



**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

METODOLOGÍA

4. METODOLOGÍA

4.1 Cepas, plásmidos y cebadores

Tabla 7. Cepas de laboratorio usadas en este trabajo.

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

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

Tabla 8. Plásmidos usados en este trabajo.

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

Tabla 9. Cebadores utilizados para este trabajo.

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

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

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

4.2 Características de los centros sanitarios

Hospital Universitari Son Dureta

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

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

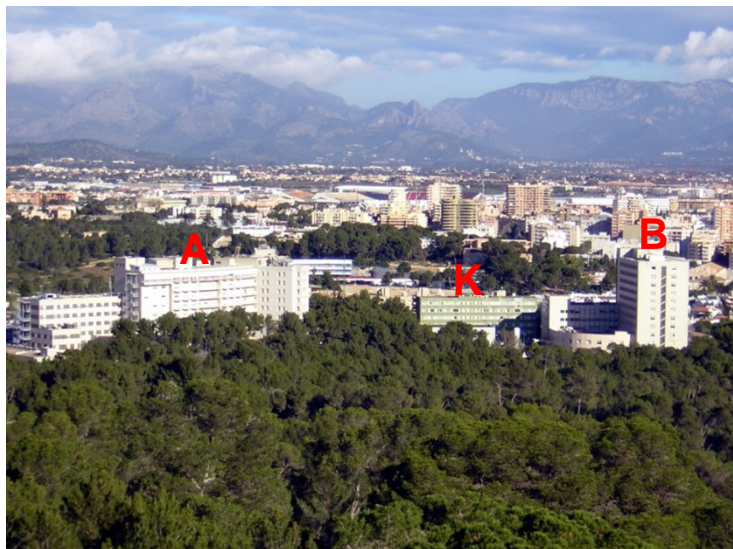


Figura 23. Hospital Universitari Son Dureta, con los tres edificios: Hospitalización general (A), Maternal (B) y Consultas (K) (Foto obtenida en www.datuopinion.com).

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

Hospital Universitari Son Espases

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



Figura 24. Hospital Universitari Son Espases.

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

Hospital Son Llàtzer

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

Resto de hospitales participantes de Mallorca

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

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

Residencia geriátrica Bonanova

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



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

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

4.3 Diseño de los estudios epidemiológicos

4.3.1 Epidemiología molecular de SARM en el HUSD-HUSE

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

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

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

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

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

4.3.2 Estudio de prevalencia de SARM en la Residencia Bonanova

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

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

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

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

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

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

Definiciones de portadores nasales de SARM

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

Procesamiento de las muestras recogidas en la Residencia Bonanova

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

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



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

4.3.3 Estudio de caracterización de un plásmido de multirresistencia

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

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

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

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

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

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

4.4 Procedimientos de identificación

4.4.1 Identificación de los aislados de *S. aureus*

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

4.4.2 Identificación de los aislados de *S. hominis*

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

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

4.5 Métodos de sensibilidad antimicrobiana

4.5.1 Aislados de SARM del HUSD-HUSE

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

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



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

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

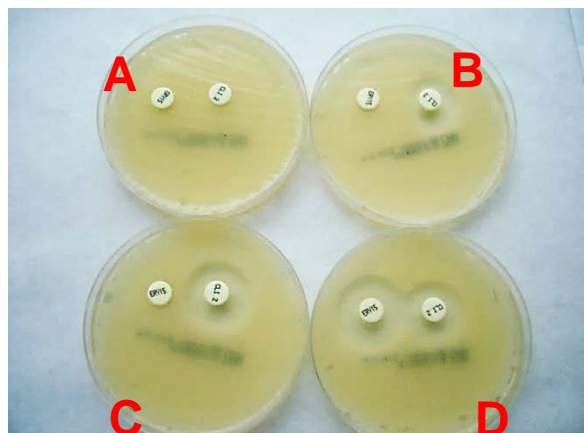


Figura 29. Técnica de difusión con doble disco. A: fenotipo MLS_B constitutivo, B: fenotipo MLS_B inducible, C: fenotipo M, D: sensibles a la eritromicina y clindamicina.

4.5.2 Aislados de SARM de la residencia geriátrica

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

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

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

4.5.3 Aislados de SARM resistentes a la linezolida

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

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

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

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

4.6 Análisis de la clonalidad

4.6.1 Electroforesis en campo pulsado

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

4.6.2 Multilocus sequence typing (MLST)

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

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

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

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

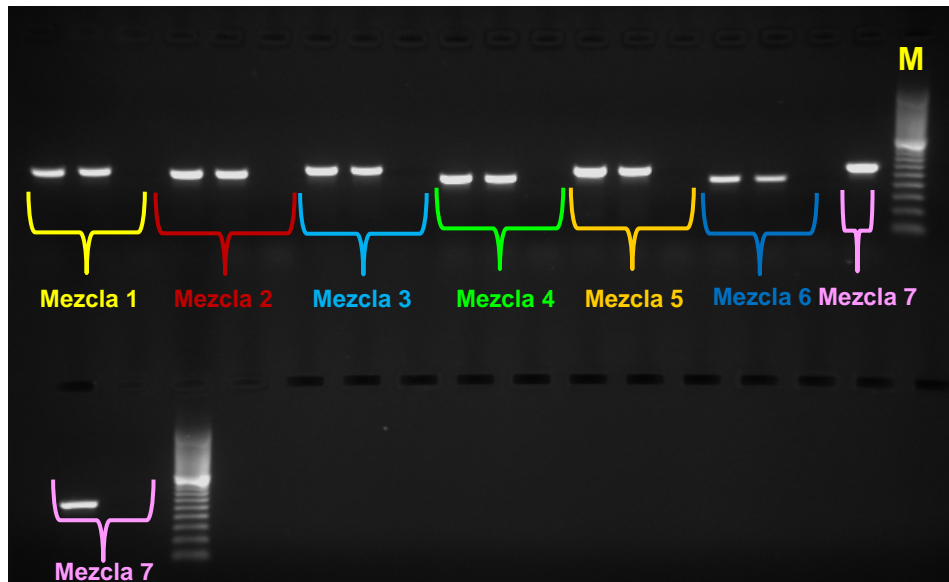


Figura 30. Electroforesis para MLST de dos cepas de SARM junto con un control negativo. En los extremos se encuentra el marcador de peso molecular (100-1000 pb).

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

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

4.7 Técnicas de amplificación genética por PCR

4.7.1 Extracción del ADN

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

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

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

4.7.2 Amplificación y detección del ADN

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

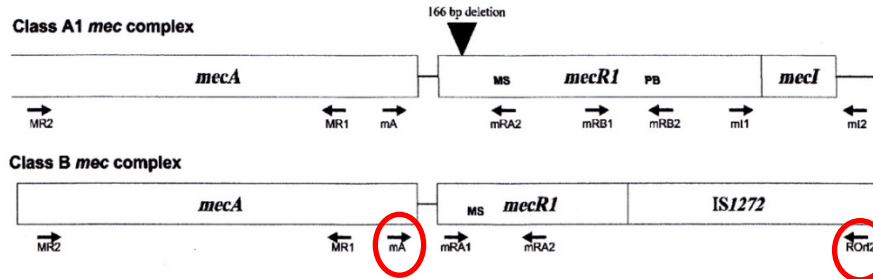


Figura 31. Diagrama esquemático de la región *mecA-mecR1-mecI*, mostrando la localización de los cebadores mA y ROrf2 (Lim, 2003).

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

4.7.4 PCR del casete cromosómico SCCmec tipo V

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

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

4.7.5 PCR para el subtipo del SCCmec tipo IV

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

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

4.7.6 PCR de la LPV

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

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

4.7.7 PCR del ACME

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

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

4.7.8 PCR del gen *cfr*

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

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

4.7.9 PCR del gen *fexA*

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

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

4.7.10 PCR de los genes de resistencia a la tetraciclina

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

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

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

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

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

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

4.7.12 PCR del gen *dfrK*

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

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

4.7.13 PCR del gen *vga(C)*

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

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

4.8 Estudio de las mutaciones en el gen ARNr 23S

4.8.1 Amplificación del dominio V del gen ARNr 23S

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

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

4.8.2 Secuenciación del dominio V del gen ARNr 23S

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

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

4.9 Caracterización del plásmido de multirresistencia

4.9.1 Conjugación del plásmido

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

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

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

Protocolo de conjugación

Día 1

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

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

Día 2

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

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

Día 3

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

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

Día 4

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

Día 5

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

4.9.2 Extracción del ADN plasmídico

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

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

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

4.9.3 Determinación del tamaño del plásmido

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

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

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

4.9.4 Clonación del plásmido

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Protocolo de transformación con CaCl_2 .

Día 1

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

Día 2

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

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

Extracción de los plásmidos con los fragmentos de pERGB clonados.

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

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

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

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

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

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

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

Secuenciación de los genes adyacentes al fragmento clonado del pERGB

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

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

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

4.10 Consideraciones éticas

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

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

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

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

4.11 Análisis estadístico

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

RESULTADOS

5. RESULTADOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

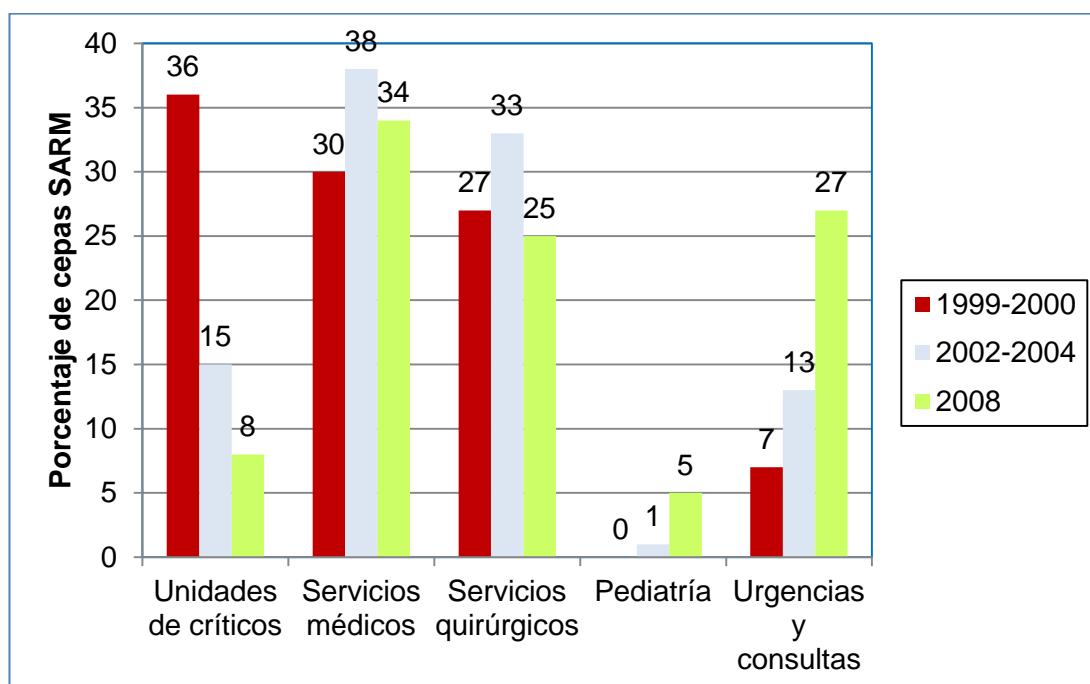


Figura 32. Comparación de la distribución de las cepas de SARM del HUSD por servicios durante los períodos 1999-2000, 2002-2004 y 2008.

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

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

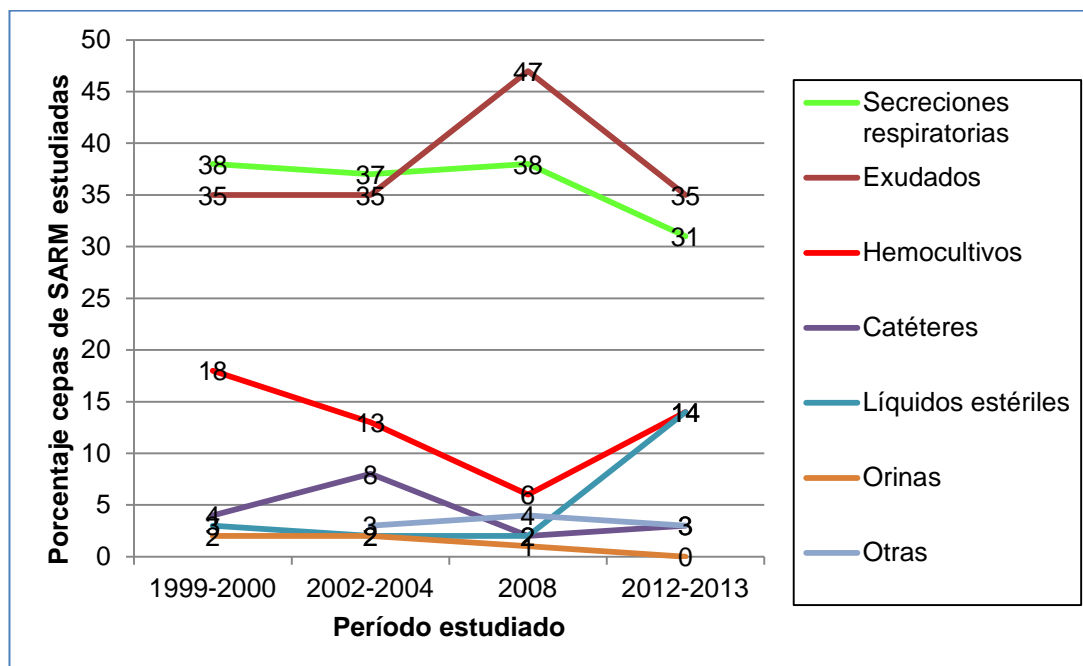


Figura 33. Tipos de muestras clínicas con SARM incluidas en los diferentes estudios de epidemiología molecular.

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

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

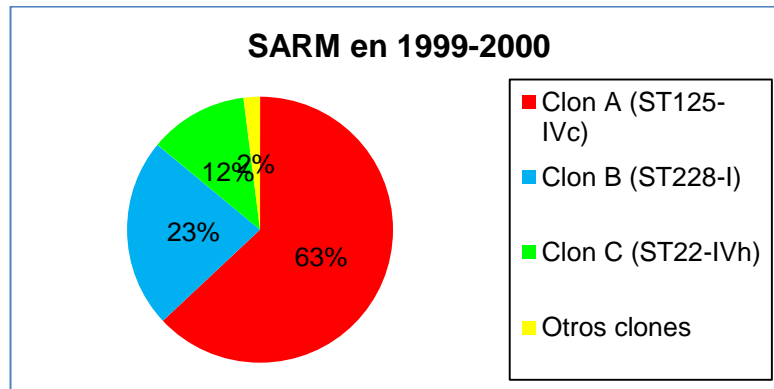


Figura 34. Proporción de clones de SARM del HUSD en 1999-2000.

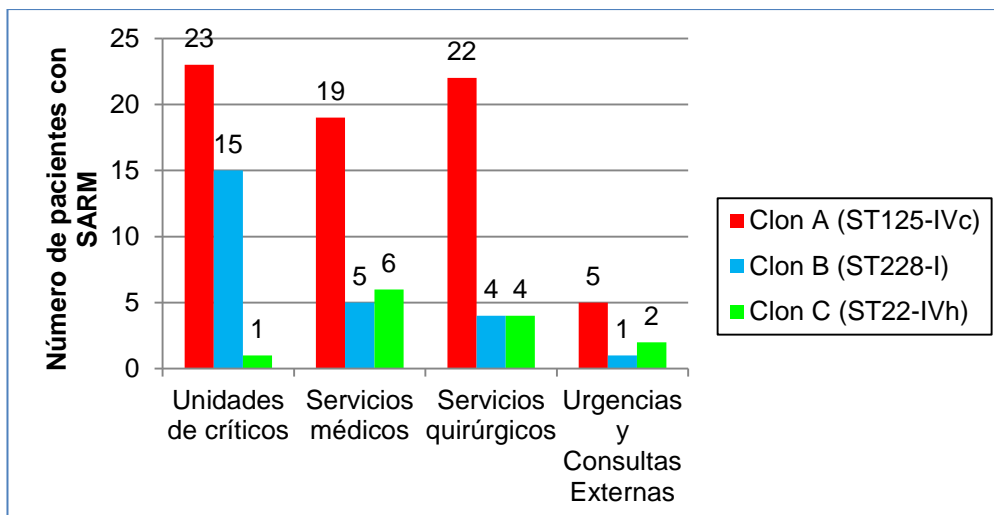


Figura 35. Distribución de los clones de SARM del HUSD por servicios (1999-2000).

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

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

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

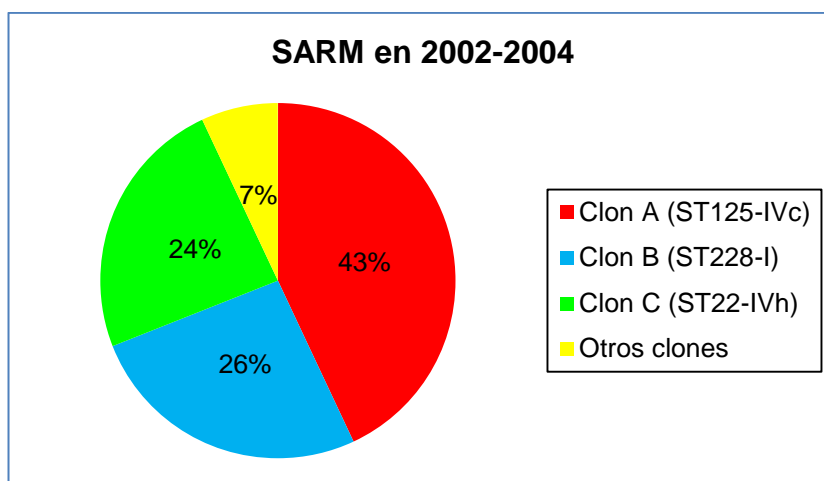


Figura 36. Proporción de clones de SARM del HUSD en 2002-2004.

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

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

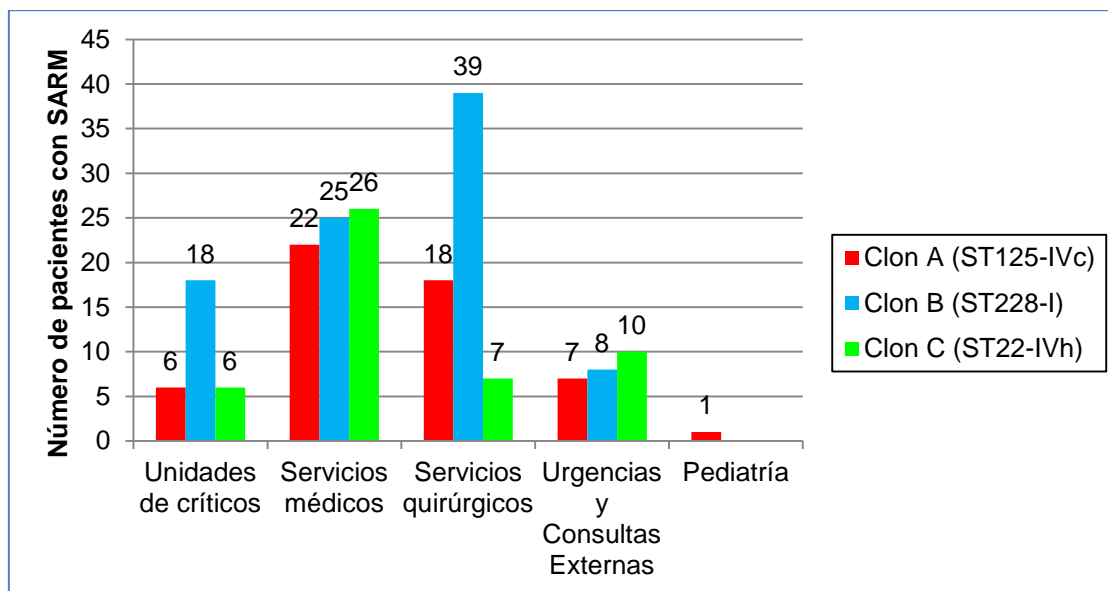


Figura 37. Distribución de los clones de SARM del HUSD por servicios (2002-2004).

