



UNIVERSIDAD DE MURCIA
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y
MICROBIOLOGÍA

Bacteriemias por *Staphylococcus Aureus* en
el Hospital Clínico Universitario
Virgen de la Arrixaca.
Estudio Epidemiológico,
Clínico y Molecular.

D^a Ana Blázquez Abellán

2016

UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Genética y Microbiología



TESIS DOCTORAL

**BACTERIEMIAS POR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* EN EL HOSPITAL CLINICO
UNIVERSITARIO VIRGEN DE LA ARRIXACA. ESTUDIO EPIDEMIOLOGICO,
CLÍNICO Y MOLECULAR.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR

Ana Blázquez Abellán

Directores:

Dra. M^a del Carmen Martínez Toldos

Dra. Genoveva Yagüe Guirao

Murcia, 2015

A una persona admirable y extraordinaria, a Teresa.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecerle al Dr. Manuel Segovia el apoyo continuo y la confianza que tuvo en mí. Sin él no hubiera sido posible realizar este proyecto.

A mis directoras, la Dra. M^a Carmen Martínez Toldos y la Dra. Genoveva Yagüe por apostar por mí y confiar en que podía realizar este trabajo. Gracias por vuestro tiempo, vuestra instrucción y guía.

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

A la Dra. Carme Salvador, por las tardes que me ha acompañado desinteresadamente ofreciéndome su ayuda y su tiempo.

Gracias a la Dra. Merche Roig por su inestimable aportación en la edición del documento.

A José Luis Carrión, por su ayuda y asesoramiento en los procedimientos estadísticos.

Gracias a Oscar Cuevas, Lina, Francisco Mendoza, Enrique, José Vicente, Isabel, Charo, Josita, Saturnino, Luis, Mireya, Gema, y a todas las personas que en mayor o menor medida me han ayudado en este trabajo.

Gracias a todos mis compañeros del Servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, al Dr. Tomás Rodríguez, Dr. Pedro Paredes, Dra Asunción Iborra, Dr. Antonio Moreno, Dr. Bartolomé Carrilero, Dra. M^a José Muñoz, y a todos los residentes, por vuestra continua disponibilidad y estímulo.

Gracias a todas las personas que han colaborado en mi formación como profesional en los diferentes lugares en los que he trabajado, y en especial a aquellos que me han enseñado Microbiología. Gracias al Dr. Bouza y a todo su Servicio. Gracias a mis compañeros del Hospital Naval y del Hospital Santa María del Rosell.

A mis padres y hermanas, por vuestro interés y apoyo incondicional siempre en todo lo que hago. A mis tías. A mis sobrinos. A todos vosotros que formáis parte de mi vida.

Finalmente, pero no por ello menos importante lugar, a Jesús y a Teresa, por su comprensión e ilusión durante el tiempo que ha durado este trabajo. Espero que os sintáis partícipes de él porque también es vuestro. Pero sobre todo, gracias por estar siempre.

A todos, gracias.

ÍNDICE

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Características microbiológicas de *Staphylococcus aureus*

1.1.1. Descripción del género y características generales

1.1.2. Estructura y Factores de virulencia

1.1.3. Bases genéticas de *S.aureus*. Genoma y elementos génicos móviles de *S.aureus*

1.1.4. Manifestaciones clínicas

1.1.5. Antibióticos con actividad frente a *S.aureus*

1.1.5.1. Generalidades

1.1.5.2. Evolución de la resistencia a *S.aureus*

1.1.5.3. Mecanismo de resistencia a β -lactámicos

1.1.5.4. Bases genéticas de la resistencia a meticilina

1.1.6. Epidemiología de la infección por *S.aureus*

1.1.6.1. Descripción de clones epidémicos

1.1.6.2. Métodos de tipado para estudios epidemiológicos

1.1.6.2.1. Fagotipia

1.1.6.2.2. Electroforesis en gel mediante campo pulsado (PFGE)

1.1.6.2.3. Tipificación mediante la técnica de Multilocus sequence typing (MLST)

1.1.6.2.4. Tipificación mediante análisis de repeticiones *spa* (*Spa* Typing)

1.2. Bacteriemia por *S.aureus*

1.2.1. Introducción

1.2.2. Epidemiología de la bacteriemia por *Staphylococcus aureus*

1.2.3. Características clínicas de las bacteriemias

1.2.4. Bacteriemia complicada por *Staphylococcus aureus*

1.2.5. Diagnóstico de la bacteriemia. Hemocultivo

1.2.6. Manejo terapéutico de las bacteriemias por *Staphylococcus aureus*.

2. OBJETIVOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Características del hospital

3.2. Tipo y periodo de estudio

3.3. Estudio microbiológico

3.3.1. Procesamiento de hemocultivos

3.3.2. Detección de PBP2a mediante inmunocromatografía

3.3.3. Estudio de sensibilidad antibiótica

3.4. Técnica de fagotipificación

3.4.1. Propagación del juego internacional de fagos

3.4.2. Determinación del "Routine Test Dilution" (RTD).

3.4.3. Propagación en medio sólido

3.4.4. Espectro lítico

3.4.5. Fagotipificación

3.4.5.1. Realización

3.4.5.2. Lectura de resultados

3.4.5.3. Interpretación de resultados

3.4.5.4. Controles

3.4.5.5. Fagotipificación inversa

3.5. Estudio molecular

3.5.1. Preparación del extracto de ADN y reconstitución de los *primers*

3.5.1.1. Extracción de ADN

3.5.1.2. Reconstitución de *primers*

3.5.2. Detección del gen *mec A* y los genes *luk-PV-1* y *luk-PV-2* por PCR multiplex (MPCR)

3.5.2.1. PCR multiplex (MPCR)

3.5.3. Caracterización del cassette cromosomal mediante PCR

3.5.3.1. PCR multiplex (MPCR)

- 3.5.4. Subtipado del cassette cromosómico *mec IV*
 - 3.5.4.1. PCR multiplex (MPCR)
- 3.5.5. Tipificación mediante secuenciación del gen de la proteína A (*Spa Typing*)
 - 3.5.5.1. Reacción de amplificación
 - 3.5.5.2. Purificación de los productos de PCR
 - 3.5.5.3. Secuenciación
 - 3.5.5.4. Asignación de spa-tipos
 - 3.5.5.5. Análisis BURP y asignación de eBURST
- 3.5.6. Electroforesis en campo de pulso (PFGE)
- 3.6. Datos clínicos y epidemiológicos
 - 3.6.1. Criterios de inclusión
 - 3.6.2. Metodología de recogida de la información
 - 3.6.3. Variables de estudio
 - 3.6.3.1. Características epidemiológicas y clínicas
 - 3.6.3.2. Evaluación de la práctica clínica
 - 3.6.3.2.1. Tratamiento empírico
 - 3.6.3.2.2. Manejo clínico y grado de cumplimiento de las intervenciones orientadas a mejorar la calidad en la práctica clínica
 - 3.6.3.3. Evolución de la bacteriemia
 - 3.6.3.4. Evaluación de la influencia de aplicar las recomendaciones en la práctica clínica de las bacteriemias por *S.aureus*
- 3.7. Análisis estadístico

4. RESULTADOS

- 4.1. Características epidemiológicas y clínicas de la bacteriemia por *S.aureus* (BSA)
- 4.2. Características microbiológicas de las bacteriemias por *S.aureus*.
 - 4.2.1. Tiempo de positividad de los hemocultivos
 - 4.2.2. Patrón de sensibilidad antibiótica de los aislados

- 4.3. Caracterización fenotípica (fagotipificación)
 - 4.3.1. Análisis de las cepas de SAMR mediante fagotipia
 - 4.3.2. Análisis de las cepas de SAMS mediante fagotipia
- 4.4. Caracterización molecular
 - 4.4.1. Tipos estructurales de SCCmec
 - 4.4.2. Tipificación de SAMR mediante secuenciación del gen de la proteína A (*spa*-*typing*)
 - 4.4.2.1. Genotipos SAMR obtenidos por *spa*-*typing*
 - 4.4.2.2. Clasificación en grupos clonales CC-BURP
 - 4.4.2.3. Asignación de grupo clonal eBURST (grupo clonal presuntivo)
 - 4.4.3. Tipificación de SAMS mediante secuenciación del gen de la proteína A (*spa*-*typing*)
 - 4.4.3.1. Genotipos SAMS obtenidos por *spa*-*typing*
 - 4.4.3.2. Clasificación en grupos clonales CC-BURP de SAMS
 - 4.4.3.3. Asignación de grupo clonal eBURST (grupo clonal presuntivo) en SAMS
 - 4.4.4. Genotipado mediante Electroforesis en Campo Pulsado (PFGE)
 - 4.4.4.1. Genotipaje de SAMR mediante Electroforesis en Campo Pulsado PFGE
 - 4.4.4.2. Genotipaje de SAMS mediante Electroforesis en Campo Pulsado PFGE
- 4.5. Evaluación de la práctica clínica de las bacteriemias por *S.aureus*
 - 4.5.1. Tratamiento empírico
 - 4.5.2. Manejo clínico de las bacteriemias por *S.aureus*
 - 4.5.2.1. Realización de hemocultivos de control
 - 4.5.2.2. Realización de ecocardiografía en pacientes con criterio de bacteriemia complicada
 - 4.5.2.3. Retirada de catéter vascular
 - 4.5.2.4. Aviso de microbiología
 - 4.5.2.5. Modificación del tratamiento tras conocer la sensibilidad
 - 4.5.2.6. Medición de los niveles de vancomicina
 - 4.5.2.7. Utilización de cloxacilina en SAMS

4.5.3. Análisis del grado de cumplimiento de las intervenciones clínicas aplicadas en las bacteriemias por *S.aureus*

4.6. Evolución de las bacteriemias

4.6.1 Evolución de las bacteriemias por *S.aureus* en población adulta

4.6.2 Evolución de las bacteriemias por *S.aureus* en población pediátrica

4.7. Evaluación de la influencia de aplicar las recomendaciones en la práctica clínica de las bacteriemias por *S.aureus*

5. DISCUSIÓN

6. CONCLUSIONES

7. BIBLIOGRAFÍA

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

AD: Agua libre de nucleasas

ADVP: Adicto a drogas por vía parenteral

BAC: Bacteriemia adquirida en la comunidad

BC: Bacteriemia Complicada

BN: Bacteriemia nosocomial

BRAS: Bacteriemia relacionada con cuidados sanitarios

BRC: Bacteriemia relacionada con catéter

BSA: Bacteriemia por *Staphylococcus aureus*

BSAMR: Bacteriemia por *Staphylococcus aureus* meticilina resistente

BSAMS: Bacteriemia por *Staphylococcus aureus* meticilina sensible

CHEF : Clamped homogeneous electric field electrophoresis

CHIPS: Proteína Inhibidora de Quimiotaxis de *S.aureus*

CMI: Concentración mínima inhibitoria.

EPINE: Estudio español de Prevalencia de Infecciones Nosocomiales

EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica

GISA: Glicopeptide intermediate *Staphylococcus aureus*

GP : Gram positivos

IQR : Rango intercuartil

Iv: intravenoso

LPV: leucocidina de Pantón Valentine

Mg : miligramos

MH : Müeller Hinton

MLS: Macrólidos, Lincosamidas y Estreptograminas B

MLST: Multilocus Sequence Typing

MPCR : PCR multiplex

NT: No tipable

OR: Odds Ratio

PIA: Polisacárido de adhesión intracelular

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PCR: Proteína C Reactiva

PFGE: Electroforesis de campo pulsado

PVL: Leucocidina de Pantón Valentine

PBP2a: proteína de fijación de la penicilina 2a

RAS: Relacionada con cuidados sanitarios

REA: Unidad de Reanimación

RTD : Routine Test Dilution

SARM: *Staphylococcus aureus* meticilina resistente

SAMS: *Staphylococcus aureus* meticilina sensible

SCC: Cassettes cromosómicos estafilococos

SCIN: Inhibidor del Complemento Estafilocócico

SCN: Estafilococo coagulasa negativa

SD: Desviación típica

Seg: Segundos

Spa : *Staphylococcus* proteína A

SRIS: Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica

ST: Tipo de secuencia obtenida mediante MLST

µg/ml : microgramos /mililitro

µl/L: microlitros /litro

UCIs: Unidades de Cuidados Intensivos

VIH: Virus de Inmunodeficiencia Humana

VISA: vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus*

VRSA: vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCION

1.1. Características microbiológicas de *Staphylococcus aureus*

1.1.1. Descripción del género y características generales

El género *Staphylococcus* está ubicado junto a los géneros *Micrococcus*, *Planococcus* y *Stomatococcus* dentro de la familia *Micrococcaceae*. Los miembros del género *Staphylococcus* son cocos gram positivos de 0,5 a 1,5 μm de diámetro, que se disponen en grupos a modo de racimos irregulares (del griego *staphylé*, racimo de uvas), (FIGURA) de donde procede su nombre, aunque en las muestras clínicas pueden aparecer aislados o formando parejas. Inicialmente los estafilococos se clasificaron dentro de un género común con los micrococos. Sir Alexander Ogston (Ogston A, 1883) introdujo el término "*Staphylococcus*" para describir a los micrococos responsables de la inflamación y supuración. Sin embargo estos microorganismos son bastante diferentes en varios aspectos, como en la composición de citocromos y menaquinona de su cadena respiratoria (Kloos WE y col., 1992 y 1995), en la estructura de la pared celular y en el contenido en guanina-citosina (G+C).

Los estafilococos son microorganismos poco exigentes en sus requerimientos nutricionales. Pueden crecer en muy diversas condiciones ambientales, pero lo hacen mejor a temperaturas entre 30 y 37°C y a un pH próximo a la neutralidad. Son resistentes a la desecación y a los desinfectantes químicos, y toleran concentraciones de NaCl de hasta el 12%. Crecen fácilmente en los medios de cultivo habituales, pero su crecimiento es mejor en medio sal manitol y en agar sangre. Son microorganismos no móviles, aerobios o anaerobios facultativos. La producción del enzima catalasa es una prueba bioquímica que los diferencia de otro género de cocos grampositivos, el género *Streptococcus* (Bannerman TL y Peacock SJ, 2007).

El género *Staphylococcus* compone de 35 especies y 17 subespecies. Las que se asocian con más frecuencia a enfermedad en el ser humano son *Staphylococcus aureus* (el patógeno por excelencia del género), *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus schleferi* y *Staphylococcus haemolyticus*. De ellas, solo *S.aureus* se caracteriza por producir el enzima coagulasa. Dado que las restantes especies estafilocócicas carecen de la capacidad de producir coagulasa, son conocidas colectivamente como estafilococos coagulasa-negativos.

S. aureus se caracteriza por crecer en medios de cultivo que contienen sangre como colonias típicas de consistencia cremosa, pigmentadas de color amarillo o dorado y con un halo de β -hemólisis a su alrededor. Desde el punto de vista bioquímico, destaca la producción de enzimas como catalasa y coagulasa, la capacidad de fermentar el manitol y la trehalosa, y la producción de una nucleasa estable al calor (termonucleasa).

En el ser humano, *S.aureus* puede existir como residente o como miembro transitorio de la flora normal de piel y mucosas; muestra preferencia por la región anterior de las fosas nasales, en especial en adultos (Kluytmans J y col., 1997). La tasa de portadores nasales varía entre el 10% y 40% en la población general. La tasa de colonización más alta se da en ciertas poblaciones, como en el caso de enfermos con forunculosis recurrente y en el de pacientes sometidos a procedimientos médicos, como hemodiálisis o cirugía (Von Eiff C y col., 2001; Laupland KB y col., 2003 y Yu VL y col., 1986). Después de dos semanas en el hospital, la tasa de colonización llega a aumentar hasta un 50% (Kluytmans J y col. 1997).

Esto supone un medio de persistencia y diseminación de estafilococos, en especial de cepas de *S.aureus* resistente a meticilina (SARM) (Kluytmans J y col., 1997; Casewell MW y Hill RL, 1986; Sanford MD y col., 1994). Estas zonas colonizadas constituyen un reservorio desde el cual se puede producir una infección en el propio paciente (Gordon RJ y Lowy FD, 2008) y también transmitirse horizontalmente entre individuos, por contacto directo o a través del contacto con objetos inanimados contaminados, Gordon RJ y Lowy FD, 2008). Muchos casos de infección nosocomial

se adquieren por la exposición a las manos de personal sanitario, después de que éstos hayan sido transitoriamente colonizados por *S.aureus* desde su propio reservorio o a partir del contacto con un paciente infectado (Dominguez-Luzón MA y Rodriguez-Baño J, 2006).

1.1.2. Estructura y Factores de virulencia

La patogenia de las infecciones por *S.aureus* es un fenómeno complejo en el que se combinan los factores de virulencia bacteriana con la disminución de las defensas del huésped. En su acción patógena intervienen productos tanto estructurales como secretados que puede se expresados por este microorganismo y favorecen la invasión tisular y diseminación en los tejidos del huésped.

A.- Componentes estructurales

La forma y estabilidad de la bacteria es conferida por una pared celular de peptidoglicano y los ácidos teicóicos (figura 1).

- **El peptidoglicano** es el componente básico de la pared celular. Se compone de numerosas capas de cadenas de glucanos construidas con 10 o 12 subunidades alternantes de ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina. Las cadenas laterales de oligopéptidos están unidas a las subunidades de ácido N-acetilmurámico y se entrecruzan por medio de puentes peptídicos. Estas capas entrecruzadas, confieren una mayor rigidez a la pared celular confiriéndole resistencia osmótica. Tiene actividad de tipo endotóxina, hecho que es importante en la patogenia de la infección; desencadena la producción de interleucina-1 por los monocitos; estimula la quimiotaxis y agregación de los leucocitos; activa el complemento e induce la producción de anticuerpos opsonizantes. Las enzimas que catalizan la construcción de peptidoglicano son las proteínas de unión a penicilina, siendo las dianas de los antibióticos betalactámicos.
- **Los ácidos teicóicos** son polímeros de fosfato específicos de especie, pueden estar unidos de manera covalente a residuos de ácido N-acetilmurámico de la capa de

peptidoglucano a través de una unión lipofílica a la membrana citoplásmica. Mediante el ensamblaje de la bacteria a las superficies mucosas mediante uniones específicas a la fibronectina (Murray PR y col, 2005).

- **Proteínas de adhesión a superficies:**

Se han identificado una gran cantidad de proteínas de superficie importantes en la adherencia a los tejidos del hospedador. La mayoría están unidas de forma covalente al peptidoglucano y se han denominado, en conjunto como proteínas MSCRAMM ("*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*"). Entre las proteínas mejor caracterizadas están la proteína A, las proteínas de unión al colágeno (Cna), la fibronectina (proteínas de unión a la fibronectina como las FnBPA y FnBPB) y el fibrinógeno (factor de agregación o clumping como ClfA y ClfB) y la sialoproteína ósea. La proteína A estafilocócica funciona como un factor de virulencia al interferir en la opsonización y en la ingestión de los microorganismos por parte de los leucocitos polimorfonucleares, activar al complemento y estimular reacciones de hipersensibilidad de tipo inmediato y retardado. Las proteínas A y B (CfIA y cfIB) del factor de agregación, clumping factor, o coagulasa ligada se unen al fibrinógeno y lo convierten en fibrina insoluble, facilitando así la agregación bacteriana. La detección de esta proteína, junto a la de la proteína A, constituyen las pruebas de identificación principal de *S. aureus* (Murray PR y col, 2005; Bannerman TL y Peacock SJ, 2007; Kaplan MH y Tenenbaum MJ, 1982; Mazmanian SK y col., 2001; O'Neill E y col., 2008).

- **Cápsula externa o glucocalix.** Otro factor importante en *S. aureus* es la cápsula de naturaleza polisacárida denominada slime o cápsula mucoide, que facilita la adherencia de las bacterias a diversas células, además de tener capacidad antifagocitaria. Se han identificado 11 serotipos capsulares, de los cuales los tipos 1 y 2 producen grandes cantidades de polisacárido, dándole a la bacteria apariencia mucoide en los medios de cultivos; sin embargo, estos tipos son poco frecuentes en las muestras clínicas, en contraste con los serotipos 5 y 8 que son responsables de más de 75% de las infecciones clínicas. (Cueto M y Pascual A, 2009; Rodríguez-Luzón MA y Rodríguez-Baño J, 2005). Junto con las adhesinas intercelulares, los polisacáridos capsulares de *S. aureus* incrementan la capacidad de formar

biopelículas, aumentando su adhesividad (Watts A. y col. 2005). Estos exopolisacáridos han sido observados por microscopía electrónica en derivaciones de marcapasos, catéteres, prótesis valvulares y articulares infectadas por *S.aureus* (Hauck CR y Ohlsen K, 2006; Speziale P y col., 2009). La habilidad para formar y residir en biofilms es una de las razones por las que las infecciones derivadas de dispositivos protésicos pueden ser tan difíciles de erradicar, quedando en muchas ocasiones la retirada de dicho dispositivo como única solución (Donlan RM y Costerton JW, 2002).

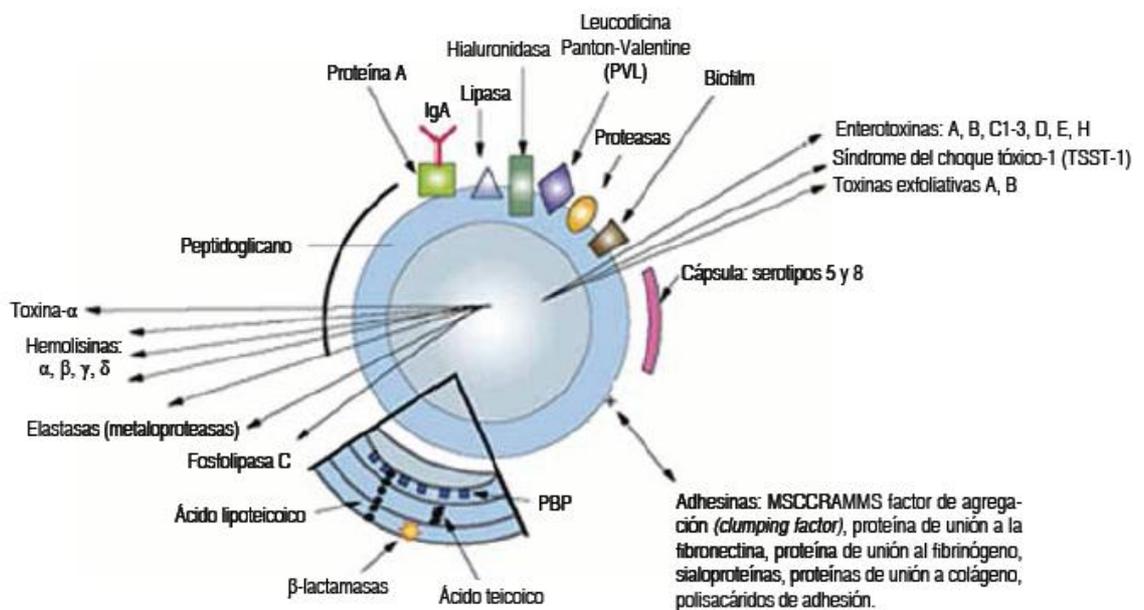


Figura 1: Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus*

B) Enzimas:

S. aureus produce un gran número de exoenzimas que facilitan la invasión y destrucción tisular y ejercen su acción en zonas próximas al foco infeccioso. Entre estas enzimas destacan: la catalasa, enzima que degrada el peróxido de hidrógeno protegiendo al microorganismo durante la fagocitosis y la coagulasa: se presenta en dos formas como factor de agregación o coagulasa ligada (clumping factor) y la coagulasa libre. La coagulasa ligada es capaz de convertir directamente sin intervención de factores plasmáticos el fibrinógeno en fibrina, produciendo la coagulación del plasma. Ambas pueden recubrir las células bacterianas con fibrina y hacerlas resistentes a la opsonización y la fagocitosis, permitiendo la formación de coágulos, facilitando procesos sépticos y la formación de abscesos, existiendo una fuerte correlación entre la producción de coagulasa y la virulencia de la cepa. La detección de la coagulasa libre es la prueba que diferencia a *S.aureus* de los estafilococos coagulasa negativos.

La mayoría de las cepas de *S. aureus*, además sintetizan otras enzimas que permiten la destrucción de los tejidos y la diseminación de los microorganismos. Entre estas destacan: hialuronidasas (hidroliza la matriz intercelular de mucopolisacáridos entre los tejidos y permite la diseminación de los microorganismos a zonas adyacentes), lipasas (contribuyen a la diseminación de los microorganismos en los tejidos cutáneos y subcutáneos provocando forunculosis crónica), fosfolipasa C (específica para el fosfatidilinositol, y presente en cepas aisladas en pacientes con distrés respiratorio del adulto y coagulación intravascular diseminada; los tejidos afectados por esta enzima se vuelven más susceptibles al daño y la destrucción por componentes bioactivos del complemento y los productos de activación del complemento), fibrinolisin (pueden degradar coágulos de fibrina y permitir la diseminación de la infección a los tejidos contiguos), endonucleasas, etc.

La penicilinasas actualmente es producida por casi todas las cepas de *S. aureus*. Es una β -lactamasas que inactiva la penicilina hidrolizando el anillo β -lactámico. Es uno de los factores de virulencia de mayor impacto en *S.aureus*. La producción de esta enzima puede ser inducible (es decir, se producen sólo en presencia de antibióticos

β-lactámicos) o constitutiva y hace que estos microorganismos sean resistentes a la penicilina y la ampicilina. Los genes que codifican esta enzima habitualmente residen en plásmidos que también poseen genes para la resistencia a diversos antibióticos, como la eritromicina y la tetraciclina. Estos genes de resistencia pueden ser transferidos a otras bacterias por transformación y transducción.

C) Toxinas:

Algunas cepas de *S.aureus* son capaces de sintetizar proteínas extracelulares adicionales que producen su acción en zonas distales del foco infeccioso. Su expresión está regulada por un gen accesorio regulador de proteínas (*agr*) y pueden ser codificadas por el ADN cromosómico o plasmídico. Las más importantes son (Dinges MM y col., 2000):

- *Hemolisinas*: se han identificado cuatro denominadas alfa, beta, delta y gamma. Son sintetizadas por la mayoría de cepas de *S.aureus*. La *toxina alfa* es la mejor estudiada ya que es considerada el prototipo de la toxina formadora de poros. Es citolítica para un gran número de células y parece intervenir en el desarrollo de edema y daño tisular como consecuencia de los cambios de permeabilidad inducidos en las células endoteliales y los consiguientes cambios en el balance iónico. Es dermonecrótica y neurotóxica. La *toxina beta* es una esfingomielinasacuyas propiedades hemolíticas son incrementadas por la exposición posterior de los eritrocitos a bajas temperaturas. La *toxina gamma* afecta a neutrófilos, macrófagos y eritrocitos. Se cree que tiene efecto en la inducción de la inflamación. La *toxina delta* se encuentra en algunas cepas de *S.aureus* y también produce la lisis de diferentes tipos celulares, actuando fundamentalmente como surfactante y además tiene actividad enzimática similar a la toxina colérica, teniendo importancia en la diarrea asociada a enfermedad estafilocócica.

- *Leucocidina de Panton Valentine (LPV)* es una exotoxina leucotóxica, que ejerce un efecto tóxico directo sobre la membrana de los leucocitos polimorfonucleares humanos pero carece de actividad hemolítica (Ladhani S y col., 1999; Dinges MM y col., 2000; Kaneko J y Kamio Y, 2004). Consta de dos cadenas de polipéptidos: el componente S y el componente F. Está codificada por los genes *lukF-PV* y *lukS-PV*, los

cuales se transfieren de una cepa a otra a través de bacteriófagos y se insertan en un lugar específico del cromosoma, diferente al del cassette *SCCmec*. La LPV se encuentra en menos del 5% de los aislados de *S.aureus* clínicos. A las cepas de *S.aureus* productoras de LPV se les ha asociado, principalmente, con cuadros de infecciones de piel y parte blandas, neumonía necrotizante o ambas en adultos jóvenes y niños y suelen ser cepas de SAMR adquiridas en la comunidad (Gordon RJ y Lowy FD, 2008). La presencia de LPV se ha convertido, en general, en un marcador de SARM-CO, aunque ésta no es una característica estrictamente necesaria, ya que algunos clones comunitarios no la presentan (Deresinski S, 2005; Cuevas O y col., 2008). La virulencia conferida por la presencia de la LPV es controvertida (Vandenesch F y col., 2003). Algunos autores consideran que LPV no constituye un factor esencial en la virulencia de estas cepas, ya que al estudiar en un modelo murino las cepas USA 300 y USA 400 de tipo salvaje y una vez eliminado el gen de la LPV, la infección presentaba idéntico curso (Voyich JM y col., 2006). Otros autores consideran que la LPV es sólo relevante en infecciones como la neumonía necrotizante (Genestier AL y col., 2005); mientras que otros relacionan la patogenia con los niveles de toxina producida, ya que al comparar, en modelo murino, cepas con un alto nivel de expresión de LPV con cepas productoras de bajos niveles, las primeras causaban grandes abscesos en la piel (Varshney AK y col., 2010).

- *Enterotoxinas*: son producidas por el 30-50% de las cepas de *S.aureus*. Son responsables de toxiinfecciones alimentarias con emesis y cuadros de enterocolitis. Poseen las características inmunomoduladoras propias de los superantígenos. Se han descrito 18 serotipos de enterotoxinas (A-R) que difieren en sus características físicas y moleculares, teniendo todas ellas capacidad para inducir el vómito. El más frecuente de ellos es el A. En los últimos años se describieron otras toxinas químicamente y biológicamente relacionadas, en las que no ha sido testada la propiedad emética y a las que se denominó "toxinas similares a la enterotoxina estafilocócica (enterotoxina-like)". La más representativa es la toxina *ss/1* (Lina G y col., 2004).

- Otro tipo de superantígeno es la *toxina TSST-1 o toxina 1 del síndrome del shock tóxico*, antes denominada exotoxina pirogénica o enterotoxina F, que puede producir cuadros similares al shock séptico por la producción incontrolada de citoquinas mediante la activación del sistema inmunológico y del sistema de la coagulación.

- *Toxina exfoliativa o epidermolisina*: este microorganismo también puede producir la toxina exfoliativa o epidermolisina responsable del síndrome de la piel escaldada o del impétigo bulloso. La prevalencia es variable, pero generalmente es inferior al 5-10%. Se han identificado dos serotipos (ETA, ETB). La *toxina exfoliativa A* es termoestable y de codificación cromosómica, y la *B* es termolábil y de codificación plasmídica. No producen citólisis ni inflamación por lo que en la capa de epidermis afectada no se encuentran ni leucocitos ni estafilococos.

1.1.3. Bases genéticas

Genoma y elementos génicos móviles de *Staphylococcus aureus*

El genoma de *S.aureus* se compone de un único cromosoma circular de 2813-2903 Mb, que constituye el núcleo del genoma y está asociado principalmente al metabolismo central de la bacteria (Lan R y Reeves PR, 2000; Lindsay JA y Holden MT, 2006). Además, contiene un conjunto de elementos accesorios que juegan un papel relevante en su capacidad patogénica (Mlynarczyk A y col., 1998). Los genes accesorios comprenden aproximadamente el 25% del genoma de *S.aureus* (Fitzgerald JR y col., 2001), y la mayoría consisten en elementos génicos móviles que se transfieren de manera horizontal entre cepas. Estos elementos incluyen bacteriófagos, islas de patogenicidad, cassettes cromosómicos, secuencias de inserción, plásmidos y transposones. El estudio de estos elementos ha permitido explicar los mecanismos de transferencia genética entre las cepas mediante procesos de conjugación, transducción, transformación y movilización mediante plásmidos conjugativos. Muchos de estos elementos génicos portan genes con funciones de virulencia o resistencia haciendo que *S.aureus* represente un ejemplo de la

adaptabilidad alcanzada por un microorganismo mediante el acceso a funciones adicionales a través de los mecanismos de transferencia génica horizontal.

- Los plásmidos son moléculas extracromosómicas de DNA circular de pequeño tamaño (2-5 Kb) que contienen genes que codifican para la producción de toxinas y/o resistencia a antibióticos y metales pesados. Pueden transferirse de una célula a otra mediante el proceso de conjugación.

- Los transposones son fragmentos móviles de DNA, generalmente flanqueados por secuencias repetidas. Su longitud varía de unos cientos a unos miles de nucleótidos. La transposición ocurre a través de dos mecanismos: uno consiste en la escisión del elemento móvil para posteriormente insertarse en el DNA diana; el otro consiste en un mecanismo de retrotransposición, mediante el cual el transposón genera una copia de si mismo que se insertará en el DNA diana. Los enzimas que catalizan los cortes y las uniones de estos elementos son específicos y están codificados en el propio transposón. Los transposones pueden transportar uno o más marcadores de resistencia antibiótica. Se han descrito distintos transposones como Tn551 portador del gen *ermB* de resistencia a eritromicina (Khan SA y Novick RP, 1980), Tn4001 portador de genes que codifican la resistencia a kanamicina, tobramicina y gentamicina (Lyon BR y col., 1984), Tn4003 que codifica la resistencia a trimetoprim (Rouch DA y col., 1989), Tn552 que contiene el gen del operon *bla* que confiere resistencia a penicilina (Rowland SJ y Dyke KHG, 1989) por la producción de penicilinasas y Tn554 que contiene los genes *ermA* para la resistencia a eritromicina y el gen *spc* que codifica la resistencia a espectinomicina (Murphy EL y col., 1985). Los dos elementos más utilizados en la transferencia genética son Tn551 y Tn554. Tn554 se encuentra con gran frecuencia en el cromosoma de *S.aureus* resistente a meticilina (SARM) y se ha utilizado para el seguimiento epidemiológico de clones epidémicos de SARM (Figueiredo AMS y col., 1991).

Las diferencias de contenido génico entre distintas cepas de *S. aureus* constituyen, muy probablemente, la base molecular de su diferente capacidad infectiva, de virulencia y de patogenicidad. Varios estudios han sugerido que ciertos genes que codifican para toxinas están asociados con determinados linajes (Moore P y Lindsay

JA, 2002; Peacock SJ y col., 2002). Dicha asociación no se debe únicamente a la transmisión vertical, sino que existen evidencias de una adquisición y pérdida frecuente de determinados elementos que está restringida a determinados linajes. Aunque el mecanismo aún no se conoce, ésta es una posible explicación del dominio de ciertos linajes que colonizan y causan enfermedad.

1.1.4. Manifestaciones clínicas

S.aureus es una de las principales causas de infección en el hombre. Suele producirse tras lesiones cutáneas, traumáticas o quirúrgicas que favorecen la penetración del microorganismo desde la piel hasta los tejidos profundos. Muchas de estas infecciones, aunque inicialmente localizadas, pueden diseminarse y ser origen de bacteriemias, endocarditis, infecciones intravasculares o neumonía, además de producir un elevado número de infecciones relacionadas con la utilización de catéteres, prótesis y otros dispositivos médicos (Klevens RM y col., 2006).

Entre los cuadros clínicos producidos por *S. aureus* están:

A) Infecciones de piel y partes blandas

Se caracterizan por la formación de vesículas pustulosas que comienzan en los folículos pilosos propagándose a los tejidos vecinos. La foliculitis es una infección superficial del folículo piloso. Su extensión al tejido perifolicular da lugar al forúnculo.

El ántrax es la infección de varios forúnculos con extensión al tejido subcutáneo. En un tercio de los casos puede producir bacteriemia. En el caso de SARM adquirido en la comunidad, la mayoría de las infecciones que produce afectan a la piel y tejidos blandos produciendo principalmente forunculosis que se asocia con la presencia de LPV (Cercenado E y Ruiz de Copegui A, 2008a).

Otras infecciones cutáneas son impétigo, mastitis, hidrosadenitis supurada, celulitis, fascitis y paroniquia.

Existen factores que predisponen a estas infecciones como la diabetes mellitus, vasculopatías, enfermedades neurológicas, alteraciones en el drenaje linfático, enfermedades cutáneas e inmunosupresión. También puede causar infección de úlceras crónicas (pie diabético, úlceras por presión).

S.aureuses uno de los patógenos más frecuentes en infecciones de heridas quirúrgicas tanto superficiales como profundas, al tratarse de un colonizador habitual de la piel, siendo la lesión más común la formación de exudado purulento o absceso (Domínguez-Lujón MA y Rodríguez-Baño J, 2006).

B) Bacteriemia y endocarditis

S.aureus es una causa frecuente de bacteriemia. En un tercio de los casos el foco es desconocido. El foco inicial de las bacteriemias producidas en el hospital y las asociadas a cuidados sanitarios suelen relacionarse con accesos vasculares y otros procedimientos invasivos, mientras que en las comunitarias el foco de origen suele ser infecciones cutáneas y, más raramente, infecciones del tracto respiratorio que, pese a ser menos frecuentes, se relacionan con un mayor riesgo de complicaciones y mortalidad (Kaech Cy col.,2006). Alrededor de un tercio de los pacientes con bacteriemia por *S.aureus*, desarrollan complicaciones locales o metastásicas, destacando por su gravedad la endocarditis. La frecuencia de endocarditis entre los pacientes con bacteriemia por *S.aureus* varía entre un 5% y un 21%, respectivamente, según sean pacientes con bacteriemia nosocomial o de adquisición comunitaria (Chang FY y col., 2003). *S.aureus* es la causa más frecuente de endocarditis infecciosa aguda, afecta sobre todo a las válvulas mitral y aórtica, ya sean nativas o protésicas. La endocarditis aguda derecha de la válvula tricúspide suele observarse en adictos a drogas por vía parenteral (ADVP), tiene mejor pronóstico y en la actualidad es menos frecuente.

C) Pericarditis

Generalmente es de origen hematógeno, aunque también puede ocurrir tras cirugía, en cuyo caso el pronóstico es grave, o por un traumatismo penetrante.

D) Infecciones de vías respiratorias

Aunque las infecciones respiratorias nosocomiales pueden deberse a diversas etiologías, *S. aureus* se encuentra entre las tres más frecuentes, siendo la mitad de los aislamientos resistentes a meticilina. Los principales factores de riesgo de adquisición de neumonía nosocomial por SARM son la presencia de EPOC (Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica), el uso de corticoides, antibioterapia previa o, más frecuentemente, pacientes sometidos a ventilación mecánica prolongada. Por otro lado, la neumonía es, junto a la infección de piel y partes blandas, otra de las manifestaciones características de SARM comunitario productor de LPV y afecta tanto a adultos como a individuos jóvenes debido, frecuentemente, a complicación de cuadros víricos gripales, aunque a diferencia de la nosocomial, suele progresar rápidamente. Un estudio reciente parece demostrar en modelo murino, que la coinfección de clones de SARM como el USA300, incrementan su capacidad patogénica durante la coinfección con el virus Influenza (Iverson AR y col., 2011). La complicación más frecuente de la neumonía es el empiema.

También es frecuente encontrar a *S.aureus* como agente etiológico de sinusitis y de infección bronquial en pacientes con fibrosis quística.

E) Infecciones musculoesqueléticas

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

También es el principal agente etiológico de la artritis séptica y de bursitis.

