistent MRSA colonisation could be determined. The annual incidence of MRSA acquisition was around 20% [95% confidence interval (CI): 14.3–25.5]. Antibiotic treatment was independently associated with MRSA acquisition (odds ratio: 2.27; 95% CI: 1.05–4.88; $P = 0.03$). Just two clones were distinguishable by pulsed-field gel electrophoresis and multilocus sequence typing: CC5-MRSA IV, which is widely disseminated in Spanish hospitals, and ST22-MRSA IV. This study adds to the knowledge of the epidemiology of MRSA in community LTCFs, which are important components of long term care in Spain.

© 2010 The Hospital Infection Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is endemic in most acute care hospitals and long term care facilities (LTCFs) in Spain and is a major problem for the healthcare system.^{1–4} Recently we found a 17% prevalence of MRSA colonisation in Spanish community LTCFs.³ In this cross-sectional study of *S. aureus* colonisation, we found comorbidity and size of LTCFs to be associated with methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) colonisation; and comorbidity, age, hospital admissions, medical devices, decubitus

ulcers and antibiotic use associated with MRSA colonisation.³ Other risk factors for nasal *S. aureus* colonisation among nursing home residents are indwelling devices, functional dependence, low nursing staff ratio, location of LTCF in a deprived area, and prolonged hospitalisation in the previous two years.^{5–7} There are limited data on the natural history of MRSA colonisation in LTCFs.^{6,8,9}

We conducted a multicentre cohort study among residents of community LTCFs for the elderly to further define the natural history of MRSA colonisation.

Methods

Study population and characteristics of community LTCFs

The characteristics of this population have been described.³ Nine community LTCFs for the elderly, located in two

* Corresponding author. Address: Infectious Disease Service, Hospital Universitari de Bellvitge, Fetixa Llarga s/n, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona 08907, Spain.

E-mail address: admanzur@yahoo.com.ar (A. Manzur).

[†] R. Fernández, D. Herreo, R. Casas, E. Fontseca, M. Bota, R. Iniesta, J. Albuquerque, C. Andreu, E. Campos, M. Vaquero, E. Antón, J. Trellis, A. Esteve, M. Canals, A. Diaz, E. Penelo, A. Oliver, J. Ariza, F. Gudiol.

communities in Spain (Catalonia and Balearic Islands) with 1586 beds (median: 120; range: 72–552) were included. Five were located in the catchment area of a 900 bed acute-care hospital (Hospital Universitari de Bellvitge, HUB), three in that of a 490 bed hospital (Corporació Sanitària Parc Taulí) and one in that of an 800 bed hospital (Hospital Universitari Son Dureta, HUSD). These facilities provide care for elderly long term residents, who may be disabled or infirm. Each LTCF has a dementia ward and its own medical staff. Residents are accommodated in rooms with one, two or three beds. Surveillance for MRSA and decolonisation procedures are not routine. In addition to standard precautions for all patient care, contact precautions are applied for residents colonised or infected with MRSA. Known MRSA carriers are not denied admission.¹⁰

Study design

This was a multicentre prospective cohort study conducted from November 2005 to May 2007. The study population consisted of all the residents in the LTCFs at baseline ($N = 1377$), and was identical to that of our previously published cross-sectional study.³ A total of 231 residents were found to be colonised with MRSA at baseline (MRSA carrier cohort). A representative sample of non-MRSA carriers was selected from the 1146 residents without MRSA colonisation at baseline as follows: for each MRSA carrier identified at baseline, one non-MRSA carrier was randomly selected from the same ward and screened six months later. Those with two consecutive negative cultures were included in the non-MRSA carrier cohort ($N = 196$). Subjects were visited by the investigators every six months for an 18 month period (Figure 1). During this

period no changes were made to infection control practices in the LTCFs and data from the study were not available to clinical staff.

Data collected and definitions

Complete clinical data were obtained for all residents at baseline and medical charts were reviewed thereafter at six-monthly intervals. Decubitus ulcers, hospital admissions, antibiotic consumption and clinical infections were recorded.

In the MRSA carrier cohort, persistent colonisation was defined as at least two MRSA-positive cultures separated by fewer than two negative cultures. Intermittent colonisation was defined as a second positive culture separated from the first by at least two negative cultures. Transient colonisation was defined as two or more negative cultures after a single positive culture for MRSA.

The prevalence of MRSA colonisation in each LTCF at baseline (17%; range: 6.7–35.8%) was used as surrogate for colonisation pressure.³ High colonisation pressure was defined as prevalence of MRSA colonisation of $>20\%$.^{11,12}

Microbiological methods

Every six months we obtained nasal and where applicable decubitus ulcer swabs for culture. Areas were swabbed with sterile cotton-tipped applicator sticks and placed into Stuart transport medium. Swabs were plated on to coagulase mannitol agar and selective MRSA agar (MRSA Select, Bio-Rad Laboratories, Madrid, Spain), then inoculated into staphylococcal enrichment broth composed of brain–heart infusion plus 7% NaCl. After 24 h of incubation at 35 °C, broths were subcultured on to coagulase

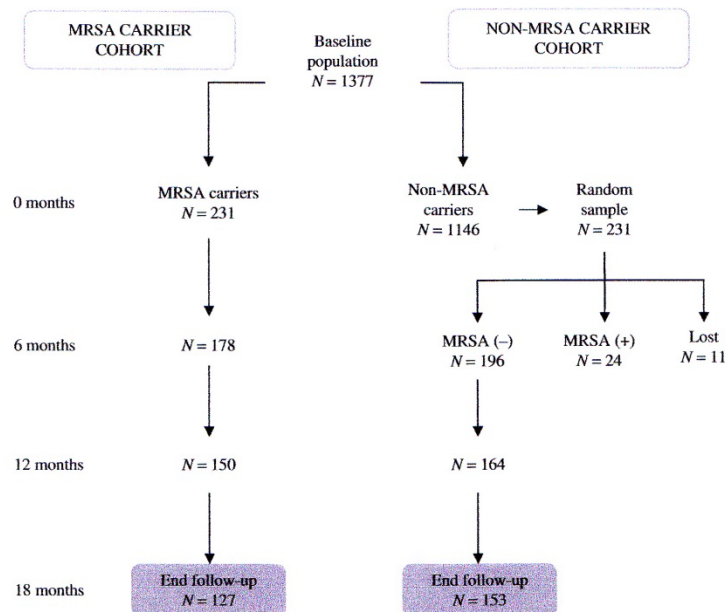


Figure 1. Residents considered and finally included at baseline and follow-up. MRSA, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

mannitol agar and selective MRSA agar. Plates were incubated for 48 h and inspected daily. Putative *S. aureus* colonies were identified by a latex agglutination test (Pastorex® Staph-plus, Bio-Rad) and DNase production (DNase Test Agar, Biomedics, Madrid, Spain). Testing for antimicrobial susceptibility was performed by the disc-diffusion method. Meticillin resistance was determined by cofoxitin disc diffusion following Clinical and Laboratory Standards Institute recommendations.¹³

Molecular epidemiology methods

Macrorestriction of chromosomal DNA and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis were performed on MRSA isolates identified in the microbiology laboratories of HUB and HUSD. Genomic DNA was digested with *Sma*I and restriction fragments were separated using a CHEF DR III apparatus (Bio-Rad) following published methodology, and interpreted according to Van Belkum.^{14,15} In a collection of representative isolates selected by their diverse PFGE patterns the following molecular studies were performed: staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) polymorphism, genes encoding class S (*lukS-PV*) and class F (*lukF-PV*) proteins for Pantón–Valentín leucocidin (PVL), and multilocus sequence typing (MLST).^{16–18}

Statistical analysis

Categorical variables were analysed with χ^2 -test or Fisher's test as appropriate and continuous variables by Student's *t*-test or non-parametric tests. Logistic regression models were used to analyse risk factors for persistence in the MRSA carrier cohort and risk factors for acquisition in the non-MRSA carrier cohort. Variables with $P < 0.15$ were included in the model. All statistical tests were two-tailed and $P < 0.05$ was deemed significant. SPSS package version 12.0 was used.

Approval for study was obtained from the Research Ethics Committee of HUB. No written informed consent was obtained since the study met criteria for a waiver of this requirement.

Results

Natural history of MRSA colonisation in the cohort colonised at baseline

A total of 231 residents colonised with MRSA at baseline were included. Of these, 104 were lost to follow-up; 70 died, 21 were discharged and 13 lost for other reasons. Table I compares residents who were lost to follow-up with those in this cohort followed to completion. Figure 2 shows the natural history of MRSA

Table I
Baseline characteristics of patients who did and did not complete the follow-up period in the MRSA carrier cohort

Characteristic	Completed follow-up N = 127	Lost to follow-up N = 104	P
Female sex	88 (69.3%)	71 (68.3%)	0.87
Age (years) ^a	81.6 (12.6)	83.3 (10.1)	0.52
Charlson index ≥ 2	50 (39.4%)	53 (50.9%)	0.08
Barthel index < 30	49 (38.6%)	50 (48.1%)	0.15
Medical devices	10 (7.9%)	21 (20.2%)	0.006
Decubitus ulcers	30 (23.6%)	28 (26.9%)	0.56
LTCFs with < 150 beds	56 (44.1%)	37 (35.6%)	0.19
LTCFs with prevalence of MRSA $> 20\%$	82 (64.6%)	55 (52.9%)	0.07
Two-site colonisation	17 (13.4%)	17 (16.3%)	0.53

MRSA, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; LTCF, long term care facility.
^a Mean (SD).

colonisation in the MRSA carrier cohort. We identified 110 (47.8%) persistent carriers, 44 (19.0%) transient carriers and nine (3.9%) intermittent carriers. The remaining 68 (29.4%) could not be classified under the definitions used.

In order to identify risk factors for persistence, persistent carriers were compared with transient and intermittent carriers (Table II). Only residents with decubitus ulcers were significantly more likely to be persistent MRSA carriers, but this was not statistically significant in multivariate analysis.

Incidence of MRSA colonisation in the cohort not colonised at baseline

Among 196 residents with negative cultures for MRSA at baseline and at 6 months, 43 were colonised with MSSA and 153 were not colonised with *S. aureus*. Table III compares characteristics of residents in the non-MRSA carrier cohort who were lost to follow-up with those who were followed to completion of the study. Thirty-nine residents acquired MRSA while in the LTCF. The incidence of MRSA colonisation during LTCF stay was 19.9% [95% confidence interval (CI): 14.3–25.5] per year. Antibiotic use was independently associated with acquisition of MRSA (odds ratio: 2.12; 95% CI: 1.05–4.45; $P = 0.05$) (Table IV).

Molecular epidemiology

Among 491 residents of five LTCFs related to HUB, MRSA was isolated from 144 (276 MRSA isolates), 108 of whom were identified at baseline. All 276 MRSA isolates were studied by PFGE and 88% belonged to a single clone. Representative strains of this dominant clone belonged to ST146, single locus variant by MLST typing of ST5, founder of clonal complex 5. All belonged to SCC*mec* type IV and were PVL negative. Among 466 residents of one LTCF related to HUSD, 39 MRSA isolates were identified at baseline. Two different strains, clone A (three subtypes) and clone C (five subtypes) were recognised by PFGE. Clone A belongs to ST125 MRSA-IV and clone B to ST22-MRSA IV. All strains were PVL negative and carried SCC*mec*IV. Subsequent MRSA isolates had the same PFGE profiles as the initial isolates.

Discussion

We have previously reported a prevalence of MRSA colonisation of ~17% among residents of community LTCFs in Spain.³ This is similar to reports from other European countries, but is lower than the prevalence reported in Veterans Affairs facilities in the USA.^{19–22} There is little information on the dynamics of MRSA colonisation in residents of community LTCFs.

Most of the carriers we identified had persistent MRSA colonisation. This agrees with studies gathered in Veterans Affairs facilities, albeit with different epidemiological features.⁶ We did not identify any factor that distinguished persistent MRSA carriers from transient and intermittent carriers. Stone *et al.* found that only bacterial burden could distinguish the groups.²³ Defining the duration of colonisation is problematic, because low bacterial burdens lead to false-negative results and the limited number of samples collected from residents could contribute towards the misclassification of colonisation status.

