



**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 Panton-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 linezolidina	193
5.19 Estudios de sensibilidad	195
5.19.1 Cepas iniciales de SARM sensibles a la linezolidina	195
5.19.2 Cepas de SARM y <i>S. epidermidis</i> resistentes a la linezolidina.....	196
5.20 Relación clonal de los aislados de SARM resistentes a la linezolidina	198
5.21 Estudio del mecanismo de resistencia a la linezolidina	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 LINEZOLIDINA	207
5.26 Características de los pacientes con <i>S. hominis</i> resistente a la linezolidina	207
5.27 Identificación de especie y estudio de sensibilidad.....	209
5.28 Mecanismo de resistencia a la linezolidina	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 linezolidina 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 *dfrrK* 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 *dfrK* 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'úlceres 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'úlceres 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 hematógena.

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).

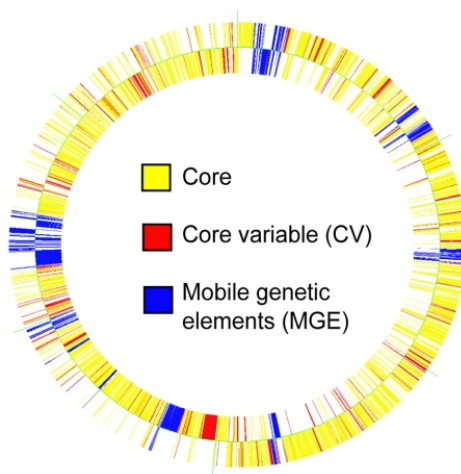


Figura 2. Esquema del genoma de una cepa de SARM. Se indican con un color distinto los genes *core*, *core* variables y los EGMs. El círculo externo representa los genes situados en la cadena codificante en sentido directo (*forward*), mientras que el círculo interno representa la cadena complementaria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

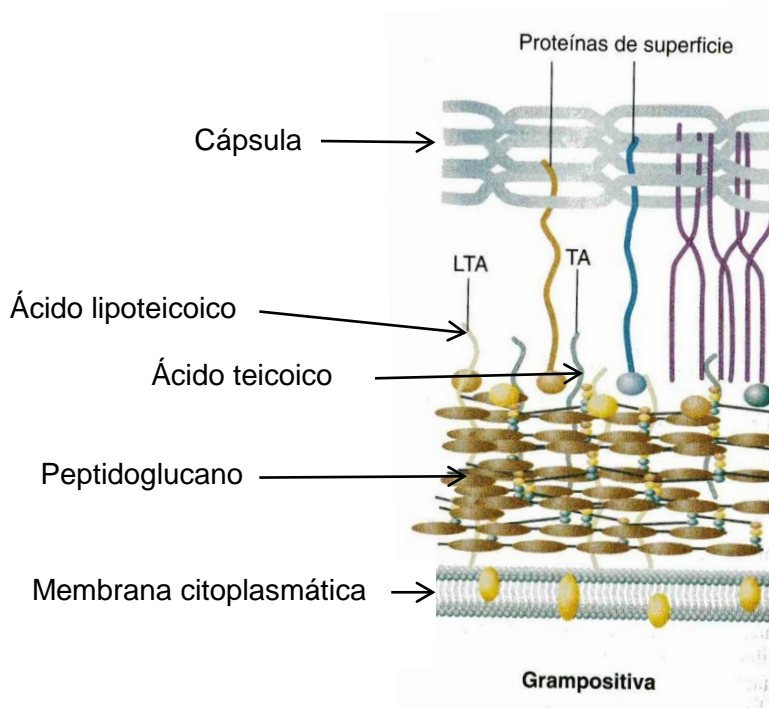


Figura 3. Estructura de la pared celular de *S. aureus* (Que, 2012).

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).