Las piomiositis son infecciones poco frecuentes de los músculos estriados; suelen afectar a personas con enfermedades de base. La forma más frecuente es el absceso de psoas, de origen hematológico desde una infección vertebral.

F) Infecciones de sistema nervioso central

La meningitis piógena estafilocócica puede ser de origen hematógeno o como complicación de un absceso cerebral.

Los abscesos cerebrales pueden ser de origen hematógeno, a partir de una endocarditis, o por contigüidad, a partir de sinusitis, traumatismos o cirugía.

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

G) Infecciones de vías urinarias

La infección de las vías urinarias por *S.aureus* es muy rara. Su presencia en orina sugiere origen hematógeno. Las manipulaciones ascendentes son debidas a manipulación instrumental.

H) Cuadros producidos por toxinas

Dentro de los cuadros producidos por la secreción de toxinas estafilocócicas destacan:

- Síndrome de la piel escaldada estafilocócica: es una dermatitis exfoliativa ampollar que no afecta a mucosas, consecuencia de la producción de dos toxinas exfoliativas (ETA y ETB) y que afecta especialmente a recién nacidos y niños. Suele aparcer como complicación de un pioderma localizado.

- Síndrome del shock tóxico: es un cuadro grave debido a la producción de TSST-1, inicialmente descrito en niños y posteriormente en mujeres jóvenes que usaban tampones y se caracteriza por fiebre elevada, vómitos, diarrea, faringitis y dolor muscular; puede progresar en tan solo 48 horas en un shock séptico con manifestaciones de lesión renal y hepática.

- Toxiinfecciones alimentarias o gastroenteritis tóxicas estafilocócicas se deben a la ingestión de alimentos contaminados con enterotoxina estafilocócica, productora de

un cuadro afebril autolimitado que cursa con vómitos, dolor cólico y diarrea a las pocas horas de la ingestión.

1.1.5. Antibióticos con actividad frente a *S. aureus*:

1.1.5.1. Generalidades

Los antibióticos que tienen actividad frente a *S. aureus*, ejercen su acción por diferentes mecanismos:

1-Inhibiendo la síntesis de la pared celular como los antibióticos β -lactámicos y glucopéptidos que actúan bloqueando distintos procesos implicados en la síntesis del peptidoglicano. Los β -lactámicos tienen actividad bactericida actuando en la última etapa de la síntesis del peptidoglicano uniéndose a las PBPs o proteínas de unión a penicilinas –*penicilin binding proteins*- e interfiriendo con su acción. Los glicopéptidos (vancomicina y teicoplanina) impiden la síntesis del peptidoglicano en un paso anterior al de los β -lactámicos, ya que evita el proceso de polimerización necesario para que el complejo disacárido-pentapéptido se separe del fosfolípido de la membrana; de este modo, secundariamente alteran la permeabilidad de la membrana celular.

2-Inhibiendo la síntesis proteica, actuando a diferentes niveles en las subunidades ribosomales 30S y 50S. Entre estos se encuentran: los aminoglucósidos, tetraciclinas, macrólidos, lincosaminas, estreptograminas, cetólidos (telitromicina), cloranfenicol, oxazolidinonas, ácido fusídico o mupirocina. Éstos dos últimos son antibióticos tópicos, especialmente útiles en el control de la diseminación hospitalaria de *S.aureus* resistente a la meticilina. Actualmente la única oxazolidinona utilizada en la práctica clínica es el linezolid, cuyo mecanismo de acción consiste en inhibir la formación del complejo de iniciación en la síntesis de proteínas bacterianas.

3- Bloqueando la síntesis de los ácidos nucleicos, como sulfonamidas y trimetoprim que actúan inhibiendo el metabolismo del ácido fólico, quinolonas que interfieren en la replicación del DNA por inhibición de la DNA-girasa o rifampicina que afecta a la transcripción inhibiendo la RNA-polimerasa dependiente de DNA.

4- Actuando a nivel de la membrana plasmática: La daptomicina es un ipeptido macrocíclico natural que actúa insertándose directamente en la membrana citoplasmática; al unirse a las moléculas de fosfatidilglicerol provoca un cambio conformacional dependiente de la concentración de los iones de calcio (Ca^{2+}). La consecuencia es una rápida despolarización de la membrana bacteriana y la salida al exterior celular de una corriente de iones potasio (K^+). Estos cambios determinan una rápida detención de los procesos de síntesis proteica y de ácidos nucleicos (ADN y ARN), lo que provoca la muerte de la célula bacteriana.

1.1.5.2. Evolución de la resistencia en *S.aureus*

Las bacterias se multiplican asexualmente por división binaria produciéndose clones unas de otras, por tanto, cualquier variabilidad genética, como la adquisición de resistencia a los antibióticos, requiere de mutaciones aleatorias del genoma (resistencia cromosómica) o de transferencia horizontal de material genético (resistencia extracromosómica). Como ya se ha explicado anteriormente (apartado 1.1.3.), esta transferencia puede producirse por transducción o por transformación, cuando el intercambio genético se produce entre bacterias de la misma especie o de especies genéticamente muy próximas, y por conjugación cuando se intercambian genes entre diferentes especies. Con ello adquiere factores de resistencia a antibióticos codificados por plásmidos (ADN circular de doble cadena capaz de replicarse de forma independiente), secuencias de inserción, y transposones (secuencias móviles de ADN) (Jiménez-Quiceno y Correa-Ochoa MM, 2009). Así la capacidad de adaptación bacteriana a nuevos ambientes es, a menudo, resultado de la adquisición de genes a través de transferencia horizontal (Sykes R, 2010).

Sólo cuatro años después del descubrimiento y la aplicación en terapéutica de las primeras penicilinas en 1940, hasta un 60% de las cepas de *S.aureus* habían adquirido resistencia a estas moléculas debido a que rápidamente desarrollaron la capacidad de producir β -lactamasas (Cameron DR y col., 2011).

Durante la década de 1950 se fueron introduciendo nuevos antibióticos en la práctica clínica (tetraciclina, estreptomicina, cloranfenicol, eritromicina), notificándose los primeros aislamientos clínicos de *S. aureus* multirresistentes en 1957, y a principios de 1960 los estafilococos habían adquirido resistencia a la gran mayoría de los antibióticos disponibles.

En 1959 se introduce la meticilina, una penicilina semisintética que resiste la acción de la β -lactamasa que degrada la penicilina. En 1961 aparecieron las primeras resistencias mediadas por adquisición del gen *meca* (Hiramatsu K y col., 2001; Deuremberg RH y col., 2007; Rodriguez-Baño y col., 2006).

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

La efectividad a otras clases de antibióticos como macrólidos, lincosamidas, aminoglucósidos y quinolonas también se ha visto disminuida.

Aunque de forma esporádica, también se ha comunicado la existencia de cepas resistentes a fármacos de más reciente introducción como la daptomicina o el linezolid (Sivakumar B y col., 2012; Tsiodras S y col., 2001), por lo que encontrar el tratamiento adecuado para las infecciones producidas por SAMR puede suponer un reto.

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

1.1.5.3. Mecanismos de resistencia a β -lactámicos

Los β -lactámicos son antibacterianos con actividad bactericida, que actúan como análogos del dipéptido D-Ala-D-Ala e inhiben la síntesis del peptidoglicano impidiendo la reacción de transpeptidación, debilitando la estructura de la pared celular provocando su rotura y, por tanto, la muerte celular. Para ello deben llegar a su diana de actuación, las PBPs o proteínas fijadoras de penicilinas, situadas en la parte externa de la membrana citoplasmática.

El mecanismo de resistencia más frecuente a este grupo de fármacos en *S.aureus* es la inactivación enzimática mediada por β -lactamasas. Estas enzimas hidrolizan el anillo beta-lactámico haciendo al fármaco inactivo, ya que con esta estructura no es reconocido por las enzimas involucradas en la síntesis de la pared celular. Esta resistencia afecta a las penicilinas naturales y semisintéticas, pero no al resto de los β -lactámicos. Esta β -lactamasa se inhibe por fármacos inhibidores de β -lactamasas como ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam.

Otro mecanismo frecuente es la resistencia a meticilina debida a la presencia del gen *mecA*, que codifica la síntesis de una nueva proteína fijadora de penicilina, laPBP2a, que presenta una disminución en la afinidad por los antibióticos β -lactámicos. Las PBPs son enzimas localizadas en la membrana bacteriana que catalizan las reacciones de transpeptidación del peptidoglicano durante la síntesis de la pared celular, interfiriendo la construcción de los puentes cruzados entre las cadenas de peptidoglicano. Sin estos, la pared celular es inestable y débil mecánicamente, se producirá la liberación de contenido celular, y la bacteria muere (Georgopapadakou N y col., 1986; Giesbrecht P y col., 1998; Berger-Bächi B, 1998).

Las cepas de SARM, además de producir las PBPs características de esta especie (PBP1, PBP2, PBP3, PBP4), desarrollan la PBP2a, la cual sigue activa manteniendo la

síntesis de la pared celular cuando las otras PBPs están inhibidas por la presencia de meticilina. Esta PBP2a confiere resistencia a todos los antibióticos β -lactámicos, (incluyendo penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas y monobactamas), excepto a las cefalosporinas anti-SARM denominadas ceftobiprol y ceftarolina, que presentan una gran afinidad por la PBP2a (Cheng M y col., 2008; Jacqueline C y col., 2009). Este mecanismo de resistencia se detecta en el laboratorio utilizando discos de cefoxitina de 30 μ g debido a que este antibiótico es un inductor más potente que las penicilinas con lo que mejora la expresión del gen y permite detectar mejor la resistencia, especialmente en las heterorresistentes; un halo de menor o igual de 21 mm indica la presencia del gen; CMI cefoxitina <4 sensible, >8 resistente). El CLSI ha establecido un punto de corte de resistencia de *S.aureus* para la oxacilina ≥ 4 μ g/ml. La expresión fenotípica de la resistencia a este antibiótico puede ser heterogénea (CMI de oxacilina: 1-16 μ g/ml) u homogénea (CMI de oxacilina: >16 μ g/ml).

Otro mecanismo de resistencia a oxacilina observado en cepas con sensibilidad intermedia o de bajo nivel, llamadas cepas “borderline a oxacilina” o BORSA (borderline oxacillin resistant *S.aureus*) es debido a la hiperproducción de betalactamasa estafilocócica o la modificación (hiperproducción o alteración) de las PBP 1, 2 o 4 de *S.aureus*, siendo en estos casos la CMI de 1-8 μ g/ml (Figura 2).

Con independencia de estos métodos fenotípicos, el método que se considera de referencia es la detección del gen *mecA* por PCR convencional o a tiempo real (Batista N y col., 2008).

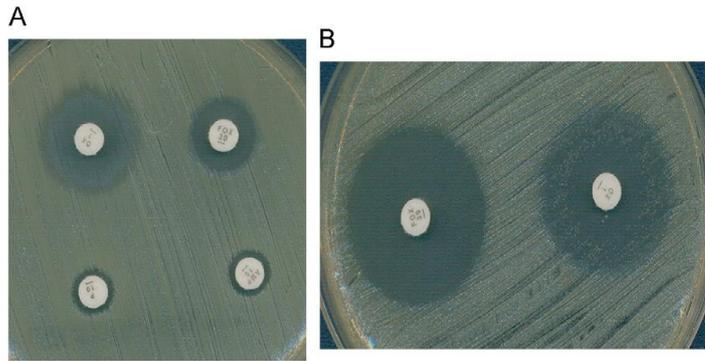


Figura 2. Cefoxitina como marcador de resistencia mediada por *mecA*. A) *S. aureus* con resistencia heterogénea a la oxacilina (*mecA*+); CMI oxacilina 4 mg/ml. Se observa resistencia a la cefoxitina. B) Borderline oxacillin-resistant *S. aureus* (BORSA) (*mecA*-); CMI oxacilina 4 mg/ml. Se observa sensibilidad a la cefoxitina. (Torres C y Cercenado E; 2010)

1.1.5.4. Bases Genéticas de la resistencia a la meticilina

Genéticamente, la diferencia de un SARM con un SASM es la presencia en el cromosoma bacteriano de un largo fragmento (40-60 kb) de ADN foráneo, al que se le conoce con el nombre de elemento o cassette *mec* (*Staphylococ calchromosome cassette mec*, *SCCmec*). El gen *mecA*, que codifica para una proteína de unión a penicilina de 75 KDa denominada PBP2a o PBP2', a la cual no se puede unir la meticilina, se encuentra en este elemento genético móvil conocido como cassette cromosómico (Chambers HF, 1997; Ito T y col., 2001) que se inserta en un sitio específico del cromosoma bacteriano *orfX* cerca del origen de replicación. Esta característica es de gran importancia porque le permite replicarse en forma temprana y transcribir los genes de resistencia importados (Grundmann H, y col., 2006).

El *SCCmec* tiene tres componentes genéticos esenciales: el complejo de genes *mec*, el complejo de genes *ccr* que codifica para recombinasas, y una región conocida como *J* (junkyard) (Jimenez-Quinceno N y Correa-Ochoa MM, 2009).

- El complejo *mec* está compuesto por el gen *mecA* y sus genes reguladores, *mecR1* y *mecI*, que pueden aparecer intactos o truncados en diferentes aislamientos. Cuando estos genes reguladores están intactos y son completamente funcionales

parece que confieren una mayor represión en la expresión de la PBP2a. El complejo *mec* contiene además el elemento de inserción *IS431mec*, al que se asocian a genes que codifican resistencia a antibióticos y al mercurio.

- El complejo *ccr* está compuesto por genes que codifican para recombinasas responsables de la movilización del *SSCmec*. Ellas median su integración y escisión del cromosoma (Zhang K y col., 2005). De la misma manera, para el complejo génico *ccr*, se han identificado ocho tipos diferentes (Figura 3): Tipo 1, *ccrA1-ccrB1*; Tipo 2, *ccrA2-ccrB2*; Tipo 3, *ccrA3-ccrB3*; Tipo 4, *ccrA4-ccrB4*; Tipo 5, *ccrC1*; Tipo 6, *ccrA5-ccrB3*; tipo 7, *ccrA1-ccrB6*; tipo 8, *ccrA1-ccrB3*.

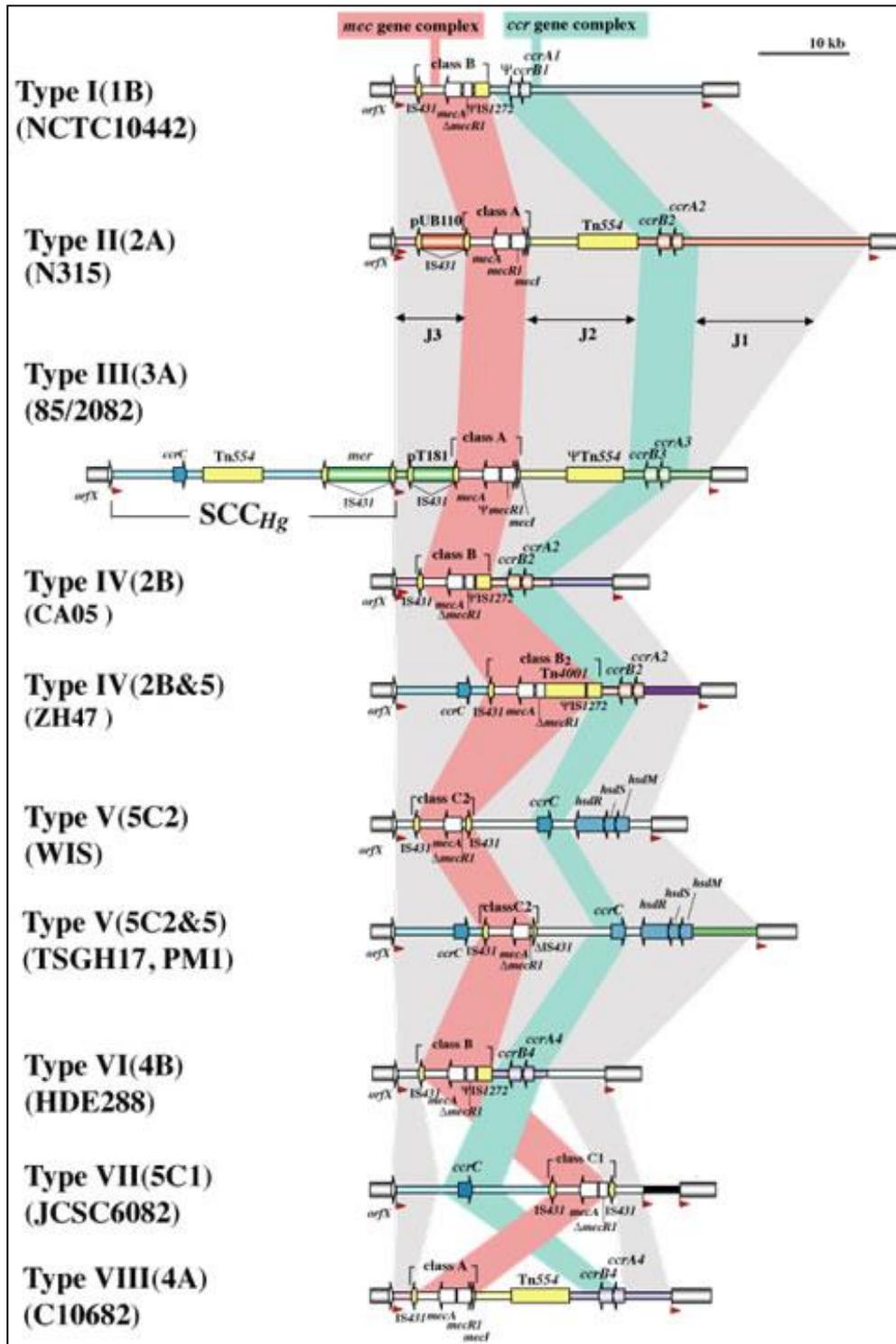


Figura 3: Tipos SCC_{mec} IWC SCC 2009 (International Working Group on the Staphylococcal Cassette Chromosome elements, IWG-SCC, 2009).

- El resto del cassette cromosómico contiene secuencias de la región J o Junkyard, que comprende tres fragmentos, J1, J2, J3; puede contener plásmidos o transposones portadores de genes de resistencia a antibióticos no betaláctámicos y a metales pesados.

El *SCCmec* no está restringido a la movilidad del gen *mecA* sino que posee elementos adicionales denominados *no mec* que contribuyen a la supervivencia y al potencial patogénico de la bacteria. Entre ellos se encuentran secuencias que codifican para resistencia a metales pesados como el mercurio (*SCCmer*), o al ácido fúcsídico (*SCC MSSA 476*), secuencias para la biosíntesis capsular (*SCCcap1*).

Se han descrito once variantes para *SCCmec* (Tabla 1) según las diferentes combinaciones de las clases del complejo *mec* con los diferentes tipos de complejo génico *ccr*. Además, variaciones en la región J, aún teniendo la misma combinación de complejos *ccr* y *mec*, definen los subtipos o variantes (International Working Group on the Staphylococcal Cassette Chromosome elements, *IWG-SCC, 2009*).

Tabla 1: Tipos de cassette *SCCmec* en función del tipo de complejo *mec* y complejo *ccr*. Según IWG-SCC 2009 (*International Working Group on the Staphylococcal Cassette Chromosome elements, IWG-SCC, 2009*).

<i>Tipos SCCmec</i>	<i>ccr</i> gene complexes	<i>mec</i> gene complexes	Strains
I	1 (A1B1)*	B	NCTC10442, COL
II	2 (A2B2)	A	N315, Mu50, Mu3, MRSA252, JH1, JH9
III	3 (A3B3)	A	85/2082
IV	2 (A2B2)	B	CA05, MW2, 8/6-3P, 81/108, 2314, cm11, JCSC4469, M03-68, E-MRSA-15, JCSC6668, JCSC6670
V	5 (C1)	C2	WIS(WBG8318), TSGH17, PM1,
VI	4 (A4B4)	B	HDE288
VII	5 (C1)	C1	JCSC6082
VIII	4 (A4B4)	A	C10682, BK20781
IX	1(A1B1)	C2	JCSC6943
X	7(A1B6)	C1	JCSC6945
XI	8(A1B3)	E	LGA251

* *ccr* gen o *ccr* gen en el *ccr* complex está indicado en paréntesis

* Otras denominaciones aceptadas

El *SCCmec* tipo I se diseminó en cepas de SARM aisladas a principios de la era antibiótica, en la década de los años 60, y a excepción del gen *mec*, no posee genes de resistencia adicionales (Hiramatsu K y col., 2001). Los *SCCmec* tipo II y III emergen en la década de los años 80 y son portadores de otros genes de resistencia accesorios. En ambos tipos de *SCC mec* se encuentra insertado el Tn554, aunque en diferentes lugares, el cual confiere resistencia a eritromicina y espectinomicina. Además, en ambos tipos hay integrados pequeños plásmidos movilizables entre secuencias de inserción IS431, ubicados corriente abajo del gen *mec* A. En el tipo II se

encuentra el plásmido pUB110 que confiere resistencia a tobramicina y bleomicina, mientras que en el tipo III se encuentra el plásmido pT181, que codifica resistencia a tetraciclina. Los *SCC mec* tipo IV y V, al igual que ocurriera con el *SCC mec* tipo I, no poseen genes de resistencia adicionales. A diferencia de los tipos I, II y III, detectados en cepas de SARM de origen hospitalario, los tipo IV y V se descubrieron en cepas de origen comunitario (Ma XX y col., 2002). El clon ST398 (tipo IV) (Kehrenberg C y col., 2009) causante de infecciones de origen comunitario tiene la característica de ser portador del gen *cfr* (chloramphenicol-florfenicol-resistance) que confiere resistencia a linezolid, ser multirresistente y ser resistente a las tetraciclinas; se ha asociado a ganado porcino.

En 2011 (Shore A y col., 2011; Loncaric I y col., 2013), describen un nuevo homólogo del *SCCmecA*, llamado *SCCmecC*, al que inicialmente se le designó como gen LGA251; tiene una homología del 70% con el gen *mecA* y está localizado en un nuevo cassette denominado *SCCmec* tipo XI. Estos aislados son resistentes a todos los betalactámicos pero sensibles a antibióticos no betalactámicos. Tanto la detección de la PBP2a como la detección del gen *mecA* por PCR son negativas (LGA251) (*mecC*) (Stegger M y col., 2012). Los complejos clonales CC130, CC 1943, CC705, CC425 se han descrito asociados a ganado bovino (García-Garrote F y col., 2014).

1.1.6. Epidemiología de la infección por *S.aureus*

1.1.6.1. Descripción de clones epidémicos

La meticilina se comercializa en Europa en 1959. Un año después en Inglaterra se detectan las primeras cepas SARM (Jevons MP, 1961) y en 1963 se describe el primer brote epidémico de infección nosocomial en el Reino Unido (Stewart GT y Holt RJ, 1963). Desde entonces se ha observado la diseminación de cepas SARM en muchos hospitales de diversos países, pudiendo documentarse varias ondas de diseminación global de diversos clones epidémicos. En los últimos años se produjo una

diseminación del SARM desde los grandes hospitales a otros con menor número de camas y de éstos a instituciones más pequeñas como geriátricos y centros de crónicos, hasta el punto que se ha convertido en una especie endémica en la mayoría de estos centros.

Se considera que un clon de SARM es epidémico cuando es capaz de producir brotes hospitalarios en un tiempo corto, en hospitales geográficamente distantes y se mantiene en dichos centros durante un periodo de varios años.

En un estudio llevado a cabo por Oliveira y col., publicado en 2001, se analizaron los genotipos a 3067 cepas de SARM aisladas en distintos países. Se concluyó que el 68% de los aislamientos podían englobarse en cinco clones denominados Ibérico (Domínguez MA y col., 1994), Brasileño (Aires de Sousa M y col., 1998), Húngaro (De Lencatre H y col., 1997), NewYork/Japón (Chung M y col., 2000) y Pediátrico (Sa-Leao R y col., 1999).

Otros clones pandémicos asociados a cepas SARM son el EMRSA-15 y EMRSA-16, ambos se caracterizan por ser sensibles a más grupos de antibióticos que los anteriores

1.1.6.2. Métodos de tipado para estudios epidemiológicos

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

Existen varios tipos de técnicas que se utilizan en la caracterización molecular de *S. aureus*.

Las técnicas fenotípicas están basadas en diferencias bioquímicas, antigénicas, lisogénicas o de sensibilidad antibiótica. El antibiotipo, análisis de los perfiles de resistencia antibiótica de diferentes cepas de *S. aureus*, es el método más empleado en la práctica diaria, pero en el caso de SARM y de otros patógenos multirresistentes, presenta un bajo poder de discriminación. La técnica del

fagotipado es menos utilizada por ser laboriosa y por las limitaciones de su poder discriminatorio.

Las técnicas genotípicas, basadas en la composición de ácidos nucleicos, alcanzan un mayor poder de discriminación que los métodos fenotípicos. Las más empleadas en *S. aureus* consisten en el análisis de los polimorfismos de los fragmentos de restricción mediante electroforesis en campo pulsante (RFLP-PFGE), el tipado de secuencias “Multilocus Sequence Typing” (MLST) el tipado del gen que codifica la proteína A (*spa typing*), y el estudio de perfiles de hibridación de múltiples secuencias (*microarrays*). De acuerdo con las recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), el método a elegir dependerá de la capacidad técnica del laboratorio y de la rapidez necesaria para resolver la situación epidemiológica (Fernández F y col., 2013).

1.1.6.2.1. Fagotipia

La fagotipificación es el sistema tradicional de tipificación. Se basa en el espectro de sensibilidad a bacteriófagos de cada tipo de *S. aureus*. Las variaciones en el espectro se deben a diferencias en los fagoreceptores en la pared de la bacteria. El set de fagos standard consta de varios grupos fágicos: 1, 2, 3, 4, y miscelánea, cada grupo incluyendo 5 fagos. El procedimiento en sí es simple, siendo lo más difícil el mantenimiento del set y la estandarización del test. Los fagos pueden tener un importante impacto en la expresión de factores de virulencia a través de mecanismos de conversión lisogénica, tanto positiva como negativa. En la positiva, la bacteria expresa los factores codificados por el genoma del profago, una vez se inserta en el cromosoma bacteriano. Por contra, la conversión lisogénica negativa ocurre cuando se produce la inactivación de genes bacterianos codificantes de factores de virulencia, al integrarse el ADN del fago dentro del cromosoma bacteriano. Esto último le ocurre por ejemplo a la β -hemolisina de *Staphylococcus aureus*. Sin embargo, aunque se produzca la pérdida de β -hemolisina durante la lisogenia, estos profagos contienen genes que codifican proteínas

inmunomoduladoras, como el SCIN (Inhibidor del Complemento Estafilocócico) y el CHIPS (Proteína Inhibidora de Quimiotaxis de *S.aureus*) (Van Wamel W y col., 2006). Bacteriófagos del grupo serotipo F se han descrito como mediadores de una simultánea triple conversión lisogénica, que aporta a *S. aureus* los genes codificantes de β -lisina, enterotoxina A y proteína Sak (Coleman DC y col., 1989). La toxina PVL también se encuentra codificada por un fago. De hecho, algunos autores se refieren a esta toxina como el fago-PVL (Kreienbuehl L y col., 2011). Recientemente se ha descrito al fago tipo 187 como portador de la toxinas TSST-1 y enterotoxina C (Piechowicz L y col., 2008).

1.1.6.2.2. Electroforesis de Campo Pulsado (PFGE)

La PFGE o macrorrestricción se basa en la digestión del ADN cromosómico bacteriano con enzimas de restricción de baja frecuencia de corte. Los fragmentos de ADN obtenidos, requieren para su separación técnicas de electroforesis en campo pulsante, en las que la orientación del campo eléctrico varía periódicamente (pulsos). De todos los sistemas desarrollados para este fin, el más extendido ha sido el CHEF (*clamped homogeneous electric field electrophoresis*) gracias a su capacidad para separar, simultáneamente, varias muestras en patrones de bandas rectos. Como resultado se obtienen patrones de restricción de ADN distribuido en pocas bandas, bien definidas, con movilidades electroforéticas distintas, lo que facilita el análisis y la comparación de múltiples aislados. Se utiliza, generalmente, la enzima *SmaI* que da lugar a fragmentos de entre 10 y 700pb.

La interpretación de los resultados de PFGE, se basa en los criterios propuestos por Tenover y colaboradores (Tenover FC y col., 1995), que analizan el grado de diferencia entre los patrones encontrados, para así establecer relaciones epidemiológicas. Los principales inconvenientes de esta técnica radican en la necesidad de un equipo caro, de uso exclusivo y en que se requieren varios días para su realización. Se añade la subjetividad de la interpretación de los patrones de

bandas, y la ausencia de normalización para cuantificar la distancia genética (Enright MC y col., 2000).

La reproducibilidad intra e interlaboratorio de esta técnica supuso un gran desafío (Murchan S y col., 2003). Los estudios multicéntricos que emplean el PFGE se realizan en la actualidad de acuerdo a directrices de estandarización de los pasos con mayor potencial de variabilidad, como la preparación de la muestra de ADN, la elección de la enzima de restricción y de los pulsos electroforéticos en función de los tamaños de fragmentos de ADN a separar. El análisis de los resultados se ha normalizado gracias al desarrollo de *softwares* específicos (Cookson BD y col., 2007).

Pese a ser considerando el método de referencia o “*gold standard*” para la mayoría de las bacterias clínicamente relevantes (Goering RV, 2007), en los últimos años se han desarrollado otras técnicas basadas en el análisis de secuencias.

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

Otro método de tipificación, *Multilocus Sequence Typing* (MLST), basado en la amplificación y secuenciación de fragmentos internos de siete genes esenciales, no ligados: carbamate kinasa (*arcC*), shikimate dehidrogenasa (*aroE*), glycerol kinasa (*glpF*), guanylate kinasa (*gmk*), phosphate acetyltransferasa (*pta*), triosephosphate isomerasa (*tpi*) y acetyl coenzyme A acetyltransferasa (*yqiL*). Su principal ventaja frente a PFGE es que, al utilizar secuencias, no da lugar a las ambigüedades en la interpretación que se pueden presentar con la PFGE. Además, es una técnica muy estandarizada y cuenta con un sitio web (<http://saureus.mlst.net/>) que contiene información de más de 1.500 aislamientos de humanos y animales procedentes de 40 países, lo que permite comparar las secuencias obtenidas con aquellas incluidas en la base de datos para obtener el perfil alélico. La MLST brinda información acerca del linaje de las cepas, lo que es muy importante para entender la epidemiología de

los SAMR. Esta técnica se recomienda realizar en estudios epidemiológicos amplios, en los que después de una PFGE inicial se seleccionan los aislados clonales para confirmación mediante MLST (Cookson B.D y col., 2007).

1.1.6.2.4. Tipificación mediante análisis de repeticiones spa (*spa* Typing)

Otro método basado en la secuenciación y también muy utilizado en estudios epidemiológicos, es el “*spa* typing” (*Staphylococcus protein A*). Consiste en secuenciar una región altamente polimórfica (región polimórfica X) del gen que codifica para la proteína A, un superantígeno de *S.aureus* (Aires de Sousa M y de Lencastre H, 2004; Shopsin B y col., 1999). El perfil de *spa* se identifica mediante un número que representa la sucesión de cada repetición individual de la región X (por ejemplo el *spa* t030 presenta una secuencia de repetición 15-12-16-02-24-24 y se corresponde con la secuencia ST239 en MLST), y también cuenta con una base de datos internacional para estandarizar la nomenclatura de los diferentes *spa*-tipos (<http://spaserver.ridom.de>).

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

1.2. Bacteriemia por *S.aureus*

1.2.1. Introducción

La bacteriemia se define como la presencia de bacterias en sangre; el término fungemia se utiliza para designar la presencia de hongos en la sangre (Loza E y col., 2003). Ambas son complicaciones graves de infecciones bacterianas y fúngicas. La invasión del torrente circulatorio por microorganismos puede producirse desde un foco infeccioso extravascular mediante el sistema linfático y directamente desde focos intravasculares (endocarditis, infecciones de catéteres intravasculares).

Las bacteriemias pueden presentar 3 patrones clínicos:

a. Bacteriemia transitoria: aquella que tiene lugar tras la manipulación de tejidos infectados (absceso, forúnculos, cirugía) o la instrumentación de superficies mucosas (endoscopias, cistoscopias, etc.) y dura de minutos a horas.

b. Bacteriemia intermitente o “de brecha”: aquella que se aclara y vuelve a recurrir. Es típica de infecciones cerradas como por ejemplo, los abscesos intraabdominales.

c. Bacteriemia continua: cuando los hemocultivos se mantienen positivos después de 48-96h horas de tratamiento adecuado, es característica de infecciones endovasculares (Reimer LG y col., 1997); es característica de las infecciones endovasculares como las endocarditis, tromboflebitis supurada, etc. El fracaso microbiológico durante y tras el tratamiento antimicrobiano de una bacteriemia, puede manifestarse como, una “bacteriemia persistente”, una “bacteriemia de brecha” o como una recidiva. Si la bacteriemia reaparece tras finalizar el tratamiento será una “recidiva” si se trata de la misma cepa que la primera bacteriemia, pero si son cepas diferentes estaremos ante una “reinfección”. Se conoce como bacteriemia “persistente” a la presencia de hemocultivos positivos a partir de las 48-96 horas de tratamiento adecuado (Reimer LG y col., 1997). La “bacteriemia de brecha” se define como la que ocurre durante un tratamiento

antimicrobiano apropiado y en la que unos hemocultivos previos son negativos. Se recomienda, debido a su valor pronóstico demostrado, obtener hemocultivos a las 48 y 96 horas del inicio de tratamiento en las bacteriemias por *Staphylococcus aureus*. En estos casos, la bacteriemia persistente se ha definido como la presencia de hemocultivos positivos a los 2 y 4 días de tratamiento adecuado para *S. aureus* sensible a meticilina (SAMS) y hasta 7 días de tratamiento adecuado cuando se trate de *S. aureus* resistente a meticilina (SAMR).

S.aureus fue el patógeno causante de bacteriemia más frecuente en EEUU (prevalencia del 26%) según los datos del “Antimicrobial Surveillance Program” y es la segunda causa en frecuencia de bacteriemia nosocomial en Europa (Biedenbach DJ y col., 2004). Además, a diferencia de la producida por otros patógenos, la bacteriemia por *S.aureus* (BSA) incrementa el tiempo y costes de hospitalización, y se asocia a una mayor morbilidad y mortalidad (Shorr AF y col, 2006; Wenzel RP y Edmond MD, 2001).

1.2.2. Epidemiología de la bacteriemia por *S.aureus*

La incidencia de bacteriemia varía de unos hospitales a otros en función de múltiples factores, sobre todo, de las características del hospital y de la población a la que atiende. Según datos publicados recientemente han demostrado que se ha producido un aumento en la incidencia de las bacteriemias en la última década. El estudio realizado por Rodríguez-Créixems M y col. en un hospital de gran tamaño en el año 2008 mostró una incidencia de 227,4 episodios por 100.000 habitantes, que aumentó en el año 2006 hasta 269,8 /100.000 habitantes.

El ***lugar de adquisición*** nos orienta sobre la etiología y, junto con el conocimiento de los patrones de sensibilidad antimicrobiana, determina la elección del tratamiento empírico.

- La bacteriemia adquirida en la comunidad (BAC) se define como aquella que se adquiere en la comunidad y es detectada en las primeras 48 horas de hospitalización (Friedman ND y col., 2002; Cisneros-Herreros JM y col., 2007).

- La bacteriemia nosocomial (BN) se define como aquella que se adquiere en el hospital, es decir no estaba presente, ni en incubación, antes del ingreso del paciente. En general, se manifiestan a partir de 48 horas tras el ingreso (Friedman ND y col., 2002; Wenzel RP, 2007). Las infecciones nosocomiales constituyen actualmente una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en las instituciones sanitarias, ocasionando un aumento importante del gasto sanitario (Correa L y Pittet D ,2000; Blot SI y col., 2005; Kilgore M y Brossette S, 2008).

- Como consecuencia de los cambios registrados en la asistencia sanitaria en los últimos años, se modificó la clasificación clásica del “*Centers for Diseases Control and Prevention*”(CDC) de EEUU y se propuso una tercera categoría epidemiológica, la bacteriemia relacionada con la atención sanitaria (BRAS) que incluyen aquellas bacteriemias no nosocomiales pero que ocurren en pacientes que no estando hospitalizados comparten características propias de la hospitalización como haber sido sometidos a una intervención quirúrgica o procedimiento invasivo, ingreso hospitalario previo en los 30 días anteriores, pacientes institucionalizados en centros médicos de pacientes crónicos, con contacto continuo ambulatorio o con el centro hospitalario como los pacientes onco-hematológicos, o pacientes en programa de hemodiálisis ambulatoria (Friedman NS y col., 2002).

Entre los **factores de riesgo** para tener una bacteriemia por *S.aureus* (BSA) destaca la colonización previa, la diabetes mellitus, la inmunosupresión, la presencia de hepatopatía crónica, la utilización de drogas por vía parenteral, la existencia de lesiones cutáneas, el ingreso hospitalario previo, hemodiálisis, estancia en UCI, presencia de diferentes cuerpos extraños (urológicos, protésicos, y fundamentalmente vasculares), (Tuazon CU y Sheagren JN, 1974; Quagliarello B y col., 2002; Wertheim HF y col., 2004; Maradona JA y col., 1992; Tacconelli E y col., 2004, Carnicer-pont D y col., 2004; Mitchell DH y Howden BP, 2005).

La presencia de un catéter venoso central se ha identificado como el factor de riesgo más importante para el desarrollo de BAS, principalmente en pacientes ingresados en UCI (Jensen AG y col., 1993), sin embargo, el aumento de la utilización de los catéteres vasculares periféricos ha tenido como consecuencia el aumento del número de complicaciones como la flebitis, la trombosis y la bacteriemia (Tagalakis V y col., 2002).

Las características de los pacientes influyen e las manifestaciones clínicas de la bacteriemia y en el pronóstico de la misma.

- En el caso de pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), *Staphylococcus aureus* es el agente más común en bacteriemias (Fichtenbaum CJ y col., 1995). Se estima que el 10% de los pacientes VIH positivo que ingresan en un hospital lo hacen por bacteriemia, siendo *S.aureus* el microorganismo aislado en el 31% de los casos, lo que supone una incidencia de 1.5 episodios por cada 100 personas-año.

- En cuanto a pacientes portadores de trasplante de órgano sólido, *Staphylococcus coagulasa negativo* supone casi el 40% de los casos de bacteriemia en los pacientes con trasplante hepático, oscilando el porcentaje de *Staphylococcus aureus* meticilin resistente entre el 45% en algunos hospitales americanos (Singh N y col., 2000) y el 4,2% en nuestro país (Torre-Cisneros J y col., 2002). En los casos de *Staphylococcus aureus*, el origen de la bacteriemia permanece desconocido en el 28% de los casos, siendo el catéter responsable del 14% de los casos, el foco abdominal del 21,4% y el pulmón del 14%.