There was a high incidence of MRSA colonisation in this study, ~20% per annum. Only antibiotic use was independently associated with MRSA acquisition in LTCFs. We used the prevalence of MRSA colonisation in each LTCF at baseline as a surrogate for colonisation pressure. This is regarded as an important determinant of the probability of acquisition when organisms spread mainly via cross-colonisation.^{11,12} In our population, the probability of MRSA

218

A. Manzur et al. / Journal of Hospital Infection 76 (2010) 215–219

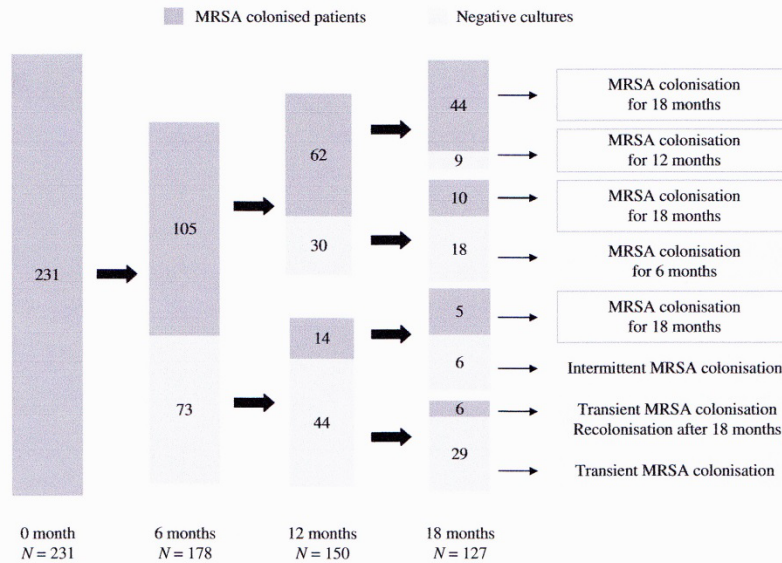


Figure 2. Natural history of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) colonisation in the MRSA carrier cohort. Results of MRSA detection performed at each point of the study. Subjects lost to follow-up are not included.

acquisition was no greater in LTCFs with a high baseline MRSA prevalence, which we defined as >20%. Perhaps the baseline prevalence of MRSA colonisation in an LTCF did not represent adequately the colonisation pressure throughout the study period.

The spread of MRSA in community LTCFs increases the reservoir of this organism in the healthcare setting, and residents transferred from LTCFs account for a large part of the burden of hospitalised MRSA carriers. Programmes for detection of carriers at hospital admission should take account of this.^{24–26}

Regarding the molecular epidemiology results, ST146 and ST125 are single locus variants of ST5, and therefore both belong to CC5. Remarkably, only two distinct clones could be distinguished by

PFGE and MLST: CC5-MRSA IV and ST22-MRSA IV. The former has been reported to be widely disseminated in Spanish hospitals.^{27,28} The dominance of clone ST146-MRSA-IV made it impossible to differentiate between persistent colonisation and recurrent acquisition.

Our study has a number of limitations. Apart from nasal swabs, we cultured swabs only from decubitus ulcers, the most frequent skin lesion. High levels of MRSA colonisation in decubitus ulcers have been reported among LTCF residents.^{9,21,29} However, recent results suggest that most community LTCF residents with MRSA are colonised at multiple sites. Some colonised residents are not detected unless multiple sites are sampled and one-third are missed if only a nasal swab is collected.⁸ We did not collect data on potential confounders such as nursing staff:bed ratio, invasive devices or functional status of residents. Functional status is likely to have been poorer in those lost to follow-up, because deaths

Table II Risk factors for persistent MRSA colonisation among residents in community long term care facilities

	Transient or intermittent colonisation N = 53	Persistent MRSA colonisation N = 110	Bivariate analysis P	Logistic regression OR (95% CI)
Aged >85 years	22 (41.5%)	45 (40.9%)	0.94	0.99 (0.96–1.02)
Female sex	43 (81.1%)	73 (66.4%)	0.06	2.02 (0.91–4.50)
Charlson index ≥2	16 (30.8%)	46 (42.6%)	0.15	0.55 (0.28–1.08)
Barthel index <30	23 (34.8%)	43 (39.8%)	0.59	
Decubitus ulcers	7 (13.7%)	30 (27.5%)	0.05	0.51 (0.22–1.15)
Two-site colonisation	3 (9.7%)	17 (19.1%)	0.23	
Hospital admissions	6 (11.5%)	23 (21.1%)	0.14	0.61 (0.55–1.44)
Antibiotic use	28 (53.8%)	67 (61.5%)	0.36	
LTCFs with MRSA colonisation prevalence >20%	30 (57.7%)	73 (67.0%)	0.25	

MRSA, meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*; OR, odds ratio; CI, confidence interval; LTCF, long term care facility.

Table III Baseline characteristics of residents who did and did not complete follow-up in the non-MRSA carrier cohort

Characteristic	Completed follow-up N = 153	Lost to follow-up N = 43	P
Female sex	103 (67.3%)	31 (72.1%)	0.55
Age (years) ^a	80.4 (11.1)	83.4 (11.6)	0.89
Charlson index ≥2	49 (32.0%)	17 (39.5%)	0.36
Barthel index <30	52 (34.2%)	25 (58.1%)	0.005
Decubitus ulcers	10 (6.5%)	7 (16.3%)	0.05
LTCFs with <150 beds	53 (34.6%)	23 (46.5%)	0.16
LTCFs with MRSA prevalence >20%	90 (58.8%)	33 (76.7%)	0.03

MRSA, meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*; LTCF, long term care facility.
^a Mean (SD).

Table IV
Risk factors associated with MRSA acquisition in community long term care facilities

	New MRSA carriers N = 39	Non-MRSA carriers N = 157	Bivariate analysis P	Logistic regression OR (95% CI)
Age (years) ^a	78.6 (12.3)	81.6 (10.9)	0.88	0.98 (0.95–1.01)
Female sex	24 (61.5%)	110 (70.1%)	0.31	0.74 (0.34–1.64)
Charlson index ≥2	14 (35.9%)	55 (33.1%)	0.73	
Barthel index <30	18 (46.2%)	59 (37.8%)	0.34	
Decubitus ulcers	6 (15.4%)	11 (7.0%)	0.09	2.17 (0.73–6.52)
Hospital admissions	6 (15.4%)	21 (13.4%)	0.75	
Antibiotic use	25 (64.1%)	69 (43.9%)	0.02	2.12 (1.05–4.45)
LTCFs with MRSA prevalence >20%	23 (59.0%)	100 (63.7%)	0.59	

MRSA, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; OR, odds ratio; CI, confidence interval; LTCF, long term care facility.

^a Mean (SD).

accounted for most of them, and poor functional status is associated with earlier death in this population.³⁰

Few longitudinal studies have assessed the incidence of MRSA colonisation among residents of LTCFs.⁵ This multicentre prospective study adds to existing knowledge of natural history of MRSA in community LTCFs and may inform more effective control measures.

Conflict of interest statement

None declared.

Funding source

Supported by Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III, Spanish Network for the Research in Infectious Diseases (REIPI RD06/0008).

References

- Cretnik TZ, Vovko P, Retelj M, et al. Prevalence and nosocomial spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a long-term-care facility in Slovenia. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2005;**26**:184–190.
- Dominguez MA, De Lencastre H, Linares J, Tomasz A. Spread and maintenance of a dominant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone during an outbreak of MRSA disease in a Spanish hospital. *J Clin Microbiol* 1994;**32**:2081–2087.
- Manzur A, Gavalda L, Ruiz de Gopegui E, et al. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and factors associated with colonization among residents in community long-term-care facilities in Spain. *Clin Microbiol Infect* 2008;**14**:867–872.
- Olona-Cabases M, Tico-Falguera N, Ramirez-Garceran L, Del Valle-Ortiz O, Castello-Verdu T, Garcia-Fernandez L. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a four-year experience in a spinal cord injury unit in Spain. *Spinal Cord* 1996;**34**:315–319.
- Mody L, Maheshwari S, Galecki A, et al. Indwelling device use and antibiotic resistance in nursing homes: identifying a high-risk group. *J Am Geriatr Soc* 2007;**55**:1921–1926.
- Bradley SF, Terpenning MS, Ramsey MA, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: colonization and infection in a long-term-care facility. *Ann Intern Med* 1991;**115**:417–422.
- Barr B, Wilcox MH, Brady A, Parnell P, Darby B, Tompkins D. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization among older residents of care homes in the United Kingdom. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2007;**28**:853–859.
- Mody L, Kauffman CA, Donabedian S, Zervos M, Bradley SF. Epidemiology of *Staphylococcus aureus* colonization in nursing home residents. *Clin Infect Dis* 2008;**46**:1368–1373.
- Muder RR, Brennen C, Wagener MM, et al. Methicillin-resistant staphylococcal colonization and infection in a long-term care facility. *Ann Intern Med* 1991;**114**:107–112.
- Rodríguez-Baño J, Bischofberger C, Alvarez-Lerma F, et al. Surveillance and control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Spanish hospitals. A GEH-SEIMC and SEMSPH consensus document. *Enferm Infect Microbiol Clin* 2008;**26**:285–298.
- Bonten M, Slaughter S, Ambergen AW, et al. The role of “colonization pressure” in the spread of vancomycin-resistant enterococci. An important infection control variable. *Arch Intern Med* 1998;**158**:1127–1132.
- Merrer J, Santoli F, Appéré-De Vecchi C, Tran B, De Jonghe B, Outin H. “Colonization pressure” and risk of acquisition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a medical intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2000;**21**:718–723.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 16th informational supplement. CLSI document M100-S16*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2006.
- Chung M, De Lencastre H, Matthews P, et al. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by pulsed field gel electrophoresis: comparison of results obtained in a multilaboratory effort using identical protocols and MRSA strains. *Microb Drug Resist* 2000;**6**:189–197.
- Van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, et al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin Microbiol Infect* 2007;**13**:1–46.
- Milheiro C, Oliveira DC, De Lencastre H. Multiplex PCR strategy for subtyping the staphylococcal cassette chromosome mec type IV in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: ‘SCmec IV multiplex’. *J Antimicrob Chemother* 2007;**60**:42–48.
- Lina GM, Piemont Y, Godail-Gamot F, et al. Involvement of Pantone–Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis* 1999;**29**:1128–1132.
- Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2000;**38**:1008–1015.
- O’Sullivan NP, Keane CT. The prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among the residents of six nursing homes for the elderly. *J Hosp Infect* 2000;**45**:322–329.
- von Baum H, Schmidt C, Svoboda D, Bock-Hensley O, Wendt C. Risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage in residents of German nursing homes. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2002;**23**:511–515.
- Bradley SF. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: long-term care concerns. *Am J Med* 1999;**106**:25–10S.
- Mulhausen PL, Harrell IJ, Weinberger M, Kochersberger GG, Feussner JR. Contrasting methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in veteran’s affairs and community nursing homes. *Am J Med* 1996;**100**:24–31.
- Stone ND, Lewis DR, Lowery HK, et al. Importance of bacterial burden among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriers in a long-term care facility. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008;**29**:143–148.
- Manzur A, Vidal M, Pujol M, et al. Predictive factors of methicillin resistance among patients with *Staphylococcus aureus* bloodstream infection at hospital admission. *J Hosp Infect* 2007;**66**:135–141.
- Gavalda L, Masuet C, Beltran J, et al. Comparative cost of selective screening to prevent transmission of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), compared with the attributable costs of MRSA infection. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2006;**27**:1264–1266.
- Cooper BS, Medley GF, Stone SP, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitals and the community: stealth dynamics and control catastrophes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;**101**:10223–10228.
- Vindel A, Cuevas O, Cercenado E, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Spain: molecular epidemiology and utility of different typing methods. *J Clin Microbiol* 2009;**47**:1620–1627.
- Rodríguez-Baño J, Domínguez M, Millán A, et al. Clinical and molecular epidemiology of community-acquired, healthcare-associated and nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Spain. *Clin Microbiol Infect* 2009;**15**:1111–1118.
- Ruiz de Gopegui E, Oliver A, Ramirez A, Gutiérrez O, Andreu C, Pérez JL. Epidemiological relatedness of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from a tertiary hospital and a geriatric institution in Spain. *Clin Microbiol Infect* 2004;**10**:339–342.
- Mahoney F, Barthel DW. Functional evaluation: the Barthel index. *Md State Med J* 1965;**14**:61–65.



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original

Diseminación nosocomial de *Staphylococcus hominis* resistente al linezolid en dos hospitales de Mallorca

Enrique Ruiz de Gopegui^{a,*}, Carmen Iuliana Marinescu^a, Paz Díaz^b, Antònia Socías^c, Margarita Garau^b, José Ignacio Ayestarán^d, Antonio Pareja^e, M^a Carmen Gallegos^b, José L. Pérez^a y Antonio Oliver^a

^a Servicio de Microbiología, Hospital Universitari Son Espases, Palma de Mallorca, España

^b Servicio de Microbiología, Hospital Son Llàtzer, Palma de Mallorca, España

^c Unidad de Cuidados Intensivos, Hospital Son Llàtzer, Palma de Mallorca, España

^d Unidad de Cuidados Intensivos, Hospital Universitari Son Espases, Palma de Mallorca, España

^e Unidad de Epidemiología y Control de Infecciones, Hospital Son Llàtzer, Palma de Mallorca, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 31 de octubre de 2010

Aceptado el 3 de febrero de 2011

On-line el 23 de marzo de 2011

Palabras clave:

Staphylococcus
Resistencia al linezolid
ARNr 23S

RESUMEN

Introducción: A partir del 2008 se detectaron varios aislados de *Staphylococcus hominis* (*S. hominis*) multirresistentes, incluyendo resistencia al linezolid y a la teicoplanina, en pacientes ingresados en dos hospitales de Mallorca. Por ello, se inició un estudio para determinar la epidemiología molecular y el mecanismo de resistencia al linezolid.

Métodos: El estudio de epidemiología molecular se realizó mediante electroforesis en campo pulsado (ECP), tras digestión con *Apal*. Se efectuó amplificación de un fragmento de los genes ARNr 23S (con secuenciación posterior) y *cfi*.