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

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

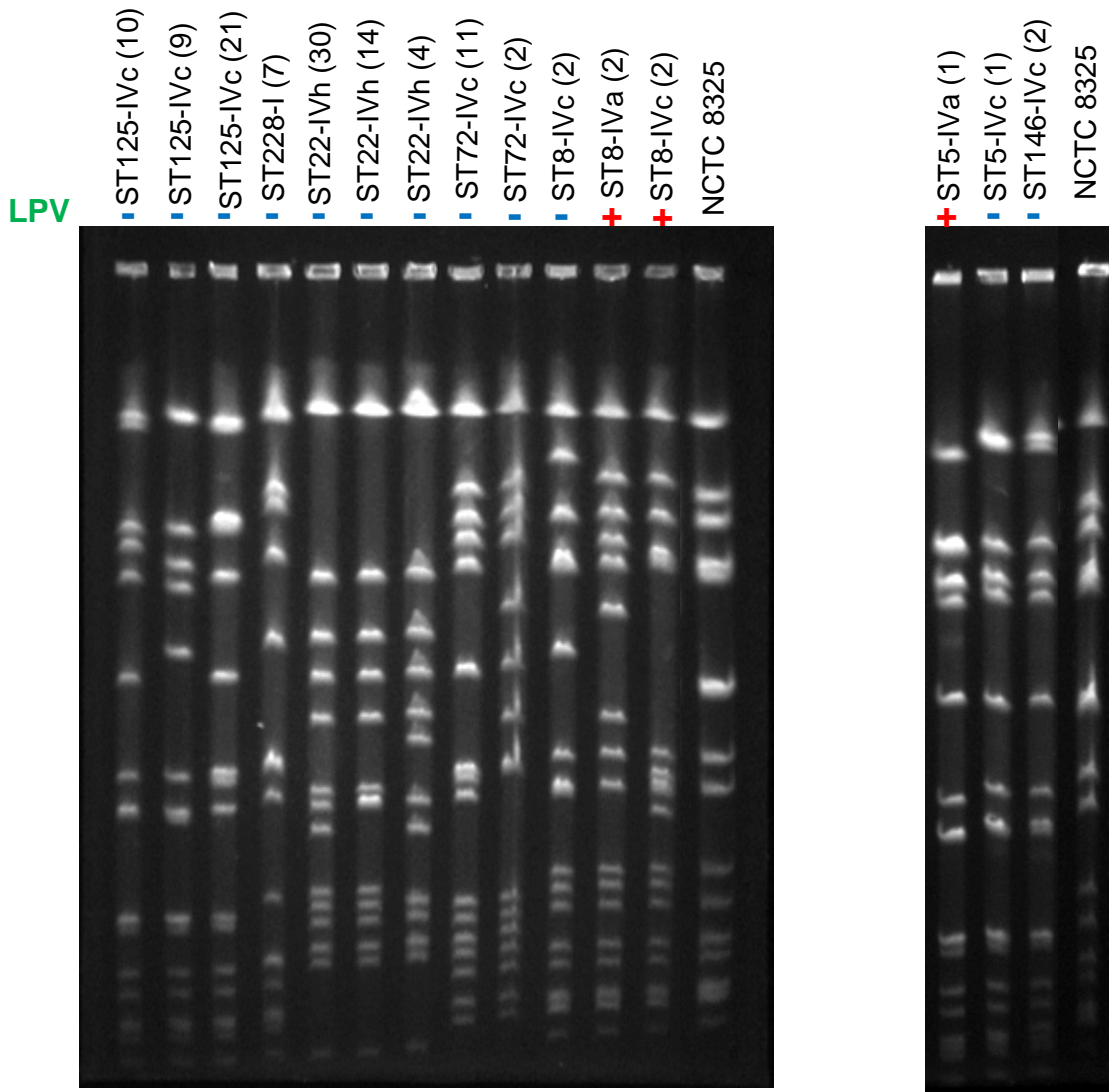


Figura 38. ECP de la mayoría de los subtipos de SARM detectados en 2008 en HUSD. Debajo de cada subtipo se indica la producción (+) o no producción (-) de LPV. (Entre paréntesis se señala el número de cepas de cada subtipo).

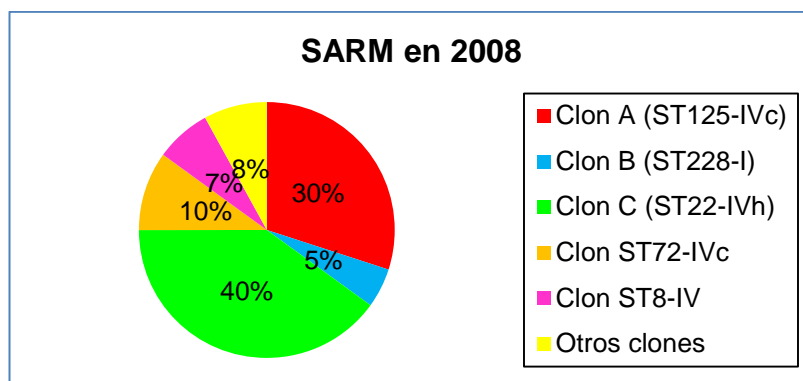


Figura 39. Proporción de clones de SARM del HUSD en 2008.

Tabla 14. Clones de SARM del HUSD en 2008.

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

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

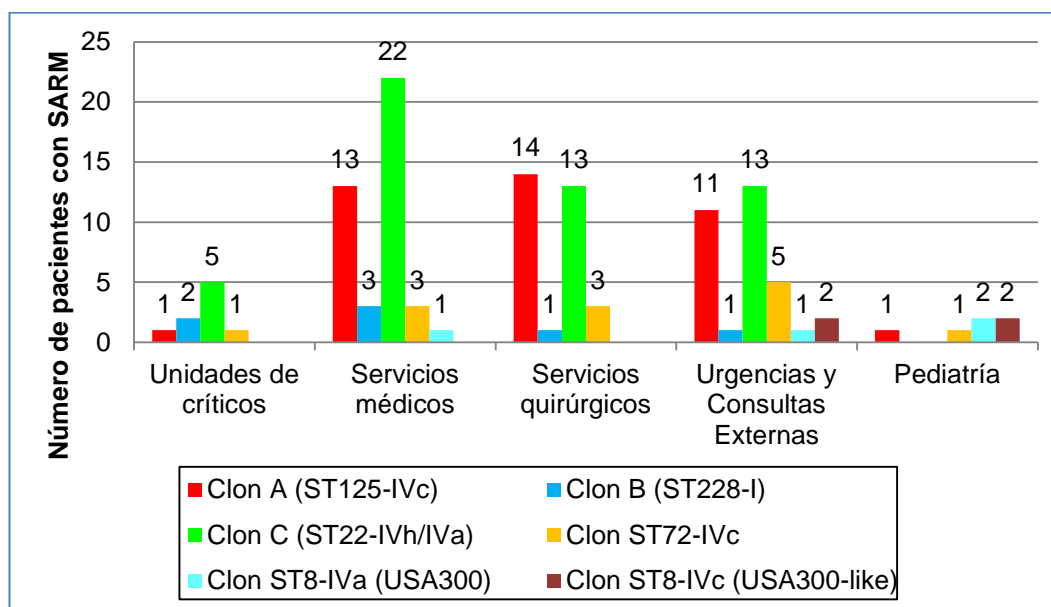


Figura 40. Distribución de los clones de SARM del HUSD por servicios (2008).

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

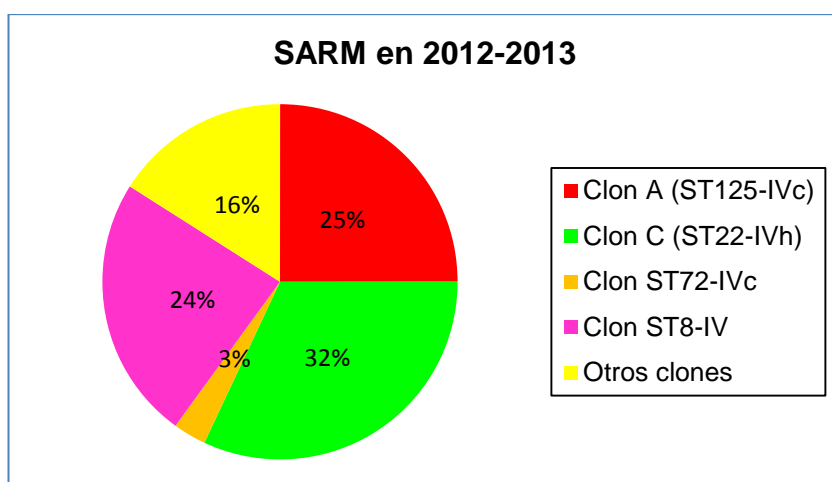


Figura 41. Proporción de clones de SARM del HUSE en 2012-2013.

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

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

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

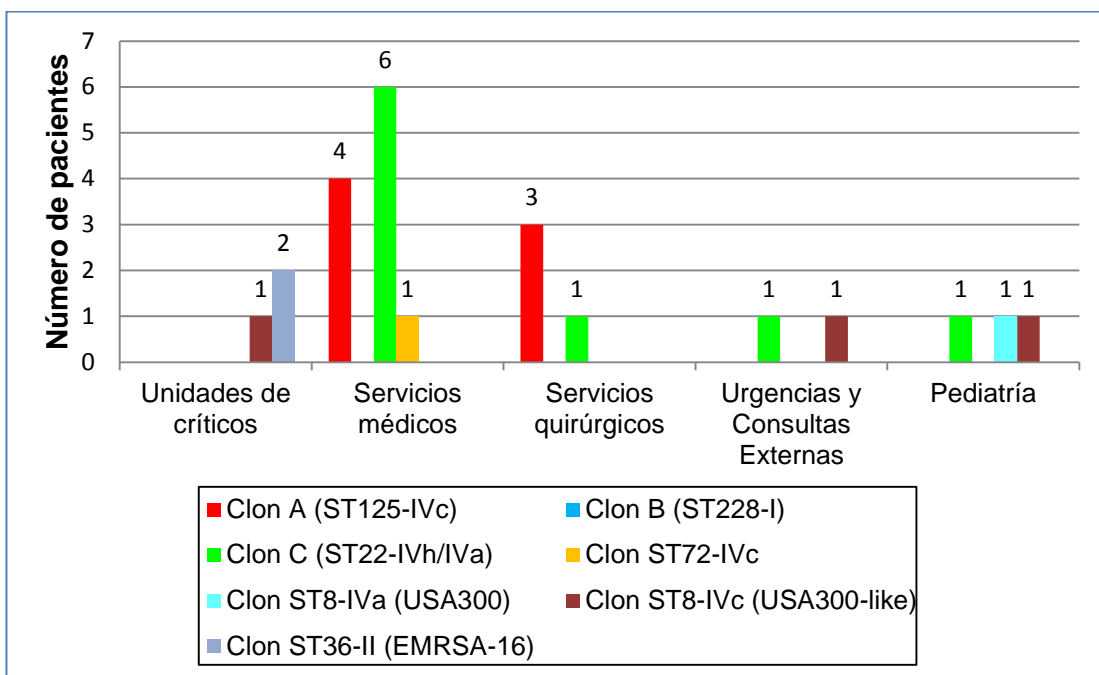


Figura 42. Distribución de los diversos clones de SARM del HUSE por servicios (2012-2013).

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

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

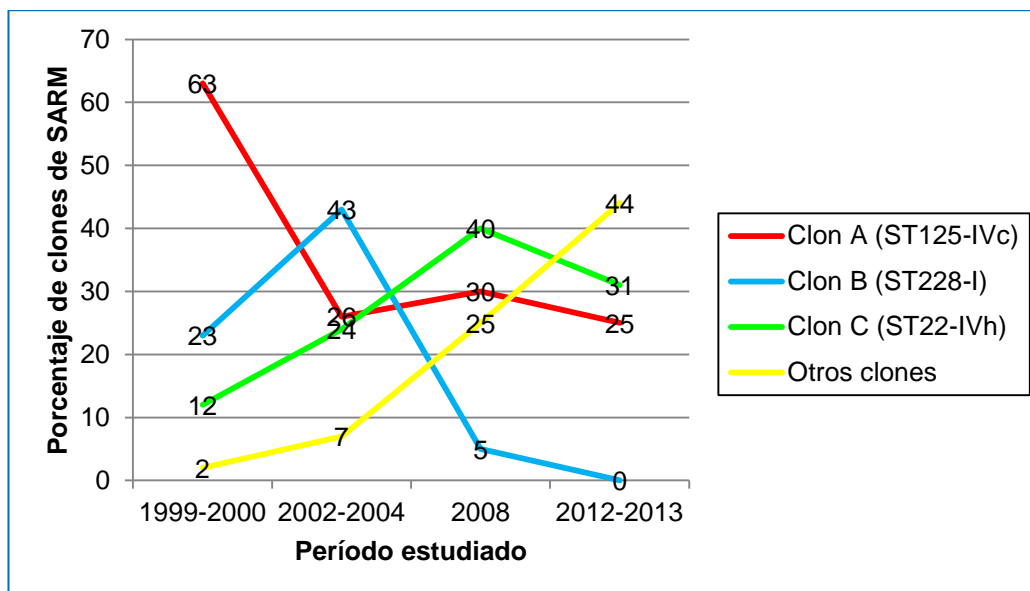


Figura 43. Distribución clonal de SARM en el HUSD-HUSE en el tiempo.

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

5.4 Epidemiología molecular de SARM en cinco hospitales de Mallorca

5.4.1 Población de estudio

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

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

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

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

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

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

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

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

5.4.2 Epidemiología molecular de los SARM en cinco hospitales de Mallorca

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

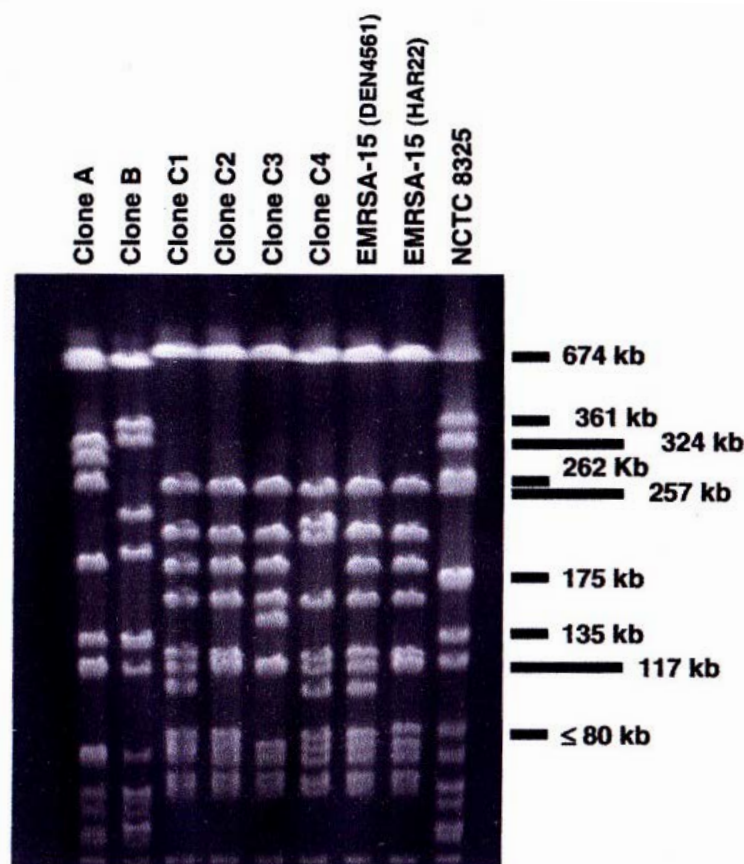


Figura 44. ECP, usando *Sma*I como enzima de restricción, de los tres clones mayoritarios detectados en el HUSD (clones A, B, C). Se han incluido dos cepas control del clon EMRSA-15 y la cepa de referencia NCTC 8325 utilizada como marcador de peso molecular (Alcoceba, 2007).

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

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

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

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

Tabla 18. Pacientes que ingresaron en dos hospitales distintos.

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

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

5.5 Tipado del SCCmec

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

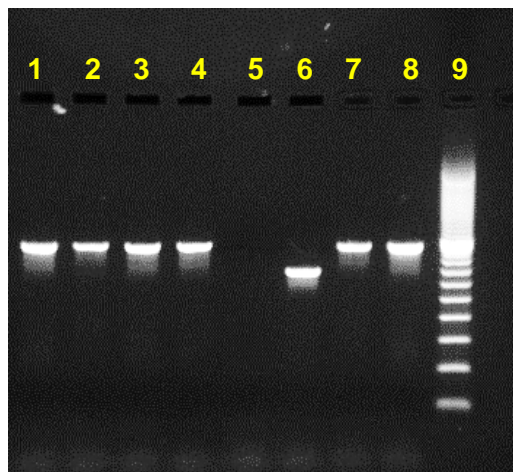


Figura 45. PCR del complejo *ccr* del SCCmec. Carriles 1-4: cepas de SARM con SCCmec tipo IV (*ccr* tipo 2); carril 5: control negativo; carril 6: clon ST228-I (*ccr* tipo 1); carril 7: clon ST36-II (*ccr* tipo 2); carril 8: clon ST22-IVh (*ccr* tipo 2); carril 9: marcador de peso molecular de 100-1000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

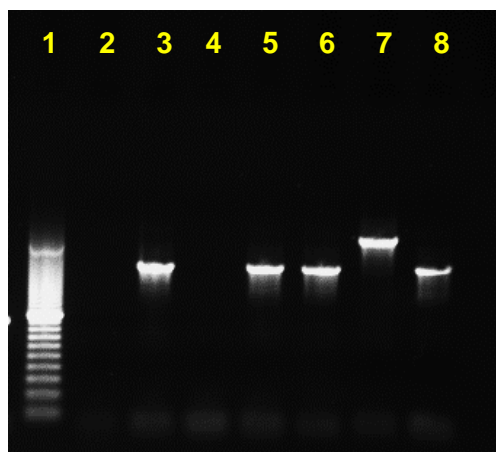


Figura 46. PCR del complejo de clase B del SCCmec. Carril 1: marcador de peso molecular de 100-1000 pb; carril 2: control negativo; carril 3: clon ST228-I (complejo *mec* de clase B); carril 4: clon ST36-II (complejo *mec* de clase A); carril 5: clon ST8-IVa (complejo *mec* de clase B); carril 6: clon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

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

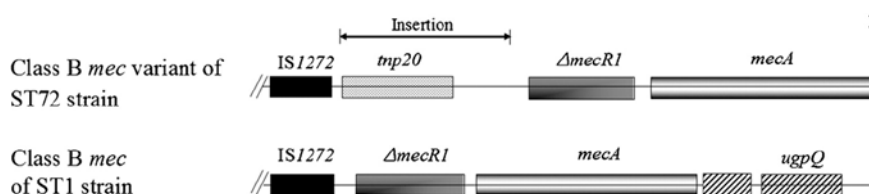


Figura 47. Comparación del complejo *mec* de clase B del clon ST72-IVc (con la inserción del *tnp20*) con el clon ST1-IVc (complejo *mec* de clase B convencional) (Park, 2009).

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

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

5.6 Subtipado del SCC*mec* tipo IV

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

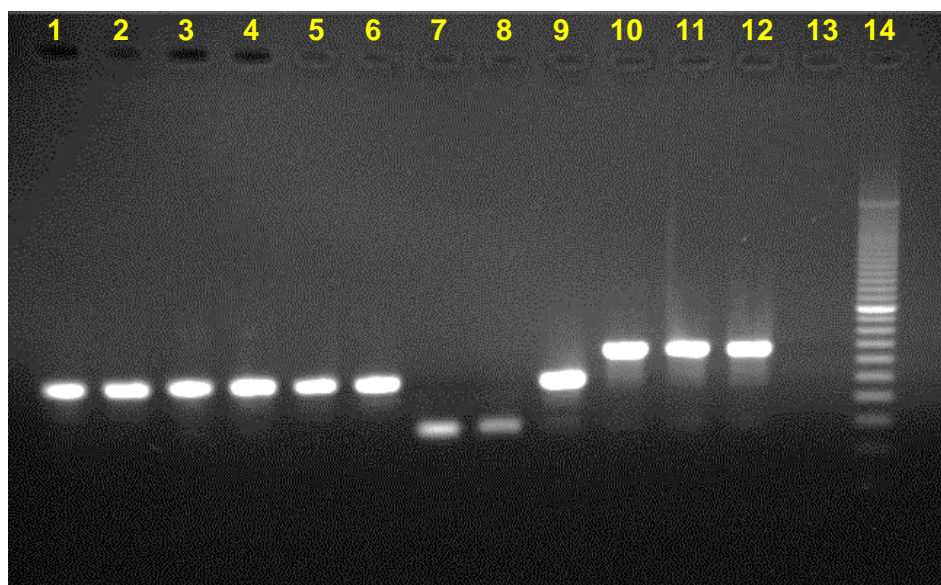


Figura 48. PCR para el subtipado del SCCmec tipo IV. Carriles 1-6: subtipo IVc; carriles 7-8: subtipo IVa; carril 9: subtipo IVc; carriles 10-12: subtipo IVh; carril 13: control negativo; carril 14: marcador de peso molecular de 100-1000 pb.

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

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

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

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

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

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

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

(CE: Consultas Externas).