- *S. aureus* supone entre el 7 y el 11% de los aislamientos en los hemocultivos en población oncológica, siendo el catéter la causa más frecuente de bacteriemia (Ghanem GA y col., 2007; Gonzalez-Barca E y col., 2001). Del 33 al 40% de los pacientes presentan complicaciones sépticas derivadas de la infección (Ghanem GA y col., 2007), de las que el 19% fueron intravasculares, siendo la más frecuente la tromboflebitis séptica (Raad II y col., 1992).

- Los pacientes en diálisis crónica presentan un riesgo especialmente elevado de presentar bacteriemia por *S. aureus*, con una incidencia anual del 4% (Kessler M y

col., 1993). La incidencia de bacteriemia por *S. aureus* en pacientes en hemodiálisis con catéter tunelizados varía entre el 0,6 y el 7,7 por cada 1000 catéteres-día (Jean G y col., 2002; Hoen B y col., 1998; Marr KA y col., 1997), más elevada que la debida a la cateterización de una fístula arteriovenosa permanente, que se sitúa entre el 0,2 y el 0,5 por cada 1000 catéteres-día. (Minnaganti VR y Cunha BA, 2001).

- En cuanto a los pacientes ADVP que sufren bacteriemia por *S.aureus*, la complicación más habitual es la endocarditis infecciosa. *S.aureus* es el agente del 70% de las endocarditis infecciosas de este subgrupo de pacientes. Característicamente la mortalidad es menor que en el resto de pacientes, oscilando entre el 2% y el 7% de los casos. (Chambers HF y col., 1983; Hecht SR y Berger M, 1992)

1.2.3. Características clínicas de las bacteriemias

En términos generales, la bacteriemia no se presenta con un cuadro clínico específico. Habitualmente se presenta con manifestaciones sistémicas como la fiebre y los escalofríos, a las que en ocasiones, se añaden síntomas y signos derivados del foco de origen y/ o de las metástasis sépticas. Esta falta de especificidad ha motivado el desarrollo de modelos clínicos predictores de bacteriemia (Bates DW y col., 1997; Lizarralde E y col., 2004). Algunas de las variables clínicas descritas como predictoras de bacteriemia son: el foco urinario, la temperatura igual o mayor de 38 °C, la neutrofilia y la velocidad de sedimentación globular igual o mayor de 70. También se han evaluado variables analíticas, como la procalcitonina, aunque su utilidad no se ha llegado demostrar completamente (Muñoz P y col., 2004). Recientemente, se ha estudiado la capacidad de predicción de bacteriemia de un programa informático (TREAT system) que además sería capaz de predecir la probabilidad de ésta estuviera causada por determinados patógenos (Paul M y col., 2006).

Se recomienda que se clasifique la gravedad clínica del paciente con sospecha de BSA en sepsis, sepsis grave y shock séptico. La invasión de las bacterias al torrente sanguíneo puede ocasionar una respuesta inflamatoria sistémica (RIS) que es lo que conoce como “sepsis”. El documento de consenso de 1992 (Bone RC y col., 1992) definió el síndrome de RIS (SRIS) como la presencia de al menos dos de los siguientes; temperatura $> 38^{\circ}\text{C}$ o $< 36^{\circ}\text{C}$; frecuencia cardíaca > 90 latidos por minuto; taquipnea y leucocitosis o leucopenia (Tabla 2). También se definió la sepsis grave como el SRIS asociado a la disfunción de algún órgano, signos de hipoperfusión o hipotensión; y finalmente el shock séptico como la sepsis con hipotensión que persiste a pesar de la reposición de volumen y precisa de drogas vasoactivas. Posteriormente se ha publicado otro nuevo documento de consenso en el que se actualizan estas definiciones (Levy MM y col., 2001). Una minoría de infecciones locales o de bacteriemias por *S.aureus* progresan a sepsis. Los factores de riesgo para la misma serían la edad avanzada, la inmunosupresión, la quimioterapia, y los procedimientos de diagnóstico invasivos. Diversos estudios han demostrado que la progresión a sepsis grave y shock séptico como consecuencia de una bacteriemia es mayor en los pacientes críticos, puede variar en función del origen de la bacteriemia y de los microorganismos causantes y además va asociada a un aumento de la mortalidad (Vallés J y col. 1997; Brun-Buisson C y col. 1996). Según estos mismos estudios, las bacteriemias secundarias a neumonías, infecciones abdominales y urinarias son las que se relacionan con mayor incidencia de sepsis severa.

Otra herramienta, el índice de Pitt (Tabla 3), calculado en base a la temperatura, estado mental y las funciones circulatoria y respiratoria del paciente, es útil para conocer el pronóstico de pacientes con bacteriemia (Paterson DL y col., 2004; Rodríguez-Baño J y col., 2003).

Tabla 2: Definición de Síndrome de Respuesta Inflamatoria sistêmica, sepsis, sepsis grave y shock séptico (Cisneros Herreros y col., 2007)

Definición de síndrome de respuesta inflamatoria sistêmica (SRIS)
<p>Presencia de alguno de las siguientes:</p> <p>Variables generales:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Temperatura > 38 °C o < 36 °C - Taquicardia (> 90 lat./min) - Taquipnea (> 20 resp./min) o hiperventilación (PaCO₂ < 32 mmHg) - Alteración del estado mental - Edemas significativos o balance hídrico positivo (> 20 ml/kg en 24 h) - Hiperglucemia (glucemia > 120 mg/dl en ausencia de diabetes mellitus) <p>Variables inflamatorias</p> <ul style="list-style-type: none"> - Leucocitosis (> 12.000/μl) - Leucopenia (< 4.000/μl) - Número de leucocitos normales con > 10% de células inmaduras - Proteína C reactiva en plasma > 2 desviaciones estándar (DE) del valor normal - Procalcitonina > 2 DE del valor normal <p>Variables hemodinámicas</p> <ul style="list-style-type: none"> - Hipotensión arterial (PA sistólica < 90 mmHg, PA media < 70, o descenso > 40 mmHg en adultos) - Saturación de oxígeno mixta venosa > 70% - Índice cardíaco > 3,5 l/min/m² <p>Otras variables de disfunción de órgano</p> <ul style="list-style-type: none"> - Hipoxemia arterial (PaO₂/FiO₂ < 300) - Oligoanuria aguda (diuresis < 0,5 ml/kg/h) - Aumento de creatinina > 0,5 mg/dl - Alteración de la coagulación (INR > 1,5 o TPTa > 60 s) - Íleo - Trombocitopenia (> 100.000) - Hiperbilirrubinemia (> 4 mg/dl) <p>Variables de perfusión tisular</p> <ul style="list-style-type: none"> - Hiperlactatemia > 1 mmol/l - Llenado capilar disminuido
Definición de sepsis
<p>Infección, documentada o sospechada y SRIS</p>
Definición de sepsis grave
<p>Sepsis asociada a algún dato de disfunción de órgano o alteraciones relacionadas con hipoperfusión de las siguientes:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Acidosis metabólica - Hipoxemia arterial (PaO₂ < 75 mm Hg o PaO₂/FiO₂ < 250) - Oliguria (< 0,03 l/h durante 3 h o < 0,7 l/h durante 24 h) - Coagulopatía (aumento en tiempo de protrombina o disminución de plaquetas del 50%, o < 100.000/μl) - Encefalopatía (cifra < 14 en la escala de Glasgow)
Definición de shock séptico
<p>Hipotensión persiste al menos 1 hora a pesar de la administración de fluidos, en asociación con signos de hipoperfusión o disfunción de órgano.</p>

Tabla 3: Índice de Pitt como predictor de mortalidad (Cisneros Herreros y col., 2007)

	Puntos
Temperatura	
35 o \geq 40 °C	2
35,1-36 °C o 39-39,9 °C	1
36,1-38,9 °C	0
Hipotensión	2
Hipotensión aguda con descenso de presión arterial (PA) sistólica y diastólica > 30 y 20 mmHg, respectivamente, o uso de agentes vasopresores, o PA sistólica < 90 mmHg	
Ventilación mecánica	2
Fracaso cardíaco	4
Estado mental	
Alerta	0
Desorientación	1
Estupor	2
Coma	4

Con respecto al **foco de origen**, gran parte de las bacteriemias estafilocócicas nosocomiales están en relación con la presencia de catéteres vasculares. (Steinberg JP y col., 1996; Fätkenheuer G y col., 2004). Inicialmente esta complicación aparecía fundamentalmente en pacientes ingresados en UCI debido a la mayor utilización de vías de acceso central. Sin embargo, el aumento exponencial de la utilización de catéteres vasculares periféricos en todos los países desarrollados ha tenido como consecuencia el aumento del número de complicaciones asociadas, siendo la más frecuente la flebitis, la trombosis y la bacteriemia. La tasa de complicaciones (24%) y la mortalidad global (15%) son mayores que en las bacteriemias no relacionadas con catéter.

En el medio nosocomial otros focos de bacteriemia son las infecciones del tracto urinario, sobre todo en portadores de sonda vesical, y las infecciones de piel y partes blandas en relación a úlceras de presión y la cirugía.

Las infecciones por *S.aureus*, supondrían el 28% de las infecciones del lecho quirúrgico (Giacometti A y col., 2000). Además, como causa de neumonía nosocomial ha aumentado en los últimos años desde el 19% de 1990 a 1996 (Lynch JP, 2001), hasta el 28% de las ocasiones (Hoban DJ y col., 2003).

Dentro de las comunitarias, la mayoría de las infecciones tienen la puerta de entrada en las lesiones o infecciones de piel y partes blandas. *S. aureus* supone menos del 10% de las neumonías, siendo más frecuente en pacientes mayores de 75 años, en relación con brotes de infección respiratoria por virus influenza, en diabéticos y en alcohólicos (Sethi S, 2002). Entre las infecciones de la comunidad son la primera causa de osteomielitis, entre el 50-70% de los casos, y una causa frecuente de bacteriemia (15-23%) y de endocarditis (suponiendo más del 38% de los casos sobre válvula nativa, el 69% de los casos en adictos a drogas por vía parenteral y el 21 y 20% respectivamente de los casos de endocarditis sobre válvula protésica precoz y tardía) (Moreillon P y Que YA, 2004; Sandre RM y Shafran SD, 1996; Sanabria TJ y col., 1990).

La osteomielitis hematógena del niño se manifiesta como un cuadro febril con dolor en la metafisis del hueso afecto con hemocultivos positivos en el 50% de los casos. La osteomielitis por contigüidad se produce como complicación de cirugía ortopédica o por traumatismo, cursando de manera subaguda con desarrollo de trayectos fistulosos. *S. aureus* es una causa frecuente de infección de prótesis articular, pudiendo manifestarse como un cuadro agudo con fiebre e inflamación local o como un cuadro indolente subagudo con aflojamiento del material protésico con desarrollo de luxaciones articulares.

Staphylococcus aureus es una de las causas más frecuentes de artritis aguda, siendo factores de riesgo para la misma la artritis reumatoide, la adicción a drogas por vía parenteral, los traumatismos penetrantes o la utilización sistémica o local de esteroides. (Domínguez-Luzón MA y Rodríguez-Baño J, 2006).

En un tercio de los casos se desconoce el origen de la bacteriemia (bacteriemia primaria), en éstas se aísla el microorganismo en el hemocultivo sin evidencia clínica de ningún foco de infección.

1.2.4. Complicaciones

Entre el 11 y el 53% de los pacientes con una bacteriemia por *Staphylococcus aureus* presentan algún tipo de complicación (Fatkenheuer G y col., 2004; Fowler VG y col., 2005; Ringberg H y col., 2000) lo que influye el manejo clínico de la bacteriemia.

Diferentes estudios prospectivos han tratado de identificar los factores predictores de complicaciones. Entre ellos, la adquisición comunitaria (Finkelstein R y col., 1984) se asocia a mayor riesgo de presentar metástasis sépticas; de igual modo la bacteriemia de foco desconocido se asocia a un mayor riesgo de desarrollo de metástasis sépticas y de endocarditis infecciosa (Finkelstein R y col., 1984; Van Hal SJ y col., 2005; Pigrau C y col., 2003). La presencia de cuerpos extraños, como son los catéteres de larga duración y la presencia de material protésico, es otro factor de riesgo para presentar una bacteriemia complicada. Los pacientes con algún tipo de inmunodepresión también tienen más riesgo de complicaciones, como ejemplo, en los pacientes con VIH se ha descrito mayor frecuencia de pericarditis purulenta o abscesos hepáticos (Gunnarsson G y col., 1994; Decker CF y Tuazon CU, 1994). Un retraso en el inicio de tratamiento de más de 45 horas se asoció a una mayor mortalidad y un mayor tiempo de hospitalización (Lodise TP y col., 2003). Igualmente, la duración óptima del tratamiento va estrechamente ligada a las presencia de complicaciones, fundamentalmente endocarditis (Fowler VG y col., 2003; Fätkenheuer G y col., 2004; Mitchell DH y Howden BP, 2005). Además, la posibilidad de complicaciones se incrementa con la duración de bacteriemia y el estado clínico del paciente y su comorbilidad.

Prácticamente cualquier estructura anatómica puede verse afectada secundariamente tras una bacteriemia por *Staphylococcus aureus*. El problema principal es la dificultad que conlleva en la práctica clínica el diagnóstico de las mismas; de hecho, la endocarditis queda infradiagnosticada en un 17-32% de las ocasiones como se ha demostrado en diferentes series autópsicas o mediante la utilización de ecocardiograma transesofágico (Figueiredo LT y col., 2001). Este hecho es similar al que se observa en los casos de osteomielitis vertebral o de

absceso epidural secundarios a una bacteriemia por *Staphylococcus aureus*, en las que el 61 y el 57%, respectivamente quedan sin diagnosticar durante el ingreso (Jensen AG y col., 1998; Danner RL y Hartman BJ, 1987). A continuación se detallan las principales complicaciones que pueden aparecer en relación a la BSA.

A) Recurrencia de la infección

Con un tratamiento correcto y a pesar de una aparente respuesta inicial adecuada, *S. aureus* tiene un elevado riesgo de recurrencia, que se sitúa en el 5- 17% (Chang FY y col., 2003a; Hartstein AI y col., 1992; Fowler VG y col., 2006). La recurrencia de la infección puede deberse a una reinfección o a la recidiva de una infección previa, siendo la recidiva más frecuente y más precoz (Chang FY y col., 2003; Fowler VG y col., 1999). En general, los factores de riesgo de recurrencia incluirían los siguientes: presencia previa de endocarditis (Small PM y Chambers HF, 1990; Korzeniowski O y Sande MA, 1982), complicaciones sépticas a distancia (Ehni WF y Reller LB, 1989; Markowitz N y col., 1992) y ciclos cortos de tratamiento antibiótico intravenoso (menores de 10 días) (Malanoski GJ y col., 1995; Raad II y Sabbagh MF, 1992a). Una duración no adecuada del tratamiento va estrechamente ligada a la presencia de complicaciones, especialmente endocarditis infecciosa.

B) Endocarditis infecciosa

La endocarditis infecciosa debida a *S. aureus* es una complicación frecuente de la bacteriemia, con una incidencia que varía según las series (Mylotte JM y col., 1987) afectando más frecuentemente a los casos de adquisición comunitaria (Jensen AG y col., 2002) y a los pacientes sin foco clínico evidente (Jensen AG, 2002). La utilización del ecocardiograma transesofágico permite incrementar el porcentaje de diagnósticos de endocarditis secundario a bacteriemia comparado con la utilización del ecocardiograma transtorácico.

Cuando la endocarditis complica la evolución de una bacteriemia por *Staphylococcus aureus*, ésta es más agresiva que la debida a otros microorganismos. En un estudio llevado a cabo en 194 pacientes con endocarditis infecciosa, la debida a *S. aureus* produjo más sepsis grave (39% frente a 6%), más fallo multiorgánico (29% frente al

10%), más eventos neurológicos adversos (18% frente al 8%) y mayor mortalidad (34% frente al 10%) (Nadji G y col., 2005).

La presencia de una válvula cardíaca protésica incrementa aún más el riesgo de presentar una bacteriemia complicada. Así, en presencia de una válvula protésica, la incidencia de endocarditis secundaria a una bacteriemia se sitúa en el 44-50% (El-Ahdab F y col., 2005). Este porcentaje es superponible al encontrado en un único estudio prospectivo con 33 pacientes portadores de marcapasos o desfibriladores (Chamis AL y col., 2001).

La complicación metastásica cardíaca por *Staphylococcus aureus* conlleva una mortalidad de entre el 20 y el 68%, especialmente entre pacientes no ADVP (Verhagen DW y col., 2003; Julander I, 1985).

En los pacientes ADVP, por el desarrollo de endocarditis derecha, tienen afectación pulmonar más frecuentemente. Cursan con dolor pleurítico y nódulos pulmonares múltiples con tendencia a la cavitación. La mortalidad, en estos casos, es inferior al 10%.

C) Infección Osteoarticular

La presencia de cualquier material protésico es un factor de riesgo independiente de recidiva tardía de la infección por *S. aureus* con un riesgo estimado 18 veces superior con respecto a aquellos pacientes que no tienen material extraño (OR: 18,2; IC del 95% de 7,6-43,6) (Fowler VG y col., 2003).

Por otra parte, cualquier material protésico infectado por *S. aureus* debe ser retirado siempre (Brandt CM y col., 1997), a pesar de que se han comunicado algunos resultados óptimos manteniendo prótesis ortopédicas infectadas en pacientes seleccionados (Zimmerli W y col., 1998).

En adultos, la osteomielitis hematógena por *Staphylococcus aureus*, que ha ido aumentando su incidencia en los últimos años, se localiza fundamentalmente a nivel de la columna vertebral como ya se ha explicado anteriormente (Espersen F y col., 1991). Se considera que son factores de riesgo para el padecimiento de la misma la edad avanzada, la adquisición comunitaria de la infección y la ausencia de un

foco clínico infeccioso evidente en la infección primaria (Espersen F y col., 1991). Típicamente, este grupo de pacientes presentan tasas de recurrencia de hasta el 35% (Jensen AG y col., 2002), muy superiores a las vistas en población general.

La artritis séptica es otra de las complicaciones asociadas a la bacteriemia por *S. aureus*, debido a que las articulaciones son una localización muy frecuente de infecciones por diseminación hematógena dado que la sinovial articular es un espacio muy vascularizado sin membrana basal. Generalmente afecta a una sola articulación, siendo más frecuente la implicación de la rodilla (Dubost JJ y col., 1993), aunque en los ADVP la localización puede ser más variada, afectando a articulaciones como la sacroilíaca y la esternoclavicular. Se considera que existe un riesgo aumentado de afectación articular en pacientes que reciben inmunosupresores, así como en casos de artritis reumatoide; en este último grupo, el 40% de las infecciones de prótesis articulares son debidas a *S. aureus* (Berbari EF y col., 2006).

D) Otras localizaciones metastásicas

Los abscesos esplénicos son infrecuentes y suelen cursar sin dolor abdominal ni esplenomegalia, debiendo ser sospechados en casos de fiebre o bacteriemia mantenida a pesar de un tratamiento correcto (Weinstein L, 1986).

La tromboflebitis es otra de las complicaciones derivadas de la bacteriemia por catéter. Cursa con fiebre, bacteriemia mantenida y con signos locales de infección.

La bacteriemia por *Staphylococcus aureus* también se puede complicar con una meningitis (Pintado V y col., 2002; Jensen AG y col., 1993), siendo la causa del 27-34% de las meningitis por *S. aureus*, por detrás de las debidas a procesos neuroquirúrgicos.

1.2.5. Diagnóstico de la bacteriemia. Hemocultivo

La detección de la bacteriemia, mediante la práctica del hemocultivo, constituye una de las prioridades del laboratorio de microbiología. Su importancia radica en

que permite establecer el diagnóstico etiológico de la bacteriemia, la identificación del microorganismo causal y el estudio de su sensibilidad a los antimicrobianos. Todo ello con la ventaja añadida de que no es una técnica costosa y su obtención no conlleva ningún riesgo para el paciente.

Los hemocultivos actualmente se introducen en sistemas automáticos que se basan en la detección del CO² que se produce en el crecimiento bacteriano. Además proporcionan información relativa al tiempo de positividad del frasco. Estos sistemas utilizan instrumentos que funcionan como incubadoras y un detector. Existen múltiples sistemas comercializados que han sido descritos ampliamente (Wilson ML y col., 1994). Las diferencias entre ellos radican en el mecanismo de detección de CO₂, en el tipo de medio de cultivo utilizado, en la capacidad de los frascos, en la frecuencia de lecturas y en la capacidad máxima de los incubadores (Horvath LL y col., 2004; Flayhart D y col., 2007; Fiori B y col., 2014).

Los microorganismos aislados en la sangre no siempre son los responsables del cuadro clínico del paciente, sino que pueden proceder de la contaminación de los hemocultivos. Por ello, un hemocultivo positivo no siempre representa una verdadera bacteriemia y la interpretación clínica es imprescindible para evitar tratamientos innecesarios como sería el caso del aislamiento de estafilococos coagulasa negativa o corinebacterias (Weinstein MP y cols, 1997; Weinstein MP, 2003; Hall KK y cols 2006). En cuanto al tiempo de positividad del hemocultivo también se ha evaluado como un dato para interpretar el significado de los hemocultivos positivos. En las bacteriemias por estafilococos coagulasa negativa (SCN) en el trabajo de Kassis C y col. en 2009, demostró que un tiempo de crecimiento inferior a 16 horas se correlacionaba con recuentos bacterianos altos y una sospecha clínica compatible con sepsis, por lo que orientaría a una bacteriemia verdadera. Por el contrario, tiempos de crecimiento superiores a 20 horas se correlacionaron con recuentos bajos de colonias (< de 10ufc/ml) e indicarían una posible contaminación. Marra AR y col. en 2006, publican un trabajo en el que concluyen que el tiempo de positividad del hemocultivo en las BSA puede considerarse predictor pronóstico de ésta. El tiempo de positividad también oriente

el diagnóstico de bacteriemia relacionada con un catéter intravascular cuando el hemocultivo extraído por el catéter tiene un tiempo de positividad igual o menor de 120 minutos respecto al hemocultivo de vía periférica.

Aunque los hemocultivos continúan siendo el método de referencia para el diagnóstico microbiológico de la bacteriemia, el tiempo necesario para la detección de crecimiento y la identificación del microorganismo supone en muchas ocasiones una demora en el inicio de la terapia antibiótica correcta. Con el objetivo de acortar este tiempo se han desarrollado técnicas de diagnóstico molecular. Las técnicas comercializadas hasta el momento son capaces de detectar múltiples bacterias y hongos causantes de sepsis. Desde hace varios años, son muchos los estudios que se están llevando a cabo para evaluar estas técnicas (Forrest GN y col., 2006; Molina JM y col., 2008). LightCycler® SeptiFast Test es una de las más estudiadas. Se trata de una técnica de amplificación de ácidos nucleicos *in vitro*, que puede detectar ADN de hasta 25 especies distintas de bacterias y hongos. Esta técnica ha mostrado muy buenas sensibilidades en todos los estudios que se han realizado, excepto en los casos de sospecha de endocarditis (Mancini N y col. 2010).

A pesar de las ventajas de esta tecnología, las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos tienen limitaciones importantes que hacen difícil por el momento su implantación en los laboratorios. En primer lugar, la presencia de ADN no siempre indica presencia de microorganismos viables en la sangre, además; la sensibilidad tan alta de estas técnicas hace que la tasa de falsos positivos por contaminaciones sea alta, y sobre todo no aporta información sobre la sensibilidad antimicrobiana (Mancini N y col., 2010). Por todo ello, no parece que de momento puedan reemplazar el hemocultivo.

1.2.6. Manejo terapéutico de las bacteriemias por *S.aureus*

El **tratamiento empírico** precoz y adecuado y la optimización del tratamiento antibiótico son unas de las claves para mejorar el pronóstico de las BAS. En los

últimos años, han surgido nuevos estudios en el ámbito clínico y experimental centrados en nuevas combinaciones de antibióticos con el objeto de mejorar el tratamiento y pronóstico de la bacteriemia y endocarditis infecciosa causada por *S.aureus* (Gudiol F y col., 2015).

El tratamiento empírico para bacteriemias por SAMS (BSAMS) sería en primer lugar una penicilina semisintética como la cloxacilina o una cefalosporina de primera generación (cefazolina) indicada potencialmente en pacientes en hemodiálisis. En algunos estudios se ha demostrado que las cefalosporinas de segunda o tercera generación o los betalactámicos asociados con inhibidores de betalactamasa se asocian a una mayor mortalidad (Paul M y col., 2011). Además, en otros estudios in vitro se ha demostrado una actividad disminuida de vancomicina sobre cepas SAMS en comparación con los betalactámicos (Small PM y Chambers HF. 1990; Fernández-Guerrero y De Górgolas M. 2006) y su uso se asocia a más frecuencia de complicaciones (Aguado JM y col., 2011). Sin embargo, a diferencia de la vancomicina, daptomicina muestra una eficacia similar a los pacientes tratados con cloxacilina (Fowler VG y col., 2006).

El tratamiento empírico para bacteriemias por SARM (BSARM) más frecuente en las últimas décadas se ha basado en el uso de vancomicina (Gemmell CG y col., 2006) sin embargo en un estudio randomizado que compara daptomicina con vancomicina queda demostrado que no hay diferencias. El aumento de CMI a vancomicina es un serio problema en la actualidad en relación con el tratamiento de infecciones por SARM, si ésta es $\geq 1.5 \mu\text{g/ml}$ (medida con Etest® (AB Biodisk, Solna, Sweden).), la daptomicina es la opción terapéutica más aconsejada. Incluso en cepas SAMS con CMI a vancomicina $\geq 1.5 \mu\text{g/ml}$ el pronóstico es peor aunque hayan sido tratadas con betalactámicos (Aguado JM y col., 2011).

El tratamiento empírico debe incluir, si es posible, una penicilina semisintética como cloxacilina. Si hay sospecha para tener una cepa SAMR se debe asociar un segundo antibiótico, como vancomicina. En caso de sepsis grave, o uso reciente de vancomicina (30 días previos) aumenta el riesgo de tener una CMI a vancomicina $\geq 1.5 \mu\text{g/ml}$, por lo que sería conveniente asociar daptomicina (Figura 4).

El tratamiento empírico en endocarditis protésicas y marcapasos incluye daptomicina más aminoglicosido (Gómez J y Gobernado M, 2013).

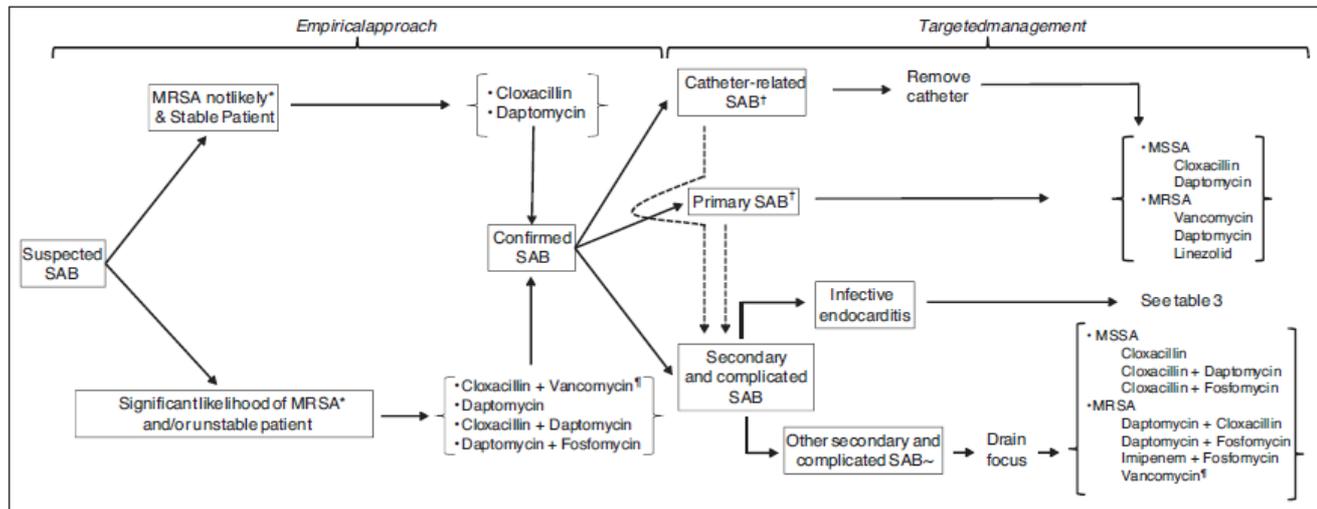


Figura 4. Esquema del manejo antibiótico empírico y dirigido en bacteriemias por *S.aureus* (Gudiol F y col., 2015).

El **tratamiento dirigido** de BSAMS debe realizarse con cloxacilina intravenosa y no con vancomicina por lo que se ha explicado anteriormente; en caso de pacientes en hemodiálisis se realizará con cefazolina. Si la CMI a vancomicina fuese ≥ 1.5 $\mu\text{g/ml}$ sería recomendable asociar daptomicina y cloxacilina o daptomicina y fosfomicina (Miro JM y col., 2012). Vancomicina o daptomicina puede sustituir a los betalactámicos en pacientes con historia clara de alergia a éstos (Gómez J y Gobernado M, 2013).

En los casos de BSARM, además de vancomicina existen otras opciones como teicoplanina, y daptomicina. Se están estudiando nuevas asociaciones como fosfomicina asociada a imipenem, aunque el mecanismo de sinergia de esta combinación aún no se ha dilucidado. (Del Río A y col., 2014)

Según los “Protocolos consensuados de tratamiento antibiótico 2013” del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, los casos de celulitis complicada en pie

diabético con sepsis grave e inestabilidad hemodinámica, el tratamiento empírico sería daptomicina o linezolid más un carbapenem. Tras mejoría clínica y/o documentación microbiológica se ha de valorar el tratamiento secuencial vía oral o intravenosa, en caso de SARM con linezolid vía oral (si osteomielitis añadir rifampicina) y en caso de SAMS con levofloxacino o trimetoprim.

Las infecciones graves de herida quirúrgica con factores de riesgo para SARM se pueden tratar con linezolid; en caso de sepsis grave e inestabilidad hemodinámica se tratarán con daptomicina.

Las infecciones del sistema nervioso central por SAMS requieren dosis elevadas de cloxacilina (2 gramos cada 4 horas iv) o vancomicina si es una cepa SARM. Linezolid alcanza buenas concentraciones en líquido cefalorraquídeo ya que tiene muy buena biodisponibilidad (80% de la concentración plásmática) por lo que es aceptable como tratamiento secuencial por vía oral para desescalar. (Gómez J y Gobernado M, 2013).

En la bacteriemia asociada a catéter vascular, en caso de SAMR, tras hemocultivos negativos y mejoría clínica, se puede pasar a linezolid por vía oral más rifampicina (Gómez J y Gobernado M, 2013).

En endocarditis sobre válvula natural, para SAMS, cloxacilina es el fármaco de elección sin ser preciso asociarla a aminoglicosidos; en caso de SARM los fármacos de elección serían vancomicina o daptomicina. Linezolid no está aceptado como una alternativa a los gluco-lipopéptidos en enfermos con endocarditis infecciosa por tratarse de un fármaco bacteriostático aunque hay experiencias anecdóticas en las que pudiera ser una alternativa (Gómez J y Gobernado M, 2013).

La **duración del tratamiento** dependerá de la existencia de bacteriemia complicada. En las no complicadas será de dos semanas y en las bacteriemias complicadas de cuatro a seis semanas.

En endocarditis se aconseja asociar un aminoglicosido durante los primeros 5-7 días. Si la endocarditis es izquierda se trata durante 4-6 semanas. La endocarditis derecha puede tratarse durante dos semanas. Si la endocarditis es sobre válvula protésica se

aconseja realizar sinergia con rifampicina debido a su actividad bactericida, su actividad intracelular y su capacidad de difusión en biocapas (Thwaites G y col., 2012).

Las infecciones osteoarticulares pueden tratarse durante 1-2 semanas con tratamiento intravenoso seguido de tratamiento oral durante dos a seis semanas. El tratamiento será más prolongado en caso de osteomielitis crónica y en la asociada a material protésico.

La duración del tratamiento en la celulitis complicada con sepsis grave en pie diabético será de dos a cuatro semanas teniendo en cuenta el tratamiento secuencial por vía oral.

Las infecciones del sistema nervioso central se tratarán durante cuatro a seis semanas

Además de la terapia antibiótica, nos apoyaremos en otras medidas como una evaluación clínica exhaustiva para determinar el foco de la bacteriemia y descartar metástasis sépticas; la retirada del catéter intravenoso o drenaje del absceso si éstos fuesen la causa de la bacteriemia; extraer nuevos hemocultivos después de 48-96 horas del comienzo del tratamiento adecuado; hacer un ecocardiograma transesofágico a todas las bacteriemias por *S.aureus*, sobre todo si están relacionadas con catéter, es controvertido (Soriano A y col., 2011) sin embargo en caso de bacteriemias complicadas, cuando hay sospecha de endocarditis infecciosa, paciente portador de válvula protésica, bacteriemia persistente después de 72 horas de tratamiento adecuado sí estaría indicado hacer un ecocardiograma para descartar endocarditis.

OBJETIVOS

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

JUSTIFICACIÓN

La bacteriemia por *Staphylococcus aureus* es una patología infecciosa de gran importancia por su morbimortalidad y prevalencia. Creemos que es de interés conocer la epidemiología y características microbiológicas y clínicas de estas bacteriemias en nuestro medio. El manejo clínico de la bacteriemia tiene implicaciones pronóstica por lo que es de interés evaluar las intervenciones dirigidas a mejorar la orientación diagnóstica y terapéutica .

Hemos considerado de interés conocer cómo es la epidemiología molecular de las cepas bacteriémicas de *S.aureus* para detectar posibles brotes comunitarios o nosocomiales y para realizar estudios epidemiológicos en un futuro.

OBJETIVOS

1. Describir las características microbiológicas de los aislamientos de *Staphylococcus aureus* en nuestro hospital.
2. Estudiar las características clínicas y epidemiológicas de las bacteriemias por *S.aureus*.
3. Estudiar la epidemiología molecular de las cepas bacteriémicas de *S.aureus* e identificar los diferentes clones y su estructura poblacional. Conocer la relación evolutiva y clonal de las diferentes cepas
4. Evaluar el tratamiento empírico administrado a los pacientes
5. Analizar las medidas clínicas orientadas al manejo adecuado del paciente con bacteriemia por *S.aureus*.
6. Estudiar la evolución de cada episodio de bacteriemia y evaluar el impacto del manejo clínico en cada caso según las intervenciones realizadas

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Características del hospital

El estudio se llevó a cabo en el Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca adscrito a la Universidad de Murcia. Es un hospital de tercer nivel con 873 camas, de las que 611 corresponden al Hospital General y el resto al Hospital Materno-Infantil. Atiende a una población aproximada de 450.000 personas. Es hospital de referencia de la Comunidad Autónoma de Murcia en determinadas especialidades como Neurocirugía, Unidad de Quemados, Cirugía Cardiovascular y Unidad de Trasplantes.

3.2. Tipo y periodo de estudio

Se trata de un estudio retrospectivo y observacional de pacientes con bacteriemia por *Staphylococcus aureus* atendidos en el Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia durante un periodo de dos años (2012 y 2013). Se realizó un estudio clínico en el que se recogieron diferentes variables y un estudio microbiológico y molecular de los aislamientos clínicos de *S. aureus*. Éste último fue realizado en el Instituto de Salud Carlos III de Madrid (Área de Infecciones Intrahospitalarias).

Para realizar éste, las cepas fueron recuperadas del cepario existente en el Servicio de Microbiología. Tras su descongelación, se realizó una siembra en medio agar Müller-Hinton 2 (bioMérieux, La Balme Les Grottes, France) y las placas se incubaron en atmósfera aerobia a 37°C durante 24 h. Una vez crecidas y, tras comprobar la pureza del inóculo, se procedió a la creación de un nuevo archivo de cepas en criotubos, con 250 µl de leche convencional esterilizada y unas 3-4 colonias del microorganismo. A partir de este nuevo cepario se recuperaron los aislamientos para realizar las diferentes técnicas moleculares.

3.3. Estudio microbiológico

3.3.1. Procesamiento de hemocultivos

Los hemocultivos se procesaron con el sistema automático de monitorización continua BacT/Alert (bioMerieux® La Balme Les Grottes, France) (Wilson ML y col., 1994; Horvath LL y col., 2004; Flayhart D y col., 2007) siguiendo los protocolos del Servicio de Microbiología. Este sistema proporciona información acerca del tiempo de positividad cada frasco, dato que puede orientar en la interpretación del significado de los hemocultivos positivos y también ayuda en el diagnóstico de bacteriemia relacionada con un catéter intravascular cuando el hemocultivo extraído por el catéter tiene un tiempo de positividad igual o menor de 120 minutos respecto al hemocultivo de vía periférica.

Tras la detección de crecimiento por el sistema automatizado y posterior subcultivo en medios sólidos, la identificación de *S.aureus* se realizó por la presencia en las placas de Agar sangre (bioMerieux® La Balme Les Grottes, France) y, tras 24 horas de incubación a 37°C, de colonias características, formadas por cocos gram positivos, catalasa y coagulasa positivas. Con esta identificación presuntiva se emitió un informe preliminar verbal al médico responsable del paciente y se escribió una nota en la historia clínica electrónica. La identificación definitiva se realizó mediante el sistema automatizado Vitek2 (bioMerieux®) con las tarjetas GP (Gram Positivos).

3.3.2. Detección de PBP2a mediante inmunocromatografía

A cada aislamiento de *S. aureus* se le realizó la detección de la proteína PBP2a con el fin de determinar de forma rápida la sensibilidad a meticilina. Para ello se utilizó un inmunoanálisis cromatográfico cualitativo (Alere®- Alere™ PBP2a Culture colony).

El proceso se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Las colonias se eluyeron en un tubo de ensayo que contiene el reactivo 1, que es solución alcalina azul transparente. A continuación, se añadió el reactivo 2, que es una solución

transparente y ligeramente ácida que contiene ácido sódico, tampón y proteínas. Se colocó la tira reactiva en el tubo de ensayo. La tira contiene una membrana de nitrocelulosa donde se inmovilizan los anticuerpos monoclonales y un anticuerpo de control en forma de dos líneas diferenciadas que se combinan con una almohadilla de muestra, una almohadilla azul con el conjugado y una almohadilla absorbente. Los resultados son visibles en 5 minutos. La aparición de una línea azul en la posición “línea de control” se puede considerar un control positivo interno, y debe estar siempre presente. En comparación con la línea de control, el fondo de la tira debe ser blanco en 5 minutos. En cuanto a la interpretación del resultado, en las muestras negativas, sólo aparece la línea de control azul. Cuando se trata de una muestra positiva, aparece además una segunda línea azul en la mitad inferior de la tira reactiva (Figura 5). Según la ficha técnica, la sensibilidad es de 99.0%; especificidad: 98.8%; valor predictivo negativo: 99.6% y valor predictivo positivo: 98.6%.