Resultados: Desde marzo de 2008 hasta febrero de 2009 se detectaron 15 aislados de *S. hominis* resistentes al linezolid y a la teicoplanina, procedentes de 14 pacientes. Todos ellos excepto uno habían ingresado en las Unidades de Cuidados Intensivos de alguno de los dos hospitales. La mayoría de los aislados (9) se obtuvieron en hemocultivos. Gran parte de los pacientes infectados (12 de los 15 episodios infecciosos, el 80,0%) recibieron pautas de linezolid antes de la detección del aislado resistente. La ECP reveló la presencia de un único clon entre los aislados de *S. hominis* resistentes al linezolid. Se detectó la mutación G2576T en todas las cepas resistentes, mientras que la PCR del gen *cfi* fue negativa en las mismas. Todos los aislados fueron también resistentes a la penicilina, oxacilina, trimetoprim-sulfametoxazol, ciprofloxacino, levofloxacino y tobramicina; y sensibles a la eritromicina, tetraciclina, gentamicina y daptomicina. La CMI a la vancomicina fue de 4 µg/ml en todos ellos.

Conclusiones: La detección de cepas de estafilococos resistentes al linezolid resalta la necesidad de racionalizar el uso del linezolid y mantener un control activo de dicha resistencia con objeto de preservar la utilidad clínica de este antimicrobiano.

© 2010 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Nosocomial spread of linezolid-resistant *Staphylococcus hominis* in two hospitals in Majorca

ABSTRACT

Objective: Since March 2008, several linezolid and teicoplanin-resistant *Staphylococcus hominis* (*S. hominis*) isolates have been recovered from patients admitted to the two major hospitals on the island of Majorca, Spain. For this reason, a study was conducted to determine the molecular epidemiology of these isolates and the mechanism of linezolid resistance.

Methods: The molecular epidemiology study was performed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis, after digestion with *Apal*. Linezolid resistance mechanisms were evaluated by PCR amplification of a fragment of the domain V of the 23S rRNA gene (followed by sequencing) and *cfi* gene.

Keywords:

Staphylococcus
Linezolid resistance
23S rRNA

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: enrique.ruiz@ssib.es (E. Ruiz de Gopegui).

0213-005X/\$ – see front matter © 2010 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

doi:10.1016/j.eimc.2011.02.001

Results: From March 2008 to February 2009, 15 linezolid and teicoplanin-resistant *S. hominis* isolates were recovered from 14 patients. All of them, except one, were hospitalised in the intensive care units of either of the two institutions. Isolates were obtained mainly from blood cultures (9). The majority of infected patients (12 of 15 infectious episodes, 80.0%) had received courses of linezolid prior to detection of the resistant isolate. PFGE analysis revealed the presence of a unique clone among linezolid resistant *S. hominis* isolates. The G2576T mutation was detected in all the linezolid resistant strains. None of the resistant isolates showed a positive PCR for the *cfr* gene. All of the isolates were also resistant to penicillin, oxacillin, trimethoprim-sulfamethoxazole, ciprofloxacin, levofloxacin, and tobramycin; whereas all of them were susceptible to erythromycin, tetracycline, gentamicin, and daptomycin. The MIC of vancomycin was 4 µg/ml for all the strains.

Conclusions: The detection of linezolid resistant *Staphylococci* highlights the need to rationalise the use of linezolid, and maintain an active surveillance of its resistance to preserve the clinical usefulness of this antimicrobial.

© 2010 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

Los estafilococos coagulasa negativa (SCN) se encuentran frecuentemente como residentes ubicuos en la piel y membranas mucosas de personas sanas. Sin embargo, constituyen también la principal causa de bacteriemia y de infecciones relacionadas con catéteres, especialmente en los pacientes ingresados en las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI)^{1,2}. En España, en dos estudios multicéntricos, entre los aislados clínicamente significativos de SCN, *Staphylococcus hominis* (*S. hominis*) ocupó el segundo lugar en frecuencia tras *Staphylococcus epidermidis*^{3,4}.

La mayoría de aislados de SCN son habitualmente resistentes a múltiples antibióticos, incluyendo las penicilinas resistentes a penicilinasas⁵. Por ello, se recomienda el tratamiento empírico con glucopéptidos (vancomicina o teicoplanina) para cubrir las infecciones producidas por estos microorganismos. No obstante, la aparición de cepas de SCN con sensibilidad disminuida a los glucopéptidos (incluyendo aislados resistentes a glucopéptidos), los parámetros farmacocinéticos subóptimos para este grupo antibiótico y la toxicidad limitan su utilidad⁶. Por todo ello se ha considerado la administración de otras familias de antimicrobianos, entre ellas las oxazolidinonas. El mecanismo de acción de las oxazolidinonas se basa en la unión a la subunidad 50S del ribosoma bacteriano (concretamente al dominio V del ARNr 23S), inhibiendo la síntesis proteica⁷. El linezolid es, hasta el momento, la única oxazolidinona aprobada para su uso.

La resistencia al linezolid en SCN es extremadamente rara, aunque incrementándose en los últimos años. En un informe que recoge la resistencia al linezolid en cepas de grampositivos detectadas en el año 2008 (Zyvox® *Annual Appraisal of Potency and Spectrum* [ZAAPS]), en el que participaron 24 países del mundo, entre 748 aislados de SCN, solamente 3 de ellos (0,4%) fueron resistentes al linezolid⁸. El mecanismo de resistencia al linezolid más frecuentemente detectado en estafilococos se produce por mutaciones en el dominio V del gen ARNr 23S, mayoritariamente la mutación G2576T (según la numeración para *Escherichia coli* [*E. coli*])^{5,7-9}. La resistencia al linezolid también puede producirse por mutaciones en las proteínas ribosomales L3 o L4, y por la presencia del gen *cfr*, que forma parte de un plásmido que puede ser horizontalmente transferido a otros estafilococos¹⁰.

Desde marzo del 2008, se detectaron los primeros aislados de *S. hominis* resistentes al linezolid y a la teicoplanina, en dos hospitales terciarios de Mallorca, principalmente a partir de hemocultivos de pacientes hospitalizados en UCI. Este trabajo se llevó a cabo con el fin de investigar el mecanismo de resistencia y la epidemiología molecular de los aislados de *S. hominis* resistentes al linezolid detectados en los dos hospitales desde marzo de 2008 hasta febrero de 2009.

Material y métodos

Hospitales participantes

Este estudio fue llevado entre marzo de 2008 y febrero de 2009 en los dos principales hospitales públicos de la isla de Mallorca, España. El Hospital Son Llàtzer (HSL) es un hospital terciario con 377 camas. La UCI del HSL es una unidad médico-quirúrgica con 18 camas. El Hospital Universitario Son Dureta (HUSD) es el hospital terciario de referencia para las Islas Baleares con 740 camas. La UCI del HUSD tiene 30 camas divididas en 5 unidades según enfermedad Coronaria, Médica, Quirúrgico-Traumatológica, Neurocrítica y de Cirugía Cardíaca.

Identificación bacteriana

Los aislados se identificaron mediante el sistema Vitek® 2 (bioMérieux, Francia) en HSL o API® ID 32 STAPH (bioMérieux, Francia) en HUSD. Para confirmar la identificación de *S. hominis*, se realizó en una cepa resistente al linezolid una amplificación del gen ARNr 16S usando los cebadores 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG -3') y 907R (5'-CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT -3')¹¹. Posteriormente se realizó secuenciación de dicho gen con los cebadores 27F y 519R (5'-GWA TTA CCG CGG CKG CTG -3')¹¹ y se consultaron las bases de datos del Genbank y del *Ribosomal Database Project*.

Pruebas de sensibilidad antimicrobianas

El estudio de sensibilidad inicial se realizó con la tarjeta Vitek® 559 (HSL) o por disco-difusión (HUSD), según las recomendaciones del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI)¹². Posteriormente, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los aislados de *S. hominis* resistentes al linezolid mediante tiras de E-test® (bioMérieux, Francia), para los siguientes antimicrobianos: linezolid, oxacilina, vancomicina, teicoplanina, ciprofloxacin, eritromicina, clindamicina, trimetoprim-sulfametoxazol (cotrimoxazol), y daptomicina. Se consideraron los puntos de corte definidos por el CLSI¹².

Detección de mutaciones en ARNr 23S

Para identificar las posibles mutaciones, amplificamos el dominio V del gen ARNr 23S en tres aislados de *S. hominis* sensibles al linezolid (todos fueron detectados en hemocultivos, uno del HSL y dos del HUSD), y en cinco aislados de *S. hominis* resistentes al linezolid (tres del HSL y dos del HUSD). Se usaron los cebadores 5'-TGG GCA CTG TCT CAA CGA -3' (correspondientes a las bases 1984-2001 del ARNr 23S de *E. coli*) y 5'-GGA TAG GGA CCG AAC TGT CTC-3' (correspondientes a las bases 2597-2617 del ARNr 23S de *E. coli*) para amplificar un fragmento de 634 pb⁸. Los productos de PCR

fueron secuenciados y alineados con las correspondientes secuencias de oligonucleótidos de la cepa de referencia de *Staphylococcus aureus* (número de acceso en GenBank X68425).

Detección del gen *cfr*

Se realizó una PCR para detectar la presencia del gen *cfr*, según las condiciones descritas por Kehrenberg¹³. Como control positivo para esta PCR, se usó una cepa de *S. aureus* resistente al linezolid y a la meticilina procedente del Hospital Clínico San Carlos, Madrid¹⁴.

Estudios de epidemiología molecular

La relación clonal de los aislados de *S. hominis* resistentes al linezolid se determinó mediante electroforesis en campo pulsado (ECP). En cada ECP, se incluyeron algunos aislados de *S. hominis* sensibles al linezolid. Al principio del estudio, se usó *Sma*I como enzima de restricción, pero sólo se visualizaron 3-5 bandas para cada cepa. Luego, en una segunda fase, se empleó la enzima de restricción *Apal*, según el protocolo descrito por Sorlozano y Vindel¹⁵. Los fragmentos de ADN cromosómicos se separaron usando el sistema Chef-DR III[®] (Bio-Rad, Richmond, EE.UU.), con las siguientes condiciones: pulso inicial 0,1 s, pulso final 30 s, tiempo 24 h a 6 V/cm. Los patrones de bandas de la ECP se interpretaron según los criterios de Tenover¹⁶.

Resultados

Durante el periodo del estudio (marzo 2008-febrero 2009), se identificaron en los dos hospitales un total de 15 aislados clínicos de *S. hominis* subsp. *hominis* resistentes al linezolid en 14 pacientes distintos (tabla 1). Un paciente tuvo dos hemocultivos positivos a este microorganismo (con el mismo antibiograma) en dos ingresos diferentes separados por 100 días. De los 15 aislados, 12 se detectaron en pacientes ingresados en el HSLL (11 de ellos en la UCI) y los otros 3 en el HUSD (todos ellos en la Subunidad Quirúrgica-Traumatológica de la UCI). La evolución en los 15 episodios infecciosos fue buena en 12 de ellos, otros 2 pacientes fallecieron por causas no relacionadas, mientras que el paciente restante desarrolló una bacteriemia con infección del cable de marcapasos por este microorganismo, falleciendo a los pocos días (tabla 1).

Los aislados se obtuvieron principalmente de hemocultivos (9), seguido de catéteres (2), y líquidos estériles (2). Además, se llevó a cabo un estudio de colonización (nasal, axilar, e inguinal) en los últimos tres pacientes ingresados en HSLL. Todos ellos tuvieron colonización axilar e inguinal por *S. hominis* multiresistente, con el mismo antibiograma que su cepa clínica correspondiente.

La secuenciación del gen ARNr 16S confirmó la identificación de *S. hominis* subsp. *hominis*. Todos estos aislados fueron resistentes a la penicilina, oxacilina (CMI > 256 µg/ml), teicoplanina (CMI > 256 µg/ml), trimetoprim-sulfametoxazol (CMI > 32 µg/ml), ciprofloxacino (CMI > 32 µg/ml), levofloxacino, tobramicina y linezolid (CMI ≥ 96 µg/ml). Todos estos aislados fueron sensibles a la eritromicina, tetraciclina, gentamicina y daptomicina. La CMI de la daptomicina fue de 0,25 µg/ml en todos ellos. Respecto a la vancomicina, todas las cepas presentaron una CMI de 4 µg/ml, todavía sensibles según las recomendaciones del CLSI¹⁷ (S ≤ 4 µg/ml, I 8-16 µg/ml, R > 32 µg/ml) pero resistentes según los criterios del *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) de enero de 2011¹⁷ (S ≤ 2 µg/ml, R > 2 µg/ml).