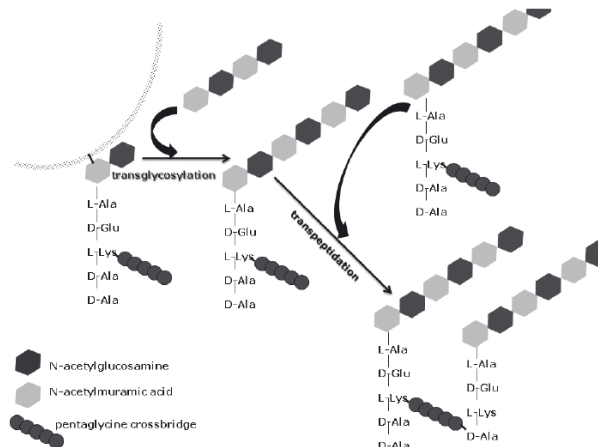


Figura 4. Esquema de la biosíntesis del peptidoglucano (Plata, 2009).

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 estafopaína B (cisteína proteasa), SspC (inhibidor cisteína proteinasa), ScpA o estafopaína 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 acelular 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, dfrD, 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).

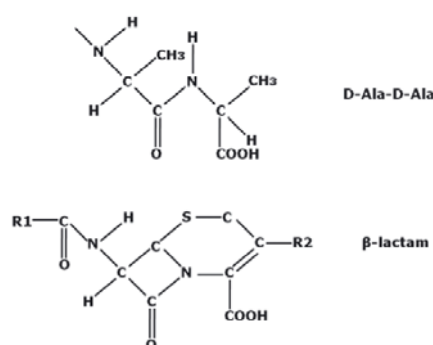


Figura 5. Estructuras de D-alanil-D-alanina y de un β -lactámico (Plata, 2009).

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):

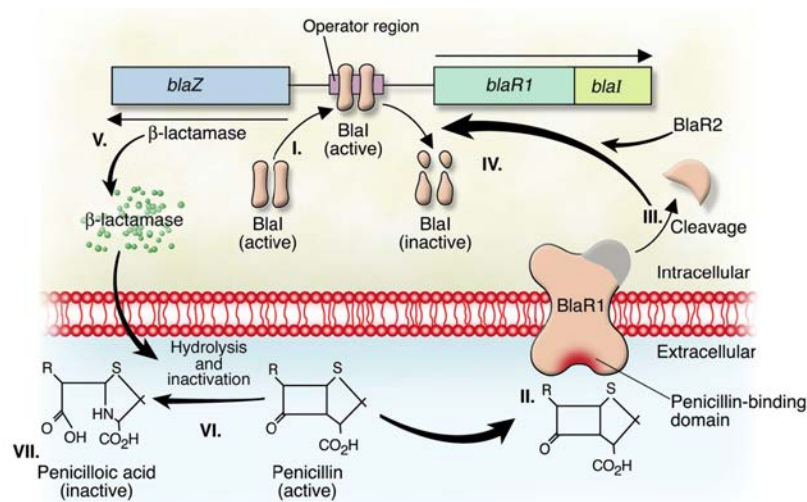


Figura 6. Esquema de la inducción de la síntesis de β -lactamasa (Lowy, 2003).

- 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.

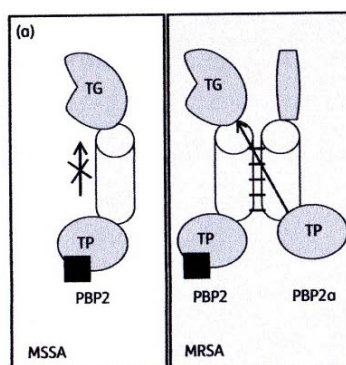


Figura 7. Modelo del mecanismo de acción de la meticilina (representada mediante un cuadrado negro) en SASM y SARM (Alm, 2014).

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).