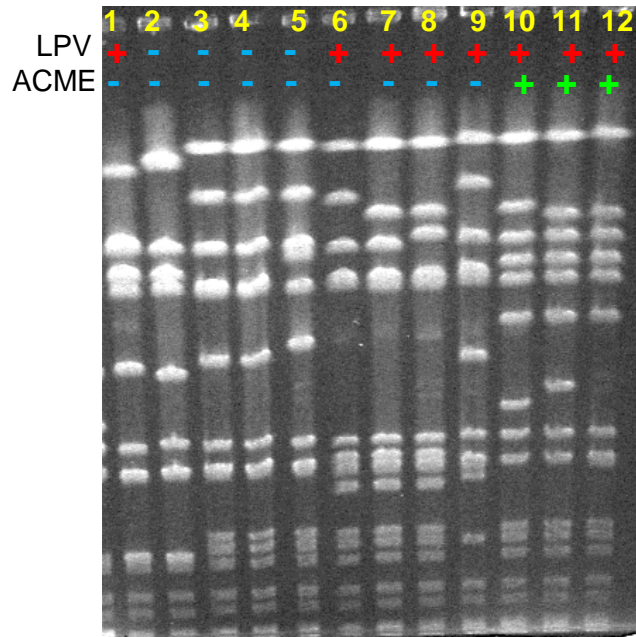


Figura 49. ECP de distintos subtipos de los clones ST5-IV y ST8-IV. Carril 1: ST5-IVa (LPV+); carril 2: ST5-IVc (LPV-); carriles 3-5: ST8-IVc (LPV-); carriles 6-9: ST8-IVc (LPV+, ACME-, USA300-like); carriles 10-12: ST8-IVa (LPV+, ACME+, USA300). Encima de cada carril se indica la producción (+) o no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

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

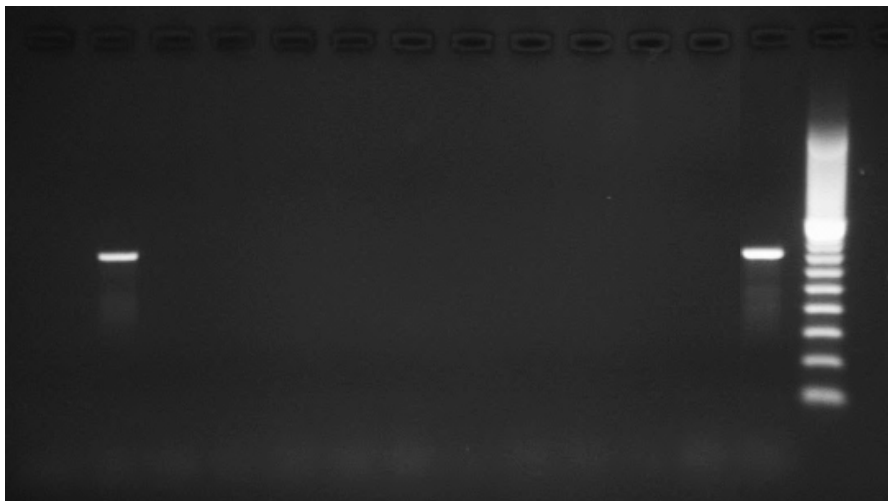


Figura 50. PCR del ACME. Carril 1: cepa ACME negativa; carril 2: cepa ACME positiva; carriles 3-11: cepas ACME negativas; carril 12: control negativo; carril 13: control positivo (USA300); carril 14: marcador de peso molecular de 100-1000 pb.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

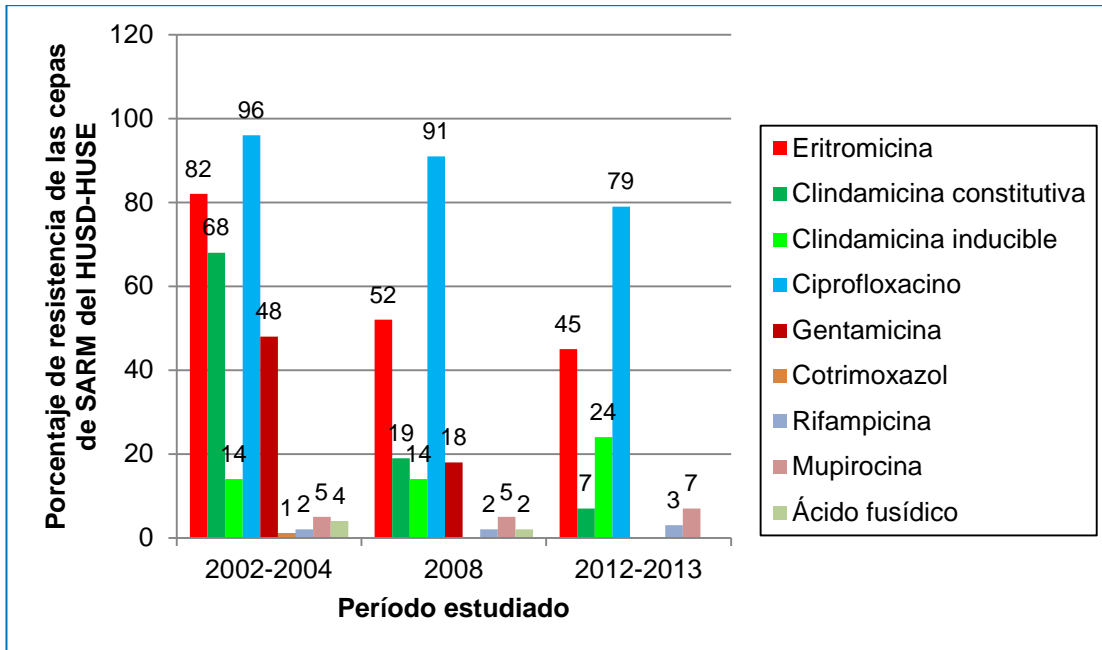


Figura 51. Esquema de la resistencia antimicrobiana de las cepas de SARM del HUSD-HUSE durante los tres períodos estudiados.

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

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

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

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

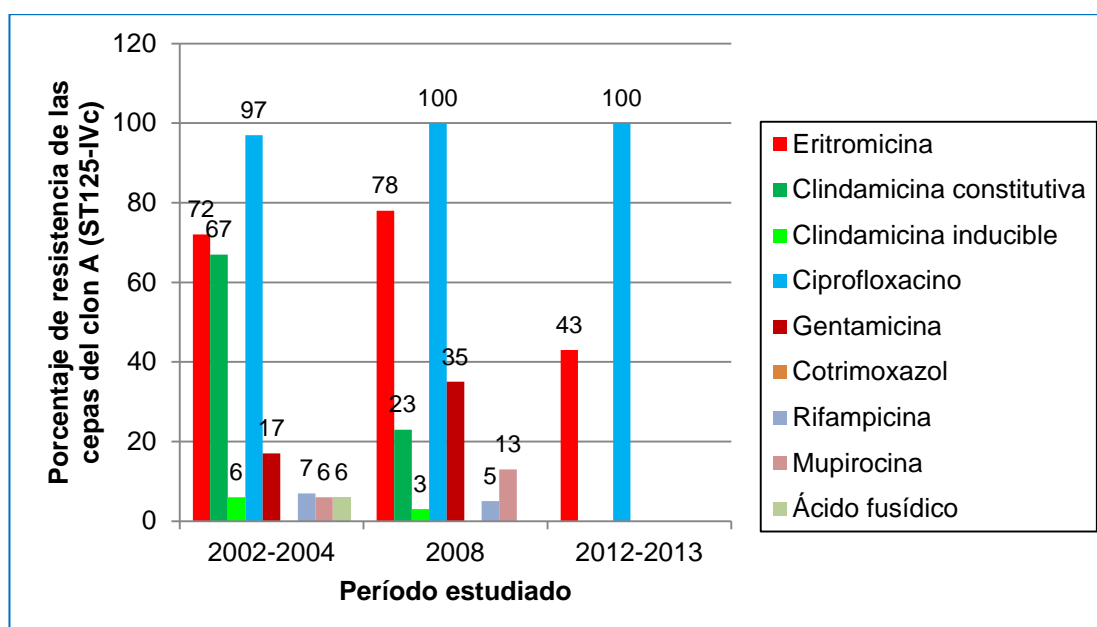


Figura 52. Esquema de la resistencia antimicrobiana del clon A (ST125-IVc) durante los tres periodos estudiados.

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

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

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

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

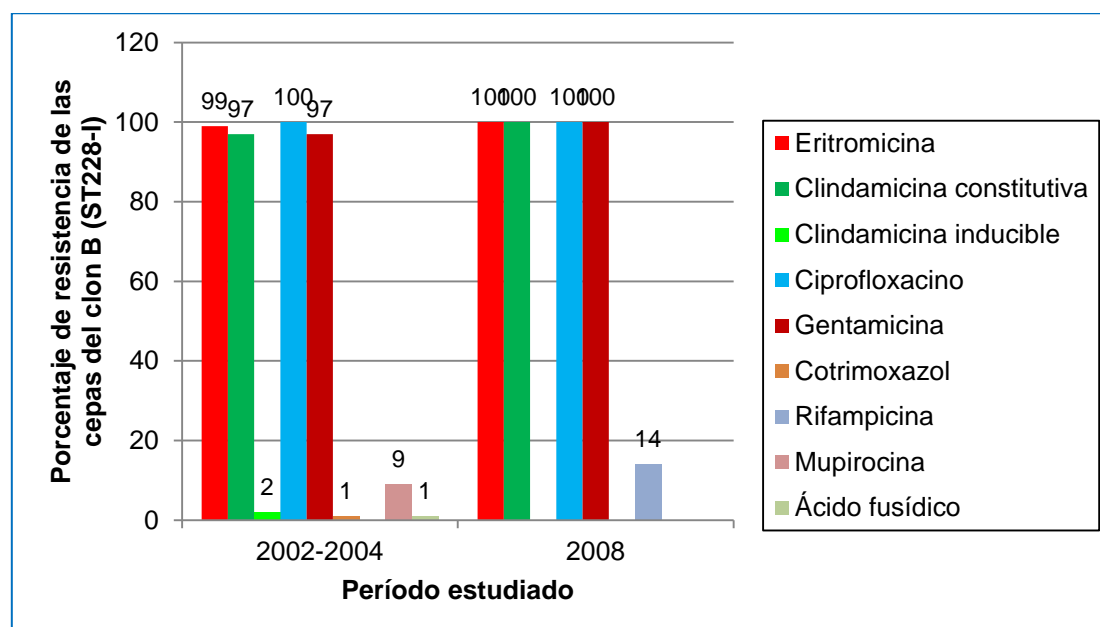


Figura 53. Esquema de la resistencia antimicrobiana del clon B (ST228-I) en dos períodos estudiados.

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

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

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

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

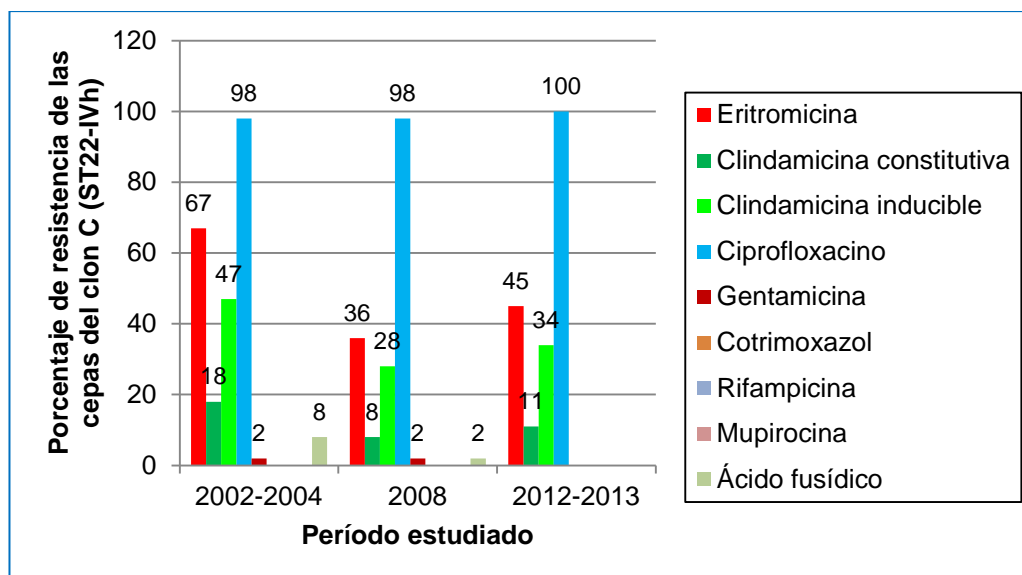


Figura 54. Esquema de la resistencia antimicrobiana del clon C (ST22-IVh) durante los tres períodos estudiados.

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

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

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

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

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

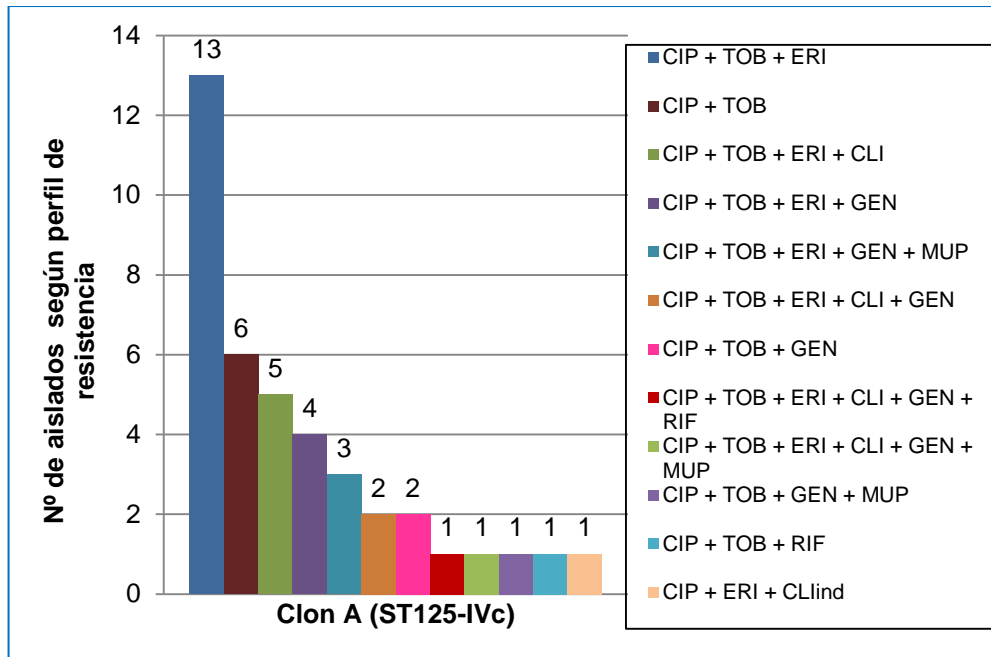


Figura 55. Esquema de los diversos perfiles de resistencia antimicrobiana del clon A (ST125-MRSA-IVc) en 2008.

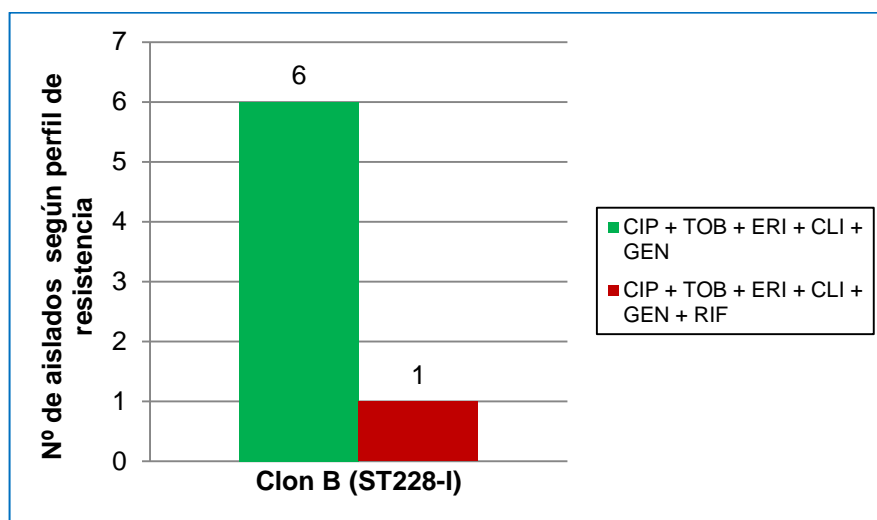


Figura 56. Esquema de los diversos perfiles de resistencia antimicrobiana del clon B (ST228-MRSA-I) en 2008.

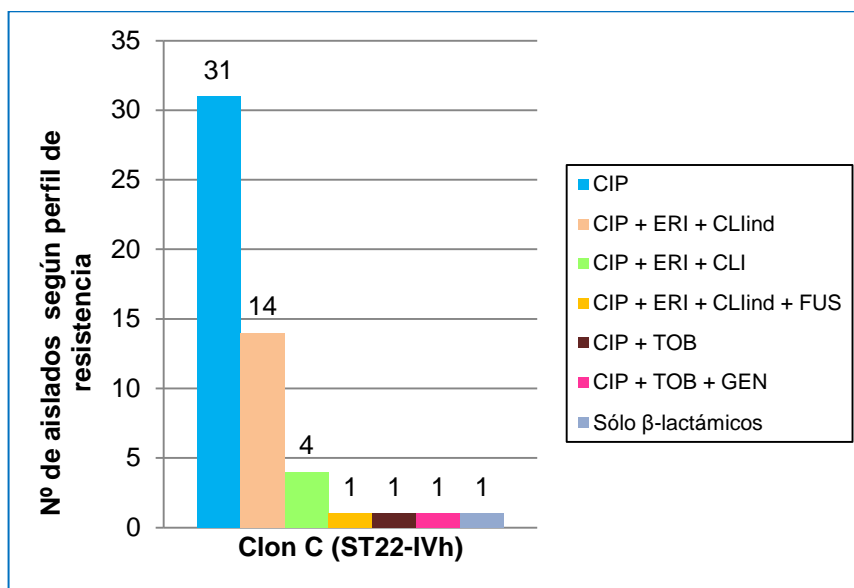


Figura 57. Esquema de los diversos perfiles de resistencia antimicrobiana del clon C (ST22-MRSA-IVh) en 2008.

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

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

5.9 Residentes participantes y características poblacionales

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

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

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

Tabla 26. Características de los residentes participantes.

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

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

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

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

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

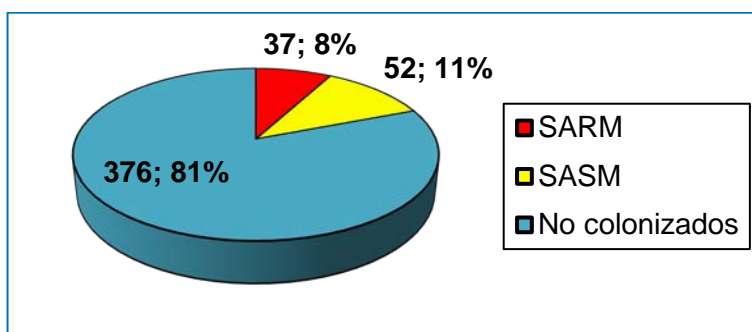


Figura 58. Colonización nasal por *S. aureus*.

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

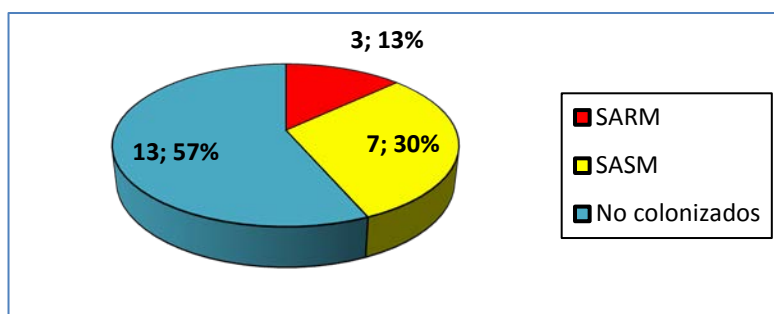


Figura 59. Colonización en úlcera por *S. aureus*.

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

5.11 Factores de riesgo de la colonización por SARM

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

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

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

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

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

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

5.12 Estudio de epidemiología molecular

5.12.1 Electroforesis en campo pulsado y MLST

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

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

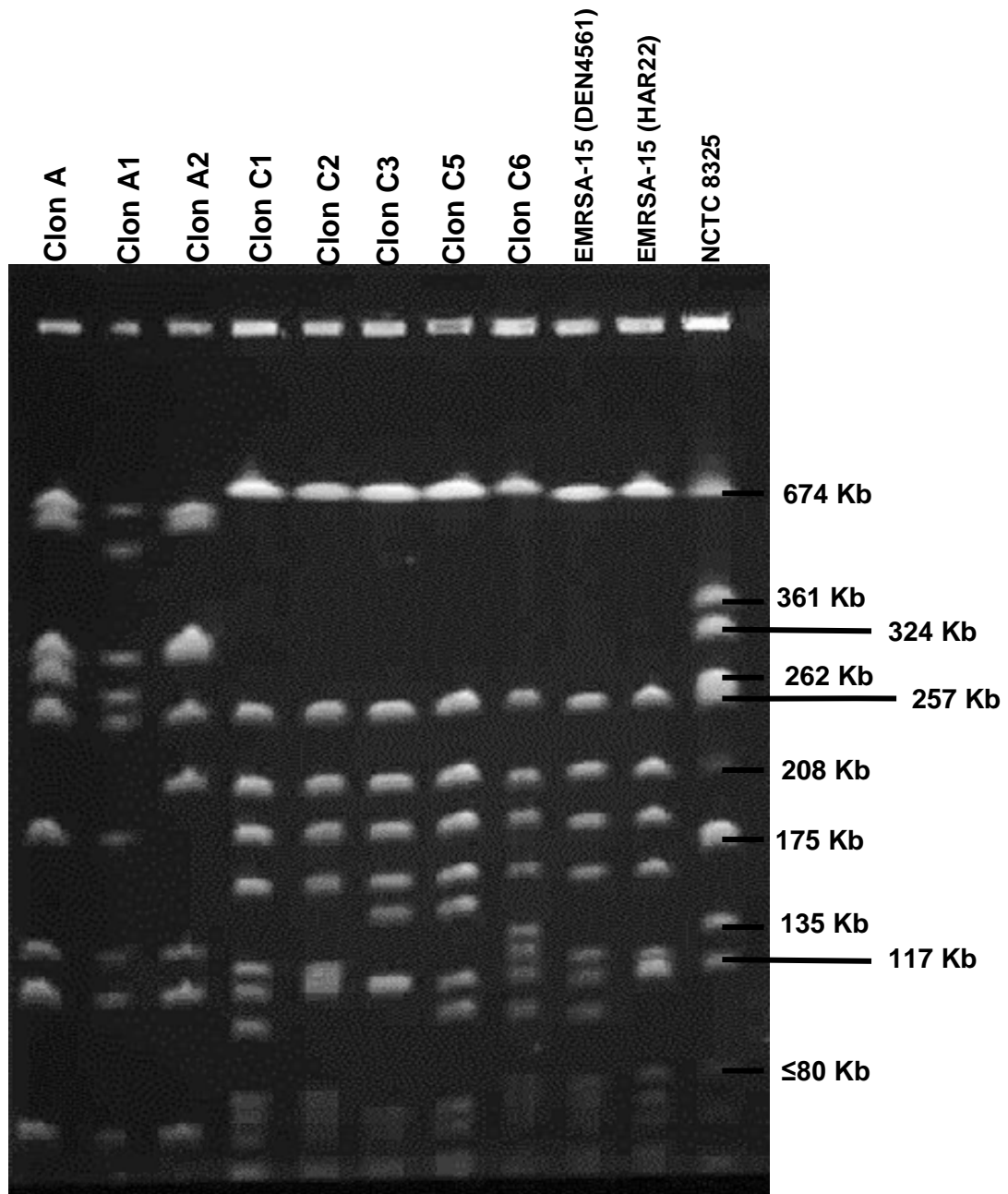


Figura 60. Electroforesis en campo pulsado de los diferentes clones y subtipos de SARM aislados en la Residencia Bonanova, junto con dos cepas tipificadas del clon EMRSA-15 y la cepa de *S. aureus* NCTC 8325 utilizada como marcador de peso molecular.