En relación con la clindamicina, casi todos los aislados tuvieron una sensibilidad intermedia a este antibiótico (CMI = 0,75 µg/ml), excepto en dos aislados. Uno de ellos fue sensible (CMI = 0,5 µg/ml) y el otro resistente a la clindamicina (CMI = 4 µg/ml). Todas las

Tabla 1
Características de los pacientes con *Staphylococcus hominis* resistente al linezolid

Paciente	Hospital	Fecha de aislamiento	Muestra	Sexo	Días de tratamiento con linezolid previos al aislamiento	Tratamiento previo con glucopéptidos	Probable origen contaminante	Tratamiento dirigido	Evolución
1	HSLL	29/03/2008	Hemocultivo	F	16	No	Sí	No	Muerte no relacionada
2	HSLL	22/05/2008	Hemocultivo	F	10	Vancomicina	No	Vancomicina	Buena
3	HSLL	06/08/2008	Hemocultivo	F	0	No	Sí	No	Buena
4	HSLL	19/08/2008	Hemocultivo	M	9	Vancomicina	Sí	No	Buena
5	HSLL	01/09/2008	Hemocultivo, cable marcapasos	F	6	No	No	Vancomicina	Muerte relacionada
6	HSLL	01/10/2008	Hemocultivo	M	0	No	Sí	Vancomicina	Buena
6	HSLL	21/01/2009	Hemocultivo	M	4	Vancomicina	No	Vancomicina	Buena
7	HUSD	11/11/2008	LCR	F	19	Vancomicina	Sí	Vancomicina	Muerte no relacionada
8	HUSD	16/11/2008	Catéter	M	17	No	No	Vancomicina	Buena
9	HSLL	17/12/2008	Hemocultivo	M	3	No	Sí	No	Buena
10	HSLL	28/01/2009	Líquido sinovial	F	42	No	Sí	No	Buena
11	HSLL	06/02/2009	Exudado herida	M	1	No	No	Vancomicina	Buena
12	HSLL	13/02/2009	Hemocultivo	M	0	No	Sí	No	Buena
13	HSLL	23/02/2009	BAS	F	11	Vancomicina	No	Tigeciclina	Buena
14	HUSD	26/02/2009	Catéter	M	11	No	No	Tigeciclina	Buena

HSLL: Hospital Son Llàtzer; HUSD: Hospital Universitario Son Dureta; LCR: líquido cefalorraquídeo; BAS: aspirado bronquial.

342

E. Ruiz de Gopegui et al / Enferm Infecc Microbiol Clin. 2011;29(5):339-344

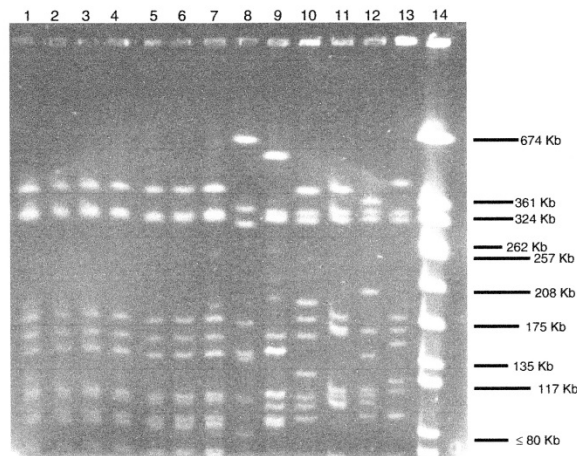


Figura 1. Electroforesis in campo pulsado de trece aislados de *Staphylococcus hominis* utilizando Apal como enzima de restricción. Líneas 1-6: aislados de *S. hominis* resistentes al linezolid del Hospital Son Llàtzer (HSLL). Línea 7: aislado de *S. hominis* resistente al linezolid del Hospital Universitario Son Dureta (HUSD). Línea 8: aislado de *S. hominis* sensible al linezolid del HUSD. Líneas 9-13: aislados de *S. hominis* sensibles al linezolid del HSLL. Línea 14: cepa de referencia de *Staphylococcus aureus* NCTC 8325.

cepas fueron sensibles a la rifampicina, excepto una que fue intermedia.

Los cinco aislados de *S. hominis* resistentes al linezolid secuenciados tuvieron la mutación G2576T (según numeración de *E. coli*) en el dominio V del gen ARNr 23S, mientras que ninguno de los tres aislados de *S. hominis* sensibles al linezolid secuenciados presentaron dicha mutación. En comparación con la secuencia del dominio V del gen ARNr 23S de la cepa control de *S. aureus* (número acceso GenBank X68425), nosotros también encontramos en todos los ocho aislados de *S. hominis* (tanto sensibles como resistentes al linezolid) la sustitución C2163T. Por ello, consideramos que esta sustitución es un polimorfismo de especie. No se detectó el gen *cfr* en ninguno de los aislados de *S. hominis*.

La ECP, tras digestión con *Sma*I, mostró que todos los aislados de *S. hominis* resistentes al linezolid tenían el mismo patrón electroforético, aunque mostraron sólo tres bandas, mientras que los aislados sensibles tuvieron 3-4 bandas en diferentes posiciones. La ECP usando Apal como enzima de restricción mostró que todos los aislados resistentes al linezolid pertenecían al mismo clon, mientras que todos los aislados de *S. hominis* sensibles pertenecían a diferentes clones (fig. 1).

Discusión

El linezolid fue aprobado para uso clínico en Estados Unidos en el año 2000 y en Europa en el 2001, con una excelente actividad contra la mayoría de los cocos grampositivos⁷. No se encontraron aislados de cocos grampositivos resistentes al linezolid antes de su aprobación y además, la resistencia por mutación es difícil de seleccionar *in vitro*¹⁸. No obstante, en el año 2001, un año después de su comercialización, se detectó en Boston, EE.UU., el primer aislado clínico de estafilococo resistente al linezolid. Este primer caso estaba producido por una cepa de *S. aureus* resistente a la metilina (SARM) con la mutación G2576T en el gen ARNr 23S, que se había detectado en un paciente que había recibido diálisis peritoneal en tratamiento previo con linezolid⁸. El primer SCN resistente al linezolid publicado fue una cepa de *S. epidermidis* detectada en EE.UU. en el 2002, también con la misma mutación¹⁹. Los primeros dos

brotes descritos de estafilococos resistentes al linezolid ocurrieron en el 2005, uno de ellos en Pittsburgh, EE.UU.²⁰, y el otro en Dublín, Irlanda²¹; ambos producidos por dos cepas de *S. epidermidis*. El mecanismo de resistencia al linezolid en los aislados de *S. epidermidis* del hospital americano no es conocido, pero todas las cepas resistentes del hospital irlandés contenían la mutación G2576T. En España, se han descrito varios brotes de SCN resistentes al linezolid con la mutación G2576T en aislados de *S. epidermidis*²², *Staphylococcus haemolyticus*²³ y *S. hominis*¹⁵. Por lo que respecta al gen *cfr*, la primera cepa de *S. aureus* detectada en humanos con dicho gen ocurrió en 2005 en Colombia²⁴, mientras que el primer SCN con el gen *cfr* se aisló en 2007 en EE.UU. en una cepa de *S. epidermidis*²⁵. Asimismo, en 2008 se detectó el primer brote de SARM con el gen *cfr* en el Hospital Clínico San Carlos, Madrid¹⁴.

En marzo de 2008, se detectó la primera cepa de *S. hominis* resistente al linezolid en Mallorca, en una paciente ingresada en la UCI del HSLL, que comenzó tratamiento con linezolid 16 días antes del aislamiento de la cepa resistente. El segundo aislado se observó en mayo 2008, en otra paciente de la misma UCI también tratada con linezolid. Pero, en agosto del 2008, a pesar de las medidas de control implantadas (aislamiento de los pacientes infectados y administración de un tratamiento antibiótico efectivo) se estableció en la UCI del HSLL una situación endémica, que persiste actualmente. Además, en enero de 2009, se detectó en el HSLL el primer paciente infectado por esta cepa hospitalizado fuera de la UCI. En el HUSD, los aislados de *S. hominis* resistentes al linezolid se detectaron por primera vez en dos pacientes ingresados en la UCI de este hospital en noviembre del 2008. Posteriormente, se aisló de nuevo en febrero del 2009 también en una paciente ingresada en la UCI.

De modo similar al primer brote descrito de *S. hominis* resistente al linezolid en Granada, España¹⁵, en la mayoría de nuestros pacientes, este microorganismo se aisló solamente en un vial de hemocultivo de un total de cuatro, por lo que podría considerarse como un contaminante de los hemocultivos. Pero, en algunos casos, detectamos *S. hominis* resistente al linezolid en líquidos corporales, aspirados bronquiales, o simultáneamente en catéter y hemocultivos. Llama la atención que algunos de los pacientes infectados tenían además una colonización axilar e inguinal por la misma cepa,

pero no colonización nasal. Esto está en concordancia con el trabajo de Center et al en el que encontraron, en neonatos, una mayor detección de aislados de *Staphylococcus warneri* con sensibilidad disminuida a la vancomicina en muestras cutáneas y de heces (32 aislados en 39 muestras) que en nasofaringe (7 de 39)²⁶.

Nosotros encontramos la mutación G2576T en el gen ARNr 23S en todos los cinco aislados de *S. hominis* resistentes al linezolid que secuenciamos. La aparición de la resistencia al linezolid se desarrolla en un proceso de dos pasos: inicialmente tiene lugar una mutación en la posición 2576 de una de las copias del gen ARNr 23S (los estafilococos poseen cinco o seis copias de este gen), seguida de una recombinación intracromosómica (conversión de genes), en la que se distribuye dicha mutación a las otras copias de los genes, confiriendo resistencia al linezolid⁹. Los aislados de estafilococos con un mayor número de copias mutadas del gen ARNr 23S suelen tener unos valores de la CMI del linezolid más altos²⁷.

Los mecanismos de resistencia al linezolid en *S. hominis* se caracterizaron por primera vez en los aislados del brote de Granada¹⁵. Ese trabajo describió la presencia de dos «nuevas mutaciones» simultáneamente en aislados de *S. hominis* resistentes al linezolid: C2190T y G2603T. Sin embargo, ellos no usaron la numeración de *E. coli* para las mutaciones, sino la numeración de la cepa de referencia de *S. aureus* X68425. De hecho, su mutación G2603T corresponde realmente a la clásica G2576T, como encontramos en nuestro estudio. Además, en el estudio de Granada no secuenciaron aislados de *S. hominis* sensibles al linezolid, con lo que la mutación C2190T que encontraron en los aislados resistentes (C2163T con la numeración de *E. coli*) es de hecho un polimorfismo de la especie *S. hominis*, también presente uniformemente en los aislados sensibles al linezolid de esta especie. No se ha estudiado específicamente si este polimorfismo C2163T confiere alguna ventaja a *S. hominis* en relación a otras especies de SCN, si bien, al detectarse la resistencia al linezolid en diferentes especies de estafilococos sin este polimorfismo, es probable que éste no juegue ningún papel en la resistencia al linezolid. Recientemente, se ha publicado la detección de la mutación G2576T en cinco aislados de *S. hominis* resistentes al linezolid en pacientes ingresados en la UCI de dos hospitales de Sicilia²⁸.

Dos aspectos adicionales no quedan claros en nuestro brote. Uno de ellos es la diseminación de la cepa desde la UCI del HSLI a la UCI del HUSD. En 2008, no se produjo ninguna transferencia de pacientes entre las UCI de ambos hospitales y tampoco hubo ningún traslado de instrumental entre ellas. No obstante, dos enfermeras estaban trabajando en las dos UCI al mismo tiempo, aunque no se realizó estudio de colonización del personal sanitario. De modo similar, se desconocen los factores responsables de la persistencia de la cepa en la UCI del HSLI, produciendo 1-2 infecciones cada mes. La cepa podría transmitirse de paciente a paciente a través de las manos del personal sanitario colonizado²⁹, o bien, podría haber un reservorio en el ambiente de la UCI. En el brote irlandés de *S. epidermidis* resistente al linezolid, los autores encontraron la misma cepa resistente en las cercanías de los pacientes colonizados y en un ordenador usado por el personal de la UCI²¹.

Una larga duración del tratamiento con linezolid, una dosificación insuficiente, y la administración repetida del linezolid son factores de riesgo para desarrollar resistencia a este antimicrobiano³⁰. La resistencia al linezolid no sólo se ha observado en pacientes con un tratamiento prolongado a dicho antimicrobiano, sino también en casos sin exposición obvia²⁰⁻²³. En nuestra serie, la mayoría de pacientes infectados (12 de 15 episodios infecciosos, el 80,0%) habían recibido ciclos de linezolid antes de la detección del aislado resistente. Con todo, 3 pacientes (20,0%) no recibieron linezolid, lo que sugiere la adquisición por transmisión cruzada^{21,23}.

Todos los aislados de *S. hominis* resistentes al linezolid fueron también resistentes a la teicoplanina y tuvieron por E-test CMI a la vancomicina de 4,0 µg/ml. En el momento actual, 4,0 µg/ml

es el límite superior del rango de sensibilidad según el CLSI¹², y resistente según el EUCAST¹⁷. Este perfil de resistencia a glucopeptidos está también presente en aislados resistentes al linezolid de *S. epidermidis*²⁰, *S. haemolyticus*²³ y *S. hominis*^{15,28}, todos ellas con la mutación G2576T. La relación entre esta mutación en el gen ARNr 23S y la resistencia a los glucopeptidos es desconocida. La resistencia a los glucopeptidos en *Staphylococcus* spp. es multifactorial³¹, siendo el engrosamiento de la pared celular una característica común³².