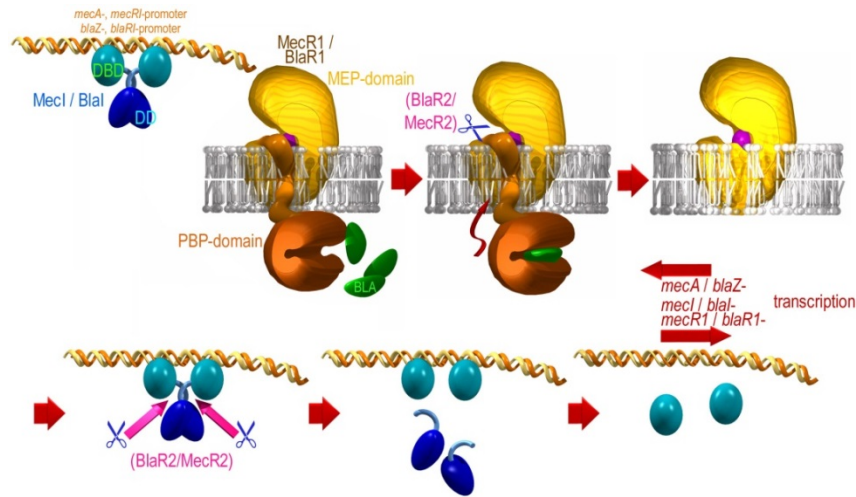


Figura 8. Modelo propuesto de la regulación del gen *mecA* (García-Castellanos, 2004).

- 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 *mecI-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>).

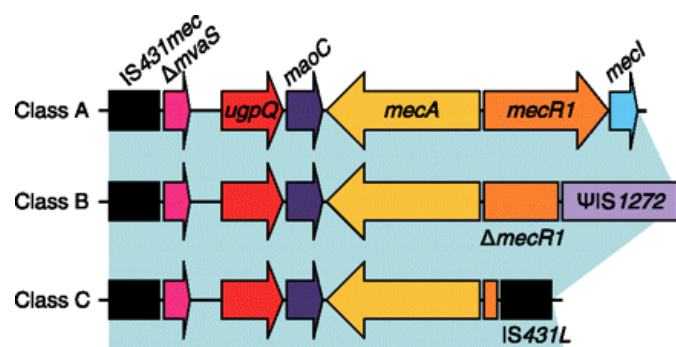


Figura 9. Estructura genética de las clases A-C del complejo del gen *mec* (Tsubakishita, 2010).

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 SCC <i>mec</i>
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 SCC*mec* 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 SCC*mec* 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 SCC*mec* descritos (**tabla 5** y **figuras 10-12**).

Tabla 5. Tipos actuales de SCC*mec* descritos.

Tipo SCC <i>mec</i> ^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>)

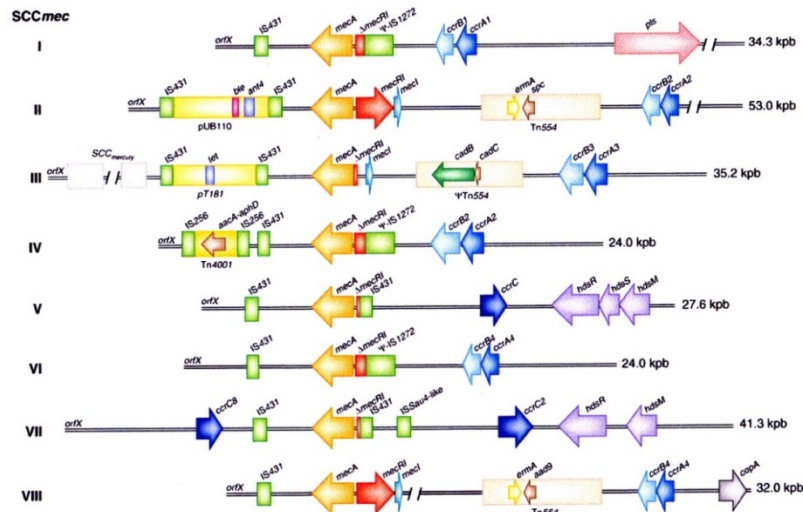


Figura 10. Estructura de SCCmec de los tipos I al VIII (Malachowa, 2010).