Figura 5: Test dePBP2a mediante inmunocromatografía

3.3.3. Estudio de sensibilidad antibiótica

Para estudiar la sensibilidad antibiótica definitiva se utilizó la tarjeta AST-588 del sistema semiautomatizado Vitek 2® (Biomerieux), que incluye los siguientes antibióticos: bencilpenicilina, oxacilina, gentamicina, tobramicina, levofloxacino, eritromicina, clindamicina, quinupristina / dalfopristina, linezolid, teicoplanina, vancomicina, tigeciclina, fosfomicina, rifampicina, y trimetoprim /sulfametoxazol. La interpretación de los resultados se realizó siguiendo las recomendaciones del CLSI (National Committee for Clinical Laboratory Standards).

Adicionalmente, y para comprobar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de algunos antibióticos (tigeciclina, vancomicina, daptomicina y linezolid) se realizó el método E-test®(AB Biodisk, Solna, Sweden). Para ello, se preparó una suspensión del microorganismo en solución salina estéril ajustándose la concentración hasta conseguir una turbidez del 0,5 de la escala de Mc.Farland y se sembró en una placa de 15 cm de diámetro de medio MH, en la que se dispusieron en forma de cruz las tiras de E-test correspondientes a los cuatro antibióticos (Figura 6). Se incubó 24h a 37°C, y se realizó la lectura determinándose la CMI para cada antibiótico (Fig.16).



Figura 6: E-test® de vancomicina, tigeciclina, daptomicina y linezolid.

Para determinar la posible asociación de resistencia a macrólidos con resistencia a lincosaminas (clindamicina) -resistencia inducible- se realizó el método de difusión con discos de eritromicina y clindamicina. Con la suspensión bacteriana ajustada al

0,5 de la escala de MCFarland se realizó la siembra en una placa de Mueller Hinton. Sobre ella se depositaron un disco de eritromicina de 15 µg y otro de clindamicina de 2 µg , colocados a una distancia de 15-20 mm. La lectura se realizó tras incubación a temperatura de 35º-37ºC durante 16-18 h en atmósfera aerobia. Se observó la presencia de achatamiento del halo de la clindamicina en el borde enfrentado a eritromicina (D-test). La presencia de este achatamiento indica resistencia inducible.

3.4. Técnica de Fagotipificación

3.4.1. Propagación del Juego internacional de Fagos

La fagotipificación se llevó a cabo en el Laboratorio de Infección Intrahospitalaria del Centro Nacional de Microbiología (Instituto de Salud Carlos III – Majadahonda), utilizando el Juego Internacional de Fagos (Blair JE y Williams REO, 1961).

Los fagos que se utilizaron en este estudio fueron propagados a partir del juego básico suministrado por el Laboratorio Internacional de Referencia de Fagotipificación de *S. aureus* de Colindale ("*Central Public Health Laboratory*", Londres), que consta de 23 fagos como se refleja en la Tabla 4.

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

Tabla 4. Juego Internacional de Fagos

Fagogrupo	Fagos				
I	29	52	52A	79	80
II	3A	3C	55	71	
III	6	42E	47	53	54
	75	77	83A	84	85
V	94	96			
Sin agrupar	95	81			

3.4.2. Determinación del “Routine Test Dilution” (RTD)

Antes de realizar la propagación de un fago, se determinó su RTD (“*Routine Test Dilution*”) titulándolo sobre su cepa propagadora. Para ello, se añadió un cultivo de caldo de la cepa propagadora sobre una placa de agar común 1.1, retirando el exceso de líquido con una pipeta *Pasteur*. Sobre la superficie de la placa de agar, ya inoculada y seca, se añadieron gotas de diluciones crecientes del fago a titular, desde 10^{-1} hasta 10^{-7} . Tras incubación durante 18 horas a 30°C se observó la presencia de placas de lisis (Figura 7), considerando como RTD la máxima dilución capaz de producir lisis confluyente.

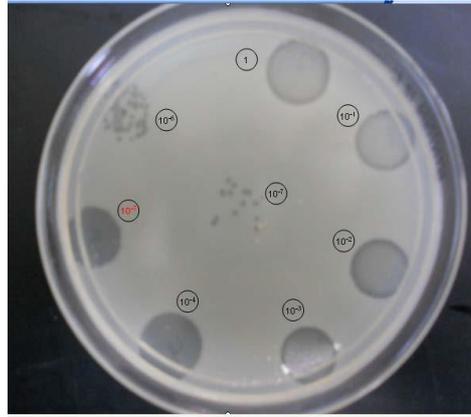


Figura 7. Determinación del RTD. En este caso el RTD resultó ser la dilución 1×10^{-5}

3.4.3. Propagación en medio sólido

La propagación en medio sólido se realizó mediante el método de agar semisólido descrito por Swanstrom M y Adams MH (1951). Se calentó el tubo de agar semisólido distribuido en 6 ml para fundirlo, dejándolo enfriar a 45°C. Se añadieron entonces:

- 0,6 ml de un cultivo en caldo común de la cepa propagadora crecido a 37°C durante 4 horas en agitación.
- 0,6 ml de fago diluido a su RTD.
- 0,25 ml de cloruro cálcico al 1% (w/v).

Sobre una placa de agar común 1.1 de 15 cm de diámetro se añadió el agar semisólido que contenía la mezcla del fago y de la cepa propagadora en proporciones equilibradas, para que se produjera una lisis semiconfluente. Se incubó durante 18 horas a 30°C y se recogió el fago contenido en la sobrecapa añadiendo 15 ml de caldo común a la placa por medio de una pipeta *Pasteur* doblada en ángulo recto. Esta suspensión se centrifugó a 5 000 rpm durante una hora y el sobrenadante se recogió y filtró a través de una membrana de 0,22 μm .

Por último, se realizó una nueva titulación sobre la cepa propagadora y se desecharon aquellos fagos cuyo título no era elevado. Una parte se conservó a 4°C hasta su uso y otra parte se liofilizó y congeló a -70°C.

3.4.4. Espectro lítico

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

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

Los valores del espectro lítico de cada fago se compararon con los ya conocidos desechándose aquellos cuyo espectro no coincidía (De Saxe MJ y Notley CM, 1979).

Una vez obtenido el concentrado del fago en las condiciones mencionadas se prepararon las diluciones del RTD y 100xRTD para hacer la fagotipificación, reponiéndose periódicamente en previsión de una posible pérdida del título.

3.4.5. Fagotipificación

3.4.5.1. Realización

Cada aislado se inoculó en un tubo de caldo común a partir de un cultivo puro y se incubó en agitación, a 37°C durante 4 horas. Una vez crecidos los cultivos líquidos, se sembraron por inundación en placas de agar común 1.1 secadas previamente a 37°C durante al menos 2 horas. Se retiró el exceso de líquido con una pipeta *Pasteur* y se dejaron secar las placas, destapadas y boca arriba, entre 15 y 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación en cada placa se aplicó una gota de 25µl de

cada uno de los fagos (dilución 100X RTD). Cuando las gotas estuvieron secas, se taparon las placas, se incubaron a 37°C durante 18 horas y se procedió a su lectura.

3.4.5.2. Lectura de resultados

Se realizó siguiendo el criterio de lisis confluyente (CI) (Figura 8):

- CI: ++: >50 placas de lisis
- CI: +: entre 20 y 50 placas de lisis, y
- CI: + -: <20 placas de lisis

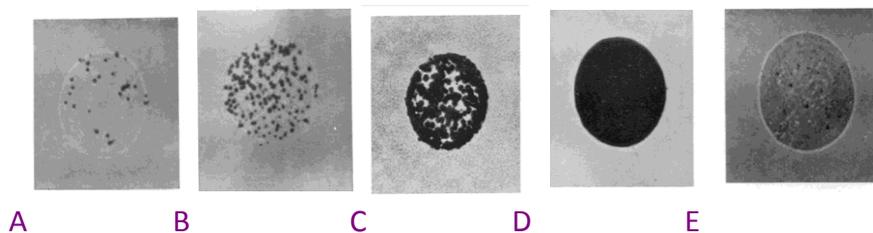


Figura 8: Lectura de resultados en fagotipía: A: +, B: +, C: ++, D: CI, E: crecimiento secundario en el área de la lisis confluyente, con la consiguiente placa secundaria (*Williams REO y Rippon JE, 1952*)

3.4.5.3. Interpretación de resultados

Siguiendo las directrices mostradas en la Tabla 4, a cada aislado se le asignó un fagogrupo, del I a IV, en función del perfil de fagos que le hayan provocado placas de lisis (cada uno de estos recibe el nombre de “fagotipo”). Se definirán como “No Tipables” (NT) aquellos en los que no se obtenga lisis con ningún fago. Los aislados que muestren lisis con los fagos 95 u 81, no se asignan a ningún fagogrupo, quedando simplemente como fagotipos de ese número. Aquellos que muestren simultáneamente perfiles compatibles con los fagogramos I y III, se interpretan como “Fagogrupo Mixto”, y aquellos que presenten un perfil de fagotipos del grupo III, además del 81, se clasifican como “III/81”. En la Figura 9 se muestra un ejemplo.

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

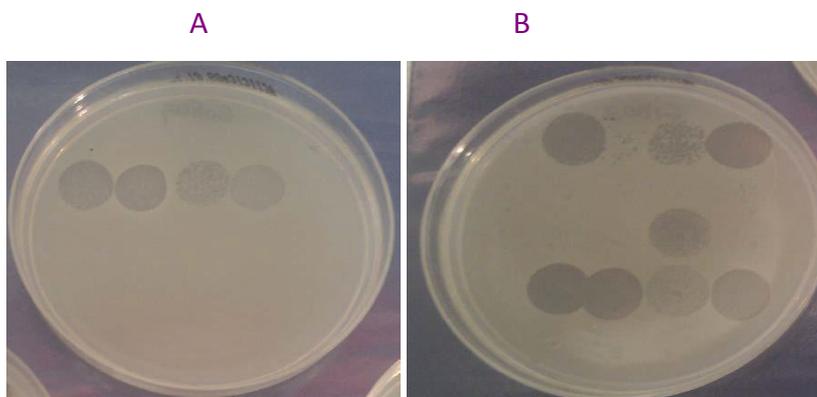


Figura 9. Ejemplos de fagotipaje: A) Aislado fagotipo I; B) Aislado fagotipo MIXTO (I y III)

3.4.5.4. Controles

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

3.4.5.5. Fagotipificación Inversa

La técnica se realizó según el método de Saxe MJ y Notley CM (1979) por inducción de los profagos o fagos lisogénicos de los estafilococos con mitomicina C.

Cada cepa problema se hizo crecer en un caldo común durante 18 horas. A partir del cultivo se hizo una dilución 1/3 con caldo común y se incubó a 37°C durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se añadió mitomicina C para obtener una concentración final de 0,5 µg/ml y se incubó nuevamente en baño a 37°C durante media hora. A continuación se centrifugó a 5 000 rpm durante 15 minutos y se desechó el sobrenadante. Se resuspendió el sedimento en 2 ml de caldo común y se incubó 90 minutos en baño a 37°C. Para permitir la liberación de los fagos de los restos bacterianos, se centrifugó nuevamente a 5 000 rpm durante 15 minutos y se recogió el sobrenadante, que presumiblemente contenía los fagos inducidos.

A partir de este momento, se procedió de igual modo que en la fagotipificación directa, utilizando estos inducidos como supuestos fagos y estudiando los patrones de lisis que produjeron sobre las cepas propagadoras del juego y las siguientes cepas polivalentes: W57, 1030, 2009 y 18042. La lectura se realizó siguiendo los mismos criterios que en la fagotipificación directa.

3.5. Estudio molecular

3.5.1. Preparación del extracto de ADN total y reconstitución de los *primers*

3.5.1.1. Extracción de ADN

El primer paso, común para la realización de todas las técnicas de PCR utilizadas en este trabajo, fue la extracción de ADN.

Esta fase, previa al análisis, tiene por objeto liberar el material genético de la bacteria, mediante la ruptura de su membrana plasmática y posterior degradación de restos celulares que podrían interferir en la determinación.

Para ello, tras descongelar las cepas de estafilococos y, partiendo de un cultivo de 24 horas de incubación, se resuspendieron las colonias con un asa de cultivo en 100 μ l de una solución de extracción (EDTA 0,1M; Tris-Hcl 1M pH 7,5, Lisostafina 0,4 μ l).

Posteriormente se aplicó un tratamiento térmico (30 minutos a 37°C y 10 minutos a 100°C). A continuación, se centrifugó y recogió el sobrenadante que contenía el ADN bacteriano.

3.5.1.2. Reconstitución de *primers*

Es un proceso común a todas las técnicas de PCR utilizadas en este trabajo. A cada iniciador liofilizado se añadió un volumen de agua (en μ l) igual al valor numérico de su masa (en μ g). De esta manera todos los iniciadores reconstituidos presentaron una concentración inicial de 1 μ g/ μ l (w/v), equivalente a 1/Pm μ mol/ μ l en términos de molaridad.

3.5.2. Detección del gen *mecA* y los genes *Luk-PV-1* y *Luk-PV-2* por PCR *multiplex* (MPCR)

A los 21 aislados que presentaron resistencia a meticilina (SARM) se les detectó el gen estructural para la proteína 2a fijadora de penicilina (*mecA*) y el gen codificante de la leucocidina de Pantón Valentine (LPV).

La resistencia a meticilina (oxacilina) en estafilococos está codificada por el gen *mecA*. Su detección mediante técnicas moleculares es fundamental a la hora de determinar el patrón de resistencia de las cepas de estafilococos a penicilinas, cefalosporinas y carbapenemas, lo cual condicionará el tratamiento de las infecciones que puedan provocar estos microorganismos.

El método que se utilizó para llevar a cabo la detección del gen *mecA* fue la amplificación específica por una “Reacción en Cadena de la Polimerasa *multiplex*” (MPCR) de la región del genoma de estafilococos que contiene este gen *mecA*, cuyo tamaño aproximado es de 310 pares de bases, y codifica la proteína PBP2a. Además, en esta MPCR se detectó el gen codificante de la PVL (*Luk-PV-1* y *Luk-PV-2*) originando la amplificación de un fragmento de 433 pb. A modo de control, se introdujeron cebadores para amplificar una secuencia específica de *S.aureus* (*sau*), que da lugar al producto amplificado más pequeño con únicamente 107 pb.

3.5.2.1. PCR *multiplex* (MPCR)

Para la amplificación de los genes citados se añadió a 3 µl de cada uno de los extractos de ADN de las cepas, 12,5 µl de la mezcla de reacción Econotaq-Plus (Lucigen®) (“*Master Mix*”) en un volumen final de 25µl.

La secuencia nucleotídica de los iniciadores (“*primers*”) utilizados para la amplificación del gen *mecA*, de los utilizados como control interno (*sau 1* y *sau 2*) y de la Leucocidina de Pantón Valentine (*Luk-PV-1* y *Luk-PV-2*) aparece reflejada en la Tabla 5. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización a 94°C (5

minutos), 30 ciclos de 94°C (30 segundos), 55°C (30 segundos) y 72°C (1 min) y una extensión final a 72°C (7 minutos).

Tabla 5. Secuencia de iniciadores (“primers”)

Gen	Oligonucleótido (secuencia 5'→3')	Tamaño amplificado (pb)
<i>mecA</i>	<i>mecA1</i> GTAGAA ATG ACT GAACGT CCGATAA	310
	<i>mecA2</i> CCAATTCCACATTGTTTCGGTCTAA	
Control interno	<i>Sau-1</i> GGAATTGAAAKGAATTGACGGGGG C	107
	<i>Sau-2</i> CGGGATCCCAGGCCCGGGAACGTATTAC	
PVL	<i>Luk-PV-1</i> ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA	433
	<i>Luk-PV-2</i> GATCAASTGTATTGGATAGCAAAAAGC	

(Geha DJ y col., 1994; Strommenger B y col., 2003; Adler A y col., 1999)

La visualización de los productos de PCR se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% (w/v) en *buffer* TAE (Tris-HCl/Ac. Acético glacial/EDTA) a una concentración 1x .

Cada muestra se preparó añadiendo 2 µL de tampón de carga en el tubo de reacción de PCR y se cargaron en los pocillos (10 µL).

Tras aplicar un campo eléctrico (70-80 V) se realizó la tinción con bromuro de etidio (100µl en 1 litro de agua) durante 30 minutos y se visualizó con luz ultravioleta en un transiluminador.

3.5.3. Caracterización del *Staphylococcal Chromosome Cassette* mediante PCR

La tipificación del cassette SCC*mec* (*Staphylococcal Chromosome Cassette*) se realizó mediante una PCR *multiplex* (MPCR) según describió el grupo de Oliveira DC y De Lancastre H en 2002 que permite de manera rápida una tipificación genómica de

aislados de SARM, basada en las características estructurales diferenciales de los diferentes tipos de cassette *SCCmec*, previamente descritos hasta entonces: I (34 kb), II (52 kb), III (66 kb) y IV (20-24 kb) encontrándose éste último relacionado con infecciones por SARM adquiridas en la comunidad (Ma XX y col., 2002; Oliveira DC y col., 2001).

Basándose en la combinación del complejo de genes *mec* y complejo de genes *ccr*, actualmente los elementos *SCCmec* han sido clasificados en once tipos I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, y XI (García-Garrote F y col., 2014). La caracterización del *SCCmec* IX se realizó según el protocolo descrito Shore y col. en 2011.

El tipo de *SCCmec* se determinó aplicando una MPCR con la que se obtiene un patrón de amplificación específico para cada uno de los tipos estructurales existentes para *SCCmec*. Dicha MPCR permite la identificación de los *SCCmec* tipo I, II, III, y IV, así como las variantes IA y IIIA, basándose en la amplificación de 8 loci (denominados A, B, C, D, E, F, G, y H), con cebadores seleccionados en base a las secuencias de los elementos *mec* previamente descritos (Ito T y col., 1999; Ito T y col., 2001). Para la elección de estos 8 loci, los autores siguieron tres criterios. Los dos primeros consistieron en la inclusión para cada tipo de *SCCmec* de un locus localizado corriente arriba del gen *mecA* y un segundo locus localizado corriente abajo del *mecA*. El tercer criterio fue la selección de un locus exclusivo en cada uno de los tipos de *SCCmec*. Adicionalmente, se incluye en el protocolo el *meca* como control positivo interno. El locus A se localiza corriente arriba del gen *pls* y es específico del *SCCmec* tipo I; el locus B se sitúa en el interior del operón *kdp*, el cual es específico del *SCCmec* tipo II; el locus C se sitúa en el interior del gen *mecI* presente en los *SCCmec* tipo II y III; el locus D se encuentra en el interior de la región *dcs*, presente en los *SCCmec* tipo I, II y IV; el locus E se localiza en la región entre el plásmido integrado *pl258* y el transposón *Tn554*, específico para el *SCCmec* tipo III; el locus F, que también es específico del *SCCmec* tipo III, se localiza en la región entre *Tn554* y la unión cromosómica derecha (*orfX*). Los loci G y H se incluyeron para distinguir las variantes estructurales IA y IIIA, respectivamente. El locus G es la

unión izquierda entre *IS431* y *pUB110*, y el locus H es la unión izquierda entre *IS431* y *pT181*. Los fragmentos van de 162 a 495pb, diferenciándose al menos en 40pb, lo que permite distinguir a cada uno de ellos (Oliveira DC y de Lencastre H, 2002) (Tabla 6).

Tabla 6. Primers utilizados para la amplificación de cada locus, el tamaño del fragmento amplificado, y la correspondencia con el tipo de SCCmec (Oliveira DC y de Lencastre H, 2002)

<i>Locus</i>	Iniciador	Secuencia de los oligonucleótidos (5'-3')	Tamaño del amplicón (bp)	Tipo de SCCmec
A	CIF2 F2	TTCGAGTTGCTGATGAAGAAGG	495	I
	CIF2 R2	ATTTACCACAAGGACTACCAGC		
B	KDP F1	AATCATCTGCCATTGGTGATGC	284	II
	KDP R1	CGAATGAAGTGAAAGAAAGTGG		
C	MECI P2	ATCAAGACTTGCATTACAGGC	209	II, III
	MECI P3	GCGGTTTCAATCACTTGTC		
D	DCS F2	CATCCTATGATAGCTTGGTC	342	I, II, IV
	DCS R1	CTAAATCATAGCCATGACCG		
E	RIF4 F3	GTGATTGTTCGAGATATGTGG	243	III
	RIF4 R9	CGCTTTATCTGTATCTATCGC		
F	RIF5 F10	TTCTTAAGTACACGCTGAATCG	414	III
	RIF5 R13	GTCACAGTAATCCATCAATGC		
G	IS431 P4	CAGGTCTCTTCAGATCTACG	381	
	pUB110 R1	GAGCCATAAACACCAATAGCC		
H	IS431 P4	CAGGTCTCTTCAGATCTACG	303	
	pT181 R1	GAAGAATGGGGAAAGCTTCAC		
mecA	MECA P4	TCCAGATTACAACCTCACCAGG	162	Control interno
	MECA P7	CCACTTCATATCTTGTAACG		

3.5.3.2. PCR *Multiplex* (MPCR)

La determinación de *SSCmec* se realizó mediante una PCR *multiplex* utilizándose para cada aislado un tubo *Pure Taq Ready To Go*[®] (*GE Healthcare Life Science*) que contiene un liofilizado con las concentraciones óptimas de dNTPs, Cl₂Mg y polimerasa, adecuadas para la reacción de amplificación. A cada uno de los tubos de reacción se le añadieron 0,5µl de cada uno de los primers utilizados, 12 µl de H₂O libre de nucleasas y 3µl del Extracto de ADN correspondiente, completando un volumen final de 25 µl.

En la optimización de la PCR *multiplex* se siguió el método descrito por Henegariu O y col., 1997, con las siguientes condiciones de amplificación: desnaturalización a 94°C (4 minutos), 30 ciclos de 94°C (30 segundos), 53°C (30 segundos) y 72°C (1 min) y una extensión final a 72°C (7min).

Para la visualización de los productos de PCR, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa MS-8 al 2% (w/v). La interpretación del patrón de bandas se hizo siguiendo los criterios que aparecen reflejados en la Tabla 7 y siguiendo los criterios de validación de la técnica publicados por Oliveira DC y de Lencastre H, 2002 (Figura 10).

Tabla 7. Interpretación de resultados SCCmec

		Tipo de SCCmec							
		I	IA	II	III	IIIA	IIIB	IV	IVA
Tamaño (bp)	495	495							
					414	414			
			381	381				381	381
	342	342	342						342
						303			
				284					
				209	209	209	209		
					243	243	243		

Modificado de Oliveira DC y de Lencastre H, 2002

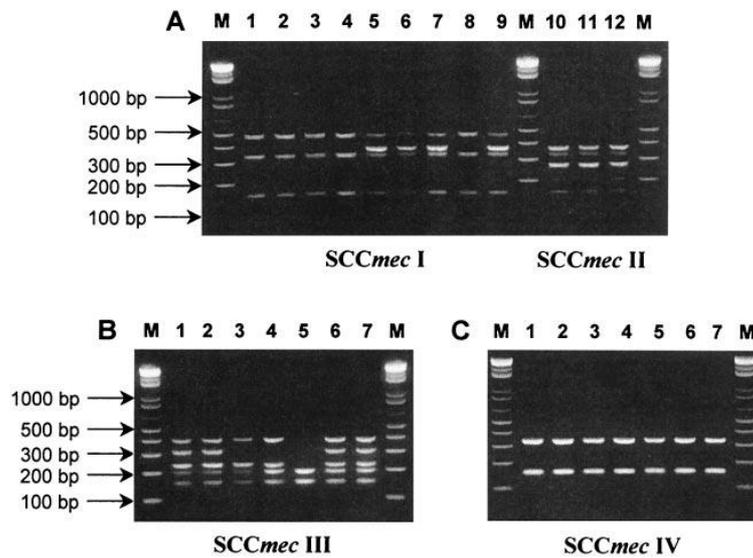


Figura 10. PCR *multiplex* para caracterización de SCCmec (tipos I-IV). En la figura (A) Calles 1 a 4 y 8 se corresponden a SCCmec tipo I; calles 5 a 7 y 9: variante IA; y calles 10 a 12: SCCmec tipo II. Fig(B) Calles 1, 2, 6, y 7: SCCmec tipo III; calles 3 y 4: variante IIIA, calle 5: y variante IIIB. (C) SCCmec tipo IV. (Oliveira DC y de Lencastre H, 2002)

3.5.4 SUBTIPADO del *Staphylococcal Chromosome Cassette mec IV*

La PCR *múltiplex* que se ha descrito previamente, permite la detección del tipo IV, pero no así de sus múltiples subtipos que posteriormente se describieron (IVa, IVb, IVc, IVd, IVg y IVh), cuya discriminación es fundamental para estudiar la epidemiología del SARM comunitario y su relación con el intrahospitalario. Para el subtipado del SCCmec IV se procedió a realizar una PCR *múltiplex* siguiendo el protocolo de Milheiriço C (Milheirico C y col., 2007a) que detecta los subtipos IVa, IVb, IVc, IVd, IVg, IVh, y el tipo V según el protocolo de (Zhang K y col., 2005).

3.5.4.1. PCR *múltiplex* (MPCR)

El primer paso fue la extracción de ADN, la reconstitución y preparación de *primers* a la concentración de uso según se indica en el apartado 3.5.1.

En la Tabla 8 aparecen detalladas las principales características de los iniciadores utilizados en esta PCR

Tabla 8. Características de los iniciadores (“*primers*”) empleados en la PCR

INICIADOR	SECUENCIA DE OLIGONUCLEOTIDOS (5' - 3')	TAMAÑO DEL AMPLICÓN (bp)	TIPO DE SCCmec
<i>ccrB2F</i>	CGAACGTAATAACATTGTGCG	203	CONTROL INTERNO
<i>ccrB2R</i>	TTGGCWATTTTACGATAGCC		
<i>IvAF</i>	ATAAGAGATCGAACAGAAGC	278	IVa
<i>IvAR</i>	TGAAGAAATCATGCCTATCG		
<i>IvBF</i>	TTGCTCATTTTCAGTCTTACC	336	IVb
<i>IvBR</i>	TTACTTCAGTGCATTAAGC		
<i>IvCF</i>	CCATTGCAAATTTCTCTCC	483	IVc
<i>IvCR</i>	ATAGATTCTACTGCAAGTCC		
<i>IvDF</i>	TCTCGACTGTTTGCAATAGG	575	IVd
<i>IvDR</i>	CAATCATCTAGTTGGATACG		
<i>IvGF</i>	TGATAGTCAAAGTATGGTGG	792	IVg
<i>IvGR</i>	GAATAATGCAAAGTGGAACG		
<i>IvHF</i>	TTCCTCGTTTTTCTGAACG	663	IVh
<i>IvHR</i>	CAAACACTGATATTGTGTCG		
<i>VF</i>	GAACATTGTTACTTAAATGAGCG	325	V
<i>VR</i>	TGAAAGTTGTACCCTTGACACC		

Milheiro C y col., 2007a

La mezcla de reacción de PCR (“*Master Mix*”) se preparó añadiendo los volúmenes que se detallan en la Tabla 9 cada uno de los reactivos de Pure Taq Ready To Go® (GE Healthcare Life Science)

Tabla 9: Volúmenes de reactivos en la mezcla de reacción (“*Master Mix*”) de la PCR

Iniciadores	Volumen (μl)	
	1 muestra	10 muestras
<i>ccrB2</i> F	1	10
<i>ccrB2</i> R	1	10
J IVa F	2	20
J IVa R	2	20
J IVb F	1	10
J IVb R	1	10
J IVc F	1	10
J IVc R	1	10
J IVd F	1	10
J IVd R	1	10
J IVg F	1	10
J IVg R	1	10
J IVh F	2	20
J IVh R	2	20
JVF	1	10
JVR	1	10
Reactivos		
AD	2	20
Volumen total (μl)	22	220

AD: Agua libre de nucleasas

Se añadieron 22 μl de esta mezcla a cada “*Eppendorf*” o pocillo de reacción junto con 3μl de extracto de ADN de cada muestra, completando un volumen de 25μl.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización a 94°C (4 minutos), 30 ciclos de 94°C (30 segundos), 53°C (30 segundos) y 72°C (1 min) y una extensión final a 72°C (7min) (Henegariu ONA y col. 1997).

Se realizó una electroforesis en un gel de agarosa MS al 2% (w/v), sobre los productos obtenidos en la PCR. La interpretación del patrón de bandas se hizo siguiendo los criterios tal como aparecen reflejados en la Figura 11.

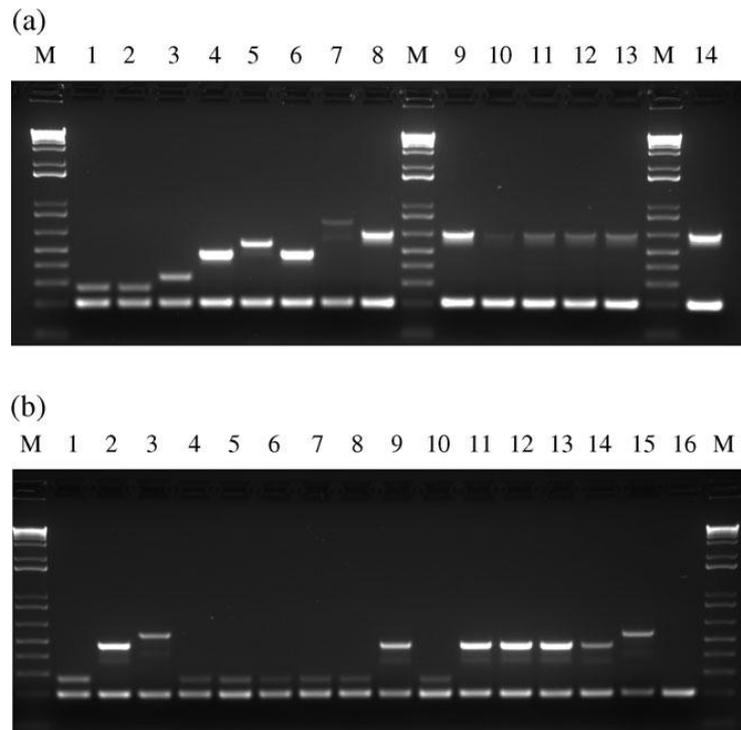


Figura 11. PCR *Multiplex* para subtipado de SCCmec IV. (a) Patrones de amplificación obtenidos para las cepas prototipo y para seis cepas del subtipo IVh. **Calles 1–8, cepas** prototipo de los primeros subtipos descritos de SCCmec IV y el subtipo IVh característico de EMRSA-15: cepas MW2 y CA05, subtipo IVa; 8/6-3P, IVb; Q2134, IVc; JCSC4469, IVd; AR43/3330.1, IVE; M03-68, IVg y HAR22 (EMRSA-15), IVh. **Calles 9–14,** cepas HGSA146, HGSA157, HGSA158, HGSA163, HGSA168 y HAR36 subtipo IVh. (b) Aplicación de la PCR *multiplex* a una colección de 13 cepas SCCmec tipo IV. **Calles 1–3,** cepa prototipo MW2, Q2314 y JCSC4469—subtipos IVa, IVc y IVd, respectivamente. **Calles 4–8 y 10,** cepas BM18, FFP311, VNG17, RJP17, HSA74 y HAR38—subtipo IVa. **Calles 9 y 11–14,** cepas DEN2946, ARG9, DEN2949, DEN114 y DEN1451—subtipo IVc. Lane 15, cepa BK2529—subtipo IVd. **Calle 16,** cepa COB3—subtipo IVNT. M, DNA marcador de peso molecular (1 kb DNALadder Plus, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). (Milheirico C y col., 2007a)

3.5.5. Tipificación mediante secuenciación del gen de la proteína A (*spa-typing*)

A la totalidad de los aislados de SARM y SAMS se secuenció el gen que codifica la proteína A

3.5.5.1. Reacción de amplificación

Para la amplificación por PCR de la región X del gen de la proteína A estafilocócica, se utilizó por cada aislado un tubo de Pure Taq Ready To Go® (GE Healthcare Life Science) y los primers: *Forward* (5-AGACGATCCTTCGGTGAGC-3) y *Reverse* (5-GCTTTTGCAATGTCATTTACTG-3) (Harmsen D y col., 2003).

A cada uno de los tubos de reacción se le añadió 1 µl de Primer Forward , 1 µl de Primer Reverse, 18 µl de H₂O libre de nucleasas y 5 µl del Extracto de ADN correspondiente. Los cebadores quedaron a una concentración final de 4 pmol/µl.

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

3.5.5.2. Purificación de productos de PCR

La purificación de los amplificados se realizó añadiendo a cada 5 µl del producto de PCR, 2 µl de ExoSAP-IT® (GE Healthcare Life Science). Los tubos se introdujeron nuevamente en el termociclador y se mantuvieron, un primer periodo de 15 minutos a 37°C, y uno segundo de 15 minutos a 80°C.

3.5.5.3. Secuenciación

La secuenciación del producto amplificado y por tanto de la región X de cada muestra, se llevó a cabo mediante un sistema basado en el método de Sanger y usando el “The Big Dye Terminator” v3.1 Cycle Sequencing Kit® (Applied Biosystems), mezcla de reactivos que proporciona los componentes necesarios para la reacción de secuenciación. El usuario solo debe añadir el ADN molde y los cebadores específicos que hibriden con los extremos y de manera bidireccional con el fragmento que se desea secuenciar. Así, se prepararon dos mezclas, una denominada Master Mix Forward y otra Master Mix Reverse, en la que se añadieron por cada muestra: 0.5 µl de *Ready Reaction Mix*, 1.5 µl de Big Dye Terminator v1.1/3.1 Sequencing Buffer (5X), 1µl de Primer *Forward/Reverse* (según corresponda) y 5µl de H₂O libre de nucleasas. Por cada muestra se rotularon dos *Eppendorf* de 0.2 ml especiales para secuenciación, en el que se añaden a cada uno: 8 µl de Master Mix (*Forward* o *Reverse* según corresponda) y 2µl de producto amplificado. Para la reacción de secuencia, los tubos se introducen en el Termociclador 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) y son sometidos a 25 ciclos de 10 minutos a 96°C, seguidos de 4 minutos y medio a 60°C (previo a los 25 ciclos hay una fase inicial de desnaturalización de 3 minutos a 94°C). Los productos de la reacción de secuenciación fueron pasados a través de una columna de Sephadex G-50 para retirar los dideoxiNTPs fluorescentes terminadores de cadena no incorporados. Las secuencias de ADN fueron obtenidas con el Secuenciador 3130 Genetic Analyser® (Applied Biosystems).

3.5.5.4. Asignación de *spa-types*

Las secuencias de ADN se analizaron con el StaphType software® (Ridom). Este software construye una secuencia consenso, automáticamente detecta las repeticiones “*spa*”, les asigna su código alfa-numérico, y en función del perfil de

repeticiones le asigna a cada muestra uno u otro *spa-type* (Harmsen D y col., 2003) (Figura 12).

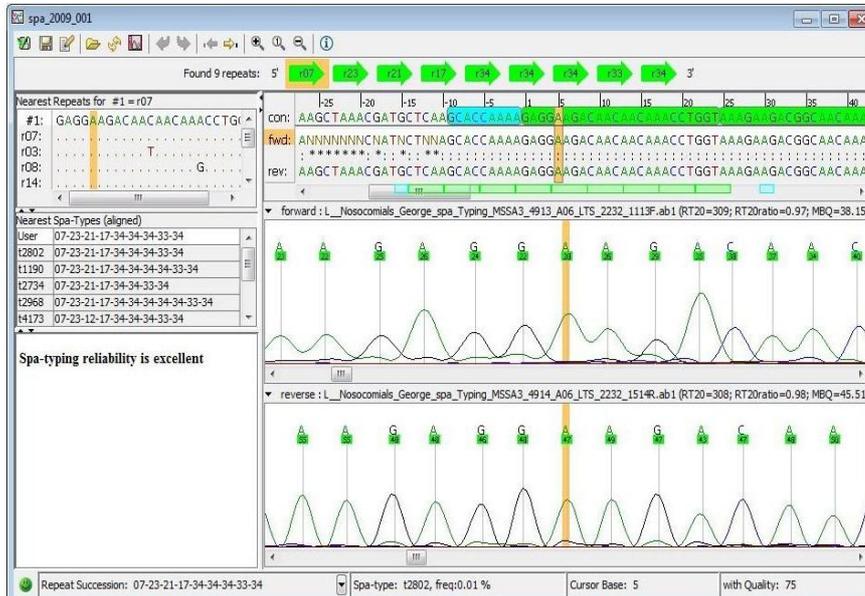


Figura 12. Captura de pantalla del software StaphType. A) Visor que muestra las secuencias obtenidas a partir de los cebadores F y R, y la secuencia consenso. Puedes ir avanzando en la secuencia verificando la conformidad en la secuenciación con los picos correspondientes a cada fluorocromo. B) Tipos de repeticiones (*r*) encontradas automáticamente en la secuencia consenso. C) Se indican los nucleótidos en los que existe discrepancia entre la secuencia consenso y la secuencia del tipo de repetición encontrada. D) Diagrama que muestra la comparación entre el perfil de repeticiones de nuestra secuencia consenso (*user*) y los perfiles de repeticiones más similares de diferentes *spa-types* ya registrados. A medida que bajemos con el cursor, disminuye la similitud.

3.5.5.5. Análisis BURP y asignación de eBURST

Aquellos aislados con el mismo *spa-type* fueron considerados indistinguibles, pero se utilizó el algoritmo BURP del *StaphType software* para clasificar dentro de un mismo grupo o “cluster” aquellos *spa-types* con perfiles similares (Mellmann A y col., 2007). Distintos *spa-types* son agrupados en el mismo cluster cuando al aplicar el algoritmo se obtienen diferencias entre ellos menores o igual a 6. Los cluster se nombran con

las siglas CC (de componente clonal) seguido de un número que corresponde al del *spa-type* representado con el mayor número de aislados (Figura 13).

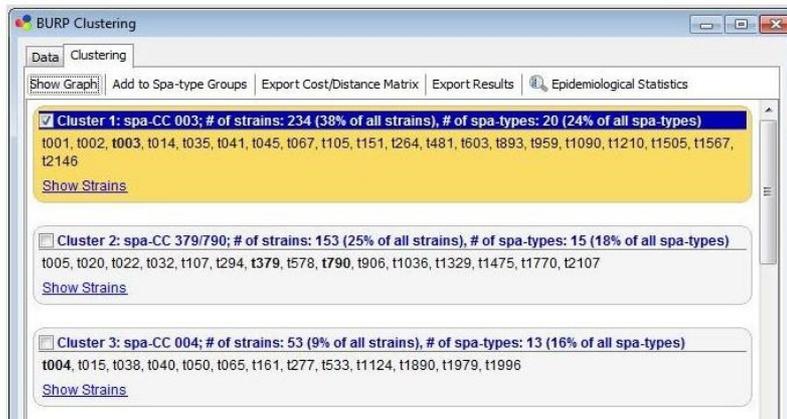


Figura 13. Captura de pantalla del software StaphType. Ejemplo de un resultado de análisis BURP. Los *spa-types* similares entre ellos son agrupados en *Clusters*. El *spa-type* representado con el mayor número de aislados dentro de un Cluster, y por tanto el que le da nombre, se muestra en negrita.