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

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

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

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

5.12.2 Tipado del SCCmec

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



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

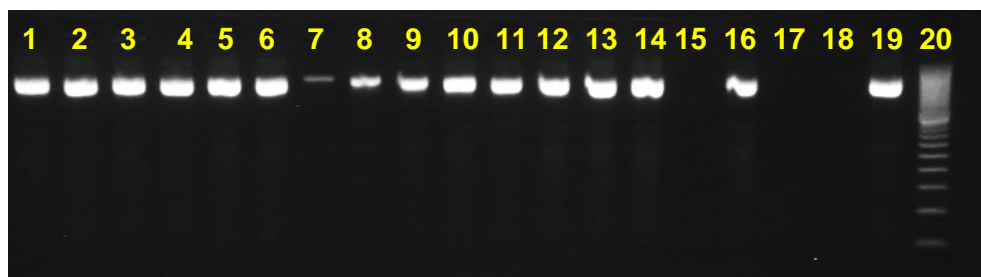


Figura 62. PCR para el genotipado del complejo *mec* de clase B. Carriles 1-14: cepas de SARM de la Residencia Bonanova (*SCCmec* tipo IV, con complejo *mec* de clase B); carril 15: control negativo; carril 16: clon Ibérico (*SCCmec* tipo I, con complejo *mec* de clase B); carril 17: clon NY/Japón (*SCCmec*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

5.12.3 Subtipado del *SCCmec* tipo IV

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

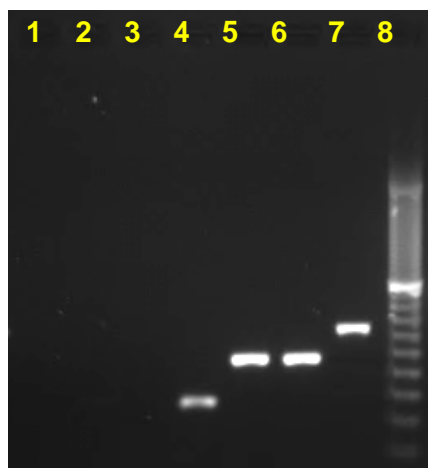


Figura 63. PCR para el subtipado del SCCmec tipo IV. Carril 1: control negativo; carril 2: clon Ibérico (SCCmec tipo I); carril 3: clon NY/Japón (SCCmec tipo II); carril 4: clon USA300 (SCCmec tipo IVa); carriles 5 y 6: cepas de SARM de la Residencia Bonanova (clon A, SCCmec tipo IVc); carril 7: cepa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

5.13 Detección de la leucocidina de Panton-Valentine

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

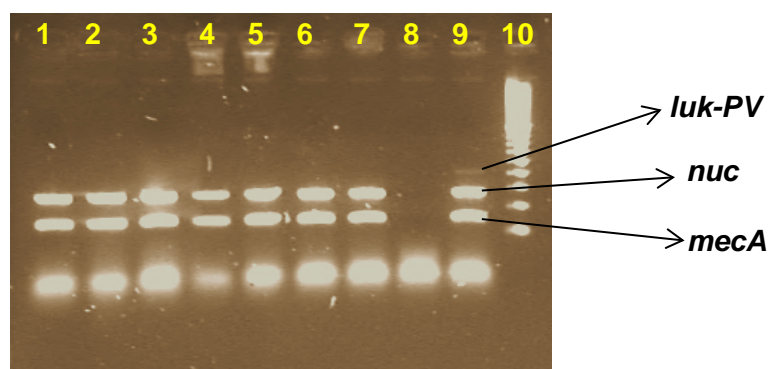


Figura 64. PCR para la detección de LPV. Carriles 1-7: cepas de SARM de la Residencia Bonanova; carril 8: control negativo; carril 9: cepa 3922-04 (control positivo); carril 10: marcador de peso molecular de 100-1000 pb.

5.14 Estudio de sensibilidad antimicrobiana

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

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

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

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

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

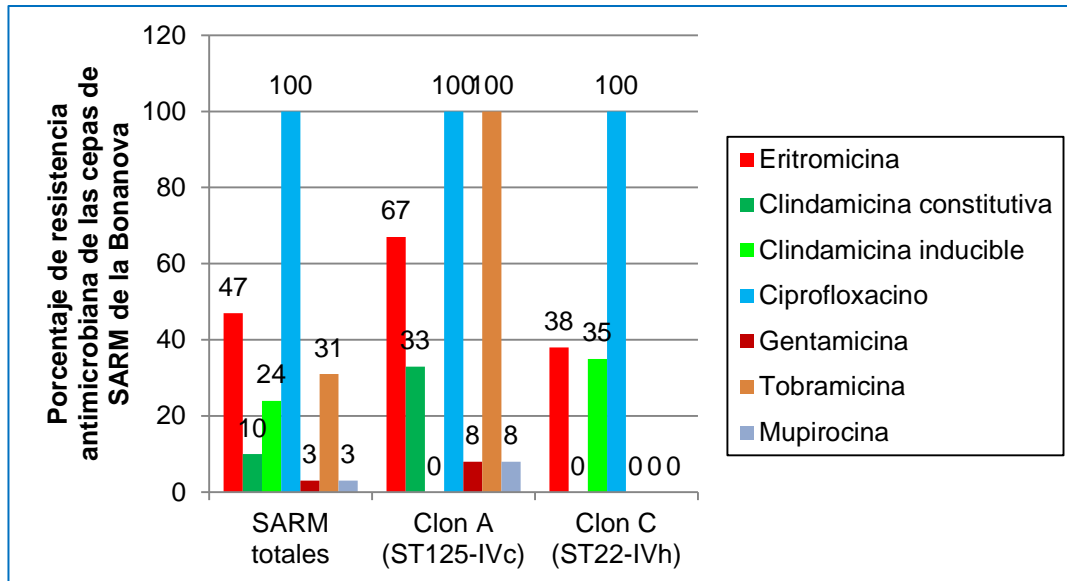


Figura 65. Esquema de la resistencia antimicrobiana de las cepas de SARM de la Residencia Bonanova.

5.15 Estudio de seguimiento longitudinal

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

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

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

5.15.1 Seguimiento a los 8 meses

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

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

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

Tabla 30. Resumen del número de casos y controles.

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

^aNinguno relacionado por infección por SARM.

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

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

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

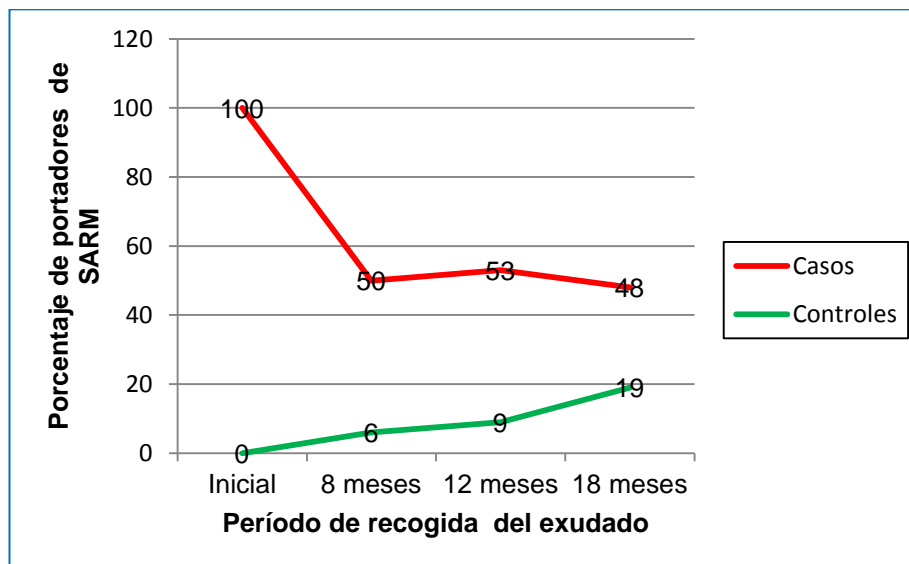


Figura 66. Detección de SARM en el estudio longitudinal.

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

5.15.2 Seguimiento a los 12 meses

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

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

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

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

5.15.3 Seguimiento a los 18 meses

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

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

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

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

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

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

^aSARM a los 13 meses.

Figura 67. Seguimiento longitudinal del grupo control.

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

5.16 Epidemiología molecular de SARM en el estudio de seguimiento

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

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

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

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

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

5.17 Persistencia del estado de portador nasal de SARM

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5.19 Estudios de sensibilidad

5.19.1 Cepas iniciales de SARM sensibles a la linezolida

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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



Figura 70. Doble halo con el disco de linezolida.

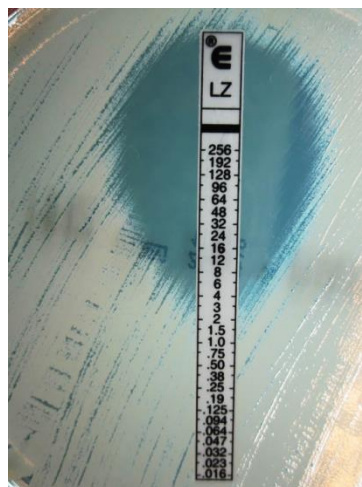


Figura 71. E-test a la linezolida en la cepa anterior.

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

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

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

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

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

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

5.21 Estudio del mecanismo de resistencia a la linezolidina

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

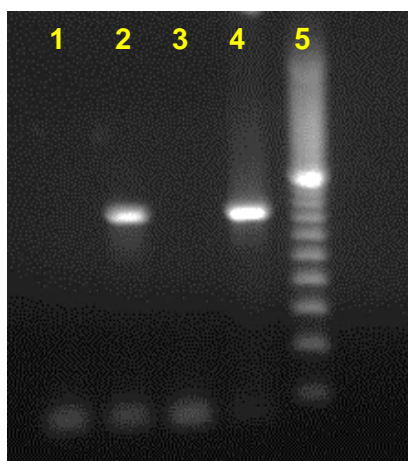


Figura 72. PCR para el gen *cfr*. Carril 1: SARM sensible a la linezolidina del paciente 1; carril 2: SARM resistente a la linezolidina del paciente 1; carril 3: control negativo; carril 4: control positivo (cepa HC08); carril 5: marcador de peso molecular de 100-1000 pb.

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

5.22 Estudios de conjugación

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

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

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

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

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

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

5.23 Determinación del tamaño del plásmido

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

5.24 Detección de los restantes genes de resistencia transferidos

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

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

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

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

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

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

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

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

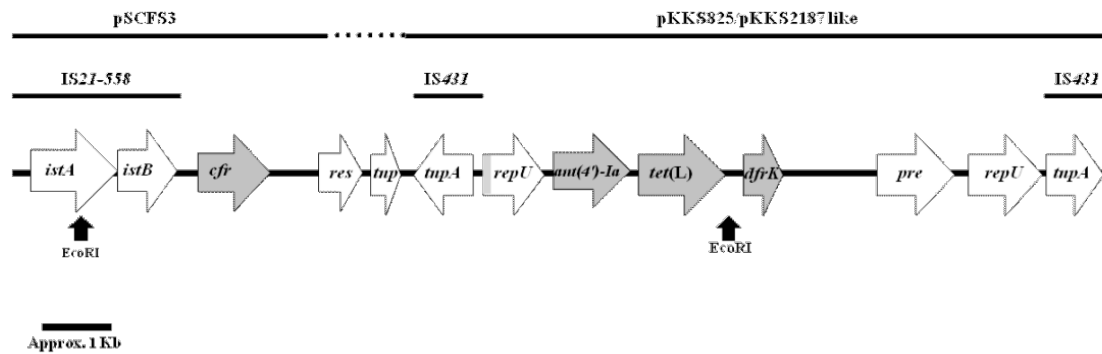


Figura 73. Estructura genética del fragmento de ADN secuenciado de 15.259 pb del plásmido de multirresistencia pERGB. Los puntos de corte de la enzima de restricción *EcoRI*, que delimitan el fragmento de 8.675 pb clonado, están representados con flechas negras. En la parte superior de la figura se indican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

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

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

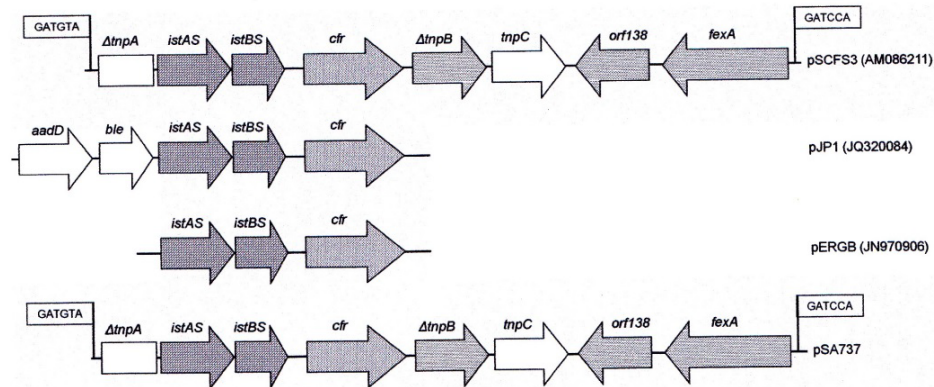


Figura 74. Representación esquemática del entorno genético del gen *cfr* en los plásmidos pERGB, pSCFS3, pJP1, pSA737 (Mendes, 2013).

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

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

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

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

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

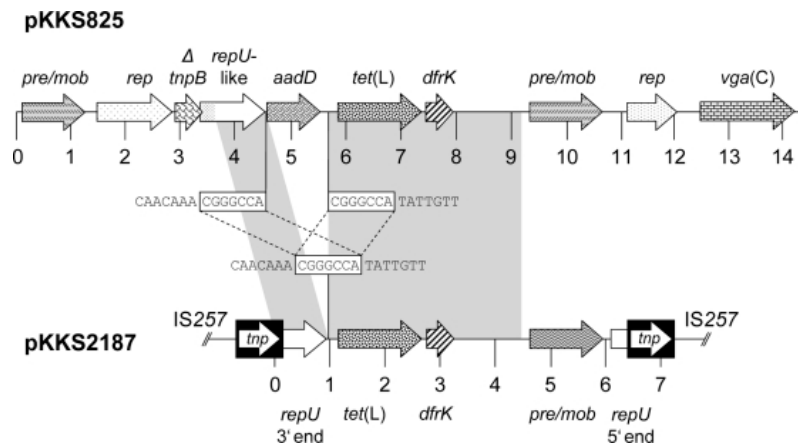


Figura 75. Estructura de los plásmidos pKKS825 y pKKS2187 (Kadlec, 2009b).

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

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

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

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

Por último, al final del fragmento secuenciado, se encontró una copia directa de la IS431, idéntica a la IS431 situada en el SCCmec de la cepa de *S. cohnii* WC28 ([Zong, 2010](#)).

PARTE 4. ESTUDIO DE EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR Y CARACTERIZACIÓN DEL MECANISMO DE RESISTENCIA DE UN BROTE DE *Staphylococcus hominis* RESISTENTE A LA LINEZOLIDA

5.26 Características de los pacientes con *S. hominis* resistente a la linezolida

Durante febrero 2008 y marzo 2009 se detectaron en los hospitales HSSL y HUSD un total de 15 aislados clínicos de *Staphylococcus hominis* subsp. *hominis* resistentes a la linezolida en 14 pacientes distintos. Un paciente tuvo dos hemocultivos positivos a este microorganismo (con el mismo antibiograma) durante dos ingresos diferentes en el mismo hospital separados 100 días entre sí. De estos 15 aislados de *S. hominis*, 12 se detectaron en pacientes atendidos en el HSSL (11 de ellos en la UCI) y los otros 3 estaban ingresados en el HUSD, todos ellos en el área quirúrgica-traumatológica de la UCI de este hospital. La decisión sobre la significación clínica se adoptó tras revisar las historias clínicas y los antecedentes microbiológicos de los pacientes (tabla 35).

Tabla 35. Características de los pacientes con *S. hominis* resistente a la linezolida^a.

Paciente	Hospital	Fecha de aislamiento	Muestra	Sexo	Significación clínica
1	HSSL	29/03/2008	Hemocultivo	F	No
2	HSSL	22/05/2008	Hemocultivo	F	Sí
3	HSSL	06/08/2008	Hemocultivo	F	No
4	HSSL	19/08/2008	Hemocultivo	M	No
5	HSSL	01/09/2008	Hemocultivo, cable marcapasos	F	Sí
6	HSSL	01/10/2008	Hemocultivo	M	No
6	HSSL	21/01/2009	Hemocultivo	M	Sí
7	HUSD	11/11/2008	LCR	F	Sí
8	HUSD	16/11/2008	Catéter	M	Sí
9	HSSL	17/12/2008	Hemocultivo	M	No
10	HSSL	28/01/2009	Líquido sinovial	F	No
11	HSSL	06/02/2009	Exudado herida	M	Sí
12	HSSL	13/02/2009	Hemocultivo	M	No
13	HSSL	23/02/2009	BAS	F	Sí
14	HUSD	26/02/2009	Catéter	M	Sí

^aAbreviaturas. HSSL: Hospital Son Llätzer; HUSD: Hospital Universitari Son Dureta; M: masculino; F: femenino; LCR: líquido cefalorraquídeo; BAS: aspirado bronquial.

Es importante señalar que en dicho período no se produjo ninguna transferencia de pacientes entre las UCI de ambos hospitales y tampoco hubo ningún traslado de instrumental entre ellas. No obstante, dos enfermeras compatibilizaban el trabajo en ambas UCI durante el período de tiempo del brote.

Respecto al tipo de muestra (**tabla 35**), los aislados de *S. hominis* resistentes a la linezolidina se obtuvieron de hemocultivos (9), seguidos de catéteres (2), líquidos estériles (2), cable de marcapasos (1) y exudado herida (1). Adicionalmente, se llevó a cabo un estudio de colonización (nasal, axilar e inguinal) en los últimos tres pacientes del HSLL. Todos ellos tuvieron colonización axilar e inguinal por *S. hominis* multiresistente, con el mismo antibiograma que su cepa clínica correspondiente.

La evolución en los 15 episodios infecciosos fue buena en 12 de ellos, otros 2 fallecieron por causas no relacionadas, mientras que el paciente restante desarrolló una bacteriemia con infección del cable de marcapasos por este microorganismo, falleciendo a los pocos días por una probable endocarditis (**tabla 36**).

Tabla 36. Tratamiento y evolución de los pacientes con *S. hominis* resistente a la linezolidina^a.

Paciente	Días de tratamiento con linezolidina previos a la detección de <i>S. hominis</i>	Tratamiento previo con glucopéptidos	Tratamiento dirigido	Evolución
1	16	No	No	<i>Exitus</i> NR
2	10	Vancomicina	Vancomicina	Buena
3	0	No	No	Buena
4	9	Vancomicina	No	Buena
5	6	No	Vancomicina	<i>Exitus</i> R
6	0	No	Vancomicina	Buena
6	4	Vancomicina	Vancomicina	Buena
7	19	Vancomicina	Vancomicina	<i>Exitus</i> NR
8	17	No	Vancomicina	Buena
9	3	No	No	Buena
10	42	No	No	Buena
11	1	No	Vancomicina	Buena
12	0	No	No	Buena
13	11	Vancomicina	Tigeciclina	Buena
14	11	No	Tigeciclina	Buena

^aAbreviaturas. NR: no relacionado; R: relacionado.

5.27 Identificación de especie y estudio de sensibilidad

La secuenciación del gen ARNr 16S en una cepa de *S. hominis* multirresistente (previamente identificada mediante la tarjeta Vitek® GP, bioMérieux) confirmó la identificación de *S. hominis* subsp. *hominis*.

Todos estos aislados fueron resistentes a la penicilina, oxacilina (CMI > 256 µg/mL), teicoplanina (CMI > 256 µg/mL), cotrimoxazol (CMI > 32 µg/mL), ciprofloxacino (CMI > 32 µg/mL), levofloxacino, tobramicina y linezolid (CMI ≥ 96 µg/mL). Por el contrario, todos ellos fueron sensibles a la eritromicina, tetraciclina, gentamicina y daptomicina. La CMI para la daptomicina fue de 0,25 µg/mL en todos ellos.

Respecto a la vancomicina, todas las cepas presentaron una CMI de 4 µg/mL, todavía sensibles siguiendo los criterios del CLSI (sensible ≤4 µg/mL, intermedio 8-16 µg/mL, resistente ≥32 µg/mL) (CLSI, 2009; CLSI, 2012), y también sensibles con los puntos de corte del EUCAST del 2012 (sensible ≤4 µg/mL, resistente >4 µg/mL) (EUCAST, 2012).

En relación con la clindamicina, casi todos los aislados tuvieron una sensibilidad intermedia a este antibiótico (CMI = 0,75 µg/mL), excepto en dos de ellos. Uno de los aislados fue sensible (CMI = 0,5 µg/mL) y el otro resistente a la clindamicina (CMI = 4 µg/mL) (CLSI, 2009; CLSI, 2012). Todas las cepas fueron sensibles a la rifampicina, excepto una que presentó sensibilidad intermedia.

5.28 Mecanismo de resistencia a la linezolid

En el análisis de secuenciación de un fragmento del gen ARNr 23S, los cinco aislados de *S. hominis* resistentes a la linezolid que fueron secuenciados presentaron la mutación G2576T (según numeración de *E. coli*) en el dominio V del gen ARNr 23S, mientras que ninguno de los tres aislados sensibles presentaron dicha mutación (**figuras 76 y 77** de la página siguiente).

En comparación con la secuencia del dominio V del gen ARNr 23S de una cepa de *S. aureus* disponible en GenBank (número de acceso X68425), se encontró además, la sustitución C2163T en los ocho aislados de *S. hominis* secuenciados

(tanto los sensibles como los resistentes a la linezolid). Por ello, se consideró que esta sustitución era un polimorfismo de especie.