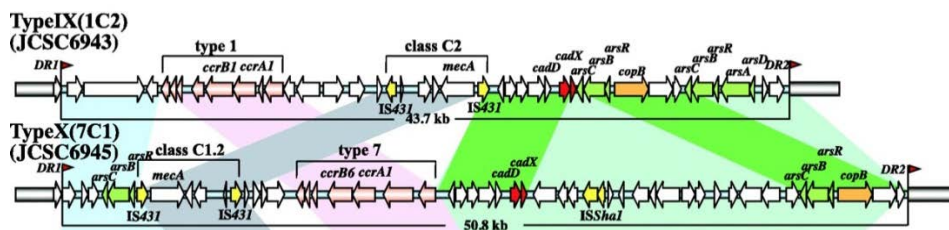


Figura 11. Estructura de SCCmec de los tipos IX y X (Li, 2011).

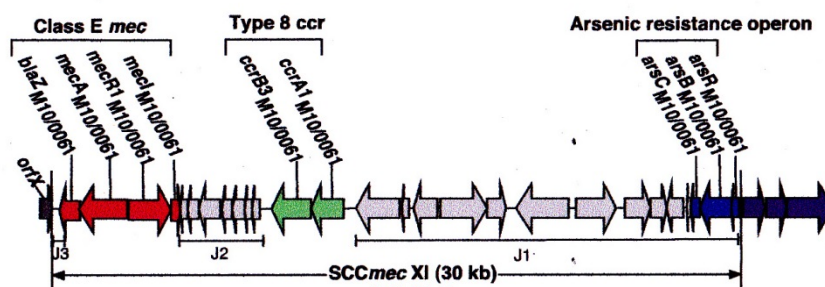


Figura 12. Estructura de SCCmec del tipo XI (Shore, 2011).

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 (Wiielders, 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 peptidogluano 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 peptidogluano (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.

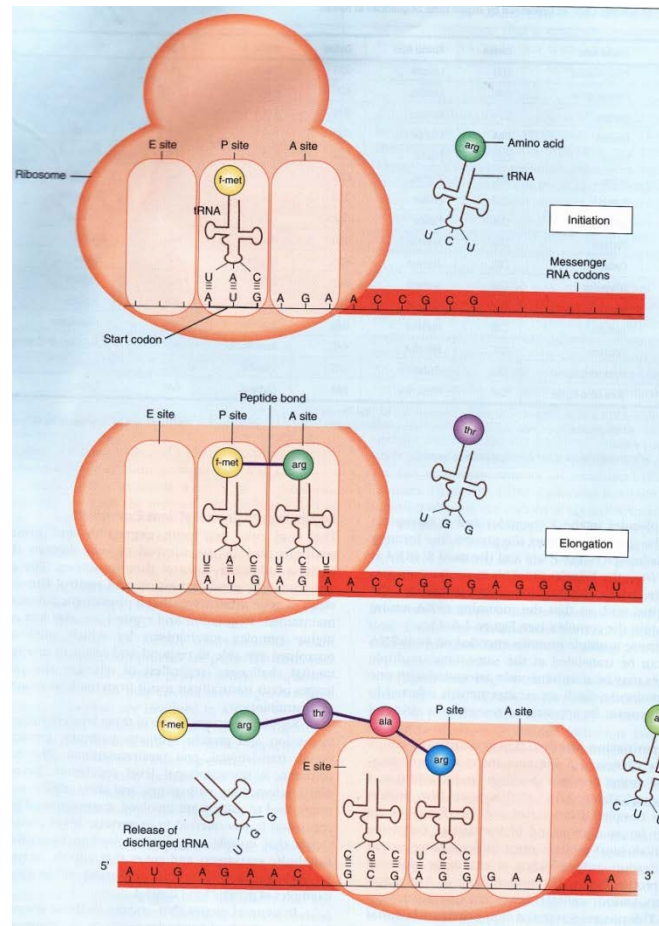


Figura 13. Esquema de la síntesis de proteínas (Forbes, 2007).