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

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

StaphType software dispone de una base de datos muy útil en la que puedes observar que tipos de ST (por MLST) se corresponden estadísticamente con un determinado *spa-type*, con qué otras denominaciones se les hace referencia en la literatura (entre ellas los CC de eBURST), en qué porcentaje se encuentra representado un determinado *spa-type* a nivel mundial según los registros de

SARM hechos hasta la fecha, o las zonas geográficas de origen de cada *spa-type* (Figuras 14 y 15).

The screenshot shows the 'Ridom SpaServer - SpaTypes' interface. It includes a search bar at the top and a table with the following data:

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

Figura 14. Captura de *StaphType software*. Base de datos que relaciona el *spa-type* con los STs más probables, además de indicar el posible CC de eBURST y otras denominaciones en la literatura científica

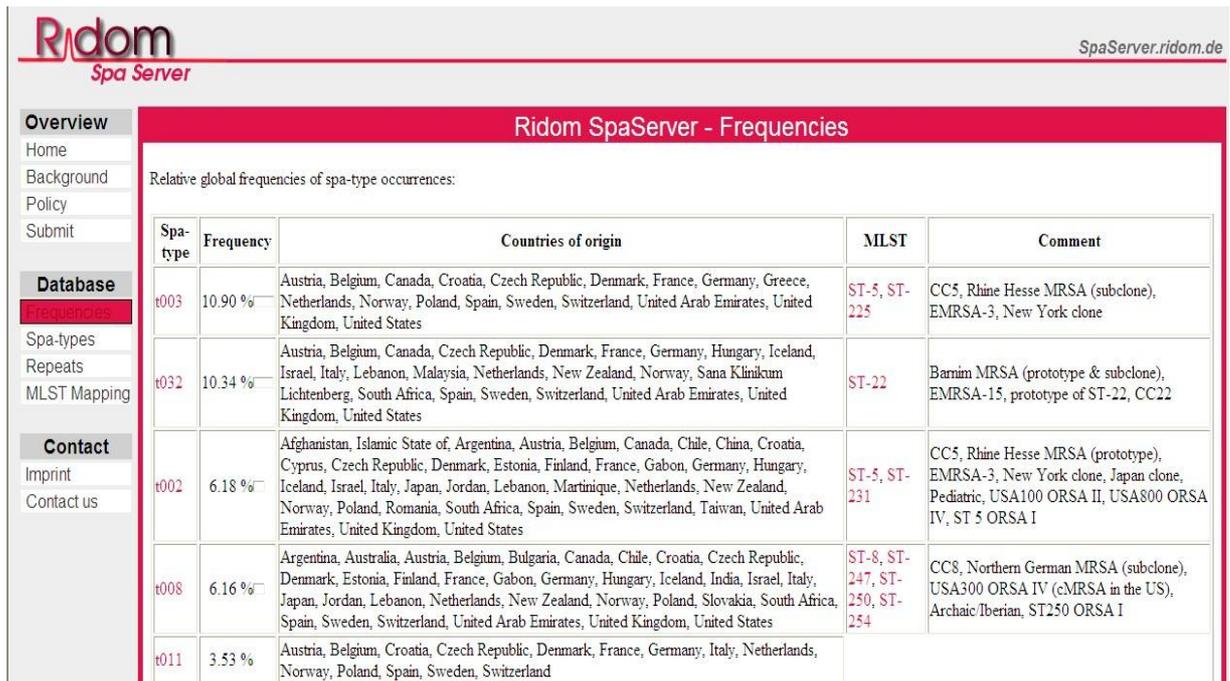


Figura 15. Captura de *StaphType software*. Base de datos que muestra además para cada *spa-type* la frecuencia registrada hasta el momento y los países de origen en los que se ha detectado.

En este estudio, la definición definitiva de los clones se llevó a cabo siguiendo la nomenclatura recientemente propuesta según la cual un clon queda caracterizado de manera inequívoca mediante el ST y el tipo estructural de *SCCmec*. De esta manera, un determinado clon de SARM lo conforman un grupo de aislados, probablemente descendientes de un ancestro común, que muestran el mismo ST y que portan el mismo tipo de *SCCmec* (Enright MC y col.,2000).

3.5.6. Electroforesis en gel mediante campo pulsado (PFGE)

El protocolo que se utilizó para la preparación de ADN fue una modificación del descrito por Goering RV y Winters MA en 1992.

El primer paso consistió en la preparación de los bloques de agarosa que contienen en su interior el ADN bacteriano a fin de protegerlo de las degradaciones inespecíficas.

a. Extracción del DNA

A partir de una resiembra de los aislamientos en el medio de cultivo sólido agar Müller-Hinton (MH) (bioMérieux, La Balme Les Grottes, France) se realizó la extracción del ADN con el siguiente protocolo:

- De cada cepa de estafilococo, se preparó una suspensión en un tubo *Eppendorf* con 1 ml de *buffer* SE pH 7,5 (NaCl 75 mM, EDTA 25 mM) y se midió la densidad óptica en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 420 nm. Con ayuda de una curva de calibrado, se ajustó una concentración final de microorganismo igual a 10^9 ufc/ml.

- Se añadió agarosa Certified Molecular Biology Agarose (BioRad) al 1% (w/v) en *buffer* SE a la suspensión bacteriana en proporción 1:1 (en baño termostático a 56°C).

- Se repartió la mezcla en los moldes (Insert moulds, Pharmacia Biotech) y se dejó solidificar a 4°C durante 30 minutos.

b. Lisis celular

Cada uno de los bloques se trató con solución de lisis bacteriana (50 mM de Tris-HCl (pH 7,5), 50 mM EDTA, 1% lauril sarcosina, 1,5 µl/cepa de lisotafina y 500 µg/cepa de lisozima) manteniendo en incubación a 37°C durante 24 horas.

Transcurrido este tiempo se eliminó la solución de lisis y se reemplazó por solución de proteólisis conteniendo el mismo *buffer* de lisis (pH 9,5) más proteinasa-K (50 µg/mL), incubándose en baño a 56°C durante toda la noche.

c. Lavado de bloques

Al día siguiente se eliminó la solución de proteólisis lavando al menos cuatro veces los bloques con *buffer* TE pH 7,5 (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM) dejando como mínimo entre cada lavado 30 minutos a 4°C. Una vez lavados, estos bloques se conservaron a 4°C hasta su utilización, durante un periodo máximo de 6 meses, cambiando el *buffer* TE una vez al mes.

d. Digestión del ADN con enzima de restricción

A continuación se realizó la fase de digestión del ADN con el enzima de restricción *SmaI* (4 U/ml) en *buffer* Y pH 7,9 (Tris-acetato 33 mM, acetato magnésico 10 mM, acetato potásico 66 mM, BSA 0,1 mg/ml). Se hizo un tratamiento enzimático durante 4 horas a 30°C (temperatura óptima de uso del enzima).

e. Electroforesis en campo de pulso

Para la detección de los fragmentos de restricción mediante electroforesis se utilizó el sistema "Contour Clamped Homogeneous Electric Field" (CHEF-DR II Pulsed Field Electrophoresis System, Bio Rad Laboratories, S.A.). Se empleó un gel de agarosa Certified Molecular Biology Agarose (Bio-Rad) al 1% (w/v) en *buffer* TBE 0,5x pH 8,4 (cada litro de TBE 10x contiene Tris-HCl 108 g, EDTA 9,8 g, ácido bórico 55 g). En su solidificación se utiliza un peine de 30 pocillos. Cada bloque digerido es introducido en cada pocillo procurando situarlo en la parte inferior y perfectamente adherido al gel. Posteriormente se sellaron los pocillos con la agarosa. Las condiciones de electroforesis empleadas fueron: temperatura 12-14°C; se usaron dos rampas: la primera con un pulso inicial de 5/seg y pulso final 15/seg durante 10 horas; la segunda rampa con pulso inicial de 15/seg y el pulso final de 60/seg durante 13 horas, diferencia de potencial 200 voltios (6 V/cm). La tinción se realizó con bromuro de etidio (100µl/L) durante 15 minutos a temperatura ambiente y se visualizó mediante transiluminación con luz ultravioleta (Cockson y col., 2007).

f. Lectura e interpretación de los resultados

La comparación entre los diferentes patrones electroforéticos obtenidos se realizó siguiendo los criterios propuestos por Tenover F y col. (1995) que consideran las siguientes relaciones entre dos aislados:

-Genéticamente indistinguibles, si sus patrones de restricción tienen el mismo número de fragmentos y sus tamaños son iguales.

- Estrechamente relacionados, si el patrón de un aislado se diferencia del patrón de la cepa brote o mayoritaria en un evento genético, que típicamente resulta en dos o tres bandas de diferencia.
- Posiblemente relacionados, si un aislado se diferencia del mayoritario en cambios que pueden ser consecuencia de dos eventos genéticos independientes, lo que se traduce en 4-6 bandas de diferencia.
- No relacionado con la cepa brote, si se diferencian por cambios consecuencia de 3 o más eventos genéticos independientes, lo que se traduce generalmente en 7 o más bandas de diferencia.

De acuerdo a hallazgos realizados en estudios previos (Vindel A y col., 2006; Cuevas O y col., 2007; Vindel A y col., 2009), a cada pulsotipo o genotipo se le asignó la letra E seguida de un número correlativo al orden cronológico de aparición en que fue aislado, mientras que a cada subtipo se le asignó el número del genotipo principal al que estaba más estrechamente relacionado, seguido de una letra (ej. E7a, E7b,...). En estos estudios se establecieron las siguientes correspondencias: el pulsotipo E1 corresponde a la secuencia tipo de SARM 247 (ST 247) y SCCmec tipo I (ST247-SARM-I); el E3 y E10 corresponde a ST146-SARM IV; los pulsotipos E6, E9, E15 y E17 a ST228-SARM-I ; los E7, E8 y E11 a ST125-SARM-IV; el E12 a ST36-SARM-II; E16 a ST228-SARM-IV y pulsotipo E13 a ST22-SARM-IV. El genotipo A1 comunitario corresponde a ST8-SARM-IV (Cercenado E y col., 2008). Se denomina perfil esporádico a aquellos casos representados por un solo aislado.

El análisis de los datos se realizó utilizando el programa informático *Molecular Analyst* Fingerprinting, Bio-Rad Laboratories, Hercules, California EEUU, de modo que se construyó un dendograma que permitiera apreciar las relaciones de agrupación entre los diferentes pulsotipos.

3.6. Datos clínicos y epidemiológicos

3.6.1. Criterios de inclusión

Se incluyeron aquellos pacientes que presentaron al menos un episodio de bacteriemia entre el 1 de enero de 2012 y 31 de diciembre de 2013. En caso de que el mismo paciente hubiese tenido dos o más episodios de bacteriemia en este periodo se consideró sólo el primer episodio, siendo el resto valorados como complicaciones. Se excluyeron del estudio clínico aquellos pacientes cuya historia clínica estaba incompleta, los pacientes derivados a otros hospitales, y cuando el médico responsable consideró el aislamiento de *S.aureus* como una contaminación y no prescribió antibiótico.

3.6.2. Metodología de recogida de la información

El estudio de los pacientes se realizó mediante un protocolo establecido de recogida de datos. Ver Anexo I

Para la obtención de estos datos se realizó una revisión sistemática de la historia clínica de la red informática interna y de la red de información del Servicio de Microbiología del Hospital.

3.6.3. Variables de estudio

3.6.3.1. Características epidemiológicas y clínicas

Se obtuvo información microbiológica sobre el *episodio de bacteriemia*, como:

- Fecha de extracción del hemocultivo, número de parejas positivas, si el hemocultivo se extrajo por catéter o por vía periférica y tiempo de positividad menor o igual a 12 horas para determinar la posible gravedad de la bacteriemia y posibles complicaciones.

- Se definió bacteriemia como la presencia del microorganismo (*S.aureus*) en un hemocultivo o más. La bacteriemia fue polimicrobiana cuando se aislaron dos o más microorganismos. Se valoró contaminación del hemocultivo (Weinstein MP y col., 1983) por *S. aureus* cuando el paciente tenía un solo hemocultivo positivo en ausencia de evidencia clínica de infección (fiebre, leucocitosis o signos locales o generales de infección) que sugiriesen la presencia de *S. aureus* en opinión del médico responsable del paciente o del interconsultor de Medicina Interna si fue requerido.
- Se definieron hemocultivos de control como aquellos hemocultivos obtenidos entre 48 y 96 horas después del último hemocultivo positivo, pudiendo ser positivos si persistía el crecimiento de *Staphylococcus aureus* en los mismos o negativos cuando a los 6 días de incubación no hubo crecimiento.
- Se recogieron datos demográficos del paciente, como la fecha de ingreso hospitalario y de alta, género, edad, y días de ingreso previo a la bacteriemia.
- Enfermedades de base y estudio de la comorbilidad que pudiera tener importancia pronóstica como: Diabetes mellitus, hipertensión arterial, neoplasia, enfermedad cerebrovascular, trasplante de órgano sólido, ADVP, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) inmunopresión (VIH, quimioterapia, radioterapia, tratamiento esteroideo durante más de una semana si superaba los 20 miligramos (mg) al día o durante más de tres meses si no los superaba), enfermedad hepática (incluye cirrosis), insuficiencia renal, enfermedad osteoarticular (se agruparon: ser portador de prótesis articular, material de osteosíntesis, antecedentes de fractura o conectivopatía).
- Factores de riesgo que pudieran influir en la adquisición de la infección como serportador de catéter venoso central, sonda vesical, diálisis, ser portador de válvula protésica, marcapasos, endoprótesis de aorta (estas tres variables fueron agrupadas en una sola), antecedentes de estancia en UCI, ventilación mecánica, nutrición parenteral, haber sido sometido a un procedimiento invasivo en el mes previo

(endoscopia, colangiografía retrograda endoscópica, biopsia, tubo torax...), antecedente de cirugía en mes previo, y presencia de heridas.

- La gravedad de la comorbilidad se midió según el índice de Charlson (Charlson ME y col., 1987) y los criterios de Mc Cabe Jackson (MacCabe W y Jackson CG, 1962) atendiendo a la gravedad inicial del paciente basada en la presencia y gravedad de las enfermedades de base, clasificándose como “rápidamente fatal” cuando la muerte era previsible en un plazo de días o semanas, “últimamente fatal” cuando la muerte era previsible en un plazo de meses o años, “no fatal” cuando la muerte no era previsible.

- Adquisición de la bacteriemia por *S. aureus*: se consideró nosocomial (BN) si el primer hemocultivo positivo se obtuvo pasadas 48 horas desde el ingreso hospitalario y no existía evidencia clínica de infección al ingreso. La bacteriemia se considero de adquisición comunitaria (BC) si el primer hemocultivo positivo se obtuvo en las primeras 48 horas del ingreso o si existía evidencia de infección por *Staphylococcus aureus* en el momento del ingreso. Bacteriemia relacionada con la atención sanitaria (BRAS) se definió como aquel paciente que había sido dado de alta del hospital en los 30 días anteriores, aquellos que se encontraban institucionalizados en centros médicos de pacientes crónicos, aquellos con contacto continuo ambulatorio con el centro hospitalario como ocurre con los pacientes oncohematológicos que habían acudido al Hospital de día o los pacientes en programa de hemodiálisis ambulatoria.

- Los servicios clínicos donde se encontraba el paciente en el momento de la extracción, clasificándose en los siguientes grupos:

- Servicios médicos: Medicina Interna y especialidades médicas;
- Servicios de “alto riesgo”: Unidad de Cuidados Intensivos (UCI),
Unidad de Reanimación (REA), la Unidad de Quemados,
- Servicios Quirúrgicos;
- Urgencias y
- Pediatría.

- Origen de la bacteriemia: La clasificación según el foco o el origen primario de bacteriemia se ajustó a lo definido por The Centers for Disease Control and Prevention (Garner JS y col., 1998). Se consideró que había una infección focal de etiología estafilocócica como causa primaria de bacteriemia cuando los síntomas y signos a este nivel o el aislamiento de *S.aureus* en esta localización eran anteriores al comienzo de la bacteriemia. Cuando la bacteriemia no se asociaba a ningún foco primario y precedía a éste en su aparición, se consideró como primaria o de foco no aclarado. Se valoró como bacteriemia relacionada con un catéter intravascular si no había otro foco para la bacteriemia y se identificaba al menos una de las siguientes condiciones: inflamación en el punto de inserción del catéter; drenaje purulento en el lugar de la inserción del catéter con cultivo positivo para *Staphylococcus aureus* ; el crecimiento del mismo en un cultivo semicuantitativo de la punta de cateter; o cuando el hemocultivo extraído por el catéter tuvo un tiempo de positividad igual o menor de 120 minutos respecto al hemocultivo de vía periférica. Para el diagnóstico de neumonía como el origen de la bacteriemia por *Staphylococcus aureus* se tuvieron en cuenta los siguientes criterios: la existencia de un nuevo infiltrado en la radiografía de tórax en las primeras 24 horas tras la bacteriemia no explicable por otras causas, el cultivo de *Staphylococcus aureus* en el esputo o en el aspirado endotraqueal el día de la bacteriemia o en las 72 horas antes de la misma y la ausencia de otro foco clínico para la bacteriemia. La infección osteoarticular durante el ingreso fue considerada siempre un foco secundario (metastásico) excepto que existiera evidencia clínica de inoculación directa (como traumatismo o cirugía).

- Se registraron características clínicas y analíticas relacionadas con el episodio de bacteriemia como:

a. Presencia de fiebre, cuando la temperatura axilar fue mayor de 38°C en las 48 horas previas o posteriores a la extracción del primer hemocultivo positivo para *S. aureus*.

b. Leucocitosis se definió como la presencia de cifras igual o mayores a 11.000 leucocitos/mm³ en las 48 horas previas o posteriores a la extracción del primer

hemocultivo positivo; leucopenia como cifras inferiores a 1500/ μ l y la neutropenia en caso de recuentos menores de 500/ μ l.

c. Procalcitonina: cuando fue menor de 0,5 ng/ml se consideró dentro de los límites de normalidad; 0,5-2 ng/ml posible infección vírica; 2-10 ng/ml: sepsis probable e infección bacteriana sistémica; mayor de 10 ng/ml: shock séptico y riesgo de fallo multiorgánico. En lactantes a partir del tercer día de vida y en el resto de niños se aplican las mismas indicaciones para la medición del nivel de PCT que en los adultos (García de Guadiana L y col., 2014; Stocker M y col., 2010; Chiesa C y col., 1998; Assicot M y col., 1993)

d. Proteína C reactiva (PCR): unas cifras de PCR inferior a 1 mgr/dl se consideraron normales; cifras entre 5 y 20 mgr/dl orienta a una posible infección bacteriana, y cifras mayores de 20 mgr/dl infección bacteriana severa. En nuestro estudio valoramos cifras mayores de 5 mgr/dl como punto de corte que indicara la existencia de un proceso inflamatorio importante (León C y col., 2007).

e. Gravedad del síndrome de respuesta sistémica: Se agruparon los pacientes como aquellos que debutan con SRIS, sepsis leve o grave, shock séptico y fallo multiorgánico. La gravedad de respuesta inflamatoria sistémica como forma de presentación se determinó con el índice de Pitt (*Paterson DL y col., 2004*), también validado como predictor de mortalidad), aunque en población infantil se utilizan otros índices como el de PRIMIS o PELOD.

- Complicaciones de la bacteriemia: Se definió bacteriemia complicada (BC) si cualquiera de los siguientes criterios estuvo presente: bacteriemia persistente; bacteriemia relacionada con el catéter en la que no retira éste en las primeras 48 horas; desarrollo de endocarditis infecciosa secundaria a la bacteriemia (la endocarditis se considero en aquellos casos que cumplían los criterios de Duke (248); desarrollo de metástasis sépticas como artritis, absceso pulmonar embólico o a otro nivel (fundamentalmente óseo o epidural); presencia de cualquier dispositivo protésico permanente; pacientes sometidos a hemodiálisis crónica; y presencia de shock séptico (López Cortés LE y col., 2013; Mitchell DH y Howden BP, 2005).

3.6.3.2. Evaluación de la práctica clínica

3.6.6.2.1. Tratamiento empírico

Se definió tratamiento empírico aquel que se inició después de la extracción de los hemocultivos y antes de conocer los resultados de éste. Se apreciaron las siguientes situaciones, una vez informada la sensibilidad definitiva del microorganismo:

a) Tratamiento empírico adecuado o de elección para SAMS: aquel que una vez conocida la sensibilidad, incluyera cloxacilina, cefazolina en pacientes con hemodiálisis, o daptomicina. Quedan excluidos los pacientes alérgicos, en los que se acepta adecuado el tratamiento con vancomicina o daptomicina.

b) Tratamiento empírico alternativo para SAMS: aquel régimen terapéutico que no siendo adecuado incluyese antibióticos con actividad antiestafilocócica como: amoxicilina-clavulanico intravenoso, levofloxacino intravenoso, penicilinas antipseudomónicas como piperacilina-tazobactam intravenosa, teicoplanina intramuscular o intravenosa, vancomicina intravenosa.

c) Tratamiento empírico inadecuado para SAMS: cuando no estuvo recibiendo ningún antibiótico hasta conocerse el resultado o éste no tenía actividad antiestafilocócica.

d) Tratamiento empírico adecuado o de elección para SARM: Vancomicina intravenosa, teicoplanina intramuscular o intravenosa o daptomicina. Para el tratamiento secuencial por vía oral se incluye a Linezolid oral o intravenoso como tratamiento eficaz en caso infecciones de piel y partes blandas. El resto de opciones se consideran inadecuadas para SARM.

3.6.3.2.2. Manejo clínico y grado de cumplimiento de las intervenciones orientadas a mejorar la calidad en la práctica clínica de estas infecciones

También se revisó si se cumplieron aquellas medidas necesarias en el manejo del paciente consideradas como indicadores de calidad en estudios previos (Lopez-Cortés LE y col., 2013) debido a su influencia en el pronóstico como son:

1. La realización de hemocultivos de control a las 48-96 horas después de haber iniciado el tratamiento antibiótico adecuado.
2. Si se realizó ecocardiografía en aquellos pacientes con criterios de bacteriemia complicada (BC) (López Cortés LE y col., 2013; Mitchell DH y Howden BP, 2005).
3. Si se actuó en el foco de la infección retirando el catéter vascular de forma precoz o drenando el absceso en los casos en que existiera alta sospecha de ser el foco de la bacteriemia o en los casos en que se desconociera el origen de la misma.
4. Si se registró en la historia el aviso de Microbiología o la presencia de la infección.
5. Cuando el tratamiento empírico fue no adecuado se comprobó si hubo modificación después de ser informada la sensibilidad definitiva tras conocerse el resultado del hemocultivo y su sensibilidad antimicrobiana.
6. En los casos de bacteriemia por SAMR tratados con vancomicina durante al menos 72 horas, se comprobó si se realizaron niveles plasmáticos valle de dicho fármaco entre las 72 y 96 horas del inicio del tratamiento y si se realizó ajuste de dosis posterior conforme a los resultados. Para el análisis de este criterio fueron excluidos los pacientes que fallecieron antes de las primeras 96 horas y aquellos que estaban en hemodiálisis.
7. Utilización de cloxacilina IV a dosis mínima de 2 gramos cada 6 horas (o ajustadas a FG en caso de insuficiencia renal) en casos de cepas sensibles a meticilina y en pacientes no alérgicos (en pacientes en hemodiálisis, cefazolina 2 gramos tras cada sesión de hemodiálisis. Para el análisis del cumplimiento de este apartado excluimos los pacientes fallecidos en las primeras 72 horas.

Se establecieron tres grupos de cumplimiento en función al cumplimiento de estas intervenciones teniendo en consideración que no todos los pacientes tuvieron indicación de cumplirlas todas. Así,

- a) El primer grupo sería el formado por los pacientes que no cumplieron ninguna acción terapéutica correcta o cumplen hasta la mitad de las medidas (0-49%).

- b) El segundo grupo cumplió del 50-74% de las medidas y
- c) El tercer grupo cumplió del 75-100% de las medidas terapéuticas.

3.6.3.3. Evolución de la bacteriemia

Se hizo un seguimiento de los pacientes hasta un año después registrándose los datos concernientes a la evolución de la infección. Para realizar este seguimiento se siguieron varias estrategias. Se revisaron los resultados microbiológicos posteriores tanto de hemocultivos como de otras muestras; los ingresos o asistencia a Consultas Externas utilizando la red informática del Hospital; en aquellos casos en los que por estos métodos no fue posible el seguimiento se procedió a realizar una llamada telefónica al domicilio del paciente. Estos datos relativos seguimiento a largo plazo y evolución de la bacteriemia (López Cortés LE y col., 2013) se dividieron en 3 categorías:

a) Curación: se definió como la ausencia de todos los signos y síntomas de infección junto con la negatividad de los hemocultivos de control al finalizar el tratamiento antibiótico (Harstein AI y col., 1992).

b) Mala evolución relacionada con la infección, cuando se dieron las siguientes situaciones:

- Recurrencia de la bacteriemia se definió como el aislamiento de una cepa de *S. aureus* con el mismo patrón de sensibilidad del primer episodio de bacteriemia en los tres meses posteriores después de haber alcanzado la curación clínica.

- Bacteriemia persistente cuando se aisló *S. aureus* en hemocultivos después de 72 horas de haber iniciado terapia antibiótica correcta.

- Desarrollo de endocarditis infecciosa secundaria a la bacteriemia (la endocarditis se considero en aquellos casos que cumplieran los criterios de Duke (Durack DT y col., 1994).

- Metástasis sépticas como artritis, absceso pulmonar embólico o a otro nivel (fundamentalmente óseo o epidural), presencia de lesiones de Janeway, nódulos de Osler u otras lesiones cutáneas sugestivas de infección aguda sistémica (petequias,

equimosis, pústulas, manchas de Roth o hemorragia conjuntival en ausencia de otra explicación alternativa), una tromboflebitis séptica (demostrada con ecografía), o un absceso metastático.

- Shock séptico y fallo multiorgánico.

c) Muerte no relacionada con la bacteriemia, cuando a juicio del clínico aquella se daba en relación con la enfermedad de base u otras complicaciones médicas o quirúrgicas y una vez resuelta la infección.

d) Muerte relacionada con la bacteriemia cuando cumplía uno o más de los siguientes criterios: pacientes que fallecían con una infección persistente no controlada y/o hemocultivos persistentemente positivos, o que fallecían en los 14 días siguientes a la fecha de hemocultivo positivo sin otra explicación para el éxitus o que se reflejase en la historia clínica que el fallecimiento era debido directamente a *S. aureus*.

3.6.3.4. Evaluación de la influencia de aplicar las recomendaciones en la práctica clínica de las bacteriemias por *S.aureus*

Por último se evaluó como influyó en la evolución de cada paciente el hecho de cumplir un mayor o menor número de medidas terapéuticas.

3.7. Análisis estadístico

El estudio plantea un análisis descriptivo, comparaciones univariantes y análisis multivariante (bivariante) de las características clínicas y microbiológicas de las bacteriemias por *S. aureus*.

Se realizó inicialmente un “análisis de normalidad”, con el Test de Shapiro-Wilk (W_s), constituyéndose dos grupos: variables normales y no normales. Las primeras fueron descritas por medio de la media, desviación típica, valores máximo y mínimo y rango (m, sd, máx, mín, rango); las segundas por medio de la mediana, amplitud intercuartil, valores máximo y mínimo y rango (M, IQR, máx, mín, rango).

Las comparaciones univariantes se resuelven por medio de la Prueba de Student (t_{Student}) o la de Mann-Witney ($U_{\text{Mann-Witney}}$); en los casos de más de dos niveles los cálculos se orientan hacia la Prueba Anova (F_{Snedecor}) o la Transformación de Kruskal-Wallis ($H_{\text{Kruskal-Wallis}}$). La elección de la primera o la segunda pruebas la discrimina la observación de la normalidad de las variables estudiadas (vía paramétrica o no paramétrica).

El trabajo multivariante se desarrolla por medio de análisis de la correlación o de tablas de contingencia bivariantes. Las correlaciones paramétricas a través de la Prueba r de Pearson (r_{Pearson}) y las no paramétricas con la rho de Spearman (ρ_{Spearman}). Las tablas de contingencia a su vez, informan de tamaños y proporciones (n_i , %). En ellas los Índices de Relación los analiza la Prueba Ji-Cuadrado (χ^2), en todos los casos. En las tablas cuadradas de dimensión mínima la relación se valora por medio de la Prueba Exacta de Fisher (p_{Fisher})

En tanto que control del Error Tipo I se ha limitado por medio de la valoración tradicional del riesgo ($\alpha=0.05$; $H_0:p<0.05$). En aquellas ocasiones en que las no significaciones están cercanas al punto de corte de la significación, se ha elegido mostrar tal situación, denominándola de “tendencia a la significación” ($0.1>p\geq 0.05$)

Los cálculos de todo tipo se han realizado con el paquete estadístico SPSS, versión 15.0, en castellano.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

En el periodo de tiempo comprendido del 1 de Enero de 2012 a 31 de Diciembre de 2013, se procesaron en el *Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca* 32.169 hemocultivos, de los que un 80,2% fueron negativos. Se identificaron 158 *Staphylococcus aureus* correspondientes a 131 pacientes. Un 16% se confirmaron como *S.aureus* resistentes a meticilina (SARM). Del total de *S. aureus*, se realizó estudio molecular en el *Instituto de Salud Carlos III* a 122 cepas que se pudieron recuperar del archivo del Servicio de Microbiología.

Se analizaron los datos separando a los pacientes ingresados en el Hospital General (adultos) de los ingresados en el Hospital Infantil (pediátricos).

4.1. Características epidemiológicas y clínicas de la bacteriemia por *Staphylococcus aureus* (BSA)

Se analizaron las siguientes características epidemiológicas y clínicas de la BSA: edad, sexo, comorbilidad, factores de riesgo, modo de adquisición de la bacteriemia, distribución por servicios, foco de la bacteriemia, aspectos clínicos, marcadores de laboratorio y bacteriemia complicada.

En cuanto a la distribución por edades, el grupo de población correspondiente al Hospital Infantil supuso un 16% (21 pacientes), mientras que el grupo de pacientes ingresados en el Hospital General supuso un 84% (110) pacientes, de los que se recuperaron 109 historias clínicas para su revisión. De ellos, 53 pacientes tenían más de 65 años (48%). La media de edad en adultos fue 61,84 años (SD: 17,15) en niños la media fue de 2,69 (SD: 0,811). En el caso de pacientes adultos, 16 episodios (14,5%) fueron causados por cepas de SARM, en niños, 6 (28,5%) presentaron bacteriemia por SAMR (BSAMR).

En el grupo de población adulta la distribución por sexo fue de 76 varones (69%) y 34 mujeres (31%). En el subgrupo de BSAMR, 3 pacientes eran mujeres (18,8%) y 13

varones (81,3%); en el de BSAMS, 31 pacientes eran mujeres (32,2%) y 63 varones (67,7%). En la Tabla 10 se recoge patología subyacente encontrada en este grupo de población. Las patologías más frecuentes fueron HTA, diabetes mellitus, insuficiencia renal inmunosupresión, enfermedad neoplásica y enfermedad cerebrovascular. Respecto a la relación entre comorbilidad de los pacientes y bacteriemia por *S. aureus* no se encontraron diferencias significativas entre las dos grupos de pacientes con BSARM y BSAMS, salvo una mayor frecuencia en pacientes con EPOC en el primer grupo, (25% BSARM y 9,7% BSAMS) con tendencia a la significación ($p=0,081$). El Odds Ratio (OR) fue de 3,0 (IC95%: 0,798-11,283). En cuanto a la gravedad de la comorbilidad, el índice de Charlson en los dos grupos (BSAMR y BSAMS) por medio de la prueba U Mann-Whitney, se encontraron diferencias significativas a favor de BSAMR ($p=0,041$), lo que indicó que este grupo de pacientes presentaban entidades clínicas de mayor gravedad basal. En el índice de MacCabe Jackson no hubo diferencias significativas entre los dos grupos de bacteriemias.

Tabla 10: Análisis univariante de la patología subyacente en función a la sensibilidad a meticilina en pacientes adultos. Los datos se expresan como número de casos (porcentaje)

COMORBILIDAD	BSA n=109 (%)	BSARM n=16 (%)	BSAMS n=93 (%)	P
HTA	49 (45)	6 (37,5)	43 (46,2)	0,516
Diabetes Mellitus	40 (36,7)	7 (43,8)	33 (35,5)	0,526
Enfermedad cerebrovascular	20 (18,3)	2 (12,5)	18 (19,4)	0,513
Trasplante	6 (5,5)	1 (6,3)	5 (5,4)	0,887
Enfermedad Neoplásica	24 (22)	3 (18,8)	21 (22,6)	0,733
Inmunosupresión	27 (24,8)	3 (18,8)	24 (25,8)	0,546
EPOC	13 (11,9)	4 (25)	9 (9,7)	0,081
VIH	1 (0,9)	0 (0)	1 (1,1)	0,677
ADVP	1 (0,9)	0 (0)	1 (1,1)	0,677
Hepatopatía crónica(incluye Cirrosis)	19 (17,4)	4 (25)	15 (16,1)	0,388
Insuficiencia Renal	34 (31,2)	6 (37,5)	26 (30,1)	0,837
Enfermedad osteoarticular	10 (9,2)	1 (6,3)	9 (9,7)	0,661
GRAVEDAD DE LA COMORBILIDAD				
Charlson ≤ 2	35 (31,8)	3 (18,8)	32 (34)	0,225
Charlson > 2	75 (61,8)	13 (81,3)	62 (66)	
Índice de Charlson, mediana (IQR)	4 (0-23) IQR: 4 U _{MW} = 490,0	RP:67,88	RP:50,94	0,041
Mac Cabe y Jackson				
1: No fatal	27 (24,8)	3 (18,8)	24 (25,8)	0,565
2: Últimamente fatal	48 (44)	9 (56,3)	39 (41,9)	
3: Rápidamente fatal	34 (31,2)	4 (25)	30 (32,3)	

BSA: bacteriemia por *S.aureus*. BSAMS: bacteriemia por *S.aureus* sensible a meticilina; BSAMR: bacteriemia por *S.aureus* resistentente a meticilina. HTA: hipertensión arterial. EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica. ADVP: adicto a drogas por vía parenteral. U_{MW}: U-Mann-Whitney; RP: rango promedio; IQR: Rango Intercuartil.

Revisando los factores de riesgo para desarrollar una bacteriemia por *S.aureus* (Tabla 11) el ser portador de un catéter vascular, de sonda vesical, antecedente de cirugía previa, haber sido sometido algún tipo de procedimiento invasivo, y antecedente de haber estado en una Unidad de Cuidados Intensivos se relacionó con el desarrollo de BSA. De los 67 pacientes portadores de, al menos, un catéter vascular, en 34 (50,7%) se pudo documentar como bacteriemia relacionada con éste. De los 11 pacientes sometidos a ventilación mecánica en los días previos al episodio de bacteriemia, 3 pacientes (27,3%) presentaron bacteriemia de foco respiratorio. De los 23 pacientes con antecedentes de cirugía previa en el mes previo, en 4 de ellos (17,3%) se atribuyó el foco de la infección a la herida quirúrgica. Al comparar los factores de riesgo de los pacientes en los dos grupos de bacteriemia en función de la sensibilidad a meticilina no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 11: Análisis univariante de factores de riesgo en población adulta para desarrollar bacteriemia por *S.aureus*. Los datos se expresan como número casos (porcentaje).

VARIABLE	BSA n=109 (%)	BSARM n=16 (%)	BSAMS n=93 (%)	P
Antecedentes estancia UCI	21 (19,3)	3 (18,8)	18 (19,4)	0,955
Ventilación mecánica	11 (10,1)	1 (6,3)	10 (10,8)	0,581
Nutrición parenteral	4 (3,7)	0 (0)	4 (4,3)	0,398
Catéter	67 (61,5)	8 (50)	59 (63,4)	0,675
Catéter central	34 (31,19)	5 (31,3)	29 (31,2)	0,996
Catéter periférico	35 (32,11)	3 (18,8)	32 (34,4)	0,215
Prótesis valvular y dispositivos intracardiacos	12 (11)	2 (12,5)	10 (10,8)	0,837
Diálisis	12 (11)	2 (12,5)	10 (10,8)	0,837
Sonda vesical	28 (25,7)	4 (25)	24 (25,8)	0,946
Procedimientos invasivos *	23 (21,1)	2 (12,5)	21 (22,6)	0,361
Antecedente de Cirugía Previa	23 (21,1)	4 (25)	19 (20,4)	0,679
Herida	45 (41,28)	7 (43,8)	38 (40,9)	0,828
Herida Quirúrgica	21 (19,2)	3 (18,8)	18 (19,4)	0,955

*Procedimientos invasivos: tubo de tórax, biopsia, Colangiopancreatografía retrograda endoscópica (CPRE) endoscopia, derivación ventricular....

En cuanto a la población pediátrica, de los 21 niños un 47,6% fueron varones (10 pacientes) y un 52% mujeres (11 pacientes). Cuando se estudió la distribución por sexo entre las BSAMR vs BSAMS se comprobó que el porcentaje de mujeres era mayor en el primer grupo (66,7% niñas y 33,3% niños); en el grupo de BSAMS la distribución fue más uniforme (53,3% niños y 46,7% niñas).

Sólo a 19 niños se les pudo revisar la historia. Atendiendo a las enfermedades de base presentes en la edad pediátrica (HTA, diabetes, enfermedad neoplásica, inmunosupresión, enfermedad renal, diálisis) no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de bacteriemia. Podemos destacar que un 25% (4/19) presentaron inmunosupresión, 15,8% (3/19) enfermedad neoplásica, y un 5,3% (1/19) enfermedad renal.

En la Tabla 12 quedan reflejados los procedimientos invasivos y factores de riesgo que pueden influir en el desarrollo de una bacteriemia por *S.aureus* en la población pediátrica. Destacó con un 66,6% ser portador de un catéter vascular, y con un 23,6% tener antecedente de haber estado en una Unidad de Cuidados Intensivos. De los 12 pacientes portadores de al menos un catéter vascular, en 3 (25%) se pudo documentar como bacteriemia relacionada con éste. Entre los pacientes sometidos a ventilación mecánica (2 pacientes) en los días previos al episodio de bacteriemia, en ninguno se consideró que el origen de la bacteriemia fuera respiratorio. Sin embargo, de los 3 pacientes con antecedentes de cirugía previa en el mes previo, en 2 de ellos (66,7%) se atribuyó el foco de la infección a la herida quirúrgica. A diferencia de lo que sucede en la población adulta, al comparar el grupo de pacientes con BSAMR con BSAMS, de la población pediátrica se hallaron diferencias significativas en el grupo de pacientes que llevaba un catéter vascular periférico: éstos tenían más riesgo de presentar una BSAMR, con un OR: 3,143 (IC95%: 0,5-17,539).

Tabla 12: Análisis univariante de los factores de riesgo en población pediátrica para desarrollar bacteriemia por *S.aureus*. Los datos se expresan como número casos (porcentaje).