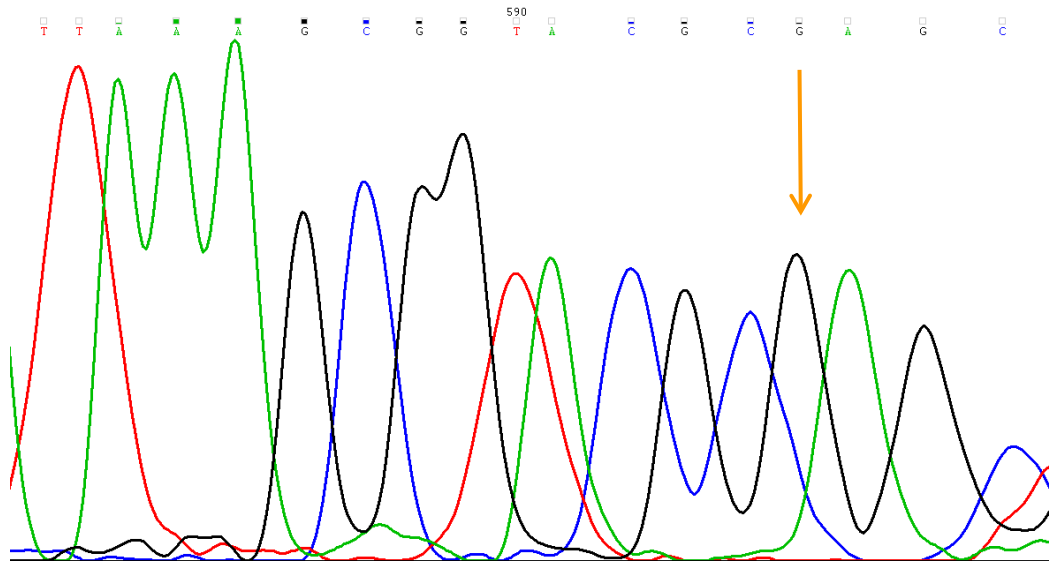


Figura 76. Cromatograma de un fragmento de las secuencias del gen ARNr 23S en un aislado de *S. hominis* sensible a la linezolid. La flecha naranja indica la guanina en la posición 2.576 (según numeración de *E. coli*), sin detectarse ninguna mutación).

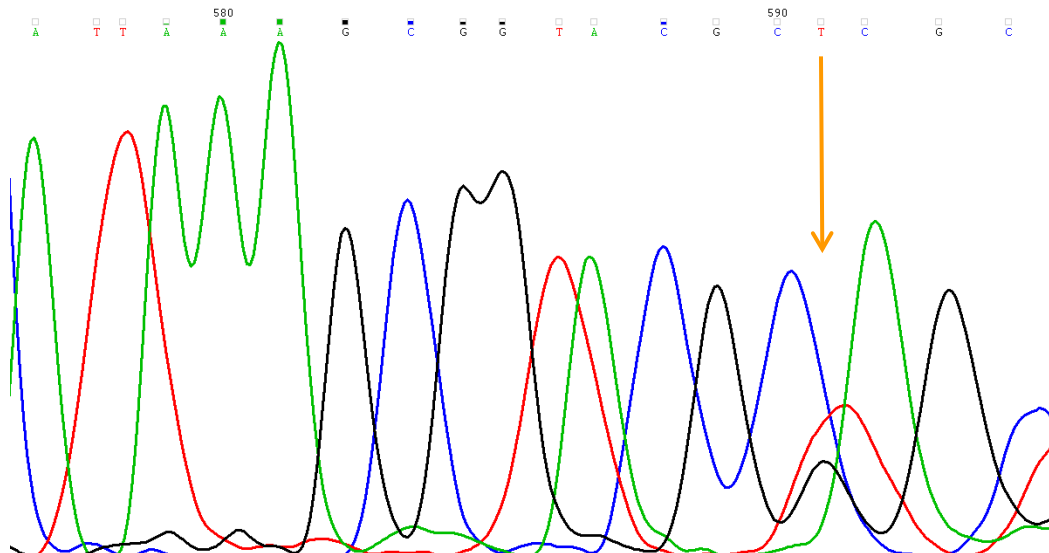


Figura 77. Cromatograma de un fragmento de las secuencias del gen ARNr 23S en un aislado de *S. hominis* resistente a la linezolid. La flecha naranja indica la posición 2.576 (según numeración de *E. coli*), observándose una doble curva, siendo la curva de la timina (alelos mutados) superior a la curva de la guanina (alelos no mutados).

Por último, no se detectó el gen *cfz* en los ocho aislados de *S. hominis*, tanto sensibles como resistentes a la linezolida, usando la cepa de SARM HC08 (Morales, 2010) como control positivo de la amplificación.

5.29 Estudio de epidemiología molecular

La ECP, tras digestión con *Sma*I, mostró que todos los aislados de *S. hominis* resistentes a la linezolida tenían el mismo patrón electroforético, aunque únicamente se observaban tres bandas, por lo que era poco discriminativa. Por el contrario, los aislados de *S. hominis* sensibles a la linezolida tuvieron 3-4 bandas en diferentes posiciones (figura 78).

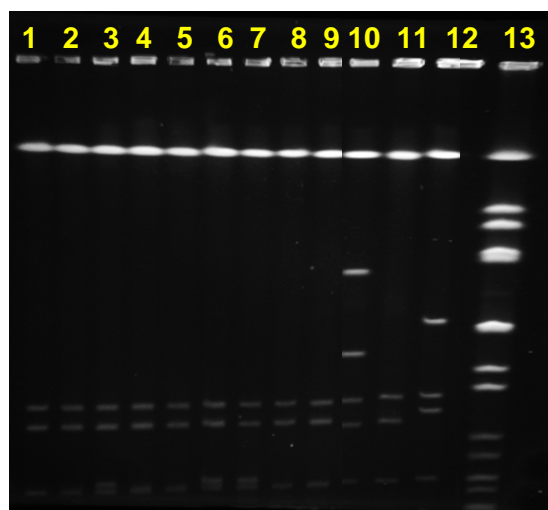


Figura 78. ECP usando *Sma*I como enzima de restricción. Líneas 1-6: aislados de *S. hominis* resistentes a la linezolida del HSL. Líneas 7-9: aislados de *S. hominis* resistentes a la linezolida del HUSD. Líneas 10-12: aislados de *S. hominis* sensibles a la linezolida de ambos hospitales. Línea 13: cepa de referencia de *S. aureus* NCTC 8325.

Cuando se utilizó *Ap*I como enzima de restricción, la ECP mostró que todos los aislados resistentes a la linezolida pertenecían al mismo clon, mientras que los sensibles a este compuesto pertenecían a diferentes clones (figura 79).

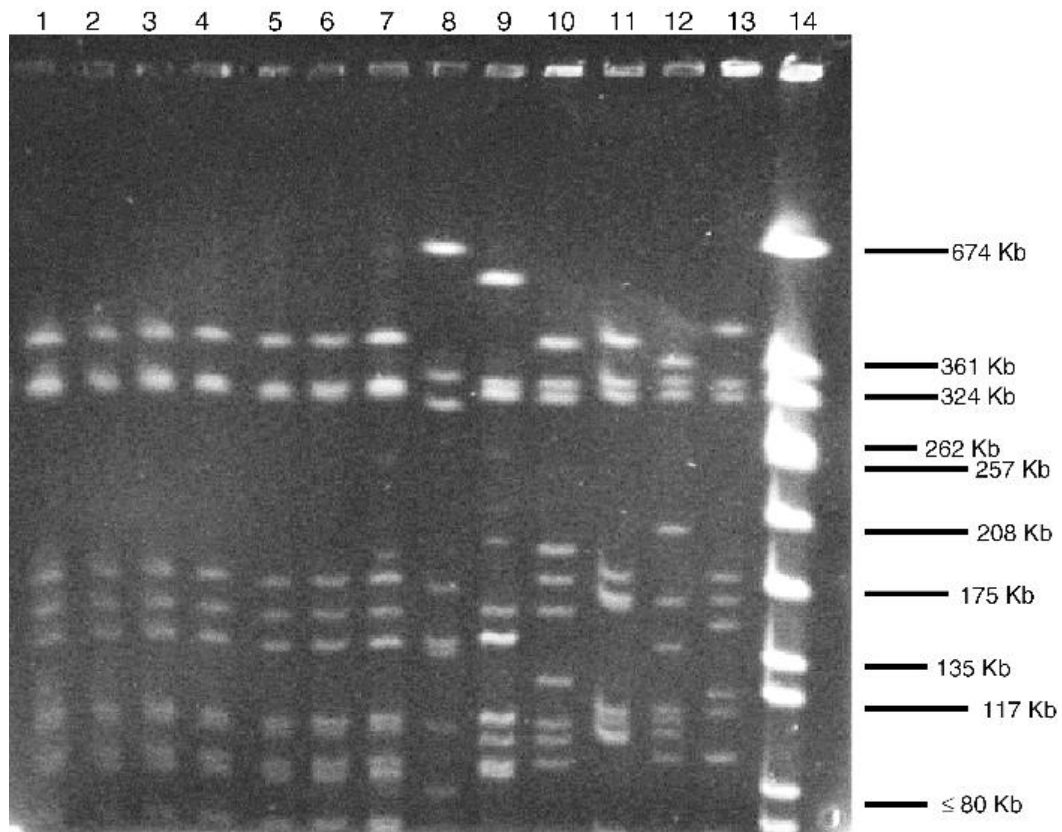


Figura 79. ECP usando *Apal* como enzima de restricción. Líneas 1-6: aislados de *S. hominis* resistentes a la linezolidina del HSSL. Línea 7: aislado de *S. hominis* resistente a la linezolidina del HUSD. Línea 8: aislado de *S. hominis* sensible a la linezolidina del HUSD. Líneas 9-13: aislados de *S. hominis* sensibles a la linezolidina del HSSL. Línea 14: cepa de referencia de *S. aureus* NCTC 8325 (Ruiz de Gopegui, 2011).

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

6.1 Epidemiología molecular de SARM en Mallorca

El comienzo del problema

Staphylococcus aureus resistente a la meticilina continua siendo uno de los principales patógenos responsables de infecciones nosocomiales (EPINE, 2011). Una vez que se introduce en el hospital, habitualmente llega a situaciones de endemidad, a pesar de las medidas del control de la infección (da Silva Coimbra, 2003). Las infecciones por SARM tienen peor pronóstico que las infecciones por SASM, con una mayor morbilidad, mortalidad, duración de la estancia hospitalaria y costes (Gould, 2012).

En la mayoría de hospitales del territorio peninsular español, la epidemia de SARM empezó en 1990, alcanzando un primer pico en 1991-1992. La mayoría de estos casos estaban producidos por el denominado clon Ibérico (Domínguez, 1994; Gasch, 2011). Sin embargo, en el HUSD, el primer brote de SARM se detectó una década más tarde, en junio de 1999. Inicialmente se aisló en pacientes ingresados en UCI y Traumatología, extendiéndose después al resto de plantas del pabellón de hospitalización general. Con el transcurso del tiempo, la situación epidémica inicial de nuestro hospital se transformó en una endemia moderada.

En nuestro primer estudio de epidemiología molecular (junio 1999-agosto 2000) la epidemia de SARM era claramente oligoclonal, con tres clones mayoritarios de SARM que comprendían el 98% de las cepas clínicas de nuestro hospital. Desde junio de 1999 hasta diciembre de ese año, únicamente se encontraron en el HUSD dos clones de SARM, el clon A (tipificado posteriormente como ST125-MRSA-IVc) y el clon C (ST22-MRSA-IVh). A partir de enero 2000 se detectó por primera vez, en pacientes que estaban ingresados en UCI, el clon B (ST228-MRSA-I).

La práctica totalidad de las infecciones por SARM durante 1999-2004 estuvieron producidas por tres únicos clones. En este sentido, nuestro trabajo concuerda con otros que señalan que las cepas de SARM hospitalarias corresponden a unos pocos clones. Así, por ejemplo, en un estudio realizado en más de 3.000 aislados de SARM procedentes de hospitales de Europa y América, casi el 70% de los

aislados pertenecía a uno de los cinco clones pandémicos (Oliveira, 2002b). En otro trabajo, el 79% de 2.093 aislados de SARM procedentes de hospitales de diversos estados de EE.UU. detectados durante 2011 pertenecía a dos únicos clones, el USA300 y el USA100 (Diekema, 2014).

Otra de las cosas que llama la atención en nuestro estudio es la ausencia del clon Ibérico (ST247-MRSA-I) en el HUSD durante la pandemia inicial del SARM. El clon Ibérico fue el clon de SARM predominante en España desde 1990 hasta 1995, disminuyendo progresivamente su prevalencia a partir de 1996 y siendo prácticamente inexistente a partir de 2000 (Vindel, 2006). En el Hospital de Bellvitge, el primer hospital donde se describió este clon, la prevalencia del clon Ibérico disminuyó del 100% de todos los clones de SARM en el período 1990-1994, un 66% durante 1996-1999, al 5% en 2000-2004 (Gasch, 2011). Asimismo, en un hospital de Tenerife, el clon Ibérico comprendía el 97% de los aislados de SARM en 1998, el 74% en 1999, el 44% en 2000, pero en 2001, únicamente el 4% de sus cepas de SARM pertenecían a este clon (Pérez-Roth, 2004). Posteriormente, el clon Ibérico ha desaparecido de estos hospitales.

El primer clon de SARM detectado en el HUSD a comienzos de junio de 1999, principalmente en pacientes de UCI, fue el clon A, que se correspondía con el ST125-IVc. Este clon pertenece al complejo clonal 5 (CC5), ya que difiere del clon ST5 en uno de los siete alelos (*yqiL*) *housekeeping* utilizados para el tipado mediante MLST. Por ello, se ha sugerido (Pérez-Roth, 2004) que el clon ST125-MRSA-IVc habría derivado del clon Pediátrico (ST5-MRSA-IVc) (Sá-Leão, 1999), uno de los primeros clones pandémicos de SARM (Oliveira, 2002b). El clon ST125-IVc emergió por primera vez en España en 1996 siendo, a partir de 1998, el clon de SARM mayoritario en la inmensa mayoría de hospitales españoles. En los estudios multicéntricos del CNM, la prevalencia del clon ST125-IVc aumentó del 6,5% en 1996 al 58,8% en 2002 (Vindel, 2006).

También en junio de 1999, emergió en el HUSD el clon C, principalmente en pacientes de Traumatología y Medicina Interna, tipificado posteriormente como ST22-IVh. Este clon se encontró por primera vez en 1991, en varios hospitales del sudeste de Inglaterra. Se le denominó clon epidémico EMRSA-15 (Richardson, 1993), ya que previamente se habían definido en Inglaterra y Gales otros 14 clones epidémicos de SARM (Kerr, 1990). En diversos estudios retrospectivos, los primeros aislados de este clon fueron en 1990 en el sur de Inglaterra. Inicialmente las cepas de este clon eran sensibles al ciprofloxacino, pero a finales de 1991 se detectaron en la región inglesa

de West Midlands varios aislados resistentes a este antimicrobiano. El aumento de la administración hospitalaria de fluoroquinolonas durante la década de los 90 en el Reino Unido ([Livermore, 2002](#)) habría ofrecido una ventaja selectiva al EMRSA-15 sobre el resto de los clones sensibles a esta familia antibiótica ([Richardson, 1993](#); [Holden, 2013](#)). En el año 2000, el EMRSA-15 se extendió por todo el Reino Unido, desplazando rápidamente a los otros clones de SARM existentes ([Holden, 2013](#)). Actualmente, es el clon de SARM más frecuente en dicho país. Por ejemplo, en el Reino Unido el clon EMRSA-15 era el responsable del 60% de las bacteriemias por SARM en 1998-2000 ([Johnson, 2001](#)), del 76% en 2001 y del 85% en 2007 ([Ellington, 2010](#); [Reynolds, 2012](#)).

Posteriormente, el EMRSA-15 se ha detectado en otros muchos países. Así por ejemplo, se ha comunicado su aislamiento en Alemania desde 1996 ([Witte, 2001](#)), en Australia desde 1997 ([Pearman, 2001](#)), en Nueva Zelanda desde 1998 ([Smith, 2005](#)), en Portugal desde 2001 ([Aires-de-Sousa, 2005](#); [Amorim, 2007](#)). En cuanto a España, se observó por primera vez en 1999, en Tenerife (quizás al mismo tiempo o unos pocos meses antes que en nuestro centro), aunque sólo era el responsable durante 1999-2002 de menos del 2% de sus clones de SARM ([Pérez-Roth, 2004](#)). En la España peninsular, este clon era muy infrecuente hasta aproximadamente 2005. Así, en el estudio multicéntrico del CNM del 2002 (143 hospitales participantes), ninguno de los 134 aislados de SARM remitidos pertenecía a este clon ([Cuevas, 2007](#)).

El origen del clon EMRSA-15 en Mallorca, como en Tenerife, muy probablemente, podría estar relacionado con los movimientos turísticos, en concreto en los turistas británicos, o incluso alemanes, dado que en Alemania también el EMRSA-15 era bastante prevalente en 1999, aunque no tan frecuente como en el Reino Unido. Se podría hipotetizar que un turista o residente inglés, previamente colonizado por esta cepa, habría ingresado en el HUSD (posiblemente en Traumatología). Tras haber recibido tratamiento antibiótico, llevar dispositivos intravasculares (catéteres vasculares, sondas urinarias), o ser sometido a una intervención quirúrgica, desarrollaría una infección por SARM. A través de las manos del personal sanitario, se transmitiría al compañero de habitación y a otros enfermos de la planta. Este clon, al tener una mayor *fitness* que otros clones por su perfil genético ([Holden, 2013](#); [Knight, 2013](#)), se asentaría en nuestro hospital.

Por último, en enero de 2000 se detectó por primera vez en el HUSD el clon B (ST228-I), inicialmente limitado a pacientes en la UCI. Este clon ST228-I, como el ST125-IVc, pertenece al CC5. Se ha propuesto que el clon ST228-MRSA-I procedería

evolutivamente del clon ST5-MRSA-I (conocido en el Reino Unido como EMRSA-3) (Robinson, 2003). Fue descrito por primera vez en la ciudad de Würzburg, Baviera, en el suroeste de Alemania, en 1991 (Schwarzkopf, 1993), por lo que se le conoce como clon Alemán del sur. A partir de 1992, se produjo una rápida diseminación de este clon al norte y este de Alemania, produciendo diferentes brotes hospitalarios (Witte, 1994; Witte, 1999). En 1993, se extendió por la mayoría de hospitales italianos, por lo que también se le denominó clon Italiano (Campanile, 2009). Desde finales de la década de los 90, el ST228-I se ha diseminado por múltiples países europeos, constituyendo uno de los principales clones de SARM (Stefani, 2012).

En España, el clon ST228-I (clon E6, según la terminología de los patrones de bandas de la ECP del CNM) era el clon predominante de SARM durante 1997-1998, con el 23,3% de los aislados de SARM (según estudios multicéntricos). A partir de 1999, la frecuencia de este clon comenzó a disminuir (Vindel, 2006). Con todo, en el Hospital de Bellvitge este clon emergió en 2004, siendo el clon de SARM predominante a partir de 2006 (Mick, 2010).

Evolución clonal de SARM en Mallorca

Si se comparan los resultados obtenidos en los tres períodos comprendidos entre 1999 y 2008, el clon de SARM que predominaba en el HUSD ha sido distinto en cada uno de ellos. Así, durante el primer estudio de 1999-2000, el 63% de los aislados de SARM de nuestro hospital pertenecía al clon A (ST125-IVc), mientras que en el periodo 2002-2004 se detectó un moderado predominio del clon B (ST228-I), en el 43% de los aislados. Sin embargo, en 2008 el clon más frecuente de SARM era el clon C (EMRSA-15, ST22-IVh), con un 40%.

El predominio del clon ST125-IV hacia 1999-2000 era una característica común en la gran mayoría de hospitales españoles, como muestra los estudios multicéntricos del CNM (Vindel, 2006). Esta cifra alcanzaba el 93% en algunos hospitales, como en Logroño (Lozano, 2013b).

Respecto al clon ST228-I, el clon mayoritario de SARM del HUSD durante 2002-2004, existen varios trabajos que describen también un predominio de dicho clon en 1994-1998 en Alemania (Witte, 1999; Wisplinghoff, 2005) y durante 2000-2007 en Italia (Campanile, 2009), desplazando a los otros clones de SARM preexistentes, como de hecho ocurrió en nuestro hospital. Una situación similar se produjo en el

Hospital de Bellvitge, donde el clon ST228-I se diseminó a partir de 2004, reemplazando al ST125-IVc y haciéndose endémico (Mick, 2010; Gasch, 2011).

El clon de SARM predominante en el HUSD-HUSE en 2008-2013 fue el ST22-IVh (EMRSA-15). Este clon ha demostrado en numerosos estudios su capacidad para reemplazar a los otros clones de SARM que previamente se encontraban diseminados por un hospital. Así por ejemplo, en un hospital de Dresden (Alemania), en el año 2000 alrededor de la mitad de sus aislados de SARM pertenecían al clon ST228-I; sin embargo, la prevalencia del EMRSA-15 aumentó del 6% en 2001 al 59% en 2010 (Albrecht, 2011). Asimismo, en Portugal a partir del 2001, el clon EMRSA-15 ha ido reemplazando progresivamente al clon Brasileño (ST239-III) (Amorim, 2007; Aires-de-Sousa, 2008; Espadinha, 2013; Faria, 2013).

La drástica disminución del clon ST228-I que se constató en el HUSD entre los periodos 2002-2004 (43%) y 2008 (5%) se produjo también en un hospital de Valladolid, donde la prevalencia de este clon bajó de un 54% (en relación al conjunto de las cepas de SARM analizadas) en 2005 a un 14% en 2007 (Menegotto, 2012b).

Las razones por la desaparición del clon ST228-I en muchos hospitales y la diseminación de algunos clones portadores del SCCmec tipo IV (ST22-IVh y ST125-IVc en nuestro caso) son parcialmente conocidas. Una de ellas podría ser el mayor tamaño del SCCmec tipo I (34,3 kb) frente al SCCmec tipo IV (20,9-24,3 kb) (Deurenberg, 2008). Un estudio mostró que la transformación de un SCCmec tipo I en un aislado de SARM provocaba una reducción en su tasa de crecimiento (Ender, 2004), mientras que, la delección del SCCmec tipo IV en un aislado de SARM USA300 no afectaba a su *fitness* (Diep, 2008). Con todo, se ha sugerido que la diferencia en la *fitness* entre los SCCmec tipo I y tipo IV no se debería estrictamente al mayor tamaño del primero, sino a un consumo de glucosa más elevado en el SCCmec tipo I lo que provocaría una menor tasa de crecimiento (Lee, 2007). No obstante, el tipo de SCCmec no explica por si solo el éxito en la diseminación de un determinado clon de SARM (Albrecht, 2011; Knight, 2013).