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 protéica ([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).

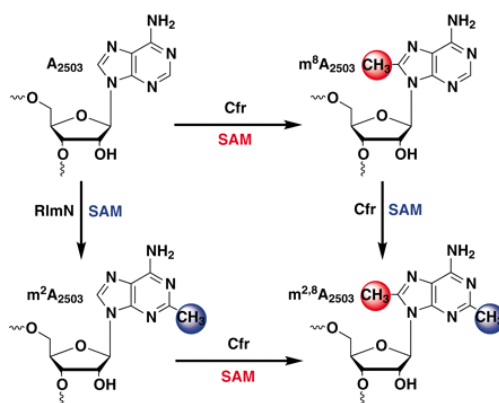


Figura 14. Reacciones catalizadas por RlmN y Cfr (Grove, 2011).

La metilación en la posición C8 de A2503 confiere resistencia cruzada a los fenicoles (cloramfenicol y florfenicol), las lincosamidas (clindamicina), las oxazolidinonas (linezolid), las pleuromutilinas (tiamulina) y la estreptogramina A (dalfopristina) (Kehrenberg, 2005; Long, 2006; Kaminska, 2010), además de a los macrólidos con un anillo de 16 átomos de carbono (Smith, 2008a). Todas estas seis familias de antimicrobianos se unen al centro peptidil transferasa del ribosoma bacteriano (figura 15).

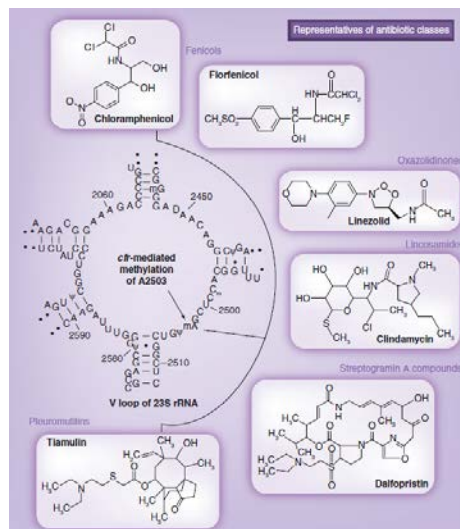


Figura 15. Modelo de la estructura secundaria del dominio V del ARNr 23S, indicándose la resistencia antibiótica cruzada mediada por la enzima Cfr en la posición A2503 (Witte, 2011).

El gen *cfr* se encuentra frecuentemente localizado en plásmidos, asociados a transposones y secuencias de inserción, que pueden transferirse horizontalmente a otros estafilococos y diseminar este tipo de resistencia (Shore, 2010a), aunque también puede estar exclusivamente en el cromosoma (Locke, 2012).

Además de en estafilococos, este gen se ha encontrado en otros géneros bacterianos como *Bacillus* (Dai, 2010), *Enterococcus* (Cercenado, 2010b), *Macrococcus* y *Jeotgalicoccus* (Wang, 2012b), en un aislado de *Proteus vulgaris* (Wang, 2011) y otro de *E. coli* (Wang, 2012a). Los aislados bacterianos portadores del gen *cfr* de los cinco géneros distintos de *Staphylococcus* y *Enterococcus* se obtuvieron en animales de granja. El uso veterinario de algunos antimicrobianos como florfenicol y tiamulina habrían facilitado en muchos casos la selección de aislados portadores del gen *cfr* (Witte, 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')-IIa, también denominada AAD(4')(4'') (Lyon, 1987). Produce resistencia a la tobramicina, amikacina, kanamicina, neomicina y paromomicina. Su gen *ant(4')-IIa* (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).