VARIABLE	BSA n=19 (%)	BSARM n=4 (%)	BSAMS n=15 (%)	P
Antecedentes estancia UCI	5 (23,6)	40	60	0,765
Ventilación mecánica	2 (10,5)	2 (50)	7 (46,6)	0,652
Catéter	12 (66,6)	4 (100)	8 (57)	0,688
Catéter central	6 (33,3)	1 (25)	5 (35,7)	0,688
Catéter periférico	6 (33,3)	3 (75)	3 (21,4)	0,045
Diálisis	1 (5,3)	0 (0)	15 (100)	0,563
Sonda vesical	3 (15,7)	1 (25)	2 (13,3)	0,570
Procedimientos invasivos *	4 (21,1)	1 (25)	3 (75)	0,865
Antecedente de Cirugía Previa	3 (15,8)	1 (33,3)	2 (66,7)	0,765
Herida quirúrgica	3 (15,8)	1 (33,3)	2 (66,7)	0,765

*Procedimientos invasivos: tubo de tórax, biopsia, endoscopia, derivación ventricular...

En relación a la adquisición de la bacteriemia en la población adulta (Tabla 13), el 13,7% (n=15/109) fue adquirida en la comunidad, siendo el 100% de ellas BSAMS. La adquisición nosocomial fue del 53,3% (n=57/109), suponiendo la BSAMR un 8,7% (5/57) y la BSAMS un 91,2% (52/57). La bacteriemia relacionada con la atención sanitaria (BRAS) supuso un 33,9% (n=37/109), el 29,7% (11/37) corresponde a BSAMR y el 70,3% (26/37) a BSAMS. Al comparar el grupo de BSAMR con BSAMS se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,006$) entre ambos grupos, de modo que más de la mitad de las BSAMR (n=11/16, 68,8%) fueron bacteriemias relacionadas con la asistencia sanitaria (RAS), aunque consideradas de forma global, las bacteriemias por *S. aureus* fueron mayoritariamente de adquisición nosocomial.

En población infantil, el 23,8% (n=5/21) de las bacteriemias por *S.aureus* fueron adquiridas en la comunidad, siendo el 100% de ellas BSAMS (Tabla14). En el 38,1% (n=8/21) la adquisición fue nosocomial. La bacteriemia relacionada con cuidados sanitarios (RAS) supuso un 38,1% (n=8/21). Al comparar el grupo de BSAMR con BSAMS se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,023$). Al igual que en los adultos, ninguna de las BSAMR tuvo adquisición comunitaria, sin embargo en los niños el porcentaje mayor de éstas fue de adquisición nosocomial (83,3%) y un 16,7% fueron bacteriemias relacionadas con la asistencia sanitaria (RAS). En el grupo de BSAMS el 20% fueron nosocomiales, 33,3% comunitarias y 46,7% RAS.

De las bacteriemias de origen nosocomial de la población adulta (57 pacientes, 53,3%), un 43,8% (25/57) se diagnóstico en la primera semana de ingreso, un 29,8% (17/57) en la segunda, un 14% (8/57) en la tercera, un 7% (4/57) en la cuarta y en un 5,2% (3/57) se hizo posteriormente.

Entre los pacientes pediátricos con bacteriemia de adquisición nosocomial, un 37,5% (3/8) la desarrolló en la primera semana de ingreso, un 12,5% (1/8) en la tercera, un 25% (2/8) en la cuarta y un 25% (2/8) lo hizo posteriormente. No se diagnóstico ningún caso en la segunda semana de ingreso.

Tabla 13: Lugar de adquisición de la bacteriemia en función a la sensibilidad a meticilina en adultos.

Los datos se expresan como número de casos (porcentaje)

Adultos	BSA n=109 (%)	BSARM n= 16 (%)	BSAMS n=93 (%)	P
Comunitaria	15 (13,7)	0 (0)	15 (16,1)	0.006
Nosocomial	57 (53,3)	5 (31,3)	52 (55,9)	
RAS	37 (33,9)	11 (68,7)	27,9 (29)	

Tabla 14: Lugar de adquisición de la bacteriemia en función a la sensibilidad a meticilina en

pediátrica. Los datos se expresan como número de casos (porcentaje)

Pediatría	BSA n=21 (%)	BSARM n= 6 (%)	BSAMS n=15 (%)	P
Comunitaria	5 (23,8)	0 (0)	5 (33,3)	0,023
Nosocomial	8 (38,1)	5 (83,3)	3 (20)	
RAS	8 (38,1)	1 (16,7)	7 (46,7)	

Tal y como se refleja en la Tabla 15, entre los servicios clínicos en los que estaba ingresado el paciente en el momento de la extracción de los hemocultivos destacó el Servicio de Urgencias y los Servicios médicos con un 30,3% respectivamente.

Tabla 15: Distribución en los diferentes Servicios Clínicos

SERVICIOS	BSA	BSAMR	BSAMS
Pediatría	21 (15,9%)	28,6%	71,4%
Urgencias	40 (30,3%)	17,5% (7/40)	82,5% (33/40)
Servicios Médicos	40 (30,3%)	10% (4/40)	90% (36/40)
Servicios Quirúrgicos	14 (10,6%)	7,1% (1/14)	92,9% (13/14)
Servicios de Alto riesgo	17 (12,9%)	23,5% (4/17)	76,5% (13/17)

Aunque no hubo diferencias significativas, se observó un mayor número de bacteriemias en el Servicio de Urgencias y en los Servicios Médicos. De los pacientes donde se les recogió el primer hemocultivo en Urgencias, más de la mitad, un 60%, fueron ingresados en el algún Servicio Médico (24/40). Sin embargo el porcentaje de SARM es ligeramente más elevado en Pediatría y en Urgencias que en el resto de servicios, y en las áreas quirúrgicas es donde menor porcentaje hay.

Al comparar el grupo de BSAMR con el de BSAMS no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

Con respecto al foco de origen de bacteriemia en el total de pacientes adultos con BSA, el síndrome infeccioso más frecuente fue la bacteriemia relacionada con catéter (31.8%), de los que un 37% fue bacteriemia relacionada con catéter central y en un 62 % el foco fue flebitis por un catéter periférico. En el 29 % del total no se identificó la causa, por lo que se consideró como bacteriemia primaria. Un 16,8% se atribuyó a infección de piel y partes blandas, 5,6% a origen osteoarticular, 10% foco respiratorio, 2,8% endocarditis infecciosa, 2,8% herida quirúrgica y 0,9% meningitis. Al comparar el foco de origen en el grupo de BSAMR con BSAMS (Figura 16) se encontraron diferencias significativas ($p=0,05$). En las BSARM, en un 25% de los casos no se aclaró el foco de origen de la bacteriemia por lo que las bacteriemias primarias fueron las más frecuentes junto al foco respiratorio, que también presentó un 25%, seguido de infección de piel y partes blandas, osteoarticular y catéter (en los tres casos con un 12,5%). En las BSAMS el foco más frecuente fue el catéter (94,1%) seguido de foco "desconocido" (29,7%) y piel y partes blandas (17,6%).

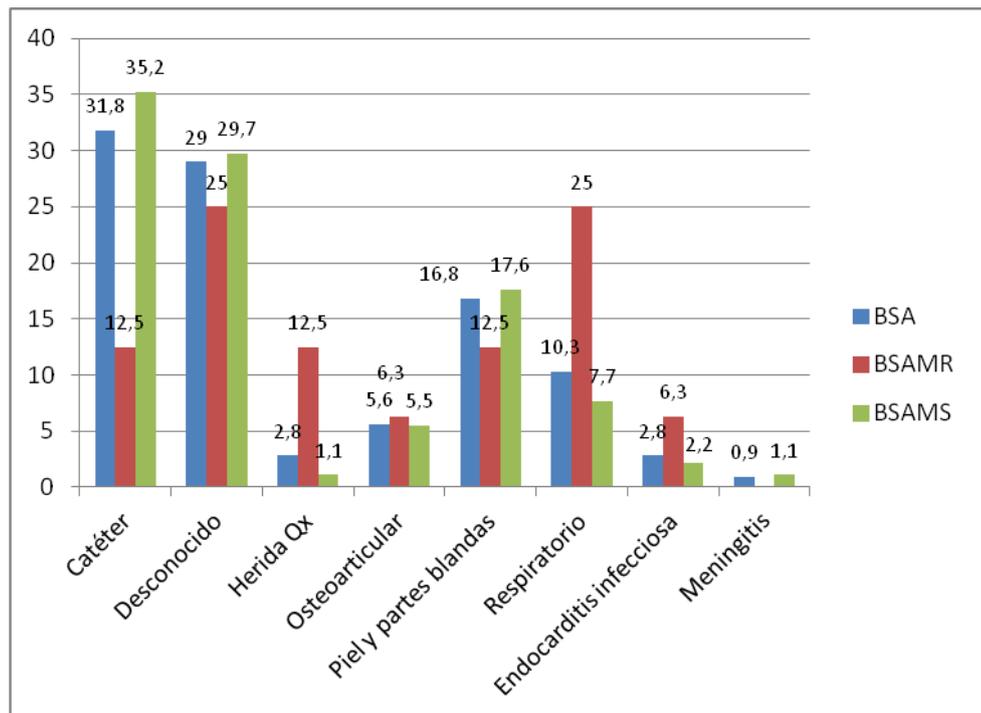


Figura 16: Principales focos de la bacteriemia en adultos.

Relacionando los focos de origen de la bacteriemia con el tipo de adquisición de la misma se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$), como se refleja en la Tabla 16:

Las bacteriemias cuyo foco de origen fue el catéter vascular, la herida quirúrgica, foco respiratorio y las de foco primario fueron mayoritariamente de origen nosocomial. Las de foco osteoarticular y piel y partes blandas la adquisición fue relacionada con la asistencia sanitaria y sólo la endocarditis infecciosa tuvo un origen predominantemente comunitario (Tabla 16).

Tabla16: Adquisición del foco de bacteriemia en pacientes adultos (porcentajes)

Foco/Adquis	CT	Desc	H.Quir	Os-art	P-P-B	Resp.	E.I	Meng	P
A.Comunitaria	0	8 (19,4)	0	0	4 (22,2)	1 (9,1)	2 (66,7)	0	<0,01
A.nosocomial	27(79,4)	15 (48,4)	2(66,7)	1 (16,7)	3 (16,7)	8 (72,7)	0	1 (100)	
A.RAS	7(20,6)	10 (32,3)	1(33,3)	5 (83,3)	11 (61,1)	2 (18,2)	1 (33,3)	0	

CT: catéter; Desc: foco desconocido; H.Quir: herida quirúrgica; Os-art: osteoarticular; P-P-B: piel y partes blandas; E.I: endocarditis infecciosa; Meng :meningitis.

En los pacientes pediátricos, de los 21 niños el síndrome infeccioso más frecuente fue la bacteriemia primaria (47,6%), seguido del foco osteoarticular (23,8%), bacteriemia relacionada con catéter (14,3%), herida quirúrgica (9,5%) e infección de piel y partes blandas (4,8%). A diferencia de los adultos, en la población pediátrica no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de BSARM y BSAMS (Figura 17). En las BSARM el foco más frecuente fue el de causa desconocida (66,7%). En BSAMS ocurre algo similar (40% de foco desconocido).

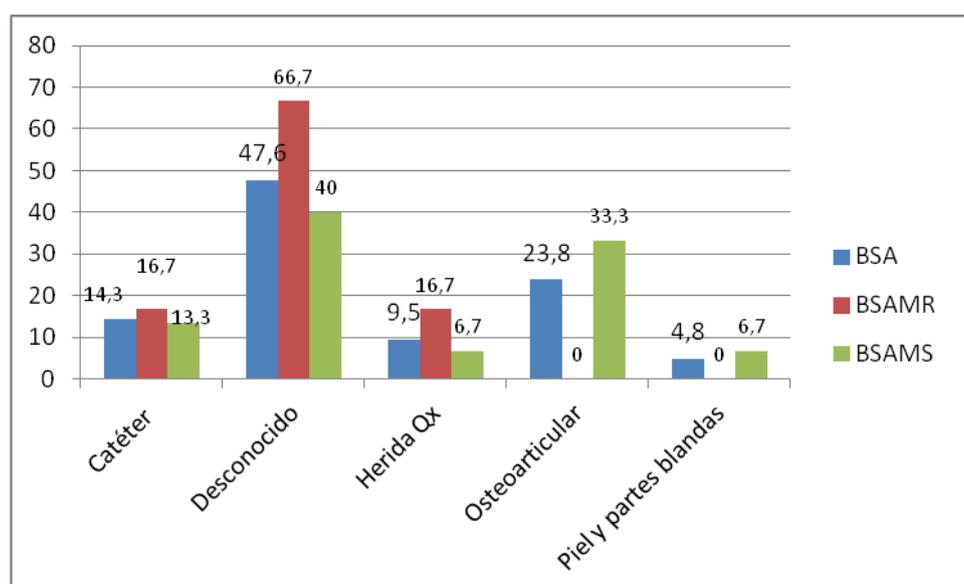


Figura 17 : Principales focos de la bacteriemia en niños.

Con respecto a la relación entre el tipo de adquisición de la bacteriemia en pacientes pediátricos y el foco de origen no se encontraron diferencias significativas, pero sí cierta tendencia a la significación ($p=0,088$) como se refleja en la Tabla 17. Así, al igual que en la población adulta la mayoría de las infecciones de origen en catéter vascular y foco desconocido fueron de adquisición nosocomial y las de piel y partes blandas relacionadas con la asistencia sanitaria. Destacar que las bacteriemias de foco osteoarticular fueron en su mayoría de adquisición comunitaria y que, a diferencia de la población adulta, las de origen en la herida quirúrgica se consideraron relacionadas con la asistencia sanitaria, no estrictamente nosocomiales.

Tabla 17: Adquisición del foco de bacteriemia en pacientes pediátricos (porcentajes)

Foco/Adquis	CT	Desc	H.Quir.	Os-art	P-P-B	P
A.Comunitaria	0	1 (10)	0	4 (80)	0	
A.nosocomial	2 (66,7)	5 (50)	1 (33,3)	0	0	0,088
A.RAS	1 (33,3)	4 (40)	2 (66,7)	1 (20)	1 (100)	

CT: catéter; Desc: foco desconocido; H.Quir: herida quirúrgica; Os-art: osteoarticular; P-P-B: piel y partes blandas

Se analizaron algunos marcadores clínicos y de laboratorio relacionados con la infección bacteriémica por *S.aureus*, como la fiebre, leucocitosis, procalcitonina, proteína C reactiva (PCR) y tipo de respuesta inflamatoria sistémica observada.

En el 50,9% de los pacientes adultos ($n=56/109$) la temperatura fue superior a 38 °C. La mediana fue de 38,5 (35-40) RIQ: 1. Al comparar las BSAMR con BSAMS mediante la U de Mann-Whitney se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0.05$), siendo mayor en BSAMS.

Un 53,27% de la población adulta presentó leucocitosis con una mediana de 11.360 (500-70.400) RIQ: 7.220. Se recogieron datos relativos a procalcitonina en 35 pacientes (32,1%), de ellos, un 48,6% tuvieron valores por encima de 2 ng/ml. Comparando dicho marcador entre los dos grupos de sensibilidad a meticilina, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, pero sí tendencia a la

significación en las BSAMR, que presentaban mayor porcentaje de procalcitonina ≥ 2 . No se encontraron diferencias significativas entre el grupo de BSAMR y BSAMS en cuanto a los valores de la PCR (Tabla 18).

Tabla 18: Diferencias entre los marcadores de laboratorio en función de la resistencia a meticilina en población adulta. El valor de los denominadores depende en cada caso del evento analizado.

ADULTOS	BSA	BSAMR	BSAMS	P
	n/n total (%)	n/n total (%)	n/n total (%)	
Leucocitosis				
LEU <11.000	50/107 (46,7)	9/16 (56,3)	1/91 (45,1)	0,408
LEU ≥ 11.000	57/107 (53,27)	7/16 (43,8)	50/91 (54,9)	
Procalcitonina				
PCT <2	18/35 (51,4)	1/6 (16,7)	18/29 (58,6)	0,061
PCT ≥ 2	17/35 (48,6)	5/6 (83,3)	12/29 (41,4)	
PCR				
PCR <5	11/75 (14,7)	3/13 (23,1)	8/62 (12,9)	0,54
PCR ≥ 5	64/75 (85,3)	10/13 (76,9)	54/62 (87,1)	

LEU: Leucocitosis; PCT: Procalcitonina; PCR: Proteína C Reactiva

En niños en los que quedó reflejada la temperatura en la historia clínica el 71.4% (n=10/14) presentaron fiebre. La mediana fue de 38,95°C (35,50-40,30) RIQ: 1. La diferencia en el aumento de la temperatura corporal entre los dos grupos de bacteriemias (BSAMR y BSAMS) no fue significativa

En población infantil, un 55,5% tuvo leucocitosis con una mediana de 10.500 (700-22.640) RIQ: 6.368. Un 38,5% tuvo una procalcitonina por encima de 2 ng/ml , y un 55% presentó una PCR mayor o igual de 5 mgr/dl. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos BSAMR y BSAMS en ninguno de los marcadores analizados (Tabla 19).

Tabla 19: Marcadores de laboratorio en función de la resistencia a metilina en población pediátrica. El valor de los denominadores depende en cada caso del evento analizado.

PEDIATRIA	BSA n y (%)	BSAMR n y (%)	BSAMS n y (%)	P
Leucocitosis				
LEU <11.000	8/18 (44,4)	1/5 (20)	7/13 (53,8)	0,196
LEU ≥11.000	10/18 (55,5)	4/5 (80)	6/13 (46,2)	
Procalcitonina				
PCT <2	8/13 (61,5)	2/4 (50)	6/9 (66,7)	0,569
PCT ≥2	5/13 (38,5)	2/4 (50)	3/9 (33,3)	
PCR				
PCR <5	9 (45)	3 (60)	6 (40)	0,574
PCR ≥5	11 (55)	2 (40)	9 (60)	

LEU: Leucocitosis; PCT: Procalcitonina; PCR: Proteína C Reactiva

En cuanto a la gravedad del síndrome de respuesta sistémica en el debut de la bacteriemia, al comparar al grupo de pacientes con sepsis grave/shock séptico frente al grupo de los que no presentaron sepsis o ésta fue leve, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre BSARM y BSAMS en ninguno de los dos grupos de población adulta y pediátrica (Figura18).

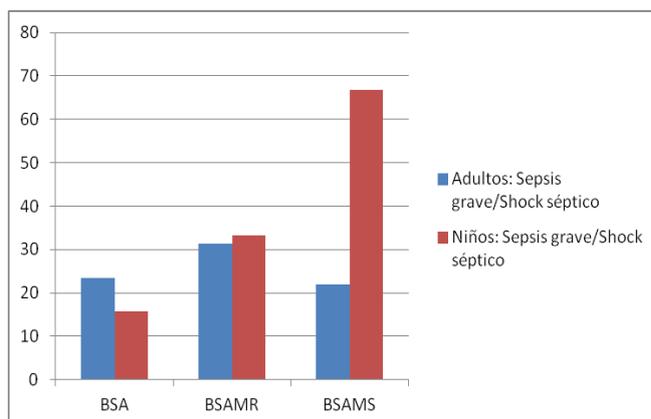


Figura 18: Porcentaje de sepsis grave en el grupo de BSAMS y BSAMR tanto en adultos como en niños

En pacientes adultos, en función del foco de infección, cursaron con sepsis grave o shock séptico el 36,4% (4/11) de las bacteriemias de origen respiratorio, el 33,3% (1/3) de las endocarditis infecciosas, el 33,3% (6/18) de infecciones de piel y partes blandas, el 33,3% (1/3) de herida quirúrgica, 19,4% (6/31) de las de origen desconocido, 17,6% (6/34) de bacteriemias relacionadas con catéter, el 16,7% (1/6) de las infecciones osteoarticulares, y la que tuvo como foco de origen una meningitis no cursó con sepsis grave (Tabla 20 y Figura 18). En los pacientes adultos, el valor de la escala de gravedad aguda (determinada el día de aparición de la bacteriemia mediante el índice de Pitt) fue mayor de 2 en el 25% de los pacientes. No hubo diferencias significativas entre el grupo de pacientes con BSARM y BSAMS.

Tabla 20. Sepsis grave vs shock séptico en cada uno de los diferentes focos de bacteriemia (porcentaje) en población adulta.

Foco/ Sepsis	CT	Desc.	H.Quir	Os-art	P-P-B	Resp.	E.I.	Meng	P
Sepsis grave	6 (17,6)	6(19,4)	1(33,3)	1 (16,7)	6 (33,3)	4(36,4)	1 (33,3)	0	0,81

CT: Catéter; Desc: Desconocido; H.Quir: herida quirúrgica; Os-art: osteoarticular; P-P-B: piel y partes

blandas; E.I: endocarditis infecciosa; Meng: Meningitis

En población infantil presentó sepsis grave o shock séptico el 20% (1/5) de las infecciones osteoarticulares, el 20% (2/10) de las de origen desconocido, y ninguna de las bacteriemias relacionadas con catéter, herida quirúrgica ni piel y partes blandas (Tabla 21 y Figura 18).

Tabla 21. Sepsis grave vs shock séptico en cada uno de los diferentes focos de bacteriemia (porcentaje) en población pediátrica.

Foco/Sepsis	CT	Desc	H.Quir.	Os-art	P-P-B	P
Sepsis grave	0	2 (20)	0	1 (20)	0	0,790

CT: Catéter; Desc: Desconocido; H.Quir: herida quirúrgica; Os-art: osteoarticular; P-P-B: piel y partes blandas

Por último, revisando los criterios de bacteriemia complicada (BC), en los pacientes adultos, 35 casos (32,11%) presentaron al menos un criterio de BC. La distribución por servicios fue la siguiente: UCI (56,3%), Servicios Quirúrgicos (35,7%) seguido de Urgencias (29,7%) y Servicios Médicos (24,3%). El servicio que mostró el menor porcentaje fue Pediatría (14,28%) con tres casos de los 21 (Figura 21).

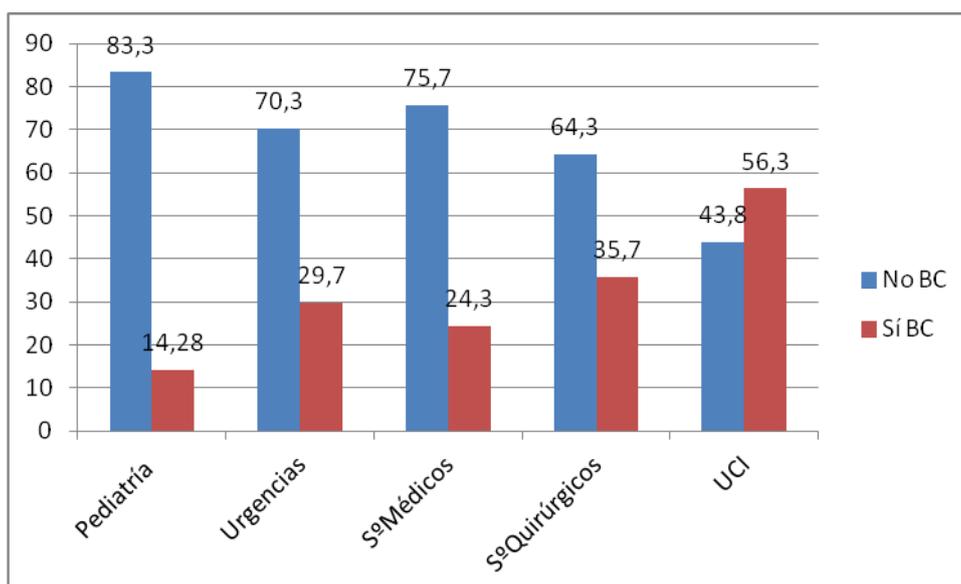


Figura 21 : Presencia de bacteriemia complicada en los diversos Servicios. Los datos se

expresan en porcentaje

En las Tablas 22 y 23 se recogen diferentes variables asociadas a BC tanto en la población adulta como en la pediátrica. Los datos se expresan como número de casos (porcentaje). Los pacientes con procalcitonina >2 o PCR >5 tienen más riesgo de tener una bacteriemia complicada; así como tener una bacteriemia con índice de Pitt >2 o que debuta con shock séptico.

Tabla 22: Variables asociadas a bacteriemia complicada en adultos. Los datos se expresan como número de casos (porcentajes). El valor de los denominadores depende en cada caso del evento analizado.

ADULTOS	Bacteriemia no complicada	Bacteriemia complicada	P	RR IC 95%
BSAMR	7 (67,3)	9 (56,3)	0,029	3,240 (1,088-9,646)
BSAMS	63 (71,6)	25 (28,4)		
Prcalcitonina				
PCT ≤2	14 (77,8)	4 (22,2)	0,001	11,375(2,347-55,124)
PCT >2	4 (23,5)	13 (76,5)		
PCR				
PCR <5	7 (70)	3 (30)	0,110	---
PCR ≥5	36 (30)	26 (70)		
Índice de Pitt				
Pitt <2	61 (75,3)	20 (24,7)	0,001	4,744(1,784-12,615)
Pitt ≥2	9 (39,1)	14 (60,9)		
Sepsisgrave/Shockséptico				
No	61 (76,3)	19 (23,8)	<0,001	5,351(2,021-14,168)
Sí	9 (37,5)	15 (62,5)		

PCT: procalcitonina; PCR: proteína C Reactiva

Tabla 23 : Variables asociadas a bacteriemia complicada en niños. Los datos se expresan como número de casos (porcentajes). El valor de los denominadores depende en cada caso del evento analizado.

PEDIATRÍA	Bacteriemia complicada	no complicada	P
BSAMR	3 (75)	1 (25)	0,612
BSAMS	12 (85,7)	2 (14,3)	
Procalcitonina			
PCT <2	4 (66,7)	2 (33,3)	0,621
PCT ≥2	2 (80)	1 (20)	
PCR			
PCR <5	6 (85,7)	1 (14,2)	0,598
PCR ≥5	9 (81,8)	2 (18,2)	
Sepsisgrave/shock séptico			
No	12 (80)	3 (20)	0,396
Sí	3 (100)	0 (0)	

PCT: Procalcitonina; PCR: Proteína C Reactiva

4.2. Características microbiológicas de las bacteriemias por *S.aureus*.

De los 131 aislamientos clínicos, 21 se identificaron como SAMR (16%) y 110 (84%) como SAMS.

Para detectar la resistencia a meticilina de forma preliminar se realizó la detección de PBP2a mediante inmunocromatografía. Esta resistencia a meticilina se confirmó en los aislados de SAMR mediante una PCR múltiple (MPCR) en la que se detectó el gen *mecA*, gen estructural de la PBP2A, siendo positivo en todos los casos, coincidiendo con los resultados obtenidos por inmunocromatografía. En esta MPCR también se amplificaron los genes codificantes de la leucocidina de Pantón-Valentine,

obteniéndose sólo una cepa positiva. Se trataba de un paciente oncológico, con antecedente de cirugía en el mes previo al episodio de bacteriemia, y en el que el foco de bacteriemia fue la herida quirúrgica. La adquisición no fue estrictamente comunitaria, sino relacionada con la asistencia sanitaria. A pesar de la gravedad de la enfermedad de base, el proceso infeccioso evolucionó satisfactoriamente.

En 15 de los 131 pacientes (11.4%) el aislamiento fue polimicrobiano, sólo uno correspondió a población pediátrica (6,7%) y el resto a población adulta.

En los pacientes con hemocultivos positivos, se comprobó el aislamiento de *S.aureus* en otro tipo de muestras clínicas. Hubo 45 pacientes con aislamientos adicionales de *S. aureus* (34.3%) siendo la muestra más frecuente el exudado de herida (13.6%) seguida de punta de catéter (9; 6.8%) (Tabla 24).

Tabla 24: Diferentes muestras procesadas junto a hemocultivos (n=45)

Ex her	CT	Resp	L. sinovial	Urocultivo	Lcr	Ex conjuntival	Ex her Qx	P.vál.Cz.
18 (13,6)	9 (6,8)	6 (4,5)	3 (2,39)	3 (2,3)	2 (1,5)	2 (1,5)	1 (0,8)	1 (0,8)

Ex her: exudado herida; CT: punta de catéter; Resp: respiratoria; L: líquido;

Lcr: Líquido cefalorraquídeo; Ex her Qx: exudado herida quirúrgica P.val.cz: prótesis válvula cardiaca

4.2.1. Tiempo de positividad de los hemocultivos

Se estudiaron los tiempos de positividad de los hemocultivos de las BSA. En adultos, los hemocultivos tuvieron un tiempo de positividad con una media de 17,55 (SD:1,09) y una mediana de 14,47 (4,88-90), RIQ: 7,15. En niños, los hemocultivos tuvieron un tiempo de positividad con una media de 16,34 (SD: 1,98) y una mediana de 14,55 (9,35-53,00), RIQ: 3,13. Se eligió un tiempo inferior o igual a 12 horas para observar como influyen las diferentes variables.

En las Tablas 25 y 26 se describen las variables que pueden estar asociadas a un tiempo de positividad del hemocultivo inferior o igual a 12 horas en la población adulta y pediátrica. No se encontraron diferencias significativas en ninguna de ellas

en ninguno de los dos grupos de población. Sólo hubo tendencia a la significación ($p=0,062$) en el caso del parámetro de laboratorio PCR en población adulta, de forma que los pacientes que presentan un valor de PCR mayor o igual a 5 tienen un mayor porcentaje de hemocultivos con tiempo de positividad inferior a 12 (73%).

Tabla 25: Variables asociadas al tiempo de positividad del hemocultivo inferior o igual a 12 horas en población adulta

ADULTOS	≤ 12 horas	> 12 horas	P
BSAMR	4 (25)	12 (75)	0,769
BSAMS	26 (28,6)	65 (71,4)	0,769
Sepsis grave/shock séptico			0,128
No	20 (24,4)	62 (75)	
Sí	10 (40)	15 (60)	
PCR			
PCR <5	3 (27)	8 (72,7)	0,062
PCR ≥5	20 (73)	44 (27,3)	

En el grupo de pacientes adultos al comparar la gravedad del episodio infeccioso en el grupo de bacteriemias cuyos hemocultivos fueron positivos con un tiempo igual o inferior a 12 horas con aquellos con un tiempo superior a 12 horas no hubo diferencias significativas. De las 30 bacteriemias con un tiempo de positividad igual o menor a 12 horas, sólo un 33,3% (10/30) cursó con sepsis grave o shock séptico; de las 77 bacteriemias con tiempo superior a 12 horas, un 19,5% (15/77) evolucionó con sepsis grave o shock séptico.

En el grupo de pacientes pediátricos tampoco se encontraron diferencias significativas (Tabla 26). De las 3 bacteriemias con un tiempo de positividad igual o menor a 12 horas, sólo un 33,3% (1/3) cursó con sepsis grave o shock séptico; de las 16 bacteriemias con tiempo superior a 12 horas, un 12,5% (2/16) evolucionó con sepsis grave o shock séptico. En las Figuras 22 y 23 se representa el porcentaje de BSA

que cursan con shock séptico vs sepsis grave en cada uno de los focos, y el tiempo de positividad inferior a 12 horas.

Tabla 26: Variables asociadas al tiempo de positividad del hemocultivo inferior o igual a 12 horas en población pediátrica

PEDIATRIA	≤ 12 horas	> 12 horas	P
BSAMR	1 (16,7)	5 (83,3)	0,861
BSAMS	3 (20)	12 (80)	0,861
Sepsis grave/shock séptico			
No	2 (12,5)	14 (87,5)	0,364
Sí	1 (33,3)	2 (66,7)	
PCR			
PCR <5	0 (0)	9 (100)	0,222
PCR ≥5	3 (27,8)	8 (18,2)	

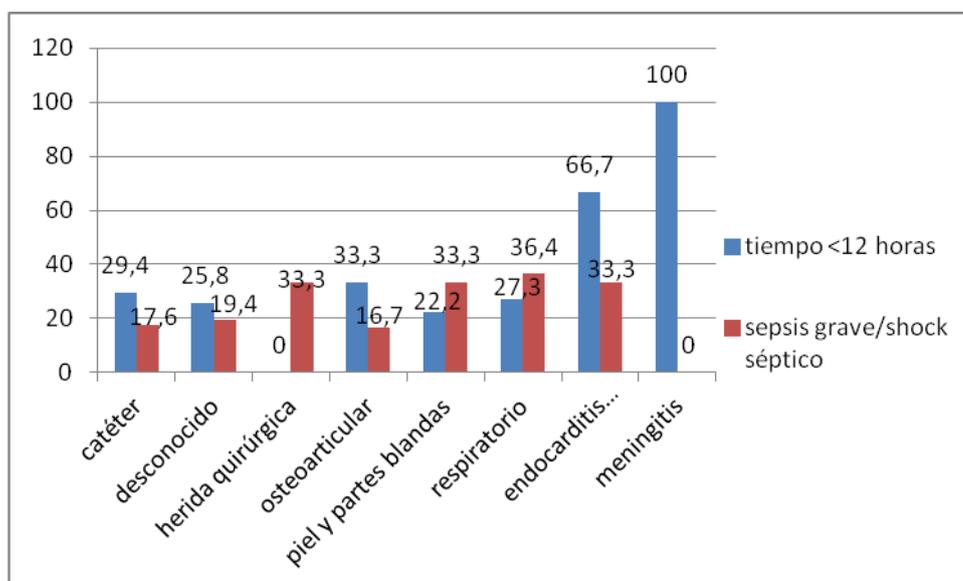


Figura 22: Porcentaje de bacteriemias que cursan con sepsis grave vs shock séptico en función al foco de infección en población adulta y tiempo de positividad inferior a 12 horas

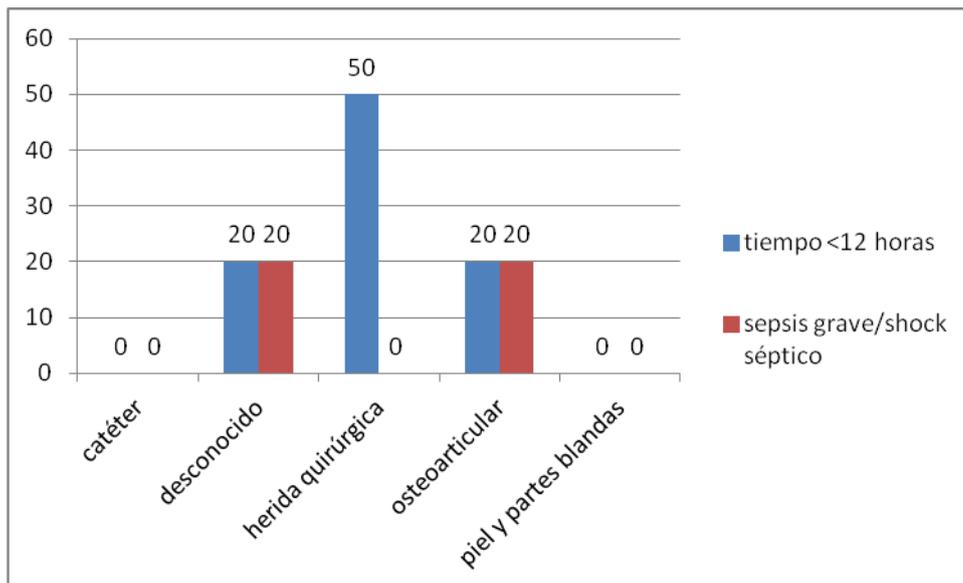


Figura 23: Porcentaje de bacteriemias que cursan con sepsis grave vs shock séptico en función al foco de infección en población pediátrica y tiempo de positividad inferior a 12 horas.

En la Tabla 27 se representa el porcentaje de BSA que cursan con BC en base al tiempo de positividad.

Tabla 27: Porcentaje de bacteriemias que cursan con BC en función al tiempo de positividad

Tiempo positividad	Bacteriemia complicada	no complicada	P
Adulto			
≤12 horas	15 (51,7)	14 (48,3)	0,035
>12 horas	55 (73,3)	20 (26,7)	
Pediatría			
≤12 horas	3 (100)	0 (0)	0,396
>12 horas	12 (80)	3 (20)	

4.2.2. Patrón de sensibilidad antibiótica de los aislados

Se realizó estudio de la sensibilidad a antibióticos de todos los aislamientos estableciéndose los porcentajes de resistencia a los diferentes antibióticos y los diferentes patrones. Así, de las 21 cepas SAMR estudiadas el 80,9% (17/21) fueron resistentes a levofloxacino, el 42,8% (9/21) fueron resistentes a eritromicina, el 33% (7/21) a clindamicina, el 71,4% (15/21) resistentes a tobramicina. De los aislados resistentes a eritromicina, el 9,5% (2/21) mostraron el fenotipo M, ninguno mostró el fenotipo de resistencia inducible y 33,3% (7/21) presentaron el fenotipo MLS_c de resistencia constitutiva. Todos los aislados fueron sensibles a vancomicina ($CMI \leq 2 \text{ mg/l}$) y a teicoplanina ($CMI \leq 8 \text{ mg/l}$) y a linezolid ($CMI < 4 \text{ mg/l}$). La Tabla 28 muestra los diferentes patrones de resistencia. Se encontraron 9 patrones de resistencias diferentes. Cuatro aislados se mostraron sólo resistentes a meticilina (19%), y se observó resistencia a tres o más antibióticos en 9 aislamientos (42,8%): a tres, cuatro o cinco antibióticos en el 9,5%, 23,8%, y 9,5% respectivamente. Es de destacar la presencia de una cepa con una CMI a daptomicina de 1,5 mg/l en un aislamiento correspondiente a un paciente varón de 70 años con BSA relacionada con infección del bolsillo de marcapasos.

Tabla 28: Patrones de resistencia fenotípica en SAMR

Pérfil resistencias	N=21 (%)
Oxacilina	4 (19)
Levo	1 (4,7)
Levo+Tobra	6 (28,5)
Levo+Eritro	1 (4,7)
Levo+Eritro+Tobra	1 (4,7)
Levo+Cotri +Tobra	1 (4,7)
Levo+Eritro+Clinda+Tobra	5 (23,8)
Levo+Eritro+Clinda+Tobra +Rifam+Cotri	1 (4,7)
Levo+Eritro+Clinda+Tobra+ Rifam+Dapto	1 (4,7)

Levo: levofloxacino; Eritro: eritromicina; Tobra: tobramicina; Clinda: clindamicina; Cotri: cotrimoxazol; Rifam: rifampicina; Dapto: daptomicina

De las 110 cepas de SAMS, 105 fueron resistentes a penicilina (95,4%). Un 64,53% fueron resistentes sólo a ese antibiótico y sensibles al resto. Fueron resistentes a levofloxacino el 9,1% (10/110), 30% (33/110) fueron resistentes a eritromicina, el 13,6% (15/110) a clindamicina, el 2,7% (3/110) resistentes a tobramicina. De los 28 aislados resistentes a eritromicina, el 11,8% (13/110) mostraron el fenotipo M, el 10,9% (12/110) mostró el fenotipo MLS_i de resistencia inducible y un 2,7% (3/110) presentaron el fenotipo MLS_c de resistencia constitutiva. Todos los aislados fueron sensibles a vancomicina ($CMI \leq 2\text{mg/l}$) y a teicoplanina ($CMI \leq 8\text{mg/l}$). Se encontraron 10 patrones de resistencias diferentes, que se muestran en la Tabla 29. Se observó resistencia a tres o más antibióticos en 21 aislamientos (19,1%): a tres, cuatro o cinco antibióticos en 13,6%, 4,5%, y 0,9% respectivamente.