Existen también otros estudios que intentan explicar el éxito de la elevada diseminación del EMRSA-15 frente a otros clones de SARM. Se ha comunicado que los aislados del clon EMRSA-15 tienen una mayor facilidad para sobrevivir y diseminarse por el medio hospitalario (Moore, 2002; Holden, 2013), una predisposición superior para colonizar las úlceras cutáneas (CDR, 1996), así como una mayor capacidad para sobrevivir a la desecación (Knight, 2013). Otro estudio concluía que el

principal determinante de la mejor *fitness* que presenta este clon es su perfil genético (*background*), diferente frente al resto de los clones (Knight, 2013).

Como es bien sabido, los hospitales no son instituciones cerradas. En el estudio de epidemiología molecular realizado en los cinco hospitales públicos existentes en 2003-2004 en la isla de Mallorca se encontraron los mismos tres clones mayoritarios en el HUSD en el resto de los hospitales, si bien la frecuencia de cada clon fue diferente en cada uno de los centros. Los hospitales General y Joan March son centros de larga estancia de pacientes crónicos. Por tanto, el origen del SARM en estos dos centros de larga estancia probablemente provendría de pacientes previamente ingresados en el HUSD, que en el momento del alta, fueron derivados a alguno de estos dos hospitales para una convalecencia.

El origen del SARM en los hospitales de Manacor y Son Llàtzer (este último inaugurado en diciembre de 2001) podría haber ocurrido en pacientes ingresados en el HUSD y que se habrían ido de alta siendo portadores de SARM. Posteriormente, habrían ingresado en los otros hospitales, y tras procedimientos invasivos y tratamiento antibiótico, desarrollarían una infección por SARM.

Por otra parte, la isla de Mallorca es un lugar turístico importante, principalmente del resto de España, de Alemania y del Reino Unido. Los clones A (ST125-IVc), B (ST228-I) y C (ST22-IVh) son, respectivamente, los clones predominantes de SARM en el conjunto de España (Cuevas, 2007), Alemania (Monecke, 2008) y Reino Unido (Johnson, 2001). Por tanto, es plausible que estos tres clones se hayan reintroducido en Mallorca en múltiples ocasiones. Un dato indirecto a favor de esta hipótesis es la mayor frecuencia del clon EMRSA-15 en el Hospital de Manacor en 2003-2004, hospital muy próximo a zonas costeras frecuentadas por el turismo británico.

Infección asociada a los cuidados sanitarios: SARM sale del hospital

En el período 1999-2000, la gran mayoría (el 93%) de las muestras con SARM procedían de pacientes que estaban ingresados en el hospital, principalmente de UCI. Sin embargo, llama la atención que la proporción de aislados de SARM detectados en pacientes que acudieron a Urgencias o Consultas Externas haya aumentado progresivamente pasando del 7% en 1999-2000, al 13% en 2002-2004 y al 27% en 2008.

Se observó (datos no mostrados) que la mayoría de pacientes con SARM de 2008 detectado en Urgencias o en Consultas Externas tenían el antecedente de haber ingresado en los últimos 6 meses en algún centro hospitalario de Mallorca, o bien, de haber acudido en múltiples ocasiones a las Consultas Externas de nuestro hospital. Los clones de SARM encontrados en la práctica totalidad de estos pacientes no ingresados eran idénticos a los clones del hospital. Por tanto, la mayoría de estos pacientes no ingresados con SARM estarían incluidos en la categoría de SARM asociado a los cuidados sanitarios (SARM-ACS) o a la asistencia sanitaria, en inglés *health care-associated, community-onset* (Klevens, 2006).

Las infecciones asociadas a los cuidados sanitarios fueron reconocidas como una nueva categoría hace relativamente pocos años (Friedman, 2002). El número de pacientes en riesgo de dicha categoría está aumentando en los últimos años, especialmente en los países desarrollados (Gasink, 2008).

Cepas de SARM productoras de LPV: SARM comunitario

En España los primeros aislados de SARM productores de LPV se detectaron en 2003 en Madrid (Broseta, 2006; Cercenado, 2008) y Barcelona (Manzur, 2008a; Rodríguez-Baño, 2009). La mayoría de los casos ocurrían en población inmigrante procedente de América Latina, principalmente de Ecuador (Cercenado, 2008; Manzur, 2008a). A partir de 2007, se produce un aumento en nuestro país de las cepas de SARM que poseían los genes productores de LPV (Cobos-Trigueros, 2010; Cañas-Pedrosa, 2012; Marimón, 2012; Vindel, 2014).

A finales del año 2003, se detectaron en el HUSD dos cepas de SARM únicamente resistente a β -lactámicos, en dos exudados (uno de herida y otro de un absceso). Desconocemos el lugar exacto de nacimiento de estos pacientes, si bien al menos uno de ellos (por los datos demográficos) era de procedencia latinoamericana. El perfil de bandas de la ECP de las dos cepas era idéntico, y diferente al de los tres clones mayoritarios del HUSD. Lamentablemente estas cepas no se conservaron para posteriores estudios.

En 2007, se llevó a cabo en nuestro hospital una búsqueda activa de los genes productores de LPV en las cepas de SARM sensibles al ciprofloxacino. El primer caso en nuestro hospital confirmado de una cepa de SARM con LPV ocurrió en abril del 2007. Se detectó en un varón de 34 años, natural de la India aunque residente en España desde hacía 6 años. Ingresó en la UCI tras haber sufrido un traumatismo

craneoencefálico. El paciente desarrolló, a los 8 días de su ingreso, una neumonía por una cepa de SARM LPV+, únicamente resistente a los β -lactámicos. A pesar de que la neumonía era de adquisición nosocomial, era probable que este paciente estuviera previamente colonizado en la orofaringe y, tras la intubación y haber recibido tratamiento antibiótico, habría desarrollado una neumonía por aspiración (Ruiz de Gopegui, 2008). Esta cepa fue posteriormente tipificada y se correspondía con el ST8-IVc (USA300-*like*). A partir de junio del 2007, encontramos los primeros aislados de SARM estrictamente comunitarios productores de LPV, la mayoría procedentes de centros de salud.

En nuestro estudio del 2008, 9 de los 132 aislados de SARM hospitalarios (6,8%) eran productores de LPV. Este porcentaje es más alto que en otros trabajos publicados en España. Así por ejemplo, la proporción de LPV en aislados de SARM fue del 2,3% en Bilbao durante 2005-2008 (Blanco, 2011), del 4,4% en San Sebastián durante 2007-2009 (Marimón, 2012), del 1,8% en la Rioja en 2009 (Lozano, 2013b) y del 4,2% en Gran Canaria durante 2003-2010 (Cañas-Pedrosa, 2012). Ello se podría explicar a que la mayoría de estos trabajos han analizado cepas detectadas antes de 2008, cuando la prevalencia de LPV era menor (Rojo, 2010; Vindel, 2014).

Casi todos los aislados de SARM productores de LPV detectados en Mallorca en 2008 pertenecían al clon ST8-IV, coexistiendo dos variantes, el ST8-IVa (USA300) y el ST8-IVc (USA300-*like*). El USA300-*like* fue el primer clon de SARM productor de LPV que detectamos en Mallorca y también es el más frecuente en el conjunto de España (Vindel, 2014), en Madrid (Cercenado, 2008) y en Barcelona (Manzur, 2008a). Con todo, en otras ciudades coexistían estas dos variantes del ST8 con una frecuencia similar (Blanco, 2011; Cañas-Pedrosa, 2012; Marimón, 2012).

Respecto al lugar de procedencia geográfica de los pacientes, si bien en 2008 sólo uno de los cuatro pacientes de nuestro hospital con USA300-*like* era de procedencia latinoamericana (un niño de 2 años de padres ecuatorianos), en 2007 al menos, 3 de los 7 pacientes con USA300-*like* de centros de salud eran de Sudamérica (datos no mostrados). Ello sugiere que el origen de este clon en Mallorca, como ha sucedido en otras ciudades españolas (Cercenado, 2008; Manzur, 2008a; Cobos-Trigueros, 2010; Daskalaki, 2010; Cañas-Pedrosa, 2012), podría provenir de la población inmigrante latinoamericana.

El clon ST8-IVa productor de LPV (USA300) se describió por primera vez en el año 1999 en EE.UU. (CDC, 2001). Respecto a Europa, se ha encontrado en más de 15 países (Nimmo, 2012), como el Reino Unido (Ellington, 2008) o Italia (Baldan, 2009;

[Sanchini, 2013](#)). Por tanto, el origen del clon USA300 en Mallorca bien pudiera estar en relación con el turismo, de modo similar a lo sucedido con el clon EMRSA-15.

En cuanto al estudio de sensibilidad antibiótica, llama la atención la diferencia de sensibilidad que encontramos en 2008 entre las cepas del clon USA300-like (principalmente resistencia exclusiva a los antibióticos β -lactámicos) con las cepas del clon USA300 (resistencia a la eritromicina y, en ocasiones, también al ciprofloxacino). En EE.UU. durante el inicio de la explosión del clon USA300 ([McDougal, 2003](#)), la práctica totalidad de estas cepas eran únicamente resistentes a los β -lactámicos y a los macrólidos (mediada por el gen *msrA*, que se encuentra en el plásmido *rep16*) ([Tenover, 2009](#); [Strommenger, 2014](#)). Sin embargo, en los últimos años alrededor del 45% de los aislados USA300 de EE.UU. son también resistentes a las quinolonas ([McDougal, 2010](#)). De modo similar, el 83-100% de las cepas de USA300 en Gran Canaria y Bilbao eran también resistentes a la eritromicina y al ciprofloxacino ([Blanco, 2011](#); [Cañas-Pedrosa, 2012](#)).

Por el contrario, los aislados del clon USA300-like suelen ser exclusivamente resistentes a los β -lactámicos ([Cercenado, 2008](#); [Manzur, 2008a](#); [Daskalaki, 2010](#); [Marimón, 2012](#)), o en ocasiones también a la tetraciclina ([Cercenado, 2008](#); [Manzur, 2008a](#); [Marimón, 2012](#)). En nuestro caso, no se detectó ninguna cepa USA300-like con resistencia a la tetraciclina.

En nuestros dos últimos estudios, 12 de las 14 cepas de SARM productoras de LPV se habían aislado a partir de exudados, principalmente de abscesos. Ello concuerda con múltiples trabajos que muestran una fuerte asociación en *S. aureus* entre la producción de LPV y las infecciones de piel y partes blandas, especialmente abscesos ([Lina, 1999](#); [Kazakova, 2005](#); [Johnson, 2006](#); [Moran, 2006](#); [Cercenado, 2008](#); [Manzur, 2008a](#); [del Giudice, 2009](#); [Daskalaki, 2010](#); [Nimmo, 2012](#)).

Perfiles de resistencia antimicrobiana en los clones mayoritarios de SARM

El clon ST125-IVc (clon A) presentó en 2008 una gran diversidad de perfiles de resistencia antimicrobiana, siendo en la mayoría de las ocasiones resistente al ciprofloxacino, tobramicina y a la eritromicina. Este perfil de resistencia fue también el más frecuente a nivel nacional en 2006-2007 ([Pérez-Vázquez, 2009](#)). Se ha descrito para los aislados de este clon que la resistencia a las fluoroquinolonas se debe a las mutaciones Ser-80 a Phe del gen *griA* (topoisomerasa IV) y Ser-84 a Leu del gen *gyrA* (ADN-girasa). Asimismo, la resistencia a la tobramicina está mediada por el gen

ant(4')-Ia que codifica una adeniltransferasa; mientras que, la resistencia a la eritromicina se suele producir por una bomba de expulsión activa codificada por los genes *msrA/msrB* (Pérez-Vázquez, 2009; Lozano, 2013b).

En nuestro estudio, llama la atención el descenso de la resistencia a la clindamicina del tipo MLS_B constitutiva pasando de un 67% en 2002-2004 a un 23% de resistencia en 2008. Curiosamente, esta misma tendencia, si bien no tan marcada, también se ha constatado en un hospital de Logroño. Así, en dicho hospital el 28% de los aislados de este clon tenían resistencia MLS_B constitutiva en 2001, frente al 16% en 2009 (Lozano, 2013b).

El clon ST228-I (clon B) fue el más resistente entre los tres clones mayoritarios del HUSD. Todos los aislados de 2008 fueron resistentes al ciprofloxacino, tobramicina, eritromicina, clindamicina y gentamicina. Los genes de resistencia asociados a este fenotipo de resistencia descritos en este clon son: *ermA* (resistencia a la eritromicina y clindamicina), *msrA/msrB* (resistencia a la eritromicina), *aac(6')-Ie+aph(2'')-Ia* (resistencia a la gentamicina y tobramicina) y *ant(4')-Ia* (resistencia a la tobramicina) (Lozano, 2013b). Uno de nuestros aislados del St228-I fue también resistente a la rifampicina, como también se ha descrito en aislados de este clon del Hospital de Bellvitge que, en su caso, fue debida a la mutación 481His/Asn del gen *rpoB* (Mick, 2010).

El clon ST22-IVc (EMRSA-15, clon C) fue el más sensible de los tres. Llama la atención, a diferencia de los otros dos clones, la alta frecuencia de resistencia MLS_B inducible que presenta este clon (entre el 28% y el 47% en los tres períodos). Esta resistencia inducible se ha encontrado también en muchas cepas internacionales del EMRSA-15 y está determinada por el gen *ermC* (Melter, 2004; Holden, 2013).

6.2 Epidemiología de SARM en las residencias geriátricas

Prevalencia y factores de riesgo de SARM en los centros geriátricos

Durante el periodo inicial (octubre-noviembre 2005), entre los 465 residentes participantes en el estudio, el 8,0% de ellos fueron portadores nasales de SARM. La tasa de colonización por SARM aumentó ligeramente al 8,1% al incluir las cepas aisladas en los exudados de úlcera/herida. Este porcentaje de colonización nasal,

aunque importante, es relativamente bajo al compararlo con otros estudios similares. Así por ejemplo, en el estudio multicéntrico del que forma parte este trabajo, que incluía además varios centros geriátricos de Barcelona (5 residencias) y Sabadell (3 residencias), la tasa de colonización por SARM fue del 16,8% en los 1.377 residentes participantes, oscilando entre 6,7% y 35,8% ([Manzur, 2008b](#)). En otro trabajo parecido, realizado en nueve residencias geriátricas de Terrassa (Barcelona), en 483 residentes, la colonización nasal por SARM fue del 10,5% ([Espejo, 2006](#)). Por último, la prevalencia de portadores nasales de SARM en 17 centros de larga estancia de la provincia de Sevilla durante 2009-2010 fue del 10,6% ([García-García, 2011](#)).

Existen algunas razones que pueden explicar la menor tasa de prevalencia nasal del SARM observada en nuestro estudio. Una de ellas es que no utilizamos para los cultivos de portadores caldos de enriquecimiento (como el caldo BHI salado) ni medios de agar cromogénicos para SARM, a diferencia de los centros de Barcelona y Sabadell. Se ha descrito que estos caldos de enriquecimiento aumentan la recuperación de cepas de SARM en aproximadamente un 14% ([van Loo, 2007](#); [Lauderdale, 2010](#)). No obstante, otra de las posibles razones es que la Residencia Bonanova es un centro de gran tamaño, que disponía, en ese momento, de un servicio médico permanente mañana y tarde. El personal sanitario de dicha institución podría tener una mayor experiencia que en las residencias pequeñas. De hecho, en el estudio al que nos hemos referido, el tamaño de la residencia se asociaba inversamente con la probabilidad de estar colonizado con SARM (“factor de protección”). Las diferencias de las tasas de colonización dependen también de la prevalencia de SARM en el hospital de referencia de cada centro geriátrico ([Manzur, 2008b](#)).

Asimismo, la prevalencia de SARM que encontramos en los residentes geriátricos de La Bonanova no fue muy diferente a la de otros países europeos como Italia (13,2%; [March, 2014](#)), Alemania (7,6%; [Pfungsten-Würzburg, 2011](#)), Gran Bretaña (4,7%; [Cox, 1999](#)), o Israel (6,2%; [Mendelson, 2003](#)). Por el contrario, en Estados Unidos el porcentaje de portadores de SARM en las residencias geriátricas suele ser más alto, con una tasa de colonización nasal del 10-58% ([Mulhausen, 1996](#); [Stone, 2012](#)).

Una limitación de la mayoría de los estudios de colonización de SARM publicados es que únicamente se recogieron muestras de exudados nasales y, en algunos casos adicionales, de exudados cutáneos. Varios trabajos han detectado que el uso exclusivo de escobillones nasales para el aislamiento de SARM tiene una sensibilidad del 77-84%, comparada con la obtención de muestras para cultivo de

múltiples localizaciones anatómicas (Sewell, 1993; Girou, 1998; Lauderdale, 2010) por lo que, en caso de existir una colonización en otros lugares, no se hubiera detectado y se perderían portadores de SARM. Se ha sugerido que sería necesario obtener tres muestras para la detección de todos los pacientes geriátricos colonizados por SARM: un exudado nasal, un exudado faríngeo y otro en el caso de haber una herida o úlcera cutánea (O'Sullivan, 2000b). Otro estudio realizado en un hospital de agudos norteamericano recomendó, para la búsqueda de SARM, la recogida de dos muestras, un exudado nasal y otro inguinal (Mermel, 2011).

En nuestro trabajo, los factores de riesgo estadísticamente significativos para ser portador de SARM entre los residentes geriátricos fueron el tratamiento antibiótico previo en el último mes ($p=0,0003$), el tener como enfermedad de base una EPOC ($p=0,003$), una enfermedad vascular ($p=0,009$), o una neoplasia de órgano sólido ($p=0,03$) y, por último, el haber ingresado previamente en un hospital en los últimos 5 años ($p=0,03$). En la literatura, cinco han sido los factores que han mostrado un incremento en el riesgo de colonización por SARM ante un paciente que entra en contacto con este microorganismo: la hospitalización previa, el uso reciente de un antibiótico de amplio espectro, el estado funcional disminuido, el uso de algún dispositivo médico (tales como una sonda urinaria, una sonda nasogástrica o un catéter endovenoso) y las enfermedades crónicas que producen heridas o rupturas de la piel (McNeil, 2002). Curiosamente, en nuestro trabajo se han detectado los tres primeros factores de riesgo de colonización.

En el estudio multicéntrico, del cual forma parte este trabajo, los factores de riesgo para la colonización por SARM fueron: la edad igual o superior a 85 años, la existencia de úlceras de decúbito, el tratamiento antibiótico previo, la presencia de dispositivos invasivos, la comorbilidad, la hospitalización previa y las residencias geriátricas con menos de 150 camas (Manzur, 2008b). Respecto al estudio multicéntrico de centros de larga estancia sevillanos, los factores de riesgo fueron muy similares: la toma reciente de antibióticos, el ingreso hospitalario en los últimos 3 meses, la elevada comorbilidad, medida por el índice de Charlson y el ser portador de SARM previo conocido (García-García, 2011).

Llama la atención la fuerte asociación que se ha encontrado en nuestro estudio entre la presencia de EPOC y el estar colonizado por SARM. En la gran mayoría de trabajos publicados acerca de los factores de riesgo de colonización por esta bacteria no se suele evaluar de forma independiente esta variable de comorbilidad. No obstante, existen unos pocos trabajos que sí lo tienen en cuenta. Uno de ellos,

realizado en un centro de larga estancia italiano, encontró que el tener EPOC era un factor de riesgo independiente para la colonización por SARM (con una *odds ratio* de 11,7 y una $p=0,039$) (March, 2010). Otro trabajo, realizado en un centro de crónicos y larga estancia de Valencia, mostró que los pacientes con antecedente de diabetes (con una *odds ratio* de 1,9) y EPOC (con una *odds ratio* de 3,0) presentaron una prevalencia de colonización por SARM superior que los pacientes sin estos factores de riesgo (Salvatierra, 2014). Por último, un trabajo realizado en pacientes en hemodiálisis de Turquía reveló que la presencia de EPOC (con una *odds ratio* de 5,2 y una $p=0,006$) junto con el antecedente de hospitalización en el último año fueron los únicos factores independientes para la colonización por SARM (Köseoğlu, 2012).

Una posible explicación de la relación entre la EPOC y la colonización por SARM es que el tratamiento antibiótico, aunque controvertido, es frecuentemente prescrito en los episodios de exacerbación de los pacientes con EPOC, lo que pudiera condicionar la selección de microorganismos multirresistentes (Wilson, 2013). También se ha especulado que el tratamiento con quinolonas como el ciprofloxacino, un grupo de antibióticos muy utilizado en esta situación clínica, provocaría un aumento de la producción de adhesinas en *S. aureus*, especialmente de las proteínas de unión a la fibronectina, con lo que se facilitarían la adherencia de esta bacteria a la mucosa nasal (Bisognano, 2004).

Epidemiología molecular del SARM en las residencias geriátricas

De los 38 residentes con SARM, 26 (68,5%) estaban colonizados por una cepa perteneciente al clon ST22-IVh (EMRSA-15). Aunque el ERMSA-15 se ha convertido en el clon más frecuente en los residentes de nuestro estudio durante el periodo estudiado, su incorporación y asentamiento epidemiológico es relativamente reciente. Así, en el estudio retrospectivo realizado por nuestro grupo sobre aislamientos de SARM en úlceras cutáneas entre enero 2000 y junio 2002 en los residentes geriátricos de la Residencia Bonanova, el clon más frecuente durante dicho período fue el clon A (ST125-IVc), en el 47%, seguido del clon C2 (ST22-IVh) en el 30%. No se encontró en ese momento ningún otro subtipo del clon C diferente al C2 (Ruiz de Gopegui, 2004). En el estudio presente (octubre-noviembre 2005), se ha detectado una mayor prevalencia de este clon con cinco subtipos diferentes mediante ECP.