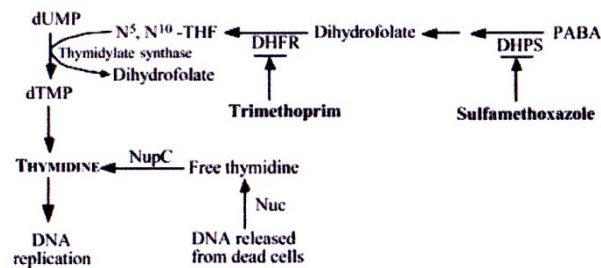


Figura 16. Esquema de la biosíntesis de la timidina y de los antagonistas del folato (Proctor, 2008).

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.

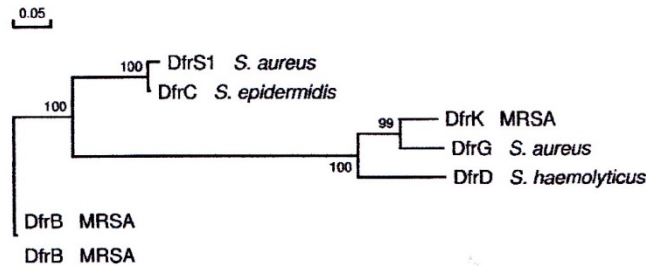


Figura 17. Árbol filogenético de las proteínas Dfr (Kadlec, 2009a).

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).

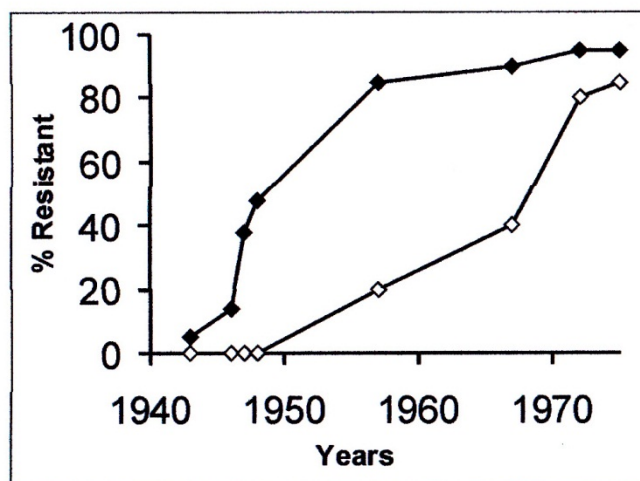


Figura 18. Tendencias en la frecuencia de cepas de SARM productoras de β -lactamasa, en hospitales (rombos negros) y en la comunidad (rombos blancos) (Chambers, 2001).

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).

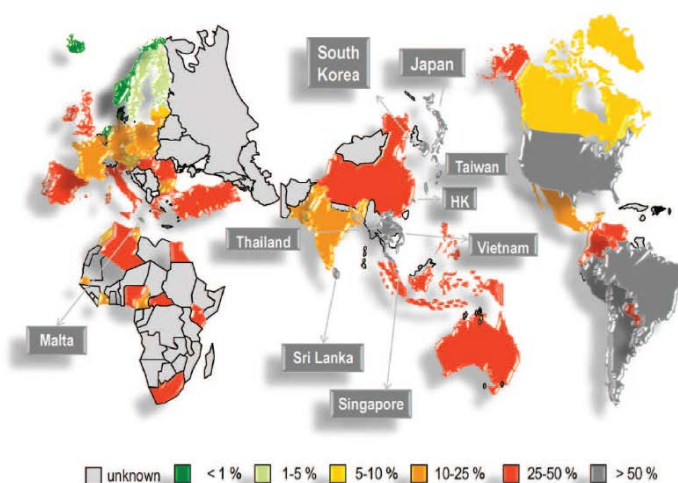


Figura 19. Prevalencia mundial de SARM hospitalario (Stefani, 2012).

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]).