Tabla 29: Patrones de resistencia fenotípica en SAMS

Pérfil de resistencia	n= 110 (%)
Sensible a todos los antibióticos	4 (3,6%)
Penicilina	71 (64,5)
Penicilina+ Eritro	13 (7,2)
Penicilina+ Levo	1 (0,9)
Penicilina+ Eritro+Clinda	12 (10,9)
Penicilina+ Eritro + Levo	3 (2,7)
Penicilina+ Eritro+Clinda+Levo	3 (2,7)
Penicilina+ Eritro + Levo+Tobra	1 (0,9)
Penicilina+ Levo+Tobra+Genta	1 (0,9)
Penicilina+ Eritro + Levo+Tobra+Genta	1 (0,9)

Levo: levofloxacino; Eritro: eritromicina; Tobra: tobramicina; Clinda: clindamicina; Cotri: cotrimoxazol; Rifam: rifampicina; Genta: gentamicina.

Con el fin de determinar la CMI exacta se realizó E-test® (AB Biodisk, Solna, Sweden) en las 122 cepas SAMR y SAMS para los siguientes antibióticos: linezolid, tigeciclina, vancomicina y daptomicina. Comparados los valores de los E-test® en los dos grupos no se observan diferencias estadísticamente significativas; no obstante en

daptomicina se manifiesta una tendencia a la significación ($p=0,076$) en el grupo de SAMR elevadas.

En cuanto a la CMI de vancomicina (Figura 22), de las 122 cepas analizadas, un total de 53 cepas (43,4%) tuvieron $CMI < 1.5 \text{ mg/l}$, de las que 46 fueron SAMS (86.8%) y 7 fueron SARM (13.2%). No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos. El resto de los *S.aureus*, 69 (56,55%) tuvieron $CMI \geq 1.5 \text{ mg/l}$, de los que 55 fueron SAMS (54.5%) y 14 SARM (66,7%).

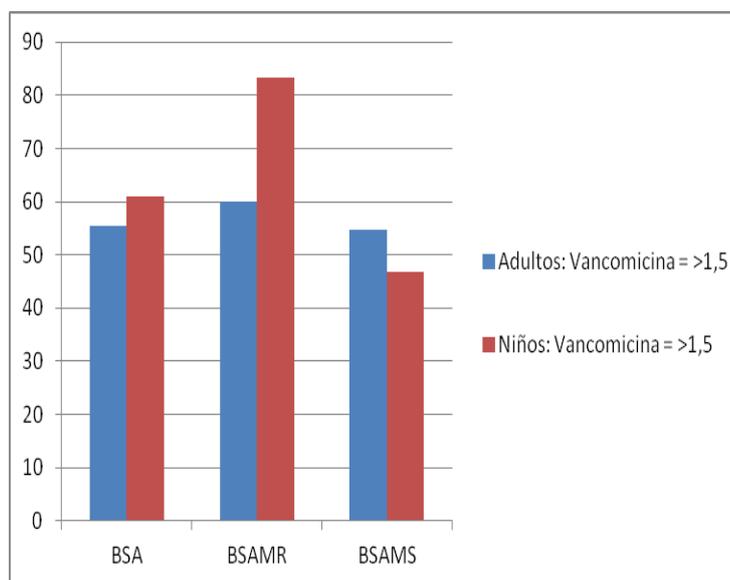


Figura 22. Aislamientos de SAMR y SAMS con CMI a vancomicina $\geq 1,5 \text{ mg/l}$, tanto en población adulta como pediátrica (porcentajes).

4.3. Caracterización fenotípica (fagotipificación)

Se realizó la caracterización mediante análisis de fagos a la totalidad de cepas de *S. aureus*, diferenciándose los resultados en los SAMR y SAMS

4.3.1. Análisis de las cepas SAMR mediante fagotipia

El análisis de las 21 cepas de SAMR aisladas en 2012 y 2013 en hemocultivos mediante la aplicación del juego de fagos internacional nos permitió diferenciar cuatro fagogrupos diferentes (Tabla 30), entre los que el tipo III y el I, fueron los predominantes con el 19% y el 14,2% respectivamente. Sin embargo, casi la mitad (47,6%) de los aislados SAMR no se pudieron fagotipar, considerándose “no tipables” (NT). A las 11 cepas de SAMR que no fueron sensibles al juego internacional de fagos se les aplicó una técnica alternativa de caracterización (fagotipia inversa) a fin de establecer relaciones epidemiológicas entre ellas, mediante la inducción de los fagos de estos aislados. La fagotipia inversa mostró una distribución heterogénea, sin poder establecer agrupaciones. La fagotipia en este estudio no nos ha permitido encontrar resultados concluyentes.

Tabla 30: Porcentaje de aislados de SAMR en cada uno de los fagogrupos

Fagogrupo	Fagotipo	Aislados n (%)
NT		10 (47,6%)
I	29, 52A y 80	3 (14,2%)
I-III	29,52,52A,75,80 83A,85	2 (9,5%)
II	55	1 (4,7%)
III	42E,53,75,77, y 84	4 (19,%)

NT: no tipables

4.3.2. Análisis de cepas SAMS mediante fagotipia

Los resultados de la fagotipia de las 101 cepas SAMS muestran la presencia de 6 fagogrupos de los cuales el tipo III y el II fueron mayoritarios con el 18,6% y el 12,7% respectivamente (Tabla 31). Sin embargo, casi la mitad de los aislados SAMS no se pudieron fagotipar (NT) como sucedía con los aislados SAMR.

Tabla 31: Porcentaje de aislados de SAMS en cada uno de los fagogrupos

Fagogrupo	Fagotipo	Aislados n (%)
NT		48 (47,5)
I	29,52,52A,79,80	7 (6,9%)
II	55,71,3C	13 (12,8%)
III	6,42E,47,53,54,75,84,85	19 (18,8%)
III- 81	83A - 81	1 (0,9%)
V	94,96	3 (2,9)
S	95	10 (9,9)

NT: no tipables

A las 48 cepas que no fueron sensibles al juego internacional de fagos se les aplicó una técnica alternativa de caracterización (fagotipia inversa) a fin de establecer relaciones epidemiológicas entre ellas, mediante la inducción de los fagos de estos aislados. No se pudo establecer relaciones epidemiológicas entre los diferentes patrones encontrados.

4.4. Caracterización molecular

4.4.1. Tipos estructurales de *SCCmec*

Se determinó el tipo de cassette *SCCmec* en todas las cepas SARM. Se observó un claro predominio del cassette *SCCmec* tipo IVc, que apareció en 19 de los 21 aislados (90,47%). Los cassettes tipo IVh y V se mostraron en sólo un aislado cada uno (Figura 23).

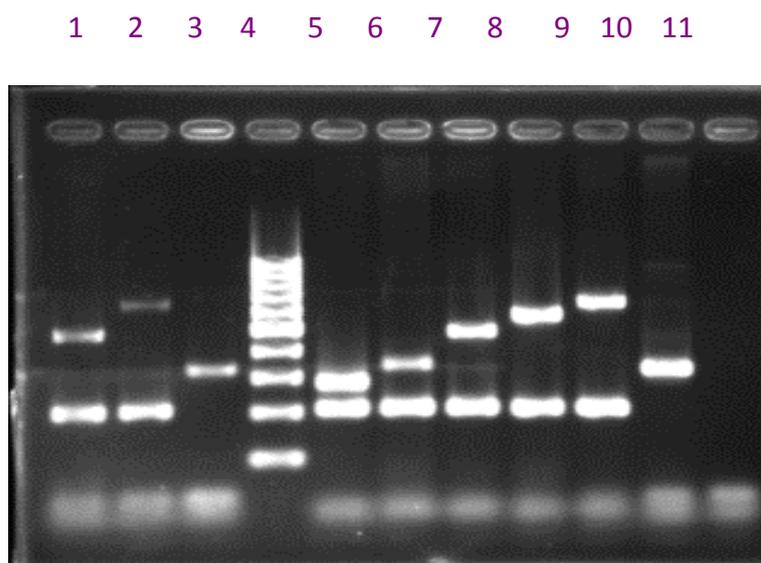


Figura 23: Electroforesis de productos de PCR múltiple para detección de tipos SCCmec. PCR múltiple para subtipaje del cassette SCCmec IV (1: Subtipo **IVc**; 2: Subtipo **IVh**; 3: Subtipo **V**; 4: ladder; 5: control subtipo **IVa**; 6: control subtipo **IVb**; 7: control subtipo **IVc**; 8: control subtipo **IVd**; 9: control subtipo **IVh**; 10: control subtipo **V**; 11: no tipable control negativo)

4.4.2. Tipificación mediante secuenciación del gen de la proteína A (*spa-typing*)

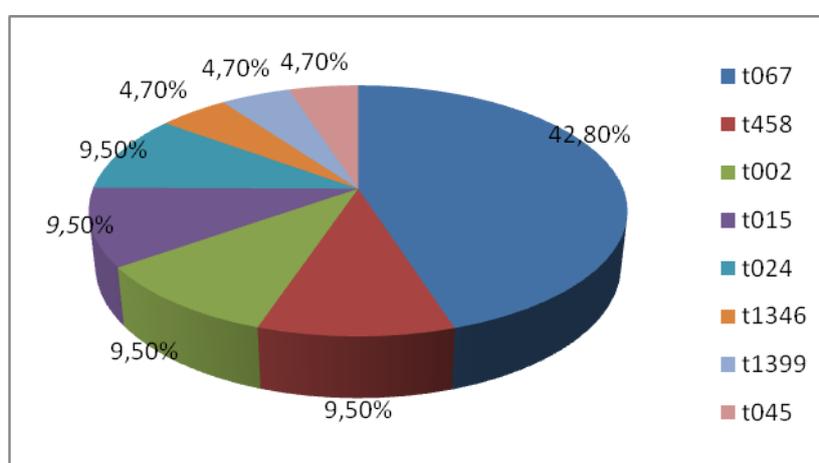
Se realizó el genotipado de todos los aislamientos mediante la secuenciación del gen que codifica la proteína A (*spa-typing*) lo que permitió la clasificación de los diferentes aislamientos en grupos clonales CC BURP y asignación presuntiva del grupo clonal eBURST.

4.4.2.1. Genotipos SARM obtenidos por *spa-typing*

El genotipaje de los 21 aislados SARM mediante *spa-typing* nos dio información de 9 *spa-types* diferentes. Las proporciones se reflejan en la Tabla 32 y Figura 24.

Tabla 32: Resultados obtenidos para el genotipaje de SARM mediante *spa-typing*

Spa type	t067	t458	t002	t015	t024	t1346	t1399	t045	t032
	n=9	n=2	n=2	n=2	n=2	n=1	n=1	n=1	n=1
NºSARM %	42.8	9,5	9.5	9.5	9.5	4.7	4.7	4.7	4.7

Figura 24: Genotipos de SARM mediante *spa-typing*

El *spa-tipe* predominante fue el t067, que representó el 42,8% de los aislados. El resto de los *spa-types* representaron frecuencias que oscilaron entre el 9.5% al 4.7%.

4.4.2.2. Clasificación en grupos clonales CC BURP

Utilizando la herramienta BURP del *StaphType Software*, se agruparon los *spa-types* similares en los siguientes clusters CC BURP:

- CC067: 11 aislados (t067, t002)
- Singleton: 6 aislados (t024, t015, t1346, t1399, t045, t032)
- Excluded: 2 aislados (t458)

Observamos la existencia de un grupo clonal mayoritario, el CC067, con el 52.3% de los aislados, que englobó a los dos *spa-tipes* predominantes, el t067 y el t002. Dos

spa-types quedaron fuera del análisis BURP, siendo clasificados como “Excluded”, correspondiendo ambos al *spa-type* t458. Seis aislados (28,5%), repartidos en seis *spa-types* no presentaron suficiente similitud en este estudio, con ningún otro *spa-type* como para formar un grupo clonal, quedando clasificados como “Singleton”.

4.4.2.3. Asignación de grupo clonal eBURST (grupo clonal presuntivo)

La asignación automática eBURST para cada *spa-type*, realizada a través de *StaphType Software*, reflejó una estrecha relación filogenética entre la mayoría de los aislados genotipados, pues los *spa-types* de los cluster CC067, además de los dos aislados t458 y el t045, se clasificaron en el grupo clonal CC5 de eBURST, lo que representó un 66.6% del total. El resto se asociaron a grupos clonales minoritarios, CC8 (formado por los dos aislados t024; 9.5%), CC45 (formado por los dos t015; 9.5%) y CC22 (t032; 4,7%).

4.4.3. Tipificación de SAMS mediante secuenciación del gen de la proteína A (*spa-typing*)

Se realizó la secuenciación del gen de la proteína A a los 101 aislado SAMS

4.4.3.1. Genotipos SAMS obtenidos por *spa-typing*.

El genotipaje de las cepas SAMS mediante *spa-typing* nos dio información de 70 *spa-types* diferentes lo que nos indicó la gran dispersión clonal en cepas SAMS en nuestra muestra. (Tabla 33), de ellos, 52 aislados representaron un solo *spa-type*.

Tabla 33: Diferentes *spa-types* (porcentajes)

<i>Spa-type</i>	%SAMS	<i>Spa-type</i>	%SAMS	<i>Spa-type</i>	%SAMS
t3266	0,9%	t116 n=4	3.9%	t1900	0,9%
t002 n=4	3.9%	t189	0,9%	t214	0,9%
t491	0,9%	t005 n=2	1.9%	t14412	0,9%
t015 n=3	2.9%	t14420	0,9%	t14414 n=2	1.9%
t5634	0,9%	t14407 n=2	1.9%	t1268	0,9%
t081	0,9%	t021 n=5	4.9%	t050 n=2	1.9%
t012 n=6	5.9%	t067	0,9%	t1951	0,9%
t688 n=2	1.9%	t715	0,9%	t710	0,9%
t701	0,9%	t084 n=2	1.9%	t230 n=3	2.9%
t589	0,9%	t14429	0,9%	t3407	0,9%
t310	0,9%	t11787	0,9%	t223	0,9%
t458	0,9%	t209	0,9%	t148	0,9%
t1601 n=2	1.9%	t267 n=2	1.9%	t4812	0,9%
t045	0,9%	t224	0,9%	t166 n=3	2.9%
t228	0,9%	t4260	0,9%	t493	0,9%
t2321	0,9%	t571	0,9%	t700	0,9%
t053	0,9%	t723	0,9%	t342	0,9%
t645 n=2	1.9%	t14419	0,9%	t270	0,9%
t620	0,9%	t1537	0,9%	t1451 n=2	1.9%
t548	0,9%	t14410	0,9%	t12908	0,9%
t026	0,9%	t258	0,9%	t159	0,9%
t1321	0,9%	t2225 n=2	1.9%	t1156	0,9%
t14411	0,9%	t14428	0,9%	t018	0,9%
t019	0,9%				

4.4.3.2. Clasificación en grupos clonales CC BURP en SAMS

La herramienta BURP de *StaphType Software*, agrupó los *spa-types* similares en clusters. Los 101 aislados de nuestro estudio se agruparon en 12 clusters (Tabla 34), de los que en tres de ellos (cluster 1, cluster 2 y cluster 3) se englobaron los *spa-types* predominantes (CC015, CC012, CC002):

- Cluster 1: spa- CC015 (18% de los aislados): t015, t050, t116, t589, t620, t1156, t1268, t1601, t4260, t14407.
- Cluster 2: spa- CC012(17%): t012, t018, t019, t021, , t342, t700, t710, t14419
- Cluster 3: spa-CC002 (12%): t002, t053, t067, t214, t548, t2225, t14414.

Además, se definieron otros clusters:

- cluster4: CC084 (6%): t084, t228, t491, t3266, t11787
- cluster 5: CC159 (6%): t159, t270, t645, t3407, t14411.
- cluster 6: CC223 (5%): t005, t223, , t310, t5634.
- cluster 7: CC1451 (6%): t230, t571, t1451.
- cluster 8: CC224 (4%): t189, t224, t267.

El resto de clusters (cluster 9, 10, 11, y 12) corresponden al 2%, 2%, 3% y 3% respectivamente de las cepas y fueron clasificados como “no founder” debido a que no están representados por un número suficientes de cepas en este estudio.

- Cluster 9: No founder (2%): t148, t14420.
- Cluster 10: No founder (2%): t081, t258.
- Cluster 11: No founder (3%): t209, t4812.
- Cluster 12: No founder (3%): t688, t12908

El 17% de los aislados no presentaron suficiente similitud con ningún otro *spa-tipo* de este estudio, como para formar un grupo clonal, y quedaron clasificados como “singleton”.

- Singletons: (17%): t045, t166, t493, t701, t715, t723, t1321, t1537, t1900, t1951, t2321, t14410, t14412, t14428, t14429.

Tabla 34: Clasificación de los diferentes *Spa-Type* de SAMS en grupos clonales CC BURP

Número de aislados	Spa-type	Spa-CC
12	t002, t053, t067, t14414, t214, t2225, t548	spa-CC 002
5	t005, t223, t310, t5634	spa-CC 223
17	t012, t018, t019, t021, t14419, t342, t700, t710	spa-CC 021/012
18	t015, t050, t1156, t116, t1268, t14407, t1601, t4260, t589, t620	spa-CC 015
2	t026, t458	Excluded
17	t045, t1321, t14410, t14412, t14428, t14429, t1537, t166, t1900, t1951, t2321, t493, t701, t715, t723	Singleton
9	t081, t688, t4812, t12908, t14420, t148, t209, t258	No Founder
6	t084, t11787, t228, t3266, t491	spa-CC 084
6	t14411, t159, t270, t3407, t645	spa-CC 159
6	t1451, t230, t571	spa-CC 1451
4	t189, t224, t267	spa-CC 224

Un 2% de los *spa-types*, quedaron fuera del análisis BURP por tener una longitud inferior a cinco repeticiones, siendo clasificados como “excluded”.

- Excluded: (2%): t026, t458.

El *Staph Type Software* dispone de una herramienta que representa de manera sencilla la relación evolutiva entre los *spa-types* de un mismo grupo clonal CC BURP. Aplicada a nuestros 12 tipos diferentes de cluster, obtuvimos la representación mostrada en la Figura 25.

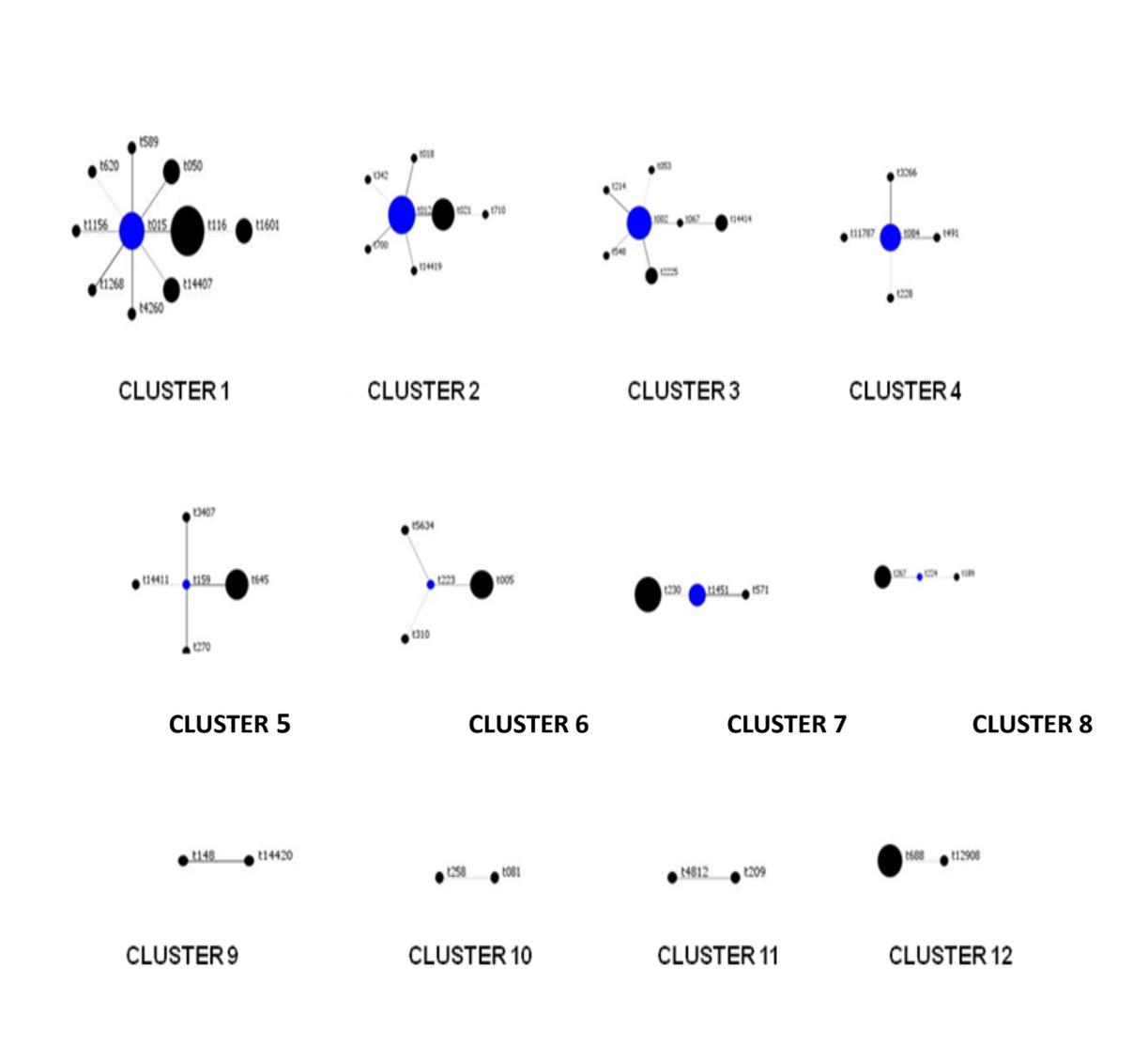


Figura 25: Relación evolutiva entre los *spa-types* que componen cada CC BURP.

En la Figura 26 se observa como los *spa-types* t116, t012, t002, y t084 son los genotipos fundadores o ancestrales de los clusters CC015, CC012, CC002, y CC084 respectivamente.

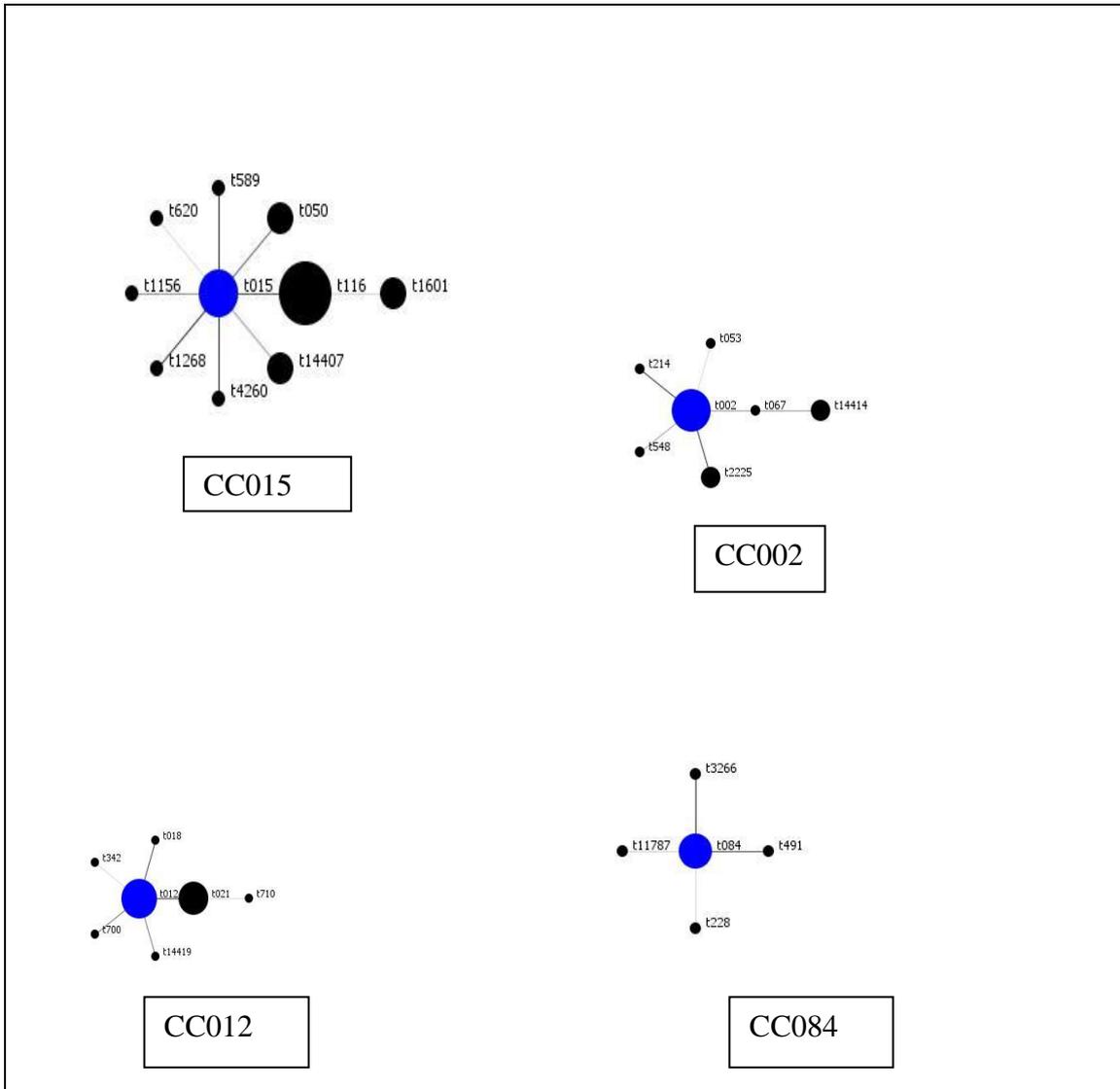


Figura 26: Los *spa-types* fundadores o ancestrales de los clusters CC015, CC012, CC002, y CC084 (se muestran en azul).

4.4.3.3. Asignación de grupo clonal eBURST (grupo clonal presuntivo) en SAMS

El *StaphType Software* permite en algunos casos realizar la asignación automática de e-BURST para algunos *spa-types* (los más frecuentes), mostrando la relación entre los *spa-types* y los grupos clonales por BURP y los grupos clonales presuntivos por BURST. Así podemos afirmar que el

- CC002 pertenece al CC5
- CC223 al CC22
- CC021/012 al CC30
- CC015, CC1451 y los *spa-types* t026 t t045 pertenecen al CC45

4.4.4. Genotipado mediante Electroforesis en Campo Pulsado (PFGE)

El total de cepas de SARM (21) fueron analizadas mediante PFGE tras digestión del ADN total con la enzima *SmaI*. En el caso de los aislados SAMS se realizó una selección de 22 cepas en base a relaciones epidemiológicas establecidas por *spa-typing* y posteriormente se realizó PFGE.

4.4.4.1. Genotipaje de SARM mediante Electroforesis en Campo Pulsado (PFGE)

El análisis de los perfiles de macrorrestricción obtenidos mediante PFGE tras digestión con la enzima *SmaI* de los 21 aislados de SARM, reveló la existencia de 12 pulsotipos diferentes como se refleja en la Figura 27.

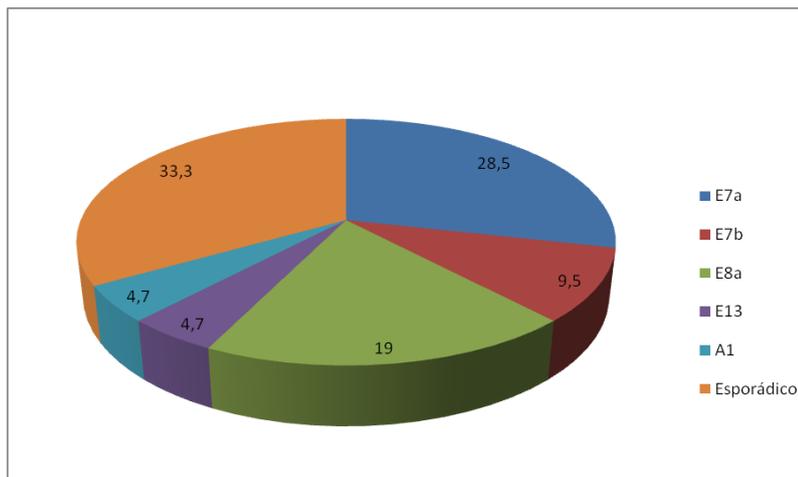


Figura 27: Genotipaje de SAMR mediante PFGE

Casi la mitad de los aislados, un 47.6%, se agruparon en dos genotipos: E7, (8 aislados; 38%) y E8a (4 aislados; 19%). El 42% restante se distribuye en 9 genotipos distintos. De éstos, dos se corresponden con un patrón de bandas con nombre asignado y descritos en estudios previos: E13 (MRSA 15) (un aislado; 4.7%); y Comunitario o A1 en el que se detectaron los genes que codifican para la toxina de Pantón Valentine (un aislado; 4.7%); y el resto (7 aislados; 33.3%) se corresponden a perfiles esporádicos representados por un único aislado. (Figura 28).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23

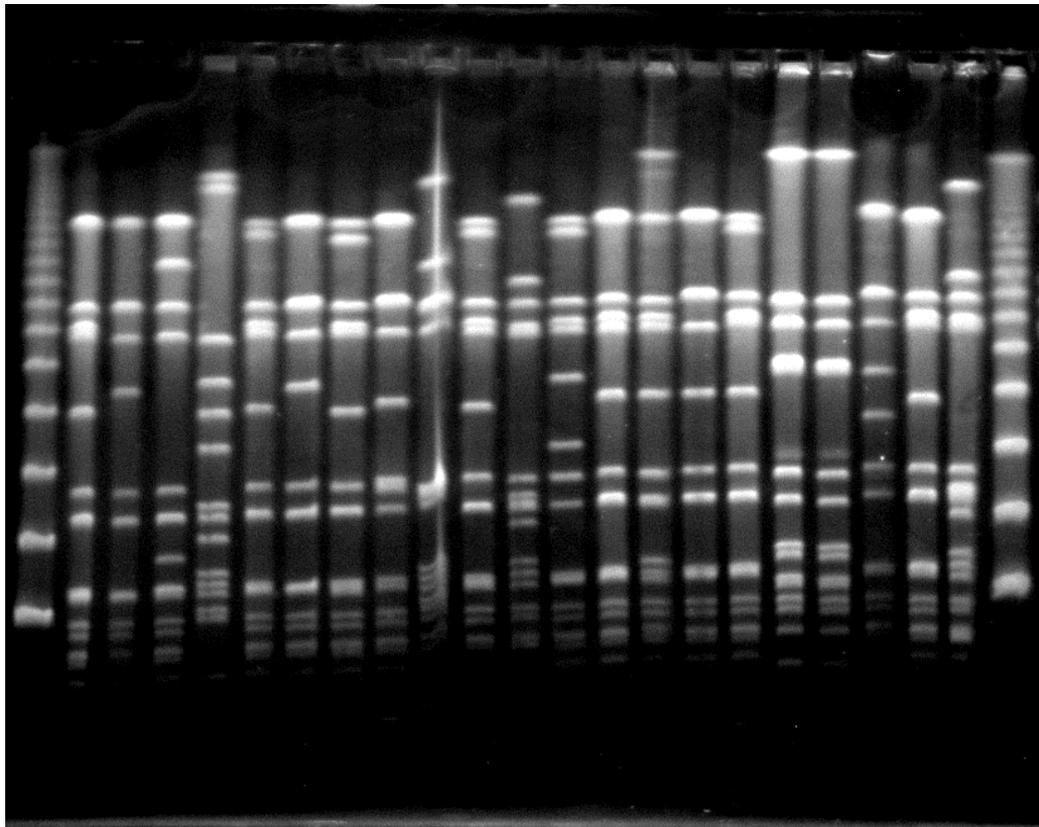


Figura 28: Electroforesis PFGE de fragmentos de macrorrestricción con *SmaI* obtenidos en los 21 aislados de SARM (*nº de pocillo en cursiva, seguido del nombre del pulsotipo; en negrita los pulsotipos más representativos*). 1. Control de Peso molecular; 2. *E7a*; 3. *E7b*; 4. *Esporádico*; 5. *E13*; 6. *E8a*; 7. *E7b*; 8. *E8a*; 9. *E7a*; 10. *Esporádico*; 11. *E8a*; 12. *Esporádico*; 13. *Esporádico*; 14. *E7a*; 15. *E7a*; 16. *E7a*; 17. *E8a*; 18. *Esporádico*; 19. *Esporádico*; 20. *Esporádico*; 21. *E7a*; 22. *A1*; 23. Control de peso molecular.

Los aislados de las calles 18 y 19 denominados “esporádico 1” son muy similares, tienen igual antibiograma, ambos corresponden al fagotipo III y grupo clonal CC45. Corresponden a dos aislados de pacientes pediátricos (neonatos prematuros), ambos ingresados en la UCI Neonatal. Se trata de bacteriemias de origen nosocomial y de foco desconocido y con relación cronológica entre ellos (una bacteriemia corresponde al 29.08.2013 y la otra a 07.09.2013).

El programa *StaphType*, una herramienta BURP que agrupó los *spa-types* similares en grupos clonales por BURP (clusters CC-BURP); además, en aquellos *spa-types*

más frecuentes, ofreció una relación directa con el grupo clonal por BURST y también indicó los ST más frecuentes o posibles dentro del grupo clonal:

- E7 y E8 corresponden a ST 125-SARM IVc o ST5-SARM IVc ambos de grupo clonal CC5
- E13 corresponde a ST 22-SARM IVh
- A1 corresponde a ST 8-SARM IV c
- Entre los perfiles esporádicos :
 - Perfil “esporádico 1”: 2 cepas con *spa-type* t015, y grupo clonal CC45;
 - 1 cepa: t024 corresponde al ST8-SARM-IVc;
 - El resto (4 cepas) con *spa-types* t067(3) y t t1346 (1) pertenecen al CC5.

Mediante el software InfoQuest Bioinformatics, que normaliza los patrones de bandas se construyó un dendograma donde se aprecia la asociación entre los genotipos obtenidos por los diferentes métodos de tipaje en SARM (Figura 29).

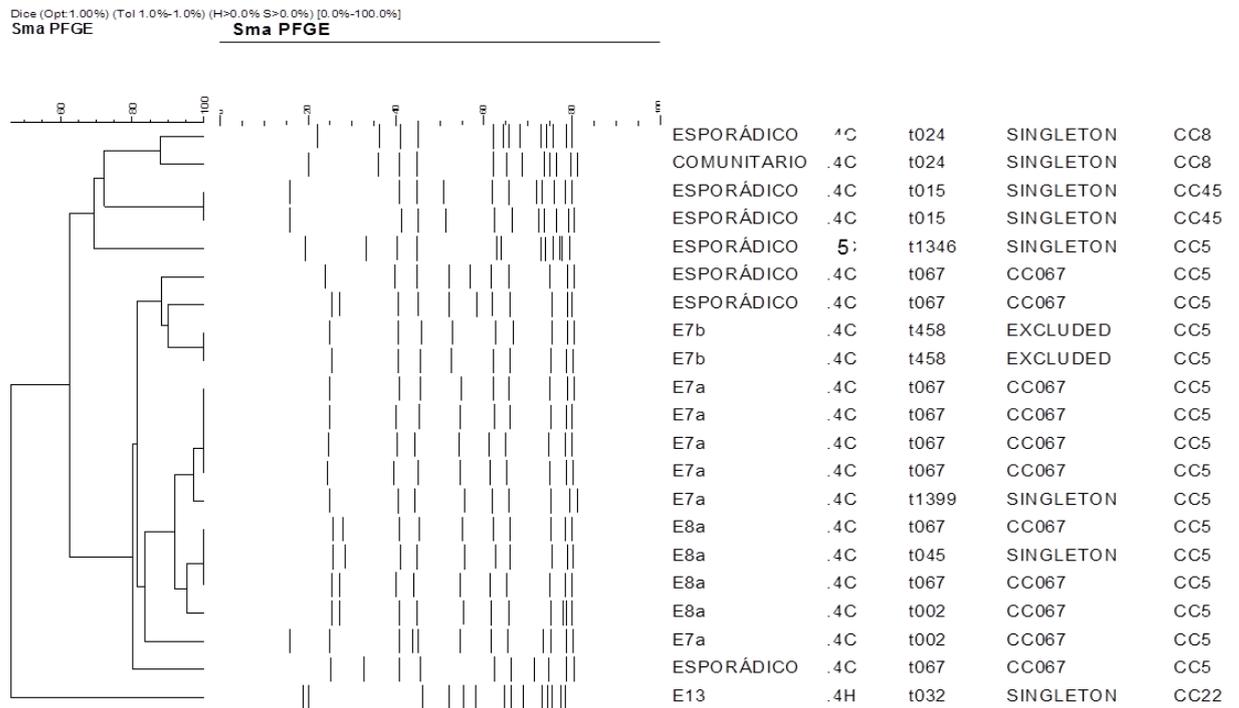


Figura 29. Dendrograma que muestra la similitud entre los diferentes pulsotipos descritos y una representación del patrón de bandas correspondiente a cada pulsotipo. A su vez nos muestra relación con los *spa-types* y los grupos clonales por BURP y los grupos clonales presuntivos por BURST

4.4.4.2. Genotipaje de SAMS mediante Electroforesis en Campo Pulsado (PFGE)

Del análisis de estos datos proporcionados por *spa-typing* se observó que a pesar de haber una gran dispersión clonal entre las cepas de BSAMS, algunas podrían estar relacionadas epidemiológicamente, basándonos en la fecha de la muestra, servicio de ingreso, foco de la bacteriemia, características clínicas y *spa-type*, por lo que se realizó el PFGE a 22 de ellas (Figura 30). Las dos cepas que presentaban el mismo *spa-type* (t1451) fueron no digeribles por *SmaI*.