El origen de este clon en la Residencia Bonanova, muy probablemente, procedería del HUSD. Algún residente geriátrico, allá por el año 2000, ingresaría en el

HUSD y se colonizaría en las fosas nasales o en una úlcera, como de hecho se constató en el primer estudio realizado, en el que se detectaron 5 residentes colonizados en úlcera con el clon C2, de los cuales uno había ingresado previamente en el HUSD (Ruiz de Gopegui, 2004). Posteriormente, este residente volvería a la residencia y sería el foco de contagio para otros residentes. El hecho de haber cinco subtipos puede ser debido a adquisiciones de diferentes cepas de SARM por varios ingresos de otros residentes en el HUSD o en otros hospitales, o bien, por una diversificación del clon C2 original, debido a cambios genéticos (mutaciones puntuales, inserciones o deleciones) (Tenover, 1995).

El clon EMRSA-15 se ha detectado también, con una alta frecuencia, en diferentes centros geriátricos del Reino Unido (Fraise, 1997; Cox, 1999; Smith, 2008b; Horner, 2013), de Alemania (Woltering, 2008; Pfingsten-Würzburg, 2011) y curiosamente, también en tres centros de larga estancia de Chicago, EE.UU. (Das, 2013).

El otro clon encontrado en la residencia fue el ST125-IVc, en el 32% de los residentes. Este clon era, globalmente, el más frecuente en cinco hospitales de Mallorca durante 2003-2004 (Alcoceba, 2007) así como el clon más frecuente en España desde 1998 (Vindel, 2006; Cuevas, 2007; Pérez-Vázquez, 2009; Vindel 2009; Gasch, 2013). El origen del clon ST125-IVc en la residencia, de forma similar al clon ST22-IVh, procedería del HUSD.

A modo de resumen, los dos clones de SARM detectados en la Residencia Bonanova en 2005-2007 son también los dos clones más frecuentes del HUSD en 2008. En los escasos trabajos que analizan la epidemiología molecular en centros de larga estancia, los clones de SARM de los residentes geriátricos son los mismos que los hospitales de la zona, tanto en el Reino Unido (Fraise, 1997; Cox, 1999; Smith, 2008b; Horner, 2013), como en Francia (Eveillard, 2008), Alemania (von Baum, 2002; Woltering, 2008; Pfingsten-Würzburg, 2011), Finlandia (Kerttula, 2005) y EE.UU. (Mody, 2008; Stone, 2012). En el estudio multicéntrico del cual forma parte este trabajo (Manzur, 2010), el 88% de los aislados de SARM detectados en los cinco centros geriátricos dependientes del Hospital de Bellvitge pertenecían al clon ST146-IV, uno de los clones de SARM dominantes en dicho hospital (Gasch, 2011).

La sensibilidad antibiótica obtenida en las cepas de SARM procedentes de los residentes geriátricos es una muestra más de la oligoclonalidad y la interrelación con el medio hospitalario, el origen último de los SARM. En conjunto, en nuestro estudio no se apreció una asociación con la multirresistencia lo que, sin duda, se debe en primera

instancia al predominio relativo de dos clones poco resistentes, probablemente facilitado por una presión antibiótica moderada en el contexto de cuidados de salud adecuados en la población a estudio.

La tobramicina fue un buen marcador para diferenciar las cepas del clon A (ST125-IVc, resistentes) de las del clon C (ST22-IVh, sensibles). Hubo un paciente en el que se le aisló una cepa del clon A (ST125-IVc) con resistencia a la mupirocina y a la gentamicina. Desconocemos si había recibido tratamiento descolonizante con mupirocina aunque, según el formulario relleno, no tenía antecedentes de SARM previo. Se ha descrito diversos plásmidos del clon ST125-MRSA-IVc que producen resistencia de alto nivel a la mupirocina y a la gentamicina ([Daskalaki, 2009](#); [Pérez-Roth, 2013](#)).

Riesgo de infección en los pacientes colonizados

Del grupo de los 38 residentes inicialmente colonizados por SARM, tres de ellos (dos portadores nasales de SARM y el tercero únicamente colonizado en la herida) desarrollaron una infección de herida por este microorganismo durante los primeros 8 meses. No se detectó ninguna infección por SARM entre los 8 y 18 meses. De los 36 residentes del grupo control, solamente uno desarrolló una infección de herida (úlceras de pie diabético) a los 13 meses. Es decir, la incidencia de infecciones por SARM en estos 18 meses ha sido baja, siendo todas las infecciones detectadas de herida/úlceras. Salvando la limitación del bajo número de casos de infección, ésta ha sido más frecuente en el grupo de residentes portadores (n=3) que en el grupo control no colonizado al inicio (n=1), lo que es coherente con el hecho de que la colonización previa asintomática por SARM es un factor de riesgo de infección ([Muder, 1991](#); [Stone, 2012](#)). Así, nuestros datos muestran que los residentes geriátricos, mientras estén residiendo en el centro geriátrico, no tienen un riesgo importante de desarrollar una infección grave por SARM.

Los estudios publicados indican que, si bien la colonización por SARM es relativamente frecuente en los residentes geriátricos, la tasa de infección es baja, tratándose en su mayoría de infecciones de herida/úlceras que no requieren ingreso hospitalario ([Bradley, 1999](#)). Así por ejemplo, en seis estudios recogidos en residencias geriátricas de EE.UU. con más de 1.000 camas en total y durante un período de tiempo superior a 10 años, solamente se documentaron 100 infecciones por SARM (más de la mitad de piel y tejidos blandos) y 5 muertes relacionadas

(Bradley, 1999; McNeil, 2002). En otro trabajo más reciente, únicamente el 1,2% de los residentes portadores nasales de SARM de tres residencias de veteranos de EE.UU. desarrollaron una infección por esta bacteria multirresistente a los 6 meses, mientras que, no se detectó ninguna infección por SARM en los residentes no portadores de SARM (Stone, 2012). Esta situación contrasta con lo que ocurre en los hospitales de agudos, en donde se calcula que un 20-30% de los pacientes ingresados colonizados desarrollarán una infección nosocomial por SARM (Huang, 2003; Davis, 2004).

En el estudio multicéntrico en el que participamos, con los datos globales de los nueve centros geriátricos de Barcelona y Sabadell, además del nuestro, 10 de 178 residentes inicialmente colonizados por SARM (4,6%) y 4 de 196 residentes no portadores (2,1%) desarrollaron una infección por SARM a lo largo de los 18 meses del estudio. De estos 14 episodios infecciosos, diez fueron infecciones de piel y partes blandas, dos infecciones respiratorias, una infección del tracto urinario y una otitis externa. Cuatro de estos 14 infectados murieron durante el período del estudio, pero esta mortalidad no fue atribuible a la infección por el SARM (Manzur, 2012).

En residentes que ya están colonizados por SARM, la comorbilidad es un predictor más importante de la infección por SARM que la edad *per se* (McNeil, 2002), especialmente la diabetes mellitus o enfermedad vascular periférica (Terpenning, 1994). En nuestro trabajo, de los tres residentes previamente colonizados que desarrollaron una infección, dos de ellos tenían EPOC (con un consumo frecuente de antibióticos) y el tercero una demencia avanzada. El residente del grupo control con una infección de herida a los 13 meses tenía diabetes y enfermedad vascular.

Dinámica poblacional de la colonización por SARM

Los clones de SARM que adquirieron los residentes del grupo control de nuestro trabajo durante el estudio longitudinal de 18 meses fueron los mismos que ya se detectaron en octubre de 2005 durante el estudio basal (ST22-IVh y ST125-IVc). Ello indica que, si bien el origen último de estos dos clones de SARM radicaba en el hospital de referencia, una vez introducidos en la residencia y adaptados a ese ambiente, la transmisión era básicamente intrainstitucional.

Diversos trabajos muestran conclusiones similares. Un estudio francés estimó que el 69% de los residentes geriátricos adquirieron su SARM durante la estancia en el centro (Talon, 2001). En un estudio irlandés, 34 de 689 residentes inicialmente no colonizados por SARM, se convirtieron en portadores de SARM a los 6 meses; de los

cuales 26 (76,5%) no ingresaron en ningún hospital, con lo que la transmisión había tenido lugar en la misma residencia geriátrica (O'Sullivan, 2000b). En un estudio similar de EE.UU., 25 de 254 (10%) residentes no colonizados inicialmente por SARM se colonizaron a los 5 meses, 13 de los cuales compartían habitación con un residente colonizado (Stone, 2012). En otro estudio norteamericano, el 62% de los residentes adquirieron el SARM en el mismo centro (Fisch, 2012).

La transmisión habitualmente se produce por contacto directo entre residentes, aunque también se han descrito brotes originados por la colonización de SARM en las manos de algún cuidador sanitario (McNeil, 2002). La contaminación del ambiente (como la habitación del paciente) probablemente juega un papel muy escaso en la diseminación de SARM en las residencias geriátricas. Sin embargo, un estudio norteamericano mostró que el 16% (78/500) de los objetos recogidos en diez residencias fueron positivos para SARM (Murphy, 2012a). No obstante, la medida más importante en controlar la diseminación de SARM es el lavado de manos, especialmente de los trabajadores sanitarios que están en contacto con los residentes colonizados (McNeil, 2002).

En nuestro estudio parece observarse una tendencia al aumento en la prevalencia de portadores de SARM en la residencia en el último control aunque, para confirmarlo, se tendría que recoger un exudado nasal a la mayoría de los 552 residentes que habitan en el centro (como hicimos en el estudio inicial). De cualquier forma, estos datos alertan sobre un riesgo potencial, de ahí la conveniencia de continuar con la vigilancia y con el mantenimiento de los elevados estándares en los cuidados geriátricos.

En cuanto a la duración de la colonización nasal por SARM, es variable entre los diferentes estudios (McNeil, 2002). Uno de ellos, realizado en un centro de veteranos estadounidense, estimó que los pacientes ancianos, una vez colonizados, son portadores de la misma cepa de SARM de 3 meses a 3 años (Bradley, 1991). En una reciente revisión, la mediana del aclaramiento de la colonización por SARM fue de 88 semanas (Shenoy, 2014).

En la literatura se han descrito clásicamente tres patrones distintos de colonización nasal por *S. aureus*: portadores persistentes (20%), intermitentes (30%) y no portadores (50%). Se sabe que los portadores persistentes tienen una mayor carga bacteriana, están colonizados en múltiples localizaciones anatómicas y pueden jugar un mayor papel en la transmisión que los portadores intermitentes (Wertheim, 2005). En nuestro estudio, siguiendo los criterios más estrictos de persistencia del CDC

(crecimiento de SARM en todos los cultivos nasales recogidos; [Stone, 2012](#)), el 30% de los residentes colonizados por SARM fueron portadores nasales persistentes y el 70% restante portadores intermitentes. El número limitado de escobillones recogidos (un máximo de cuatro exudados nasales en 18 meses) junto con una carga bacteriana baja que podrían presentar algunos residentes podrían haber producido resultados falsamente negativos con errores en la clasificación del estado de colonización nasal. Es posible que si hubiéramos utilizado un caldo de enriquecimiento (como el BHI salado), la proporción de portadores persistentes podría haber aumentado.

La clasificación para la persistencia de SARM y el diseño de los estudios es muy variable en los diferentes trabajos, con lo que es difícil la comparación entre sí. Un trabajo realizado en 65 centros de larga estancia de Leeds, Reino Unido, recogió un exudado nasal anual durante cuatro años (2006-2009) a 2.492 residentes. De ellos, un 36% fueron positivos para SARM en una sola muestra, un 21% en dos muestras, un 14% en tres y sólo un 3% fueron positivas en las cuatro muestras recogidas en dicho período. Los autores concluían que existía una amplia tasa de portadores transitorios de SARM entre los residentes ([Horner, 2013](#)). En un estudio realizado en un centro de veteranos de Pennsylvania, EE.UU., en los que se les recogió un exudado nasal mensual o bimensual durante 3 años, el 24,8% (32/129) de los portadores nasales de SARM fueron persistentes ([Muder, 1991](#)). En otro trabajo similar en tres residencias de veteranos norteamericanas de Georgia y Alabama a los que se les recogió un frotis nasal mensual durante seis meses, este porcentaje de persistencia nasal alcanzó el 34% (83/242) ([Stone, 2012](#)).

La adquisición de otra cepa distinta de SARM en portadores nasales ocurre con una baja frecuencia, si bien se ha constatado en algunos estudios ([Bradley, 1991](#); [Mody, 2006](#); [Horner, 2013](#)). En el estudio de Horner *et al*, de los 166 residentes con más de un cultivo positivo para SARM, un 46% tenían pulsotipos de ECP idénticos, un 43% tenían pulsotipos diferentes pero relacionados y un 11% tenían cepas diferentes ([Horner, 2013](#)). Otro trabajo mostró que en 4% de los residentes de un centro de veteranos de EE.UU. estaban colonizados en sus fosas nasales por dos tipos distintos de cepas de SARM ([Stone, 2008](#)).

Parece ser que la cepa de *S. aureus* inicial que está colonizando las fosas nasales impediría la adquisición de nuevas cepas por interferencia en el nicho ecológico. Además, en los pocos casos en los que sí se ha producido un cambio de clon, la nueva cepa suele estar colonizando de forma transitoria, coexistiendo con la cepa de SARM inicial ([Mody, 2006](#)). Esto es lo que ha pasado con las cepas de SARM

aisladas en la Residencia Bonanova. La mayoría de los residentes colonizados por SARM continuaban bien siendo portadores de la misma cepa de SARM, o bien, desaparecía esta colonización. Sólo cuatro residentes, inicialmente colonizados por el clon ST22-IVh, adquirieron una nueva cepa del clon ST125-IVc.

Se podría especular que este clon A2 (ST125-IVc) pudiera tener una mayor producción de alguna adhesina o algún otro factor de virulencia que facilitaría la adherencia a la mucosa nasal, inhibiendo a otras cepas de *S. aureus* que estaban colonizando previamente. En dos trabajos españoles, todos los aislados estudiados del clon ST125-IV poseían los genes de las adhesinas *fnbA* (*fibrinogen-binding protein A*), *fnbB* (*fibrinogen-binding protein B*), *clfA* (*clumping factor A*), *clfB* (*clumping factor B*) e *icaA* (*intracellular adhesin A*) (Gómez, 2009; Menegotto, 2012a). Respecto a los aislados del clon ST22-IV, si bien poseen también el gen *icaA* (Moore, 2002), presentan una delección de 2.268 pb en la proteína de unión a la fibronectina (FnBP), debido a una recombinación homóloga de la región C-terminal de *fnbA* y la región N-terminal de *fnbB*. Las consecuencias de esta delección son desconocidas (Holden, 2013).

6.3 Resistencia a la linezolida en estafilococos

Emergencia de la resistencia a la linezolida

La linezolida fue la primera oxazolidinona aprobada para el tratamiento de la neumonía y de las infecciones de piel y partes blandas por *S. aureus* (Shaw, 2011). Se aprobó en EE.UU. en abril del año 2000 (Barrett, 2000), en el Reino Unido en 2001 (Bouza, 2001), mientras que, en el resto de países de la Unión Europea su aprobación ocurrió en 2002 (Carmona, 2003).

Antes de su comercialización, nunca se encontraron aislados de cocos grampositivos resistentes a la linezolida en pacientes no tratados con este antimicrobiano y, además, la resistencia por mutación espontánea era difícil de seleccionar *in vitro* (Zurenko, 1996). No obstante, la resistencia a este compuesto ya se observó por primera vez en cepas de *Enterococcus faecium* aisladas de dos pacientes que habían recibido tratamiento con linezolida para uso compasivo, antes de su comercialización (Zurenko, 1999).

Respecto a los estafilococos, en el año 2001 se describió el primer caso de una cepa de SARM resistente a la linezolida. Se aisló en un líquido peritoneal de un paciente sometido a diálisis peritoneal en la ciudad de Boston, EE.UU, que había sido tratado previamente con linezolida durante 4 semanas. Todos los aislados resistentes a la linezolida detectados en este paciente tenían la mutación G2576T en el gen ARNr 23S (Tsiodras, 2001). El primer ECN resistente a la linezolida se trataba de una cepa de *S. epidermidis* detectada en EE.UU. en 2002, con la misma mutación (Mutnick, 2003).

Con todo, la resistencia a la linezolida en grampositivos continúa siendo infrecuente. Según los datos del Programa ZAAPS (Zyvox® Annual Appraisal of Potency and Spectrum), más del 99,9% de las cepas de *S. aureus* y el 99,1% de los ECN en Europa fueron sensibles a la linezolida en 2012 (Mendes, 2014).

En cuanto a España, la resistencia de los estafilococos a la linezolida es rara, siendo más alta en los aislados de los pacientes ingresados en la UCI. Así, el estudio ENVIN-HELICS (Estudio Nacional de Vigilancia de Infección Nosocomial en Servicios de Medicina Intensiva) mostró un incremento en la tasa de resistencia a la linezolida en cepas de *S. epidermidis*, aisladas de bacteriemias primarias y asociadas a catéter, pasando de un 4% en 2007 a un 24% en 2010, estabilizándose en los años sucesivos

en torno al 18% ([ENVIN-HELICS](#)). Esta mayor prevalencia de cepas de ECN resistentes a la linezolidina en pacientes de la UCI estaría relacionada a un mayor consumo de linezolidina y a una mayor duración del tratamiento con este antimicrobiano. Se han comunicado brotes de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* y *S. hominis* resistentes a la linezolidina en pacientes ingresados en UCI en Madrid en 2005-2009 ([Rodríguez-Aranda, 2009](#); [Morales, 2010](#); [Sánchez García, 2010](#); [Baos, 2013](#); [Quiles-Melero, 2013](#)), en Santiago de Compostela durante 2006-2007 ([Treviño, 2009](#)), en Granada en 2007-2008 ([Sorlozano, 2010](#)) y en Zaragoza durante 2008-2011 ([Seral, 2011](#); [Lozano, 2013a](#)).

Resistencia a la linezolidina en *S. hominis*

El primer aislado de estafilococo resistente a la linezolidina detectado en Mallorca ocurrió en marzo de 2008. Se trataba de una cepa de *S. hominis* subsp. *hominis* procedente de una paciente ingresada en la UCI del HSSL, que inició tratamiento con linezolidina 16 días antes del aislamiento de la cepa resistente. El segundo aislado del HSSL se observó en mayo 2008, en otra paciente de la misma UCI tratada con linezolidina. Sin embargo, en agosto del 2008, a pesar de las medidas de control implantadas (aislamiento de los pacientes infectados y administración de un tratamiento antibiótico efectivo), se estableció en la UCI del HSSL una situación endémica, que persiste actualmente. Además, en enero de 2009, se detectó en el HSSL el primer paciente infectado por *S. hominis* resistente a la linezolidina que estaba ingresado fuera de la UCI. Respecto al HUSD, los primeros aislados de estafilococos resistentes a la linezolidina detectados fueron también dos cepas de *S. hominis* de dos pacientes ingresados en UCI en noviembre del 2008.

En este trabajo, se estudiaron los primeros catorce aislados resistentes a la linezolidina de *S. hominis* detectados en los dos hospitales. En la mayoría de los pacientes, este microorganismo se aisló solamente en un vial de hemocultivo de un total de cuatro, por lo que podría considerarse como un contaminante de los hemocultivos. De modo similar, en otros brotes publicados, los estafilococos resistentes a la linezolidina frecuentemente se aislaron en un solo frasco de hemocultivo ([Potoski, 2006](#); [Mulanovich, 2010](#); [Sorlozano, 2010](#)). Sin embargo, en algunos casos detectamos *S. hominis* resistente a la linezolidina en líquidos corporales, aspirados bronquiales, o simultáneamente en catéter y hemocultivos. Una paciente falleció a causa de una posible endocarditis asociada al cable de marcapasos. Por lo tanto, no se trata de un problema banal, sino que justifica una vigilancia activa continua.

Llama poderosamente la atención la asociación, en nuestro caso, de la resistencia a la linezolidina con la especie *S. hominis*. La explicación para esta asociación no es conocida. *Staphylococcus hominis* es, tras *S. epidermidis*, la segunda especie de estafilococos más frecuentemente detectada en la mayoría de los hospitales, como muestran dos estudios multicéntricos españoles (Cuevas, 2008; Picazo, 2010). Esta especie de estafilococo es un comensal residente de la piel humana con baja virulencia (Queck, 2008; Zhang, 2013). No obstante, en ocasiones se ha implicado a *S. hominis* en infecciones de marcapasos (Sunbul, 2006), en bacteriemias (Ruhe, 2004) y en sepsis de neonatos (Chaves, 2005).

También hay que señalar que algunos de los pacientes infectados tuvieron, además, una colonización axilar e inguinal por la misma cepa resistente, pero no colonización nasal. Ello está en concordancia con el trabajo de Kloos, en el que se encontró un predominio de cepas de *S. hominis* en axilas, brazos y piernas, mientras que su aislamiento en las fosas nasales era infrecuente (Kloos, 1975).

En cuanto al mecanismo de resistencia, encontramos la mutación G2576T en el gen ARNr 23S en las cinco cepas de *S. hominis* resistentes a la linezolidina secuenciadas. La aparición de la resistencia a la linezolidina mediante este mecanismo se desarrolla por un proceso en dos pasos. Inicialmente tiene lugar una mutación en la posición T2576 de una de las copias del gen ARNr 23S (los estafilococos poseen cinco o seis copias de este gen) (Klappenbach, 2001). A continuación, se produce una recombinación intracromosómica (conversión de genes), con lo que esta mutación se distribuye al resto de las copias confiriendo la resistencia a la linezolidina (Woodford, 2009). Varios estudios han mostrado que a medida que aumenta el número de alelos del gen ARNr 23S con la mutación G2576T, se incrementa proporcionalmente los valores de la CMI para la linezolidina (Zhu, 2007). Asimismo, existe una correlación entre el número de copias con la mutación G2576T y la duración del tratamiento con este antimicrobiano (Wilson, 2003).

Los mecanismos de resistencia a la linezolidina en *S. hominis* se caracterizaron por primera vez en los aislados del brote de Granada (Sorlozano, 2010). Ese trabajo describió la presencia de dos «nuevas mutaciones» simultáneamente en aislados de *S. hominis* resistentes a la linezolidina: C2190T y G2603T. Sin embargo, no se usó la numeración de *E. coli* para nombrar las mutaciones, sino la de la cepa de *S. aureus* X68425 (disponible en: www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/X68425). De hecho, la mutación G2603T descrita en dicho artículo corresponde realmente a la clásica G2576T, como encontramos en nuestro estudio. Además, en el estudio de Granada no secuenciaron

aislados de *S. hominis* sensibles a la linezolidina, con lo que la mutación C2190T que encontraron en los aislados resistentes (C2163T con la numeración de *E. coli*) es de hecho un polimorfismo de la especie *S. hominis*, también presente uniformemente en los aislados sensibles a la linezolidina de esta especie.