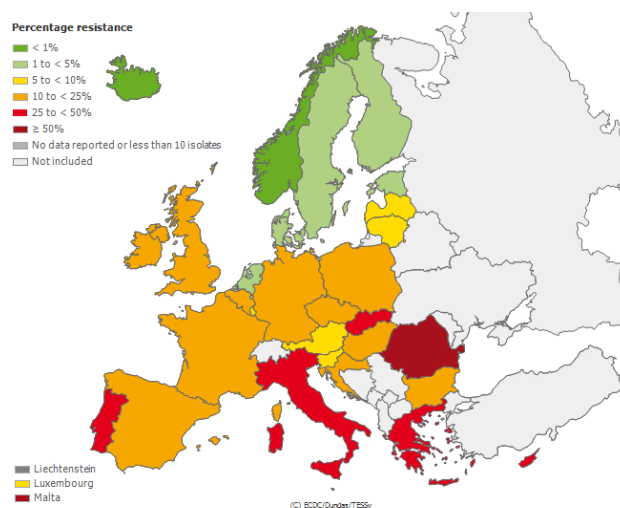


Figura 20. Proporción de aislados de SARM en los países participantes del estudio EARS-Net para el año 2013 (ECDC).

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).

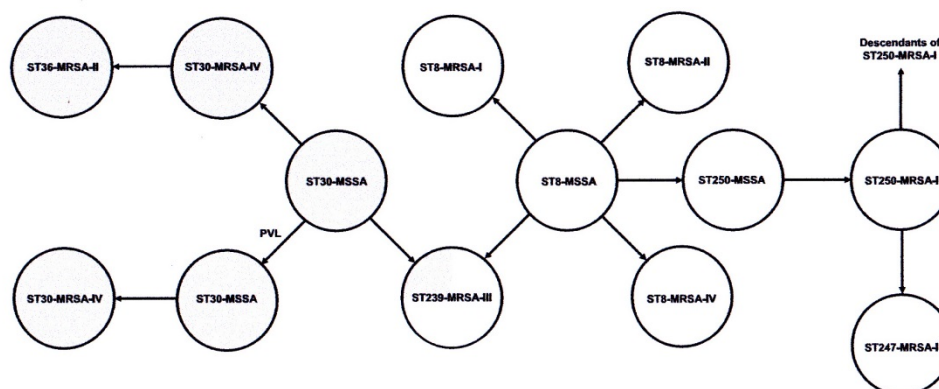


Figura 21. Origen evolutivo de dos de los principales complejos clonales de SARM: CC8 (color blanco) y CC30 (color gris). Las flechas indican: adquisición de un *SCCmec*, ó cambio de *SCCmec*, ó cambio de ST, ó adquisición de los genes codificantes de LPV (Deurenberg, 2008).

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).

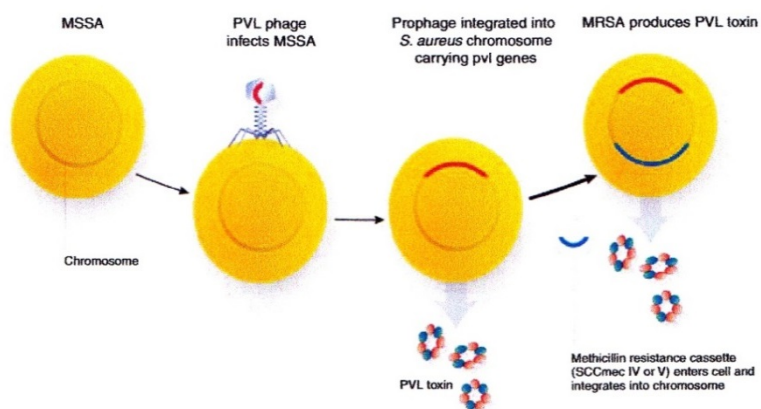


Figura 22. Modelo de emergencia del SARM comunitario (Boyle-Vavra, 2007).

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*.