La incidencia creciente de infecciones causadas por aislados de estafilococos multiresistentes, incluyendo resistencia a la teicoplanina y al linezolid, es preocupante. Es crucial hacer un uso racional del linezolid y mantener un control activo de dicha resistencia para preservar la utilidad clínica de este antimicrobiano.

Financiación

Este trabajo ha sido parcialmente sufragado por el Ministerio de Ciencia e Innovación de España, Instituto de Salud Carlos III, a través de la Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI C03/14 y RD06/0008).

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Agradecimientos

Agradecemos a la Dra. Carmen Vidal de la Unidad de Secuenciación del HUSD (ahora Son Espases) su ayuda con los experimentos de las diferentes secuenciaciones, y a la Dra. Carmen Betriu y la Dra. Gracia Morales del Hospital Clínico San Carlos, Madrid, el envío de una cepa de *S. aureus* positiva para el gen *cfr*.

Bibliografía

- Rogers KL, Fey PD, Rupp ME. Coagulase-negative staphylococcal infections. *Infect Dis Clin North Am.* 2009;23:73-98.
- Mermel LA, Alon M, Bouza E, Craven DE, Flynn P, O'Grady NP, et al. Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of intravascular catheter-related infection: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2009;49:1-45.
- Cuevas O, Cercenado E, Goyanes MJ, Vindel A, Trincado P, Boquete T, et al. *Staphylococcus* spp. en España: situación actual y evolución de la resistencia a antimicrobianos (1986-2006). *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2008;26:269-77.
- Picazo JJ, Betriu C, Rodríguez-Avil I, Culebras E, López F, Gómez M. Grupo VIRA. Actividad comparativa de la daptomicina frente a *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina y frente a estafilococos coagulasa negativa. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010;28:13-6.
- Jones RN, Ross JF, Bell JM, Utsuki U, Fumiaki I, Kobayashi I, et al. Zyxov Annual Appraisal of Potency and Spectrum program: linezolid surveillance program results for 2008. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009;65:404-13.
- Goold IM. Clinical relevance of increasing glycopeptide CMIs against *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents.* 2008;31 Suppl 2:1-9.
- Livermore DM. Linezolid *in vitro*: mechanism and antibacterial spectrum. *J Antimicrob Chemother.* 2003;51 Suppl 2:9-16.
- Tsioufas S, Gold HS, Sakoulas G, Eliopoulos GM, Wennersten C, Venkataraman L, et al. Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *Lancet.* 2001;358:207-8.
- Woodford N, Livermore DM. Infections caused by Gram-positive bacteria: a review of the global challenge. *J Infect.* 2009;59 Suppl 1:4-16.
- Long KS, Poehlsgaard J, Kehrenberg C, Schwarz S, Vester B. The Cfr rRNA methyltransferase confers resistance to Phenicol, Lincosamides, Oxazolidinones, Pleuromutlins, and Streptogramin A antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50:2500-5.
- Lane DJ. 16S/23S rRNA sequencing. En: Stackebrandt E, Goodfellow M, editors. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Chichester: Wiley; 1991. p. 115-75.
- Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 19th informational supplement. M100-S19. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, Pennsylvania: CLSI document; 2009.
- Kehrenberg C, Schwarz S. Distribution of florfenicol resistance genes *fexA* and *cfr* among chloramphenicol-resistant *Staphylococcus* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50:1156-63.

14. Morales G, Picazo JJ, Baos E, Candel FJ, Arribi A, Peláez B, et al. Resistance to linezolid is mediated by the *cfr* gene in the first report of an outbreak of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis*. 2010;50:821–5.
15. Sorlozano A, Gutiérrez J, Martínez T, Yuste ME, Pérez-López JA, Vindel A, et al. Detection of new mutations conferring resistance to linezolid in glycopeptide-intermediate susceptibility *Staphylococcus hominis* subspecies *hominis* circulating in an intensive care unit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010;29:73–80.
16. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, CMkelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*. 1995;33:2233–9.
17. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 1.3, January 5, 2011. Disponible en: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints.
18. Zurenko GE, Yagi BH, Schaadt RD, Allison JW, Kilburn JO, Glickman SE, et al. *In vitro* activities of U-100592 and U-100766, novel oxazolidinone antibacterial agents. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996;40:839–45.
19. Mutnick AH, Enne V, Jones RN. Linezolid resistance since 2001: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Ann Pharmacother*. 2003;37:769–74.
20. Potoski BA, Adams J, Clarke L, Shutt K, Linden PK, Baxter C, et al. Epidemiological profile of linezolid-resistant coagulase-negative staphylococci. *Clin Infect Dis*. 2006;43:165–71.
21. Kelly S, Collins J, Maguire M, Gowing C, Flanagan M, Donnelly M, et al. An outbreak of colonization with linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* in an intensive therapy unit. *J Antimicrob Chemother*. 2008;61:901–7.
22. Treviño M, Martínez-Lamas L, Romero-Jung PA, Giráldez JM, Álvarez-Escudero J, Regueiro BJ. Endemic linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* in a critical care unit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2009;28:527–33.
23. Rodríguez-Aranda A, Daskalaki M, Villar J, Sanz F, Otero JR, Chaves F. Nosocomial spread of linezolid-resistant *Staphylococcus haemolyticus* infections in an intensive care unit. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009;63:398–402.
24. Toh SM, Xiong L, Arias CA, Villegas MV, Lolans K, Quinn J, et al. Acquisition of a natural resistance gene renders a clinical strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* resistant to the synthetic antibiotic linezolid. *Mol Microbiol*. 2007;64:1506–14.
25. Mendes RE, Deshpande LM, Castanheira M, DiPersio J, Saubolle MA, Jones RN. First report of *cfr*-mediated resistance to linezolid in human staphylococcal clinical isolates recovered in the United States. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52:2244–6.
26. Center KJ, Rebolli AC, Hubler R, Rodgers GL, Long SS. Decreased vancomycin susceptibility of coagulase-negative staphylococci in a neonatal intensive care unit: evidence of spread of *Staphylococcus warneri*. *J Clin Microbiol*. 2003;41:4660–5.
27. Zhu W, Tenover FC, Limor J, Lonsway D, Prince D, Dunne Jr WM, et al. Use of pyrosequencing to identify point mutations in domain V of 23S rRNA genes of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2007;26:161–5.
28. Bongiorno D, Campanile F, Mongelli G, Baldi MT, Provenzani R, Reali S, et al. DNA methylase modifications and other linezolid resistance mutations in coagulase-negative staphylococci in Italy. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65:2336–40.
29. Christensen GD, Bisno AL, Parisi JT, McLaughlin B, Hester MG, Luther RW. Nosocomial septicemia due to multiply antibiotic-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Ann Intern Med*. 1982;96:1–10.
30. Yoshida K, Shoji H, Hanaki H, Yanagisawa C, Ikeda-Dantsuji Y, Fukuchi K, et al. Linezolid-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated after long-term, repeated use of linezolid. *J Infect Chemother*. 2009;15:417–9.
31. Besier S, Ludwig A, Zander J, Brade V, Wichelhaus TA. Peptidoglycan synthesis and structure in *Staphylococcus haemolyticus* expressing increasing levels of resistance to glycopeptide antibiotics. *J Bacteriol*. 1996;178:4696–703.
32. Cui L, Lian JQ, Neoh HM, Reyes E, Hiramatsu K. DNA microarray-based identification of genes associated with glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49:3404–13.



Transferable Multidrug Resistance Plasmid Carrying *cfr* Associated with *tet(L)*, *ant(4')-Ia*, and *dfrK* Genes from a Clinical Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ST125 Strain

Enrique Ruiz de Gopegui, Carlos Juan, Laura Zamorano, José L. Pérez, and Antonio Oliver
Servicio de Microbiología, Hospital Universitari Son Espases, Palma de Mallorca, Spain

A multidrug resistance (MDR) conjugative plasmid of ca. 50 kb (designated pERGB) was detected in a linezolid and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain with sequence type 125 (ST125-MRSA-IVc). This strain was detected in two patients with chronic obstructive pulmonary disease, previously treated with multiple antimicrobials, including linezolid. pERGB was transferable by conjugation and carried the resistance genes *cfr* (oxazolidinones, phenicols, lincosamides, pleuromutilins, and streptogramin A), *ant(4')-Ia* (tobramycin), *tet(L)* (tetracycline), and *dfrK* (trimethoprim). A novel genetic structure, linking all of these resistance genes for the first time, was elucidated through sequencing of a 15,259-bp fragment from pERGB. Active surveillance to prevent the dissemination of such highly concerning MDR transferable elements is needed.

Linezolid was the first oxazolidinone approved for the treatment of Gram-positive bacteria and is still the only antimicrobial in this class released for clinical use. It has been commercialized in the United States since 2000 (2) and in Spain since 2002 (3). Linezolid resistance in staphylococci is very uncommon, although it has increased in the recent years.

The most frequently reported mechanism of linezolid resistance in staphylococci is a point mutation within the central loop of domain V of the 23S rRNA gene (9), followed by mutation in the ribosomal protein L3 or L4 (17). Both forms of resistance are mainly caused by prolonged exposure to linezolid and are not transferable between strains. A third mechanism of resistance is determined by the *cfr* gene, encoding an rRNA methyltransferase that methylates the adenosine at position A2503 (*Escherichia coli* numbering) in the 23S rRNA (13). This enzyme confers cross-resistance to linezolid and four other classes of antimicrobial agents: phenicols, lincosamides, pleuromutilins, and streptogramin A. The *cfr* gene is often located in a plasmid which may be horizontally transferred (18). It was originally identified on the pSCSF1 plasmid from a *Staphylococcus sciuri* isolate obtained from the nasal swab of a florfenicol-treated calf with a respiratory infection in 1997 (26). In humans, the first clinical isolate documented to carry the *cfr* gene was a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain isolated from a patient with respiratory infection in Colombia in 2005 (29). The first outbreak by MRSA carrying the *cfr* gene was reported in 2008 and involved 15 patients admitted in the intensive care unit of a hospital from Madrid, Spain (20).

Here we describe two cases of respiratory infection by *cfr*-positive MRSA isolates detected in Majorca, Spain, occurring in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) admitted in August 2010 in the same unit of the main tertiary hospital of the island. Moreover, we show that *cfr* was located in a novel transferable plasmid together with multiple other antibiotic resistance determinants.

The linezolid-resistant MRSA isolates from the two patients had the same disk diffusion susceptibility profile. According to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (4) breakpoints, both isolates were resistant to penicillin, oxacillin, cefoxi-

tin, ciprofloxacin, tobramycin, clindamycin, chloramphenicol, and tetracycline and susceptible to erythromycin, gentamicin, rifampin, and teicoplanin. The MIC of vancomycin was determined by Etest (bioMérieux, France) to be 2 µg/ml, indicating susceptibility according to CLSI. Regarding linezolid and trimethoprim-sulfamethoxazole, the isolates were apparently susceptible by disk diffusion, but a double halo of inhibition was noted in both cases. When the isolates were tested by Etest, a double halo of inhibition was again visualized, with a MIC for linezolid of 6 to 8 µg/ml after 24 h of incubation; thus, it was considered resistant. The MIC for trimethoprim-sulfamethoxazole determined by Etest was 1.5 µg/ml (still within the susceptibility range).

Interestingly, a linezolid-susceptible MRSA isolate was previously identified in sputum cultures from both patients (in June 2009 [patient 1] and February 2009 [patient 2]), and both received linezolid therapy at that time. Moreover, patient 1 was seen 32 times for respiratory infections from October 2006 to August 2010, receiving in every admission antimicrobial therapy, including several linezolid courses. The resistance profiles of the two linezolid-susceptible and two linezolid-resistant MRSA isolates are shown in Table 1.

Clonal relatedness of the previous linezolid-susceptible and subsequent linezolid-resistant MRSA isolates from both patients was evaluated by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) (28) and multilocus sequence typing (MLST) (5). Typing of the staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) was performed with three PCR techniques: a multiplex PCR assay for the cassette chromosome recombinase (*ccr*) genes (7), another for the class B *mec* gene complex (16), and a multiplex PCR assay for the subtyping of SCC*mec* IV (19). A linezolid-resistant *cfr*-positive MRSA isolate

Received 31 October 2011 Returned for modification 11 December 2011

Accepted 24 December 2011

Published ahead of print 3 January 2012

Address correspondence to Enrique Ruiz de Gopegui, enrique.ruiz@ssib.es.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AAC.06042-11

Ruiz de Gopegui et al.

TABLE 1 Resistance profiles and genes detected in linezolid-susceptible and -resistant MRSA clinical isolates from patients 1 and 2 and in the transconjugant derivative

Patient or description	Date	Isolate no.	Sequence type	Resistance phenotype ^a	Presence of gene			
					<i>ant(4')-Ia</i> (<i>aadD</i>)	<i>cf</i>	<i>tet(L)</i>	<i>dfrK</i>
1	June 2009	50115	ST125-IVc	OXA, CIP, TOB	+	-	-	-
	August 2010	69371	ST125-IVc	OXA, CIP, TOB, CLI, LIN, CLO, TET, TS	+	+	+	+
2	February 2009	44207	ST22-IVh	OXA, CIP, ERY, iCLI	-	-	-	-
	August 2010	69533	ST125-IVc	OXA, CIP, TOB, CLI, LIN, CLO, TET, TS	+	+	+	+
Transconjugant					+	+	+	+

^a OXA, oxacillin; CIP, ciprofloxacin; TOB, tobramycin; ERY, erythromycin; CLI, clindamycin; iCLI, inducible clindamycin resistance (erythromycin-clindamycin D-zone test positive); LIN, linezolid; CLO, chloramphenicol; TET, tetracycline; TS, trimethoprim-sulfamethoxazole (cotrimoxazole); RIF, rifampin.