La mutación G2576T en aislados de *S. hominis* resistentes a la linezolidina también se ha descrito en pacientes ingresados durante 2008-2009 en la UCI de dos hospitales de Sicilia ([Bongiorno, 2010](#)), en pacientes ingresados en 2005-2009 en la UCI del Hospital La Paz de Madrid ([Quiles-Melero, 2013](#)), en pacientes ingresados en 2009 en la UCI de un hospital de Vicenza, norte de Italia ([Mazzariol, 2012](#)) y en pacientes ingresados en 2010-2011 en la UCI de un hospital de Sao-Paulo, Brasil ([de Almeida, 2013](#)).

Ninguno de nuestros aislados de *S. hominis* resistentes a la linezolidina poseía el gen *cfr*. Ello es coherente con la sensibilidad al cloranfenicol que presentaban todas las cepas, que además, en su gran mayoría, manifestaban una sensibilidad intermedia a la clindamicina; mientras que, en caso de poseer el gen *cfr*, hubieran sido resistentes a estos dos antibióticos ([Long, 2006](#)). Con todo, se han descrito aislados de estafilococos que poseían ambos mecanismos de resistencia ([Baos, 2013](#); [Chen, 2013](#); [Quiles-Melero, 2013](#)).

Dos aspectos adicionales no quedan claros en nuestro brote. Uno de ellos es la diseminación de la cepa desde la UCI del HSLI a la UCI del HUSD. En 2008, no se produjo ninguna transferencia de pacientes entre las UCI de ambos hospitales y tampoco hubo ningún traslado de instrumental entre ellas. No obstante, dos enfermeras estaban trabajando en las dos UCI durante el mismo período. Sin embargo, lamentablemente no se pudo realizar un estudio de colonización del personal sanitario, por lo que nos movemos en el terreno de la hipótesis.

De modo similar, se desconocen los factores responsables de la persistencia de la cepa en la UCI del HSLI, produciendo 1-2 infecciones cada mes. La cepa podría transmitirse de paciente a paciente a través de las manos del personal sanitario colonizado ([Milisavljevic, 2005](#); [Squeri, 2012](#)), o bien, podría haber un reservorio en el ambiente de la UCI ([Squeri, 2012](#)). En un brote irlandés de *S. epidermidis* resistente a la linezolidina, los autores encontraron la misma cepa resistente en los alrededores de los pacientes colonizados y en un ordenador usado por el personal de la UCI ([Kelly, 2008](#)). Asimismo, en el brote de SARM portador del gen *cfr* de un hospital de Madrid, se detectó la cepa de SARM resistente a la linezolidina en un conector de catéteres intravenosos ([Sánchez García, 2010](#)).

Una larga duración del tratamiento con linezolid, una dosificación insuficiente y la administración repetida de linezolid son factores de riesgo para desarrollar resistencia a este antimicrobiano (Yoshida, 2009). Con todo, la resistencia a la linezolid también se ha observado en diversas ocasiones en pacientes sin exposición a este antimicrobiano (Potoski, 2006; Kelly, 2008; Rodríguez-Aranda, 2009; Treviño, 2009; Sorlozano, 2010; Seral, 2011; Lozano, 2013a). En nuestra serie, si bien la mayoría de los pacientes infectados (12 de 15 episodios infecciosos, el 80,0%) habían recibido ciclos de linezolid antes de la detección del aislado resistente, hubo 3 pacientes (20,0%) a los que no se les administró este compuesto, lo que indica que la transmisión cruzada entre pacientes es también un factor epidemiológico real.

Respecto a la resistencia a los glucopéptidos, todos los aislados de *S. hominis* resistentes a la linezolid fueron también resistentes a la teicoplanina y tuvieron por E-test® una CMI a la vancomicina de 4,0 µg/mL. Este valor de la CMI (4,0 µg/mL) es el límite superior del rango de sensibilidad a la vancomicina según el CLSI y el EUCAST para los ECN (CLSI, 2009; CLSI, 2012; EUCAST, 2012). Sin embargo, utilizando los puntos de corte del EUCAST en 2010 (que no hacía distinción entre *S. aureus* y ECN), estas cepas de *S. hominis* serían también resistentes a la vancomicina (EUCAST, 2010). Este perfil de resistencia a la teicoplanina está también presente en aislados resistentes a la linezolid de *S. epidermidis* (Potoski, 2006; Bongiorno, 2010), *S. haemolyticus* (Rodríguez-Aranda, 2009) y *S. hominis* (Sorlozano, 2009; Bongiorno, 2010), todos ellos con la mutación G2576T. La relación entre la mutación G2576T en el gen ARNr 23S y la resistencia a la teicoplanina es desconocida. Es sabido que la resistencia a los glucopéptidos en *Staphylococcus* spp. es multifactorial, siendo el engrosamiento de la pared celular una característica común (Cui, 2005), un mecanismo de difícil relación con el responsable de la resistencia a la linezolid.

En resumen, la incidencia creciente de infecciones causadas por aislados de estafilococos multirresistentes, incluyendo resistencia a la teicoplanina y a la linezolid, es preocupante. Es crucial hacer un uso racional de la linezolid y mantener un control activo de dicha resistencia para preservar la utilidad clínica de este antimicrobiano.

Plásmidos portadores del genes *cfr*

En agosto-septiembre de 2010 se detectaron en el HUSD dos cepas de SARM y una de *S. epidermidis* resistentes a la linezolid portadoras de un plásmido con cuatro genes de resistencia antibiótica: *cfr* (resistencia a la linezolid, cloranfenicol y

clindamicina, entre otros), *tet(L)* (resistencia a la tetraciclina), *ant(4')-Ia* (resistencia a la tobramicina) y *dfrK* (resistencia a la trimetoprima).

La primera de estas dos cepas se detectó a partir de un paciente de 72 años con EPOC, portador de un *Port-a-cath*® permanente, inmunodeprimido (padecía un déficit de inmunoglobulinas debido a una inmunodeficiencia variable común, y además, recibía múltiples ciclos de tratamiento corticoideo por su EPOC). Este paciente había ingresado en múltiples ocasiones en el HUSD (32 ingresos entre 2006-2010), recibiendo en cada ingreso tratamiento antimicrobiano. Todo ello son factores de riesgo para desarrollar infecciones por SARM ([González-Castillo, 2013](#)).

Se ha sugerido que el uso clínico de ciertos antimicrobianos como la linezolida o clindamicina podrían conducir a la selección de cepas con *cfr* ([Shaw, 2011](#)). En concreto, este paciente recibió desde junio 2009 (aislamiento de SARM sensible a la eritromicina y clindamicina) hasta agosto 2009 (aislamiento de *S. hominis* sensible a la eritromicina y resistente a la clindamicina) los siguientes antibióticos: linezolida, cotrimoxazol, ciprofloxacino, imipenem, meropenem, vancomicina, tigeciclina, colistina y tobramicina inhalada. De estos antibióticos, la linezolida, cotrimoxazol, tobramicina o la tigeciclina podrían teóricamente estar relacionados con la formación del plásmido de multiresistencia.

Los dos pacientes con SARM tenían el antecedente de SARM (y de otras bacterias multiresistentes en el caso del primero), por lo que fueron aislados desde el momento de su ingreso en Neumología. Sin embargo, en algún momento debió haber algún tipo de transmisión entre ellos, rompiéndose las medidas de aislamiento. Por el contrario, no se constató ninguna relación epidemiológica entre estos dos pacientes con el otro paciente ingresado en UCI al que se le detectó, un mes más tarde, una cepa de *S. epidermidis* resistente a la linezolida en un catéter. Asimismo, se desconoce si algún personal sanitario pudiera haber compartido trabajo durante dicho período en los dos servicios, si bien, no puede descartarse por completo.

En el estudio de sensibilidad de las tres cepas, llamó la atención dos características. Una de ellas era el perfil de resistencia que presentaban respecto a la eritromicina y clindamicina (sensibles a la eritromicina pero resistentes a la clindamicina). Y la segunda era la existencia de un doble halo de inhibición para la linezolida y el cotrimoxazol, tanto con disco-placa como con E-test®. La aparición de un doble halo de inhibición con un disco o tira de E-test® de linezolida se ha descrito en otros aislados de SARM portadores del gen *cfr*. Ello se debe a la presencia de una subpoblación de células que poseen diferente grado de resistencia a la linezolida

(Arias, 2008b), de modo similar a la resistencia heterogénea a la oxacilina o a la vancomicina (Hiramatsu, 1997a) que presentan algunas cepas de SARM. Para detectar este tipo de resistencia, Arias *et al.* aconsejaban incubar el disco o la tira de E-test® de linezolid en estufa durante 48 h (Arias, 2008b), mientras que el CLSI (CLSI, 2012) y el EUCAST (EUCAST, 2012) recomiendan observar detenidamente el disco de linezolid a contraluz.

La detección del gen *cfr* en cepas clínicas de estafilococos sigue siendo infrecuente, especialmente en *S. aureus* (Ross, 2011; Flamm, 2012; Flamm, 2013a; Jones, 2014; Mendes, 2014). En nuestro país, se han publicado la detección de cepas de *S. aureus* con el gen *cfr* en hospitales de Madrid en 2007-2008 (Morales, 2010; Quiles-Melero, 2013) y en un hospital de Barcelona en 2009 (Sierra, 2013).

El gen *tet(L)* se describió inicialmente en plásmidos de diversas especies de *Bacillus* (Shishido, 1984). En estafilococos, se detectó por primera vez en un plásmido porcino de *Staphylococcus hyicus* (Schwarz, 1992). En *S. aureus*, el gen *tet(L)* es mucho menos frecuente que los genes *tet(K)* y *tet(M)* (Jones, 2006). Así, en un estudio multicéntrico europeo, entre 400 aislados de SARM resistentes a la tetraciclina recogidos entre 1997 y 1999, el gen *tet(M)* estuvo presente en el 76%, el *tet(K)* en el 73%, mientras que el *tet(L)* sólo se detectó en el 1,5% de las cepas de SARM (Schmitz, 2001). Un estudio español, realizado en 52 aislados de SARM resistentes a la tetraciclina recogidos en un hospital de Zaragoza, mostró datos similares, siendo *tet(K)* y *tet(M)* mucho más frecuentes que el *tet(L)* (Lozano, 2012a).

El gen *ant(4)-Ia* (también conocido como *aadD*) codifica una adeniltransferasa descrita por primera vez en *S. aureus* en 1976 (Le Goffic, 1976). Se encuentra frecuentemente en plásmidos pequeños multicopia, como el pUB110, que están integrados en otros plásmidos más grandes conjugativos y en el cromosoma. Esta integración del pUB110 en los plásmidos conjugativos y el cromosoma está mediada por la secuencia de inserción IS257 (Byrne, 1991). La práctica totalidad de las cepas del clon ST125-IVc poseen este gen (Pérez-Vázquez, 2009; Menegotto, 2012a; Lozano, 2013b).

El gen *dfrK* se describió por primera vez en 2005, adyacente a *tet(L)*, en un plásmido de una cepa de SARM porcina del clon ST398 (Schwarz, 2008; Kadlec, 2009a). Este gen se encuentra ampliamente diseminado entre los aislados de SARM del clon ST398, tanto en Alemania (Feßler, 2010) como en España (Lozano, 2012a), pero es excepcional en el resto de los secuenciotipos de SARM.

Se podría especular que los numerosos regímenes antibióticos administrados al paciente 1 (principalmente linezolid y cotrimoxazol) habrían favorecido el desarrollo del plásmido de multirresistencia en un aislado de estafilococo. Probablemente se habría formado primero en un aislado de ECN y, mediante conjugación, este plásmido habría pasado a un aislado de SARM del clon ST125-IVc. Ello concuerda con la detección de dos cepas de ECN (*S. hominis* y *S. epidermidis*) sensibles a la eritromicina y resistentes a la clindamicina, lo que sugiere que podrían ser portadoras del gen *cfr*. En última instancia, la linezolid administrada a este paciente en múltiples ocasiones habría favorecido la selección de esta cepa multirresistente. La **tabla 37** muestra la secuencia temporal de aislamiento de estafilococos que sugiere la verosimilitud de esta hipótesis.

Tabla 37. Cepas de estafilococos detectadas en el paciente 1.

Fecha	Tipo de muestra	Identificación	Observaciones
Junio 2009	Espuito	SARM	Eritromicina S Clindamicina S
Agosto 2009	Hemocultivo y punta catéter	<i>S. hominis</i>	Eritromicina S Clindamicina R (No congelada)
Noviembre 2009	Espuito	SARM	Eritromicina S Clindamicina R (No congelada)
Febrero 2010	Espuito	SARM	Eritromicina S Clindamicina S
Febrero 2010	Punta catéter subclavia	SARM	Eritromicina S Clindamicina S
		<i>S. epidermidis</i>	Eritromicina S Clindamicina R (No congelada)
Julio 2010	Espuito	SARM	Eritromicina S y Clindamicina R (No congelada)
Agosto 2010	Espuito	SARM	Eritromicina S Clindamicina R Linezolid R
Septiembre 2010	Espuito	SARM	Eritromicina S Clindamicina R Linezolid R

Las dos cepas de SARM de nuestro hospital portadoras del gen *cfr* eran del clon ST125-IVc, perteneciente al CC5. Llama la atención el hecho de que la mayoría de los aislados de SARM con el gen *cfr* pertenezcan a este complejo clonal, como el ST5-I de Colombia (Arias, 2008b), el ST5-II de Ohio, EE.UU. (Mendes, 2013), el ST228-I de Madrid y Barcelona (Ruiz de Gopegui, 2012; Sierra, 2013) y el ST125-IV de Madrid (Quiles-Melero, 2013). Asimismo, los primeros aislados de SARM detectados a partir de 1960 (el clon Arcaico y el clon Ibérico) también pertenecían al CC5. Ello sugiere la facilidad de dicho complejo clonal para adquirir ciertos elementos genéticos móviles.

Nuestro trabajo muestra dos cepas de SARM del mismo clon, una de ellas sensible y la otra resistente a la linezolid, detectadas en el mismo paciente tras haber recibido tratamiento con linezolid y otros antimicrobianos. De modo similar, en un paciente ingresado en un hospital madrileño se aisló una cepa de SARM sensible a la linezolid y otra de idéntico clon resistente a este compuesto portadora de *cfr*, separadas por un intervalo de 32 días, tras habersele administrado linezolid seguida de clindamicina (Pérez-Jorge, 2012).

En cuanto a la conjugación, inicialmente se publicó que el plásmido pSCFS3, portador del gen *cfr*, no era conjugativo (Kehrenberg, 2009). Sin embargo, unos meses más tarde, Shore y colaboradores consiguieron la conjugación del plásmido pSCFS7, también con el gen *cfr* (Shore, 2010a). Nosotros, para realizar el experimento de conjugación, adaptamos el protocolo descrito por Shore, utilizando la cepa de *S. aureus* ATCC® 29213 resistente a la rifampicina como receptora. Inicialmente, usamos placas de agar BHI con rifampicina y cloranfenicol a una concentración de 30 µg/mL de cloranfenicol, sin obtener ninguna colonia transconjugante. Posteriormente, bajamos la concentración del cloranfenicol a la mitad (15 µg/mL), logrando obtener una única colonia transconjugante. Ello probablemente se debía a que el plásmido pSCFS7 poseía dos genes de resistencia al cloranfenicol (*cfr* y *fexA*), mientras que, nuestro plásmido únicamente contenía el gen *cfr*. Quizás bajando todavía más la concentración de cloranfenicol habríamos obtenido más colonias transconjugantes. Con posterioridad a nuestro trabajo, se han detectado otros plásmidos conjugativos portadores del gen *cfr*, tanto en SARM (Quiles-Melero, 2013) como en *S. epidermidis* (Lozano, 2012b).

En el estudio de sensibilidad realizado en el derivado transconjugativo, la CMI a la tigeciclina se encontraba un poco elevada en el transconjugante en comparación con la cepa receptora. Ello podría indicar que el gen *tet(L)*, que codifica una α -hélice

transmembrana (bomba de expulsión activa) (Kadlec, 2012), ejercería cierto efecto sobre la tigeciclina. Las CMI's a la linezolid, cotrimoxazol y tigeciclina eran algo más bajas en el derivado transconjugativo que en la cepa donante, como también ocurrió para la linezolid y cloranfenicol en los experimentos de conjugación de Shore y de Lozano (Shore, 2010a; Lozano, 2012b). La explicación de ello es desconocida.

La amplificación por PCR para los genes de resistencia *cfr*, *tet(L)*, *ant(4')-la* [*aadD*] y *dfrK* fueron positivas en el derivado transconjugante, indicando que todos estos genes están dentro del mismo plásmido conjugativo y que dicho plásmido era capaz de transferirse a otras cepas de estafilococos. El grupo de Schwarz caracterizó un plásmido en *S. epidermidis* con los genes *tet(L)* y *ant(4')-la* adyacentes (Schwarz, 1996), otro plásmido en una cepa de SARM ST398 con los genes *tet(L)* y *dfrK* adyacentes (Kadlec, 2009a), y otro plásmido en un SARM ST398 con los genes *ant(4')-la*, *tet(L)* y *dfrK* adyacentes (Kadlec, 2009b). Asimismo, se han encontrado en China diversos plásmidos veterinarios que compartían los genes *cfr* y *ant(4')-la* en diversas especies de ECN, *Jeotgalicoccus pinnipedialis* y *Macrococcus caseolyticus* (Wang, 2012b; He, 2014). Sin embargo hasta la fecha, para nuestro conocimiento, no se ha encontrado ningún plásmido que posea el gen *cfr* junto el gen *tet(L)* o el gen *dfrK*. Por tanto, el plásmido pERGB es el primer plásmido descrito y único con estos cuatro genes de resistencia.

El tamaño aproximado del plásmido pERGB, determinado mediante el análisis de los fragmentos de restricción por *EcoRI*, fue de 50 kb. Este tamaño es similar al de otros plásmidos portadores del gen *cfr* como el pSE1243 y el pSA737 (39,3 kb) (Mendes, 2013), el pSCFS6 (43 kb) (Kehrenberg, 2007), el pSCFS7 (45 kb) (Shore, 2010a), el plásmido del aislado C2826 (45 kb) (Lozano, 2012b) y el plásmido del aislado 4303A (66 kb) (Mendes, 2010).

En el análisis del fragmento secuenciado del pERGB, llama la atención la elevada similitud existente entre fragmentos del pERGB con partes de otros plásmidos detectados tanto en cepas clínicas como también en cepas de diferentes especies animales. Ello indica la elevada interrelación existente entre aislados de *Staphylococcus* spp. humanos y veterinarios, como se ha descrito ampliamente para el clon de SARM ST398 entre los cerdos y sus cuidadores y matarifes (van den Broek, 2009; Feßler, 2010; Lozano, 2011a); así como la necesidad de extender la vigilancia de la resistencia antibiótica estafilocócica más allá del ámbito exclusivamente humano.

La primera parte del fragmento secuenciado del pERGB contiene la IS21-558 junto con el gen *cfr* y una nueva estructura, compuesta por un gen *res* y por un gen

tnp. Curiosamente, la secuencia de nucleótidos de esta región es idéntica a la de tres plásmidos veterinarios detectados con posterioridad en China: el pJP1 de *J. pinnipedialis* aislado en 2010 en cerdos (Wang, 2012b), el pJP1-like de *S. lentus* aislado en 2011 en pollos (He, 2014) y el pJP2 de *Staphylococcus rostri* aislado en 2011 en un pato (He, 2014).

La segunda parte del fragmento secuenciado del pERGB contiene el gen *repU* truncado y los genes de resistencia *ant(4')-Ia*, *tet(L)* y *dfrK*. Es muy similar a dos plásmidos detectados en Alemania, el pKKS825 encontrado en 2004 en una cepa de SARM porcino (Schwarz, 2008; Kadlec, 2009b) y el pSWS47 en *S. epidermidis* procedente de dos gatos y en un empleado de su clínica veterinaria (Weiß, 2014).

La estructura mosaico del pERGB sugiere que éste se habría desarrollado a partir de fragmentos de diversos plásmidos y transposones. El pERGB, como muchos otros plásmidos con *cfr*, contiene la secuencia de inserción IS21-558 situada justo antes del *cfr*, mientras que los tres genes de resistencia *ant(4')-Ia*, *tet(L)* y *dfrK* se encuentran flanqueados a cada lado por una copia de la IS431, divergentemente orientadas, que es muy similar a la IS257. Las secuencias de inserción IS257 y IS431 median la integración de pequeños plásmidos en otros plásmidos de mayor tamaño, pudiendo interrumpir un gen *rep* (Werckenthin, 1996), como sucede en el pERGB.

Curiosamente, todos los plásmidos analizados que poseen la IS21-558 y el *cfr*, con la única excepción del pERGB, contienen también el gen *fexA*, codificante de una bomba de expulsión de cloranfenicol (Kehrenberg, 2007; Shen, 2013; He, 2014). Ello indica que, en todos estos plásmidos, la IS21-558 y el gen *cfr* se encontrarían integrados en el transposón Tn558, mientras que, en el pERGB, estos elementos no se habrían integrado en dicho transposón.

La coexistencia en este plásmido del *cfr* con otros tres genes adicionales de resistencia haría posible la persistencia y co-selección del gen *cfr* bajo una presión selectiva impuesta por el uso de agentes antimicrobianos diferentes a la linezolidina y clindamicina (que en el caso de este plásmido serían la tetraciclina, tobramicina y el cotrimoxazol).

En resumen, nosotros hemos descrito un nuevo plásmido (denominado pERGB) que combina varios determinantes de resistencia antimicrobiana relevantes y que es capaz de transferirse a otros estafilococos mediante conjugación. Es importante prevenir la diseminación de este elemento multirresistente.