(HC08 strain) from the outbreak reported in Madrid (20) was included for comparative purposes. The linezolid-resistant isolates from both patients and interestingly also the first linezolid-susceptible isolate from patient 1 had indistinguishable electrophoretic band patterns, which corresponded to the ST125-MRSA-IVc clone, one of two MRSA clones predominant in Majorca (1, 24) and also the most prevalent MRSA clone in Spain since 1998 (30). On the other hand, the linezolid-susceptible isolate from patient 2 belonged to ST22-MRSA-IVh (EMRSA-15 clone), also prevalent in Majorca, whereas the HC08 strain corresponded to ST228-MRSA-I.

To determine the mechanism of resistance to linezolid, a PCR assay to detect the presence of the *cf* gene (14) was performed with genomic DNA extracted using the QIAamp DNA minikit (Qiagen, Germany). The HC08 strain (20) was used as a positive control. The PCR assay for the *cf* gene was negative for the linezolid-susceptible MRSA isolates and positive for those showing resistance to the drug (Table 1).

Conjugation experiments were then performed to assess whether the *cf* gene was located on a transferable plasmid, adapting the protocol described by Shore et al. (27). The linezolid-resistant MRSA isolate from patient 1 was used as a donor, and a rifampin-resistant mutant of ATCC 29213 *S. aureus* strain was

used as a recipient. The transconjugants were selected in brain heart infusion (BHI) agar plates with rifampin (20 µg/ml) and chloramphenicol (15 µg/ml) and checked through the analysis of plasmid and susceptibility profiles, *cf* PCR assay (14), and PFGE.

The antimicrobial susceptibility profiles of linezolid-resistant MRSA from patient 1 (donor), rifampin-resistant ATCC 29213 *S. aureus* (recipient), and a selected transconjugant for several antibiotics were determined by Etest and/or broth microdilution, and results are presented in Table 2. Remarkably, the transconjugant had acquired resistance or reduced susceptibility to clindamycin, chloramphenicol, and linezolid (as expected for *cf* transfer) but also to tetracycline, tobramycin, and cotrimoxazole. The tigecycline MIC was also slightly enhanced.

The PCR assay for the *cf* gene in the plasmid DNA (14) extracted from the transconjugant using the Qiagen Plasmid Midi kit was also positive. The size of the plasmid was determined through analysis of the EcoRI restriction fragments, with a result of ca. 50 kb. The plasmid was larger than the two first *cf* plasmids characterized, both detected in animals, plasmids pSCFS1 (17.1 kb) (12) and pSCFS3 (35.7 kb) (14), but the size was similar to that of other *cf* plasmids: pSCFS6 (43 kb, also detected in animals) (15) and pSCFS7 (45 kb, detected in humans) (27).

For the detection of the additional resistance genes transferred,

TABLE 2 Antimicrobial resistance profiles of isolate 69371 (*cf* positive) from patient 1 (donor), a rifampin-resistant (Rif^r) ATCC 29213 *S. aureus* strain (recipient), and its transconjugant derivative

Antimicrobial	Susceptibility testing method	MIC (µg/ml) for strain		
		69371 (donor)	ATCC 29213 Rif ^r (recipient)	Transconjugant
Penicillin	Etest	>32	0.5	0.38
Oxacillin	Etest	>256	0.5	0.5
Erythromycin	Etest	0.19	0.094	0.064
Clindamycin	Etest	>256	0.047	>256
Ciprofloxacin	Etest	>32	0.19	0.19
Trimethoprim-sulfamethoxazole (1/19) ^a	Etest	1.5	0.064	0.75
Vancomycin	Etest	2	2	2
Teicoplanin	Etest	1	1	1
Daptomycin	Etest	0.19	0.25	0.25
Tigecycline	Etest	1.5	0.19	0.5
Tetracycline	Etest	16	0.094	16
Linezolid	Etest	6	0.38	3
Tobramycin	Etest	6	0.38	3
Gentamicin	Broth microdilution	0.5	0.25	0.25
Chloramphenicol	Broth microdilution	8	2	8
Rifampin	Broth microdilution	≤0.06	>32	>32

^a The value on the MIC scale refers to the first component of the combination.

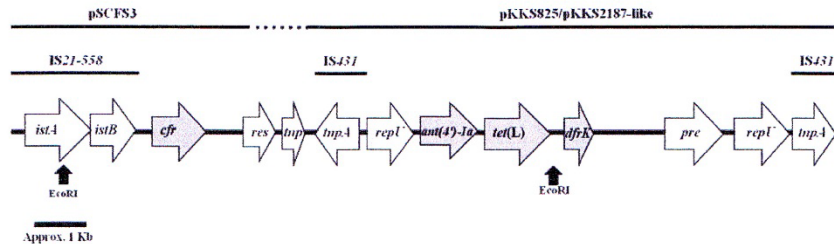


FIG 1 Genetic structure of the sequenced 15,259-bp DNA fragment from the MDR plasmid pERGB. EcoRI restriction sites delimiting the cloned 8,675-bp fragment are represented with black arrows. Regions homologous to sequence of previously described plasmids are indicated in the upper part. The gray bar on the first *repU* gene represents its truncation by the IS431 5' end.

PCR analysis was carried out with the plasmid DNA extract of the transconjugant and clinical isolates, and results are shown in Table 1. The PCR assays for the *ant(4')-Ia* gene (also known as *aadD*) which confers resistance to tobramycin, amikacin, kanamycin, and neomycin (25), for the *tet(L)* gene (tetracycline resistance) (22), and for the *dfrK* gene (6) (trimethoprim resistance) were positive for the transconjugant derivative and for the two linezolid-resistant MRSA isolates (Table 1). On the other hand, the PCR assays were negative in all cases for the *tet(K)* and *tet(M)* genes (tetracycline resistance) (8), the *vga(C)* gene (pleuromutilin/lincosamide/streptogramin A resistance) (6), and the *fexA* gene (which codifies an efflux protein of phenicols) (14).

To determine the proximity of the *cfr* determinant to the other resistance genes, DNA fragments resulting from EcoRI digestion from the transconjugant derivative were cloned into pUCP24 (21). The resulting plasmids were then transformed into the CaCl₂-competent *Escherichia coli* XL1 Blue strain. Transformants were selected on Luria-Bertani (LB) agar plates supplemented with 100 µg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-Gal)–200 µg/ml isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) and 5 µg/ml gentamicin. Plasmid DNA, purified from several transformants with the Qiagen plasmid minikit, was screened for *cfr* presence through PCR assays (14), yielding a positive result in one of them. The cloned 8,675-bp EcoRI fragment was fully sequenced through primer walking and contained the resistance genes *cfr*, *ant(4')-Ia*, and *tet(L)* (Fig. 1). Left and right ends were extended to obtain a 15,259-bp fragment through diverse PCR assays, followed by sequencing, based on available GenBank records: plasmid pSCFS3 (accession number AM086211.1) (14) for the left end and pKKS825 (accession number FN377602.2) (11) and pKKS2187 (accession number FM207105.1) (12) for the right end.

The initial segment of the sequenced fragment corresponded to an entire copy of insertion sequence IS21-558, with a homology of 100% with pSCFS3 (14), followed by the *cfr* gene and a noncoding region of 688 bp, also identical to sequence of pSCFS3. Nevertheless, adjacent to this noncoding region, a novel structure was detected, including a putative resolvase (72% nucleotide sequence identity with the *res* gene from *Bacillus megaterium*, GenBank accession number CP003018.1) and a putative transposase (amino acid identity of 63% with a transposase of *Enterococcus faecium*, accession number ZP_03980121.1). Next, an IS431-flanked genetic structure was found; an inverted copy of insertion sequence

IS431 was followed by a truncated *repU* gene, with 99% identity to the nucleotide sequence of plasmid pUB110 (23) and very similar to that previously described in pKKS825/pKKS2187 plasmids (10, 11). Downstream, the *ant(4')-Ia*, *tet(L)*, and *dfrK* resistance genes were identified, with sequences nearly identical to those described for the pKKS825 plasmid (11). Further downstream of *dfrK*, two more open reading frames (ORFs) were detected: the *pre/mob* gene (97% identical to pKKS2187) and an entire copy of the *repU* gene. At the end of the sequenced fragment, a direct copy of IS431 was documented (Fig. 1).

In summary, we describe a new plasmid (designated pERGB) that combines several relevant antibiotic resistance determinants, leading to a MDR transferable element that is highly concerning, particularly when acquired by MRSA strains as described in this work. Thus, active surveillance to prevent the dissemination of such MDR elements and strains is urgently needed.

Nucleotide sequence accession number. The described 15,259-bp sequence of plasmid pERGB from MRSA strain 69371 has been deposited in the GenBank database under accession number JN970906.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Carmen Vidal and Carmen Santos of the Sequencing Unit of HUSE for helping with sequencing experiments and to Carmen Betriu and Gracia Morales of Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain, for the gift of a *cfr*-positive strain of *S. aureus*.

This work was partially supported by the Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain, Instituto de Salud Carlos III, through the Spanish Network for the Research in Infectious Diseases (REIPI C03/14 and RD06/0008).

REFERENCES

- Alcoceba E, et al. 2007. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Majorcan hospitals: high prevalence of the epidemic clone EMRSA-15. *Clin. Microbiol. Infect.* 13:599–605.
- Barrett JF. 2000. Linezolid Pharmacia Corp. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 1:181–187.
- Carmona PM, Romá E, Monte E, García J, Gobernado M. 2003. Papel de linezolid en terapéutica antimicrobiana. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 21:30–41.
- CLSI. 2011. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 21st informational supplement. M100-S21. CLSI, Wayne, PA.
- Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. 2000. Multi-locus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 38:1008–1015.

Ruiz de Gopegui et al.

6. Feßler A, et al. 2010. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from cases of bovine mastitis. *J. Antimicrob. Chemother.* 65:619–625.
7. Ito T, et al. 2001. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:1323–1336.
8. Jones CH, et al. 2006. Diagnostic PCR analysis of the occurrence of methicillin and tetracycline resistance genes among *Staphylococcus aureus* isolates from phase 3 clinical trials of tigecycline for complicated skin and skin structure infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:505–510.
9. Jones RN, et al. 2009. Zyvox Annual Appraisal of Potency and Spectrum program: linezolid surveillance program results for 2008. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 65:404–413.
10. Kadlec K, Schwarz S. 2009. Identification of a novel trimethoprim resistance gene, *dfpK*, in a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 strain and its physical linkage to the tetracycline resistance gene *tet(L)*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:776–778.
11. Kadlec K, Schwarz S. 2009. Novel ABC transporter gene, *vga(C)*, located on a multiresistance plasmid from a porcine methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:3589–3591.
12. Kehrenberg C, Ojo KK, Schwarz S. 2004. Nucleotide sequence and organization of the multiresistance plasmid pSCFS1 from *Staphylococcus sciuri*. *J. Antimicrob. Chemother.* 54:936–939.
13. Kehrenberg C, Schwarz S, Jacobsen L, Hansen LH, Vester B. 2005. A new mechanism for chloramphenicol, florfenicol and clindamycin resistance: methylation of 23S ribosomal RNA at A2503. *Mol. Microbiol.* 57:1064–1073.
14. Kehrenberg C, Schwarz S. 2006. Distribution of florfenicol resistance genes *flexA* and *cfr* among chloramphenicol-resistant *Staphylococcus* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:1156–1163.
15. Kehrenberg C, Aarestrup FM, Schwarz S. 2007. IS21-558 insertion sequences are involved in the mobility of the multiresistance gene *cfr*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:483–487.
16. Lim TT, Chong FN, O'Brien FG, Grubb WB. 2003. Are all community methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* related? A comparison of their *mec* regions. *Pathology* 35:336–343.
17. Locke JB, Hilgers M, Shaw KJ. 2009. Novel ribosomal mutations in *Staphylococcus aureus* strains identified through selection with the oxazolidinones linezolid and torezolid (TR-700). *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:5265–5274.
18. Long KS, Poehlsgaard J, Kehrenberg C, Schwarz S, Vester B. 2006. The *Cfr* rRNA methyltransferase confers resistance to phenicols, lincosamides, oxazolidinones, pleuromutlins, and streptogramin A antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:2500–2505.
19. Milheirico C, Oliveira DC, de Lencastre H. 2007. Multiplex PCR strategy for subtyping the staphylococcal cassette chromosome *mec* type IV in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: 'SCC*mec* IV multiplex'. *J. Antimicrob. Chemother.* 60:42–48.
20. Morales G, et al. 2010. Resistance to linezolid is mediated by the *cfr* gene in the first report of an outbreak of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin. Infect. Dis.* 50:821–825.
21. Olsen RH, DeBusscher G, McCombie WR. 1982. Development of broad-host-range vectors and gene banks: self-cloning of the *Pseudomonas aeruginosa* PAO chromosome. *J. Bacteriol.* 150:60–69.
22. Pang Y, Bosch T, Roberts MC. 1994. Single polymerase chain reaction for the detection of tetracycline-resistant determinants Tet K and Tet L. *Mol. Cell. Probes* 8:417–422.
23. Rolain JM, et al. 2009. Genomic analysis of an emerging multiresistant *Staphylococcus aureus* strain rapidly spreading in cystic fibrosis patients revealed the presence of an antibiotic inducible bacteriophage. *Biol. Direct* 4:1–15.
24. Ruiz de Gopegui E, Oliver A, Galmés MI, Hidalgo O, Pérez JL. 2005. Consolidación de un clon multiresistente de *Staphylococcus aureus* no relacionado con el clon Ibérico en un hospital de Mallorca. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 23:140–144.
25. Schmitz FJ, et al. 1999. The prevalence of aminoglycoside resistance and corresponding resistance genes in clinical isolates of staphylococci from 19 European hospitals. *J. Antimicrob. Chemother.* 43:253–259.
26. Schwarz S, Werckenthin C, Kehrenberg C. 2000. Identification of a plasmid-borne chloramphenicol-florfenicol resistance gene in *Staphylococcus sciuri*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:2530–2533.
27. Shore AC, et al. 2010. Identification and characterization of the multi-drug resistance gene *cfr* in a Pantone-Valentine leukocidin-positive sequence type 8 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* IVa (USA300) isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:4978–4984.
28. Tenover FC, et al. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33:2233–2239.
29. Toh SM, et al. 2007. Acquisition of a natural resistance gene renders a clinical strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* resistant to the synthetic antibiotic linezolid. *Mol. Microbiol.* 64:1506–1514.
30. Vindel A, et al. 2006. Prevalence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Spanish hospitals between 1996 and 2002. *J. Clin. Microbiol.* 44:266–270.

Epidemiol. Infect. (2012), 140, 400–406. © Cambridge University Press 2011
doi:10.1017/S0950268811000641

Clinical significance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in residents in community long-term-care facilities in Spain

A. MANZUR¹*, E. RUIZ DE GOPEGUI², M. DOMINGUEZ³, D. MARISCAL⁴,
L. GAVALDA⁵, J. L. PEREZ², F. SEGURA⁶, M. PUJOL¹ AND the Spanish Network for
Research in Infectious Diseases†

¹ Infectious Diseases Service, ³ Microbiology Service and ⁵ Preventive Medicine Hospital Universitari de Bellvitge, Barcelona, Spain

² Microbiology Service Hospital Universitari Son Dureta, Balearic Islands, Spain

⁶ Infectious Diseases Service and ⁴ Microbiology Service, Corporació Sanitària Parc Taulí, Barcelona, Spain

(Accepted 17 March 2011; first published online 28 April 2011)

SUMMARY

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is highly prevalent in Spanish hospitals and community long-term-care facilities (LTCFs). This longitudinal study was performed in community LTCFs to determine whether MRSA colonization is associated with MRSA infections and overall mortality. Nasal and decubitus ulcer cultures were performed every 6 months for an 18-month period on 178 MRSA-colonized residents (86 490 patient-days) and 196 non-MRSA carriers (97 470 patient-days). Fourteen residents developed MRSA infections and 10 of these were skin and soft tissue infections. Two patients with respiratory infections required hospitalization. The incidence rate of MRSA infection was 0·12/1000 patient-days in MRSA carriers and 0·05/1000 patient-days in non-carriers ($P=0\cdot46$). No difference in MRSA infection rate was found according to the duration of MRSA colonization ($P=0\cdot69$). The mortality rate was 20·8% in colonized residents and 16·8% in non-carriers; four residents with MRSA infection died. Overall mortality was statistically similar in both cohorts. Our results suggest that despite a high prevalence of MRSA colonization in LTCFs, MRSA infections are neither frequent nor severe while colonized residents remain at the facility. The epidemiological impact of an MRSA reservoir is more relevant than the clinical impact of this colonization for an individual resident and supports current recommendations to control MRSA spread in community LTCFs.

Key words: Epidemiology, geriatrics, long-term care, MRSA, MRSA infections, multiresistant microorganism, nursing homes, *S. aureus*.

INTRODUCTION

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) has a high prevalence in acute-care hospitals in Spain,

and also in long-term-care facilities (LTCFs) [1–3]. This scenario is similar to other countries of the European Union [4–8]. In the nosocomial setting patients with persistent MRSA carriage have a higher risk of developing MRSA infections [9, 10] than methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) carriers and non-carriers. Although, it appears that MRSA colonization in LTC settings might have different clinical implications than in acute-care hospitals, few studies

* Author for correspondence: Dr A. Manzur, Infectious Disease Service, Hospital Universitari de Bellvitge, Feixa Llarga s/n, L'Hospitalet de Llobregat Barcelona, 08907, Spain.
(Email: admanzur@yahoo.com.ar)

† Members of the Spanish Network for Research in Infectious Diseases are listed in the Appendix.

have addressed this issue and most report a low prevalence of MRSA infection in residents [11, 12]. A relatively small number of residents require hospitalization or die as a consequence of MRSA infections and this suggests that severe infections are uncommon in this population. The most frequent MRSA infections in LTCFs are skin and soft tissue infections while bloodstream infections account for about 10% of cases [13].

Very few longitudinal studies have investigated the incidence of MRSA infections in residents in LTCFs [12, 14]. We therefore considered it necessary to analyse the clinical impact of MRSA colonization in this population in order to identify suitable measures to prevent spread and infections due to MRSA in this setting. To this end a multicentre longitudinal study was performed among residents in community LTCFs to determine the incidence of MRSA infection and assess whether MRSA colonization is associated with greater risk of infection and overall mortality.

METHODS

Study population and characteristics of community LTCFs

Characteristics of this population have been described previously [2]. Nine community LTCFs for the elderly, located in two communities in Spain (Catalonia and Balearic Islands) with 1586 beds (median 120, range 72–552) were included. Five were located in the catchment area of a 900-bed acute-care hospital (Hospital Universitari de Bellvitge), three in that of a 490-bed hospital (Corporació Sanitària Parc Taulí) and one in that of an 800-bed hospital (Hospital Universitari Son Dureta). These facilities provide care for the elderly long-term resident, who may be disabled or infirm. Each LTCF has a dementia ward and its own medical staff. Residents are accommodated in rooms with up to three beds. Surveillance for MRSA and decolonization procedures are not routine. In addition to standard precautions for all patient care, contact precautions are applied for residents colonized or infected by MRSA. Known MRSA carriers are not denied admission [15].

Study design

This was a multicentre prospective cohort study conducted from November 2005 to May 2007. The studied population consisted of all residents in the LTCFs at

baseline ($n=1377$) and was identical to that of our previously published cross-sectional study [2]. A total of 231 residents was found to be colonized with MRSA at baseline (MRSA carriers cohort). A representative sample of non-MRSA carriers was selected from the 1146 residents without MRSA at baseline as follows: for each MRSA carrier identified, one non-MRSA carrier was randomly selected from the same ward and screened 6 months later. Those with two consecutive negative cultures were included in the non-MRSA carrier cohort ($n=196$). Subjects were visited by the investigators every 6 months over an 18-month period.

During this period no changes were made to infection control practices in the LTCFs and data from the study results were not available to clinical staff. Decolonization treatment or contact precautions were not applied to the MRSA carriers detected throughout the study.

Data collection and definitions

Complete clinical data were obtained for all residents at baseline and medical charts were reviewed thereafter at 6-monthly intervals. Occurrences of infections, decubitus ulcers, antibiotic use, hospital admission and deaths were recorded. In the MRSA carrier cohort, persistent colonization was defined as at least two MRSA-positive cultures separated by fewer than two negative cultures. Transient colonization was defined as two or more negative cultures after a single positive culture for MRSA [16]. Duration of carriage was defined as the period from the first positive culture until the first negative culture with a consecutive negative culture if available and only residents who survived at the end of the study were considered for this analysis. MRSA infection was recorded in the clinical charts of each facility.

Microbiological methods

Nasal, and where applicable, decubitus ulcer swabs were obtained for culture every 6 months. Swabs were placed in Stuart's transport medium and plated on coagulase-mannitol agar plates and selective MRSA agar (MRSA Select, Bio-Rad Laboratories, Spain) before inoculating into brain heart infusion plus 7% NaCl. After 24 h of incubation at 35 °C, broths were subcultured on coagulase-mannitol and selective MRSA agar; plates were incubated for 48 h and inspected daily. Putative *S. aureus* colonies were identified by the latex agglutination test (Pastorex®

402 A. Manzur and others

Table 1. Characteristics of residents who were lost to follow-up with those followed to completion for the study period

	Completed follow-up (n=280)	Lost to follow-up (n=147)	P
Female sex, n (%)	191 (68.0)	102 (69.4)	0.08
Age, yr, mean (s.d.)	80.9 (11.6)	83.5 (10.8)	0.06
Charlson Index ≥ 2 , n (%)	99 (35.4)	70 (47.6)	0.87
Barthel Index < 30 , n (%)	101 (36.2)	75 (51.1)	0.009
Decubitus ulcers, n (%)	40 (14.2)	35 (23.8)	0.22
Centre < 150 beds n (%)	109 (39.1)	60 (40.8)	0.77
Centre MRSA prevalence $> 20\%$, n (%)	172 (61.6)	88 (59.9)	0.15
MRSA colonization, n (%)	128 (45.6)	104 (70.7)	0.17
Two-site colonization, n (%)	17 (5.0)	17 (11.6)	0.59
Infections (all microorganisms), n (%)	152 (54.1)	45 (30.6)	0.34
MRSA infections, n (%)	8 (2.8)	5 (3.4)	0.25
Hospital admissions, n (%)	39 (13.9)	20 (13.6)	0.08

Staph-plus, Bio-Rad Laboratories) and DNase production (DNase Test Agar, Biomedics, Spain). Methicillin resistance was determined by the cefoxitin disk diffusion method and antimicrobial susceptibility testing was performed by disk diffusion following Clinical and Laboratory Standards Institute recommendations [17].

Statistical analysis

Secondary outcomes (MRSA infections and overall mortality) were compared between prevalent MRSA carriers and non-MRSA carriers. Categorical variables were analysed with χ^2 or Fisher's exact tests as appropriate and continuous variables by Student's *t* test or non-parametric tests. Mortality was compared by the Kaplan–Meier method. All statistical tests were two-tailed and $P < 0.05$ was deemed significant. SPSS package version 15.0 was used (SPSS Inc., USA).

Approval for the study was obtained from the Research Ethics Committee of the Hospital Universitari de Bellvitge. No written informed consent was obtained because the study met the criteria for a waiver of this requirement.

RESULTS

The MRSA cohort comprised 178 colonized residents (86 490 patient-days) and the non-carrier cohort 196 patients (97 470 patient-days). Over the study period, 147 residents were lost to follow-up (53 at 6 months, 60 at 12 months and 34 at 18 months), 99 residents died and 30 were discharged. Table 1 compares

Table 2. Incidence rate of MRSA infection during the 18-month period related to the duration of MRSA colonization

Duration of MRSA colonization	Follow-up (days)	No. of MRSA infections	Incidence rate of MRSA infections
< 6 months	156 60	3	0.19/1000 patient-days
6 months	9720	0	—
12 months	5205	3	0.58/1000 patient-days
18 months	32 202	2	0.06/1000 patient-days

residents who were lost to follow-up with those followed to completion.

Overall 14 residents developed MRSA infections, nine in the MRSA cohort and five in the non-carrier cohort. The type of infections were: 10 skin and soft tissue infections, seven related to decubitus ulcers, one urinary tract infection, one chronic external otitis and two respiratory infections which both required hospital admission.

The incidence rate of MRSA infection in the total MRSA cohort ($n = 178$) was 0.12/1000 patient-days and in the 196 non-carriers, 39 residents acquired MRSA colonization during the study, giving an incidence rate of MRSA infection in this cohort of 0.05/1000 patient-days. The incidence rate of MRSA infection was statistically similar for prevalent MRSA carriers and residents with newly acquired MRSA colonization ($P = 0.46$). Table 2 shows that no

Table 3. Comparison of clinical outcomes in the MRSA-colonized cohort and the non-carrier cohort

	Non-carriers (N = 196) n (%)	MRSA-colonized cohort (N = 178) n (%)	RR (95% CI)
MRSA infections	4 (2.1)	10 (4.6)	2.85 (0.88–9.28)
All infections	94 (48.0)	103 (57.9)	1.49 (0.99–2.24)
Hospital admissions	27 (13.8)	32 (18.0)	1.37 (0.79–2.40)

RR, Relative risk; CI, confidence interval.

difference was found in MRSA infection rate between transient and persistent MRSA carriers (linear regression $P=0.69$). In addition there were no differences in infections of any aetiology for both cohorts, and MRSA carriers did not require more hospital admissions than non-carriers during the study period (Table 3). The mortality rate was 20.8% in residents in the MRSA cohort and 16.8% in non-carriers. Four of 14 residents with MRSA infection died during the study period but these were not attributed to MRSA infection. No statistical difference was found in the overall mortality in either group (log rank test 0.19, $P=0.66$) (Fig. 1).

DISCUSSION

In a previous study we reported a prevalence of MRSA colonization of about 17% in residents of community LTCFs in Spain [2], which represents a large reservoir of this microorganism in the healthcare setting. Several studies have highlighted the relevance of this epidemiological aspect which might influence the infection control practices implemented by acute-care hospitals [18–22] but there are limited data on the relationship of MRSA colonization and the development of infection in residents of LTCFs [12, 14]. This aspect has usually been assessed in settings where patients are at great risk of MRSA infection, such as intensive care units [10]. Our findings show that MRSA carriers in community LTCFs are not at high risk of developing severe MRSA infection while residing at the facility. This is in agreement with the out-of-hospital risk of MRSA infection reported in another population [23]. Moreover, from a clinical point of view, MRSA infections were not severe and only 2/14 cases required hospitalization. As

previously reported, we found that the main MRSA infections were skin and soft tissue infections. Remarkably the majority of infections were associated with the presence of decubitus ulcers, the most frequent skin lesion in this population. This emphasizes the need to enhance efforts to prevent the development of decubitus ulcers. Since in community LTCFs accurate microbiological diagnoses are often lacking, MRSA infections could have been underestimated and therefore we analysed the incidence of infection of any aetiology in both cohorts and found no differences. Prior studies have demonstrated an incidence of MRSA infections of 6.5% [13] and a relative risk of 3.6 in MRSA carriers in LTCFs [12].

Persistent MRSA carriers are more often colonized at multiple sites, are more likely to transmit to others, and become infected than transient carriers [24]. However, this aspect has not been studied in MRSA-colonized residents in LTCFs. A recent study performed in a LTCF showed that the degree of bacterial colonization in persistent MRSA carriers was significantly higher than in transient MRSA carriers [14]. We did not find a relationship between the incidence of MRSA infection and the duration of MRSA carriage, possibly because of the very few cases of MRSA infections. Moreover, the incidence of MRSA infection was similar in prevalent MRSA carriers and residents with newly acquired MRSA, i.e. MRSA colonization acquired while residing at the facility. A recent study, which included a small number of residents in LTCFs, found that the risk of MRSA infection in long-term carriers in the first year exceeded the risk of infection in subsequent years [23]. It appears that MRSA carriers remain at considerable risk for subsequent MRSA infection regardless of the time since the initial detection of MRSA carriage. Available data indicate that MRSA colonization in LTCFs may have different and less severe consequences than in acute-care hospitals. The risk of MRSA infection in the population of community LTCFs might not be related to the duration of colonization but might instead be attributable to known risks associated with MRSA infection such as hospitalization, bronchoaspiration, and the presence of decubitus ulcers or invasive medical devices. Except for ulcers and bronchoaspiration, these risks are not frequent in this population [24]. Reports of MRSA producing Pantón–Valentine leukocidin (PVL) strains in LTCFs are increasing [25–27]. Since these strains might produce spontaneous infections, MRSA infection rates could potentially rise in residents in LTCFs

404 A. Manzur and others

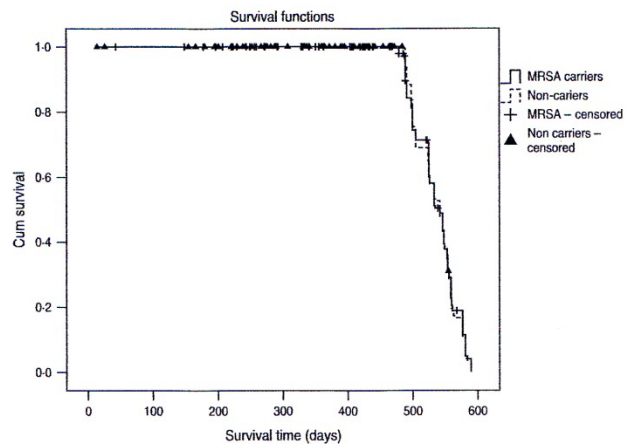


Fig. 1. Overall mortality during the study period (18 months) for cohorts of MRSA carriers and non-carriers.

without obvious clonal spread. None of the strains in this study was PVL positive [2] and previous molecular typing had shown the presence of only two distinct clones [16] one of which (CC5-MRSA-IV) has been reported as widely disseminated in Spanish hospitals [28, 29].

We found no differences in overall mortality in MRSA carriers and non-carriers. The mortality rate was around 15–20% in this elderly population and bronchoaspiration was the most frequent cause of death (data not shown). Previous studies have reported an associated mortality of MRSA infections in LTCFs of 1% [13], and a relative risk overall mortality rate of 2.0 in MRSA carriers [12]. Significantly higher mortality was associated with MRSA carriers in LTCFs only in patients with severe cognitive impairment [30].

This study has some limitations, as we only performed cultures of nasal swabs and decubitus ulcers to detect MRSA colonization. A recent study demonstrated that more than half of community LTCF residents present multiple-site MRSA colonization and one-third of MRSA carriers would have been missed if only nasal swabbing had been performed [31]. Another limitation is the large number of residents lost to follow-up, principally because of death in an elderly population. Patients lost to follow-up had significantly more deterioration in functional status; this is expected since poor functional status is associated with death in this population [32].

In addition this study was originally designed to describe the natural history of MRSA colonization in residents in LTCFs and to identify risk factors for being colonized with MRSA [16]. The MRSA infection rate and mortality in both cohorts were considered as secondary outcomes, and thus, no specific calculations were initially performed to determine if the study had sufficient power to detect significant differences. Nevertheless, major strengths of this study are the prospective design and the fact that it includes multiple facilities with a similar profile. Moreover, MRSA infections and mortality were evaluated in a population with a high prevalence of MRSA carriage.

Community LTCFs are institutions intended for the promotion of a healthy lifestyle for elderly people, a segment of population that is growing steadily; promoting comfort, optimal social environment and preserving functional status of residents are major objectives. The profile of community LTCFs and the endemicity of MRSA in these centres with a low clinical impact for colonized residents while in the facility, make the implementation of control measures to limit MRSA spread controversial. Standard precautions for all residents should be applied routinely; barrier precautions, cohorting, decolonization and other measures should be undertaken only for controlling MRSA infection outbreaks [33–36]. Our results together with the clinical experience and available literature suggest that MRSA infections are neither frequent nor severe while MRSA-colonized

residents remain in a LTCF. However, when admitted to an acute-care centre, they may spread MRSA to other patients who may develop severe infections. Therefore the epidemiological impact of the reservoir of MRSA in LTCFs is more relevant than the clinical impact of this colonization for an individual resident. The present results support current recommendations to control MRSA spread in community-LTCFs [33–36].

APPENDIX

Members of the Spanish Network for Research in Infectious Diseases who participated in the study: Raul Fernández, David Herrero, Rosario Casas, Eulalia Fontseca, Mónica Bota, Ricard Iniesta, Jesús Albuquerque, Catalina Andreu, Enrique Campos, Montserrat Vaqueiro, Esperança Antón, Jordi Trelis, Anna Esteve, Maria Canals, Ana Diaz, Eva Penelo, Antonio Oliver, Javier Ariza, Francesc Gudíol.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD06/0008).

DECLARATION OF INTEREST

None.

REFERENCES

1. **Dominguez MA, et al.** Spread and maintenance of a dominant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone during an outbreak of MRSA disease in a Spanish hospital. *Journal of Clinical Microbiology* 1994; **32**: 2081–2087.
2. **Manzur A, et al.** Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and factors associated with colonisation among residents in community long-term-care facilities in Spain. *Clinical Microbiology and Infection* 2008; **14**: 867–872.
3. **Olona-Cabases M, et al.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a four-year experience in a spinal cord injury unit in Spain. *Spinal Cord* 1996; **34**: 315–319.
4. **Cretnik TZ, et al.** Prevalence and nosocomial spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a long-term-care facility in Slovenia. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 2005; **26**: 184–190.
5. **Barr B, et al.** Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonisation among older residents of care homes in the United Kingdom. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 2007; **28**: 853–859.
6. **Talon DR, Bertrand X.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in geriatric patients: usefulness of screening in a chronic-care setting. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 2001; **22**: 505–509.
7. **O'Sullivan NP, Keane CT.** The prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among the residents of six nursing homes for the elderly. *Journal of Hospital Infection* 2000; **45**: 322–329.
8. **von Baum H, et al.** Risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage in residents of German nursing homes. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 2002; **23**: 511–515.
9. **Pujol M, et al.** Risk factors for nosocomial bacteremia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 1994; **13**: 96–102.
10. **Corbella X, et al.** *S. aureus* nasal carriage as a marker for subsequent staphylococcal infections in intensive care unit. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 1997; **16**: 351–357.
11. **Pujol M, et al.** Nosocomial *S. aureus* bacteremia among nasal carriers of methicillin-resistant and methicillin-susceptible strains. *American Journal of Medicine* 1996; **100**: 509–516.
12. **Murder RR, et al.** Methicillin-resistant staphylococcal colonisation and infection in a long-term care facility. *Annals of Internal Medicine* 1991; **114**: 107–112.
13. **Bradley SF.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: long-term care concerns. *American Journal of Medicine* 1999; **106**: 2S–10S.
14. **Stone ND, et al.** Importance of bacterial burden among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriers in a long-term care facility. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 2008; **29**: 143–148.
15. **Rodríguez-Baño J, et al.** Surveillance and control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Spanish hospitals. A GEIH-SEIMC and SEMPSPH consensus document. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 2008; **26**: 285–298.
16. **Manzur A, et al.** The natural history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization among residents in community long-term-care facilities in Spain. *Journal of Hospital Infection* 2010; **76**: 215–219.
17. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 16th Informational Supplement. CLSI document M100-S16. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, 2006.
18. **Cooper BS, et al.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitals and the community: stealth dynamics and control catastrophes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 2004; **101**: 10223–10228.
19. **Carleton HA, et al.** Community-adapted methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: population dynamics of an expanding community reservoir of MRSA. *Journal of Infectious Diseases* 2004; **190**: 1730–1738.

406 A. Manzur and others

20. **Manzur A, et al.** Predictive factors of methicillin resistance among patients with *Staphylococcus aureus* bloodstream infection at hospital admission. *Journal of Hospital Infection* 2007; **66**: 135–141.
21. **Gavaldà L, et al.** Comparative cost of selective screening to prevent transmission of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), compared with the attributable costs of MRSA infection. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 2006; **27**: 1264–1266.
22. **Ruiz de Gopegui E, et al.** Epidemiological relatedness of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from a tertiary hospital and a geriatric institution in Spain. *Clinical Microbiology and Infection* 2004; **10**: 339–342.
23. **Datta R, Huang S.** Risk of infection and death due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in long-term carriers. *Clinical Infectious Diseases* 2008; **47**: 176–181.
24. **Vandenbergh MFQ, et al.** Follow-up of *Staphylococcus aureus* nasal carriage after 8 years: redefining the persistent carrier state. *Journal of Clinical Microbiology* 1999; **37**: 3133–3140.
25. **Raab U, et al.** Prevalence of and risk factors for carriage of Panton-Valentine leucocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among residents and staff of a German nursing home. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 2006; **27**: 208–211.
26. **Wagenlehner F, et al.** Management of a large healthcare-associated outbreak of Panton-Valentine leucocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Germany. *Journal of Hospital Infection* 2007; **67**: 114–120.
27. **Kerttula AM, et al.** Molecular epidemiology of an outbreak caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a healthcare ward and associated nursing home. *Journal of Clinical Microbiology* 2005; **43**: 6161–6163.
28. **Vindel A, et al.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Spain: molecular epidemiology and utility of different typing methods. *Journal of Clinical Microbiology* 2009; **47**: 1620–1627.
29. **Rodríguez-Baño J, et al.** Clinical and molecular epidemiology of community-acquired, healthcare-associated and nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Spain. *Clinical Microbiology and Infection* 2009; **15**: 1111–1118.
30. **Suetens C, et al.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization is associated with higher mortality in nursing home residents with impaired cognitive status. *Journal of American Geriatric Society* 2006; **54**: 1854–1860.
31. **Mody L, et al.** Epidemiology of *Staphylococcus aureus* colonisation in nursing home residents. *Clinical Infectious Diseases* 2008; **46**: 1368–1373.
32. **Mahoney F, Barthel DW.** Functional evaluation: the Barthel index. *Maryland State Medical Journal* 1965; **14**: 61–65.
33. **Mody L, et al.** Preventing infections in nursing homes: a survey of infection control practices in southeast Michigan. *American Journal of Infection Control* 2005; **33**: 489–492.
34. **Manzur A, Pujol M.** Impact and control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in long-term care facilities. *Revista Española de Geriatria y Gerontología* 2008; **43**: 235–238.
35. **Kreman T, et al.** Survey of long-term-care facilities in Iowa for policies and practices regarding residents with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* or vancomycin-resistant enterococci. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 2005; **26**: 811–815.
36. **Manzur A, Gudíol F.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in long-term-care facilities. *Clinical and Microbiology Infection* 2009; **15**: S26–30.