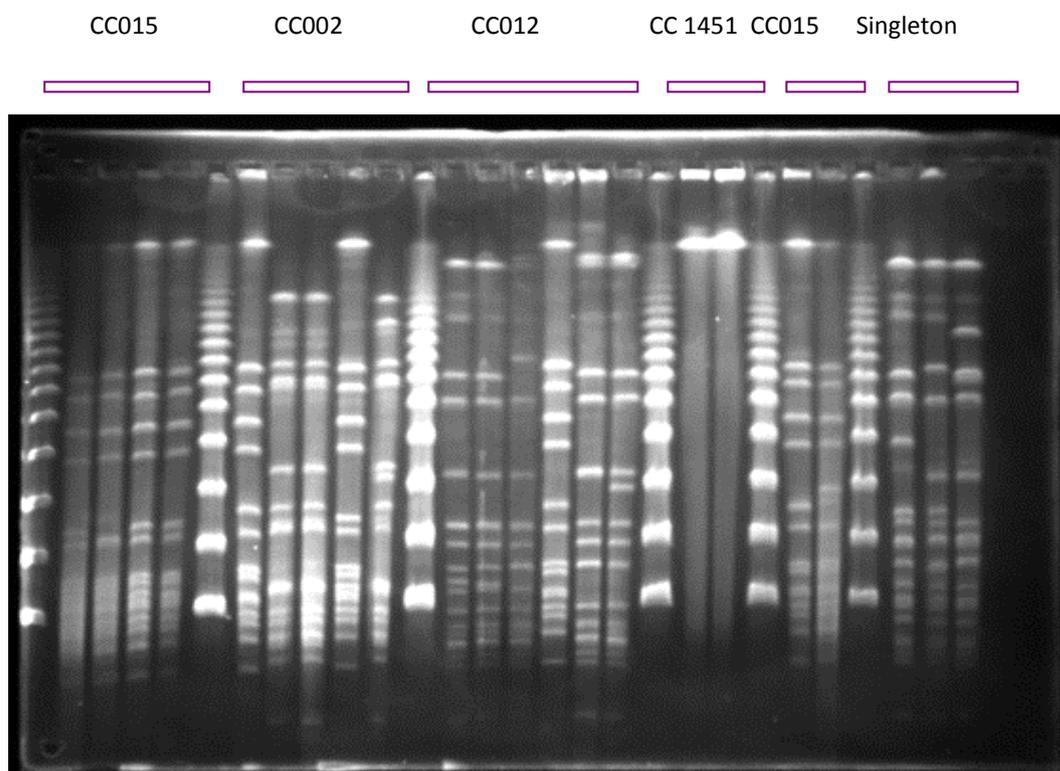


Figura 30: Electroforesis PFGE de fragmentos de macrorrestricción con *SmaI* obtenidos en 22 aislados de SAMS (el nº de pocillo en cursiva, seguido del nombre del pulsotipo; en **negrita los clusters**). 1, 6, 12, 19, 22 y 25: Control de Peso molecular. **Cluster CC015** : 2, 3, 4 y 5. **Cluster CC002**: 7, 8, 9, 10, 11. **Cluster CC012**: 13, 14, 15, 16, 17, 18 y 19. **Cluster CC1451**: 20 y 21. **Cluster CC015**: 23 y 24; **Singleton**: 26, 27 y 28

Las Figuras 31, 32 y 33 muestran los dendogramas de las cepas seleccionadas agrupadas por grupos clonales determinados por *spa-typing*.

Del estudio de PFGE encontramos que los cuatro aislados correspondientes al grupo clonal CC15 (Figura 31) tenían un coeficiente de similitud del 95% (las cepas de los carriles 4 y 5 estaban muy relacionadas) por lo que se procedió a revisar las historias clínicas para encontrar alguna relación epidemiológica. Se trataba de 4 pacientes pediátricos en los no se encontró relación cronológica, ni clínica, ni epidemiológica.

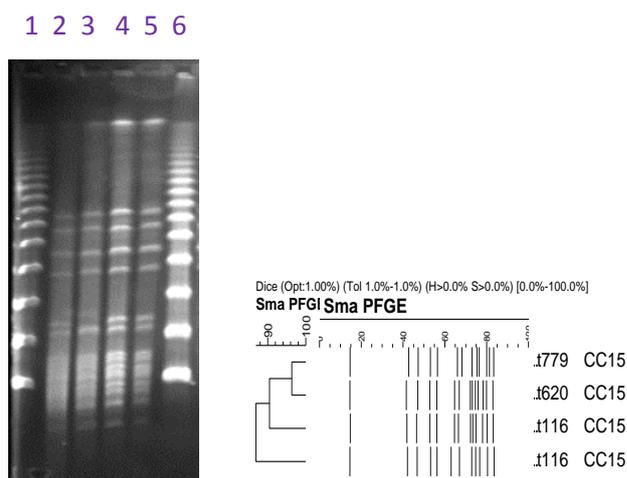


Figura 31. Dendograma de cepas pertenecientes al grupo clonal CC015 que muestra la similitud entre pulsotipos y una representación del patrón de bandas correspondiente a cada pulsotipo. Las cepas de los carriles 4 y 5 muestran un coeficiente de similitud del 95% por lo que probablemente muestren relación epidemiológica

De igual modo se encontró un coeficiente de similitud del 95% en cinco aislados correspondientes al grupo clonal CC002 (Figura 32). Los aislados de los carriles 3 y 4 estaban muy relacionados. Se revisaron las historias clínicas a fin de encontrar alguna relación epidemiológica y tampoco se encontró relación cronológica, ni clínica, ni epidemiológica.

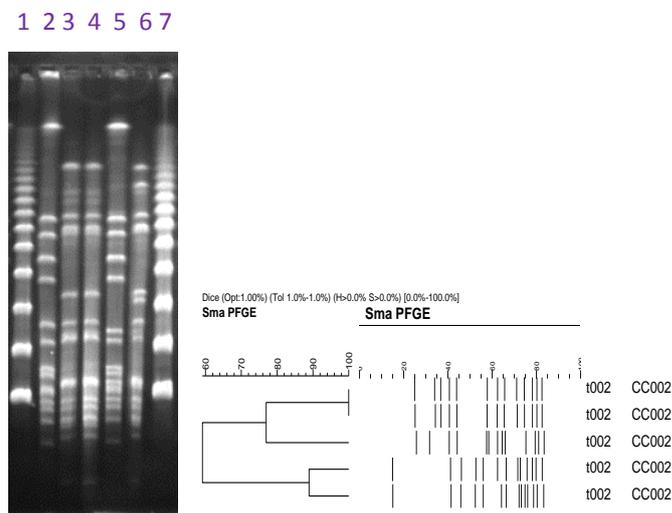


Figura 32. Dendograma de cepas pertenecientes al grupo clonal CC002 que muestra la similitud entre pulsotipos y una representación del patrón de bandas correspondiente a cada pulsotipo. Las cepas de los carriles 3 y 4 muestran un coeficiente de similitud del 95%.

En 6 aislados correspondientes al grupo clonal CC012 (Figura 33) se apreció un coeficiente de similitud del 95% (las cepas de los carriles 2, 3, 5 y 6 mostraron perfiles muy similares) por lo que se procedió a revisar las historias clínicas para encontrar alguna relación epidemiológica. En tres pacientes el foco de la bacteriemia fue una flebitis, aunque cada uno de ellos estuvo ingresado en un Servicio clínico diferente. También se observó relación cronológica: dos de ellos presentaron la bacteriemia en el mes de diciembre de 2012, y ambos tuvieron como antecedente haber sido sometidos a un procedimiento invasivo (colonoscopia).

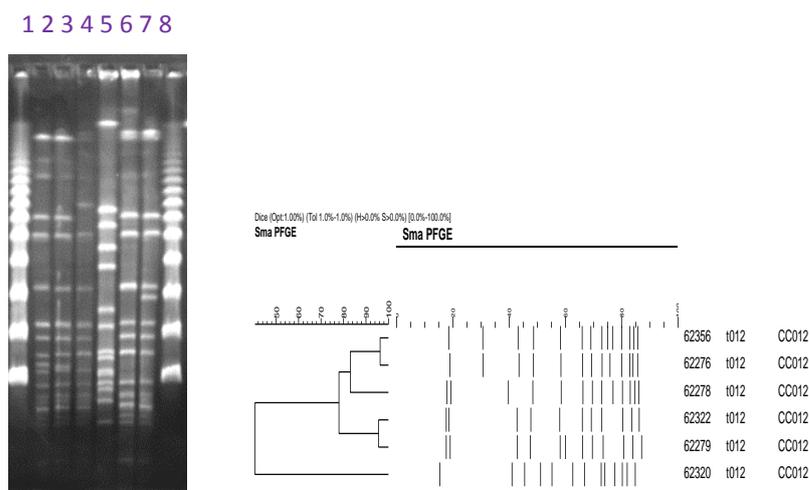


Figura 33. Dendrograma de cepas pertenecientes al grupo clonal CC012 que muestra la similitud entre pulsotipos y una representación del patrón de bandas correspondiente a cada pulsotipo. Las cepas de los carriles 2, 3, 5 y 6 muestran perfiles muy similares.

En la Figura 34 se representa el dendograma correspondiente a tres aislados “Singleton” que presentaban el mismo *spa-type* (t166). No se encontró relación epidemiológica en estos pacientes (uno pediátrico, otro ingresado en Neurología y otro en Nefrología.)

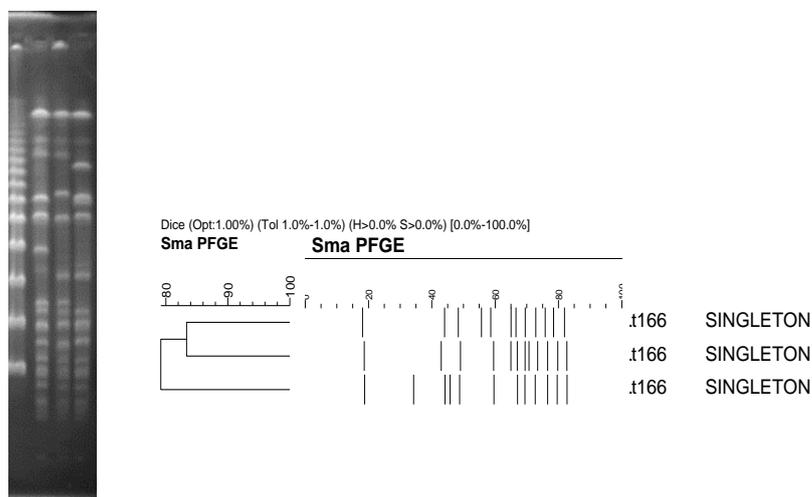


Figura 34. Dendograma de cepas agrupadas como singleton pero con el mismo *spa-type* (t166) que muestra la similitud entre pulsotipos y una representación del patrón de bandas correspondiente a cada pulsotipo

Con respecto a las dos cepas con el *spa-type* t1606 y agrupadas como CC15 (figura 35), se encontró relación cronológica, ambas corresponden al mes de marzo de 2013, sin embargo no se encontró asociación clínica ni epidemiológica.

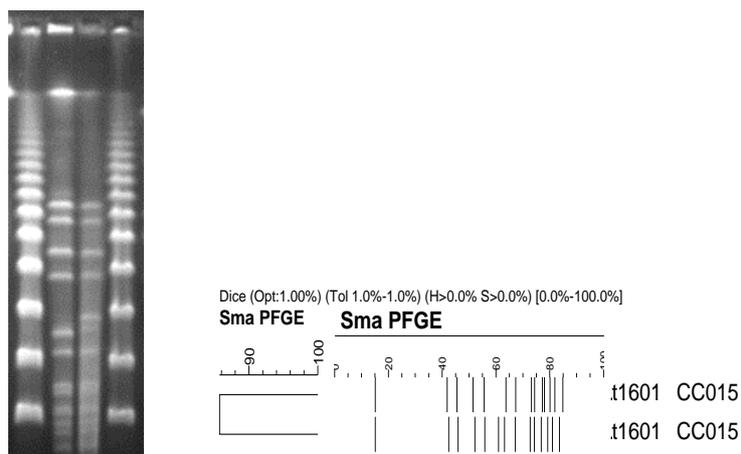


Figura 35. Dendrograma de cepas agrupadas como CC015, pero con el mismo *spa-type* (t1601) que muestra la similitud entre pulsotipos y una representación del patrón de bandas correspondiente a cada pulsotipo

4.5. Evaluación de la práctica clínica de las bacteriemias por *S.aureus*

4.5.1. Tratamiento empírico

En adultos, globalmente sólo un 11% (12/109) de BSA recibieron tratamiento empírico adecuado según los datos posteriores de sensibilidad; si comparamos el grupo de BSAMR con el de BSAMS, en el primero reciben un tratamiento correcto el 25% (4/16) mientras que en el segundo sólo el 7,5% (7 /93) ($p=0,002$). Si hacemos el análisis atendiendo a la adquisición de las bacteriemias, ninguna de las comunitarias

recibieron el tratamiento de elección, frente al 12,3% (7/57) de las nosocomiales y 8,3% (3/36) de las relacionadas con asistencia sanitaria ($p=0,276$).

En la población infantil, globalmente las cifras mejoran ya que el 18,8% (3/16) recibieron un tratamiento empírico adecuado. En el grupo de BSAMR fue adecuado en un 25% (1/4) de los pacientes, siendo también adecuado en el 16,6% (2/12) del grupo de BSAMS, aunque en este caso las diferencias no son significativas ($p=0,421$). Según la adquisición de las bacteriemias, el 50% (2/4) de las comunitarias recibieron el tratamiento de elección, frente al 20% (1/5) de las nosocomiales y 0% de las relacionadas con asistencia sanitaria ($p=0,319$).

4.5.2. Manejo clínico de las bacteriemias por *S.aureus*

Revisamos las medidas terapéuticas aplicadas en el manejo del paciente: si se realizaron hemocultivos de control a las 48-96 horas del inicio de tratamiento antibiótico adecuado, si se realizó ecocardiograma cuando estuvo indicado, retirada del catéter venoso en caso de ser el foco, si el informe precoz del Servicio de Microbiología estuvo reflejado en la historia clínica; si se modificó el tratamiento cuando éste no era adecuado; si se midieron niveles plásmaticos de vancomicina en caso de estar tratados al menos 72 horas; si las BSAMS fueron tratadas con cloxacilina o daptomicina según los casos.

4.5.2.1. Realización de hemocultivos de control

De forma global en la población adulta 81 de los 109 (75,7%) pacientes tenían realizados hemocultivos de control en cualquier momento de la evolución de la infección, de los que sólo un 7,9% fueron positivos. Se extrajeron hemocultivos de control a las 48 horas de iniciar el tratamiento antimicrobiano en 37/109 (33,63%), de ellos fueron positivos 11 (29,7%); en las 72-96 horas: 27 pacientes (24,54%), de ellos fueron positivos 22,2%; después de 96 horas: 55 pacientes (51,8%) de los que fueron positivos el 8,8% (Figura 36).

En cuanto a los pacientes pediátricos: 13 niños de los 21 (62%) tuvieron procesados hemocultivos en algún momento de la evolución de la enfermedad y ninguno de ellos fue positivo. Dos pacientes los tuvieron a las 48 horas: 2/21 (9,5%); a las 72-96 horas: 7 pacientes (33,3%); tuvieron hemocultivos después de 96 horas: 6 pacientes (28,6%).

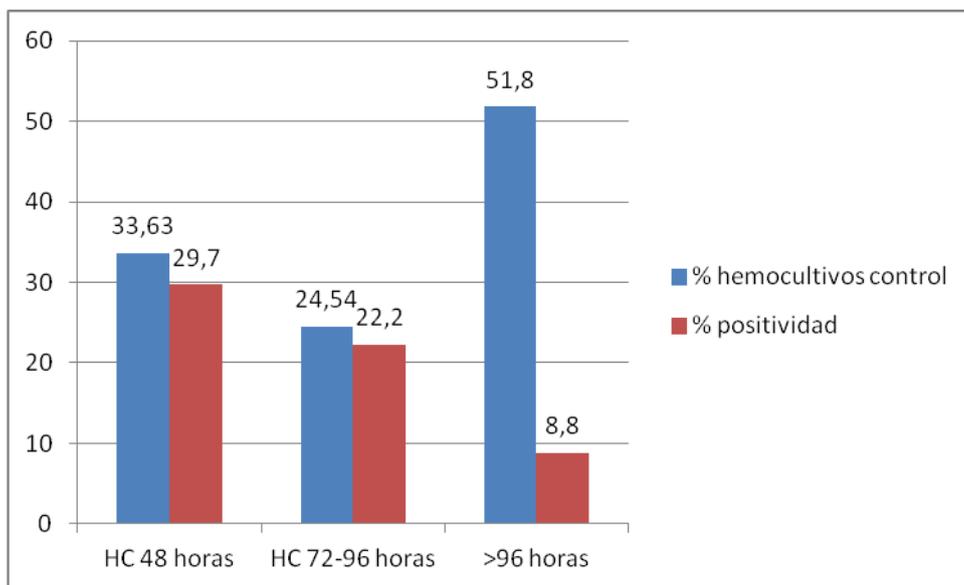


Figura 36: Porcentaje de positividad de hemocultivos de control en función al momento en que se ha extraído el hemocultivo en población adulta.

Si comparamos el grupo de pacientes con BSAMR frente al grupo de pacientes con BSAMS observamos que en la población pediátrica, en el grupo de BSAMS hay mayor porcentaje (73,3%) de pacientes en los que se indica la extracción de un nuevo hemocultivo respecto a BSAMR (33,3%) con tendencia hacia la significación estadística, $p=0,088$, con $RR:0,182$, $IC95\%(0,023-1,408)$. Sin embargo este hecho no ocurrió en población adulta ($p=0,575$) (Figura 37).

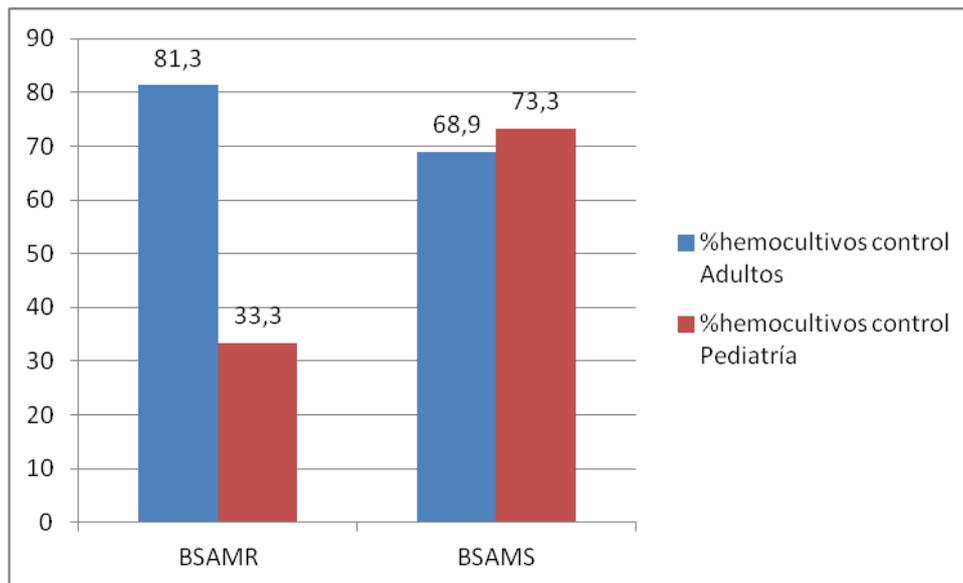


Figura 37: Porcentaje de pacientes que tienen extraídos hemocultivos de control comparando población adulta y pediátrica

4.5.2.2. Realización de ecocardiografía en pacientes con criterio de bacteriemia complicada.

De un total de 107 pacientes adultos con BSA se realizó al menos una ecocardiografía transtorácica en 59 pacientes (55,1%). De ellos 35 pacientes cumplían criterios de bacteriemia complicada, y en éstos se realizó al menos una ecocardiografía en el 68,57% (24/35). De los 72 pacientes sin criterios de bacteriemia complicada se realizó esta prueba complementaria en el 48,61% de los pacientes (35/72).

De los 21 pacientes pediátricos con BSA se realizó al menos una ecocardiografía transtorácica en 8 pacientes (38,1%). De los tres niños con bacteriemia complicada, sólo uno tiene realizada ecocardiografía (33,3%), y de los 15 niños sin criterios de bacteriemia complicada, 46,6% (7/15) tienen realizada esta prueba.

4.5.2.3. Retirada de catéter vascular de forma precoz

En caso de alta sospecha de que fuese el catéter el origen de la bacteriemia o en los casos en que se desconociera el origen de la misma se valoró si se realizó la retirada de éste de forma precoz.

En adultos de los 34 pacientes con catéter vascular, le fue retirado a 31 de ellos (91,1%). Solo a uno no se le retiró (2,9%) y en dos se desconoce dicha circunstancia (5,8%). Con respecto a las 32 bacteriemias primarias, se retiró en 7 casos (21,8%). De las 22/34 bacteriemias relacionadas con catéter periférico (flebitis), se les retiró el catéter al 100% de ellas.

En el caso de Pediatría, de los 3 casos con bacteriemia relacionada con catéter a todos se les retiró (100%). Dos de ellos fueron debidos a una flebitis. En cuanto a los 10 casos de bacteriemia de origen desconocido, se retiró el catéter en dos casos (20%).

En los casos de catéter venoso central permanente se realizó un manejo conservador en 4 ocasiones.

4.5.2.4. Aviso de microbiología

Del total de los hemocultivos (131) hay constancia en la historia clínica de aviso por parte de microbiología en 114/131 (87.0%), de los que 97/114 (85.1%) fueron BSAMS y 17/114 (14.9%) BSAMR ($p=0,581$).

4.5.2.5. Modificación del tratamiento tras conocer la sensibilidad

En adultos, el 88,8% de los casos recibieron de forma empírica un tratamiento diferente al de elección o no recibieron ningún antibiótico. De ellos, en el 11,4% (11/96) no se modificó el tratamiento tras conocer el informe microbiológico; en un 66,6% (64/96) se modificó por el tratamiento adecuado o de elección; 12,5% (12/96)

recibieron un tratamiento alternativo pero no de elección; y en 9,3% (9/96) no se modificó por exitus del paciente.

La Figura 38 muestra la evolución del episodio de bacteriemia en función a la modificación del tratamiento antibiótico.

De los 11 pacientes en los que no modificaron el tratamiento tras conocerse la sensibilidad in vitro, el 45,5% (5/11) evolucionó a la curación; el 9,1% (1/11) a mortalidad atribuible siendo la mortalidad cruda del 27,3% (3/11); y ninguno presentó complicaciones sépticas como metástasis sépticas, endocarditis entre otras. De los 64 en los que fue modificado por el tratamiento de elección, el porcentaje de curación es del 82,8% (53/64); con un 4,8% (3/64) de mortalidad atribuible; un 17,2% (11/64) de mortalidad cruda y un 14,5% (9/64) de complicaciones sépticas. De los 12 pacientes que recibieron un tratamiento alternativo al de elección, el 58,3% (7/12) evolucionó hacia la curación; 8,3% (1/12) a mortalidad atribuible; 41,7% (5/12) a mortalidad cruda y ningún paciente presentó metástasis sépticas ($p=0,001$).

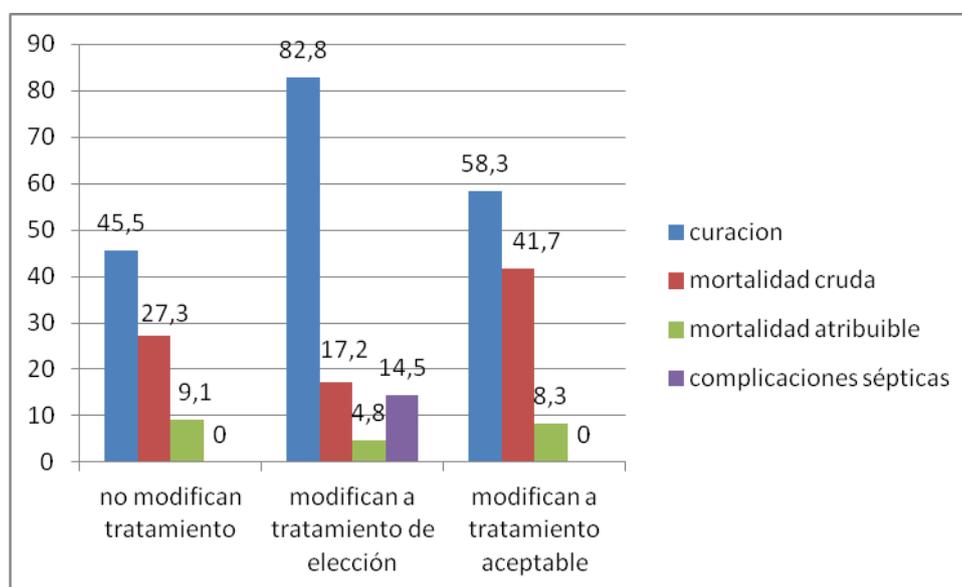


Figura 38: Evolución del episodio infeccioso del paciente según la modificación del tratamiento antibiótico.

En los pacientes pediátricos, de los 13 que no recibieron tratamiento empírico correcto, 9 (69,2%) lo modificaron y prescribieron el tratamiento de elección. Un 23% (3/13) no lo modificaron y continuaron con un tratamiento no aceptable, y un 7,6% (1/13) lo cambiaron por un fármaco no de elección a pesar de ser sensible *in vitro*. En el caso de los niños todos se curaron; solo un niño tuvo complicaciones sépticas y corresponde al grupo de los nueve pacientes en los que sí se modificó el tratamiento de forma adecuada ($p=0,620$).

4.4.3.6. Medición de los niveles de vancomicina

En los casos de BSAMR tratados con vancomicina al menos durante 72 horas, se analizó si se medieron los niveles plasmáticos de dicho fármaco.

En cuanto a la población adulta, de los 16 pacientes con BSAMR sólo 5 fueron tratados con este fármaco más de 72 horas y a todos se les realizó niveles de vancomicina (100%). Once pacientes de los 16 (68,75%) recibieron un tratamiento diferente de vancomicina como teicoplanina, linezolid, daptomicina, piperacilina/tazobactam o no recibieron ningún tratamiento por lo que no hubo indicación de realizar la medición de los niveles plasmáticos.

Además, en 5 BSAMS se prescribió vancomicina de forma inadecuada, excepto en un caso que se documentó alergia a betalactámicos, y también en todos estos casos se realizaron niveles plasmáticos de vancomicina.

En población infantil, de las 6 BSAMR, sólo dos pacientes recibieron vancomicina, y de ellos sólo a uno se le realizaron niveles de vancomicina (50%). El resto recibió un tratamiento diferente a vancomicina.

4.3.2.7. Utilización de cloxacilina en SAMS

Considerando sólo a la población adulta, sólo 7 pacientes (7,5%) de los 93 que presentaban BSAMS recibieron cloxacilina como tratamiento empírico. Cuando se conoce la sensibilidad *in vitro*, el porcentaje de los que recibieron correctamente el

tratamiento es de 67,7% (63 pacientes). El 32,2% (30/93) recibió un tratamiento diferente a cloxacilina. La Figura 39 refleja la evolución de los dos grupos de pacientes; al compararlos encontramos diferencias significativas ($p=0,008$). El grupo que finalmente recibió cloxacilina tiene un 82,5% (52/63) de curación frente 56% (17/30) en el grupo que no recibió este fármaco. El porcentaje de mortalidad cruda en el grupo que no recibió cloxacilina es del 43,3% (13/30) y la mortalidad atribuible del 6,7% (2/30). En el grupo que recibió cloxacilina la mortalidad cruda es 17,5% (11/63) y mortalidad atribuible 4,8% (3/63) ($p=0,008$) (OR: 3,615 IC95%: 1,368-9,514). Sin embargo las complicaciones sépticas son mayores en el grupo que recibió cloxacilina: 12,7% (8/63) frente a 0% en el grupo que no recibió cloxacilina.

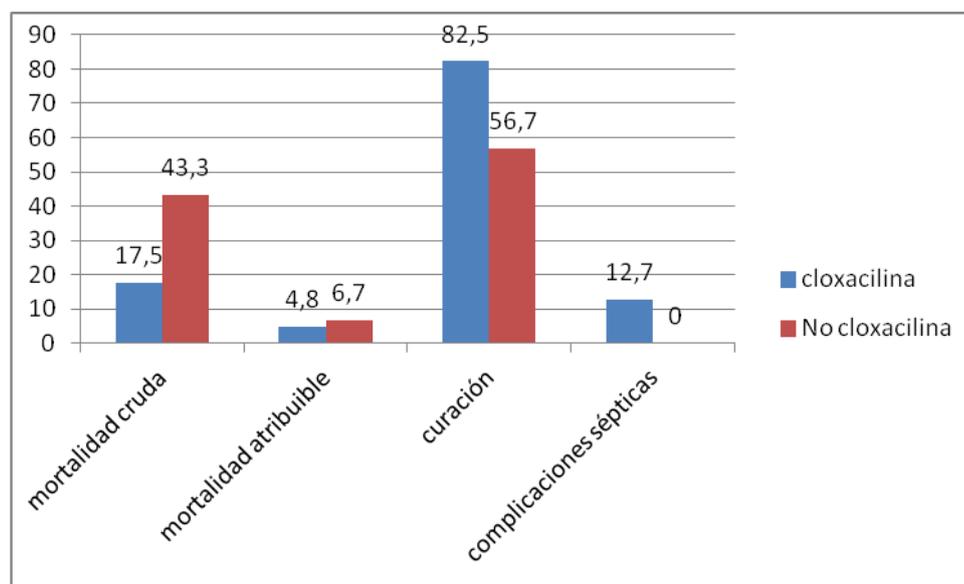


Figura 39: Evolución de los pacientes con BSAMS en función al tratamiento recibido

En población infantil recibieron empíricamente cloxacilina el 16,6% de los niños (2 pacientes de los 12 con BSAMS en los que tuvimos acceso a conocer el tratamiento). Tras conocerse la sensibilidad, el porcentaje fue de 75% (9/12), aunque un 25% (3/12) no recibió el tratamiento correcto. En todos los casos, independientemente del tratamiento recibido, los pacientes evolucionan hacia la curación, aunque paradójicamente sufrieron más complicaciones durante el curso de la enfermedad los pacientes que recibieron cloxacilina: 22,2% (2/9) de metástasis sépticas, frente a los

que no recibieron cloxacilina: 0% de metástasis sépticas (aunque no hay diferencias estadísticamente significativas $p=0,360$ a diferencia de los adultos que sí las hubo).

4.5.3. Análisis del grado de cumplimiento de las intervenciones clínicas aplicadas en las bacteriemias por *S.aureus*

Se establecieron tres grupos de cumplimiento de las diferentes intervenciones analizadas en apartados anteriores teniendo en consideración que no todos los pacientes tuvieron indicación de cumplirlas todas: aviso por parte del Servicio de Microbiología, realización de hemocultivos de control, modificación del tratamiento empírico si fuese necesario, retirada de catéteres vasculares, realización de ecocardiografía en bacteriemias complicadas, niveles de vancomicina si estuviese indicado y utilización de cloxacilina iv en casos de cepas sensibles a meticilina. Así,

- El primer grupo sería el formado por los pacientes que no cumplieron ninguna acción terapéutica correcta o cumplen hasta la mitad de las medidas (0-49%).
- El segundo grupo cumplió del 50-74% de las medidas y
- El tercer grupo cumplió del 75-100% de las medidas terapéuticas.

En población adulta, un 14,6% cumplieron entre 0-49% de los criterios de buen manejo; el 36,7% de los enfermos cumplieron entre el 50-74%; y un 48,6 de ellos cumplieron entre en 75-100% de los criterios.

En población pediátrica un 20% cumplió entre 0-49% de los criterios de buen manejo; el 50% de los enfermos cumplen entre el 50-74%; y un 30 de ellos cumplió entre en 75-100% de los criterios.

Si comparamos el grupo de BSAMR con BSAMS no encontramos diferencias significativas tanto en el grupo de pediatría como en el grupo de adultos. (Figura 40 y 41).

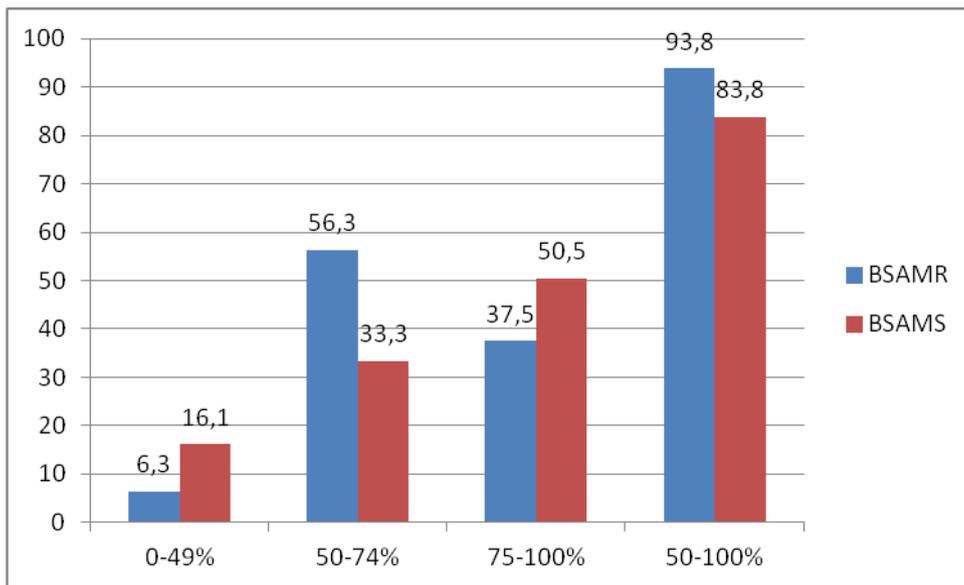


Figura 40: Intervenciones clínicas aplicadas en el tratamiento de las BSAMR y BSAMS en población adulta

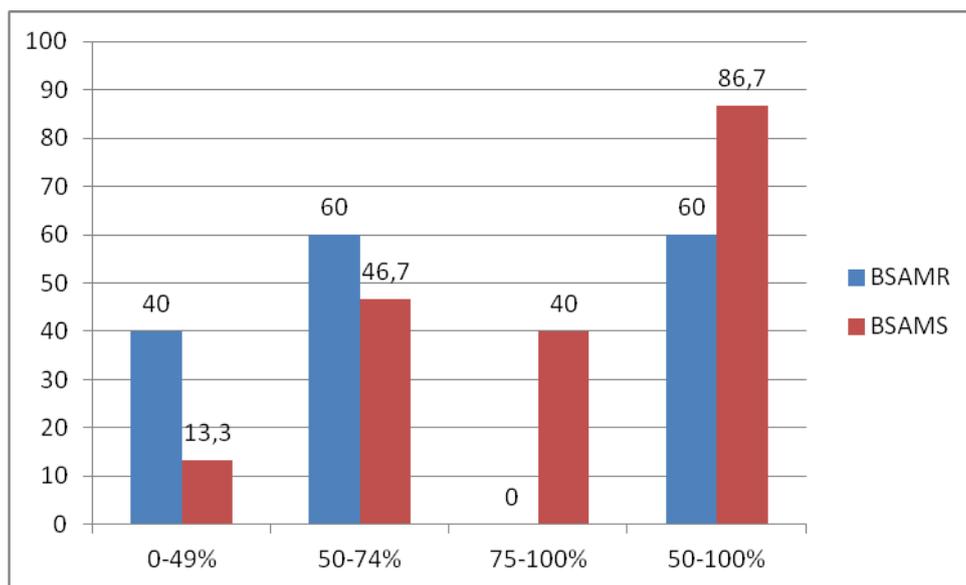


Figura 41: Intervenciones clínicas aplicadas en el tratamiento de las BSAMR y BSAMS en población pediátrica.

4.6. Evolución de las bacteriemias

Del total de las bacteriemias, un 76,15% evolucionaron satisfactoriamente hacia la curación, un 6,1% fallecieron a causa del episodio de bacteriemia y un 17,6% tuvieron muerte no relacionada con la infección. Cabe destacar que de los pacientes fallecidos ninguno pertenecía al grupo de pediatría. Presentaron algún tipo de complicación séptica el 10% de las bacteriemias: el 7,3% de los adultos y el 14,3% niños.

4.6.1. Evolución de las bacteriemias por *S.aureus* en población adulta.

Estudiamos las variables relacionadas con una peor evolución (Tabla 35), como son la recurrencia de la bacteriemia, bacteriemia persistente, desarrollo de endocarditis infecciosa, metástasis sépticas, shock séptico, mortalidad relacionada con el episodio de bacteriemia, o mortalidad no relacionada. El sexo, el tratamiento precoz (empírico) adecuado, la retirada precoz del catéter vascular o el informe temprano por parte del Servicio de Microbiología no mostraron diferencias significativas.

Respecto a la persistencia de la bacteriemia representada en la Figura 42 referida a población adulta (en población pediátrica en el 100% de los casos los hemocultivos de control son negativos) observamos que:

- Cuando los hemocultivos fueron positivos a las 48-96 horas: un 23,5% (4/17) de los enfermos presentan un índice de gravedad de la bacteriemia (Pitt) por encima de 2; un 29,4% (5/17) cursaron con sepsis grave; un 58,8% (10/17) presentaron al menos un criterio de bacteriemia complicada; un 47,1% (8/17) presentó evolución clínica desfavorable: 35,3% (6/17) complicaciones sépticas y 11,8% (2/17) mortalidad atribuible; un 5,9% (1/17) de mortalidad no relacionada con el episodio infeccioso y un 82,4% (14/17) finalmente se curó ($p=0,087$).
- Cuando los hemocultivos son positivos a las 48 horas: un 36,4% (7/11) de los enfermos presentó un índice de gravedad de la bacteriemia (Pitt) por encima de 2; un 63,6% (7/11) presentó al menos un criterio de bacteriemia complicada; hay un 45,5% (5/11) de pacientes que cursó con evolución desfavorable: un 27,3% (3/11) con

complicaciones sépticas y un 18,2% (2/11) de mortalidad atribuible; un 9,1% (1/11) de mortalidad no relacionada con el episodio infeccioso y un 72,7% (8/11) finalmente se curó ($p=0,015$).

- Cuando los hemocultivos fueron positivos a las 72-96 horas: ningún enfermo presentó un índice de gravedad de la bacterimia (Pitt) por encima de 2, un 50% (3/6) presentó al menos un criterio de bacteriemia complicada, cursó con evolución clínica desfavorable el 50%: hay un 50% (3/6) complicaciones sépticas y 0% de mortalidad atribuible, y un 100% (6/6) de curación.
- Cuando los hemocultivos fueron positivos por encima de las 96 horas: un 20% (1/5) de los enfermos presentó un índice de gravedad de la bacterimia (Pitt) por encima de 2; un 60% (3/5) presentó al menos un criterio de bacteriemia complicada; evolución clínica desfavorable 40% (2/5): ninguno presentó complicaciones sépticas y un 40% (2/5) de mortalidad atribuible; un 20% (1/5) de mortalidad no relacionada con el episodio infeccioso y un 40% (2/5) finalmente se cura ($p=0,021$).
- Cuando los hemocultivos continuaban positivos a la semana del inicio de la infección: un 50% (3/6) presentó un índice Pitt>2; un 100% (6/6) presentaron bacteriemia complicada; un 50% (3/6) presentó evolución clínica desfavorable: ninguno cursó con complicaciones sépticas pero un 50% se asoció con mortalidad relacionada con la infección; un 50% (3/6) mortalidad no atribuible; 0% finalmente se curaron.

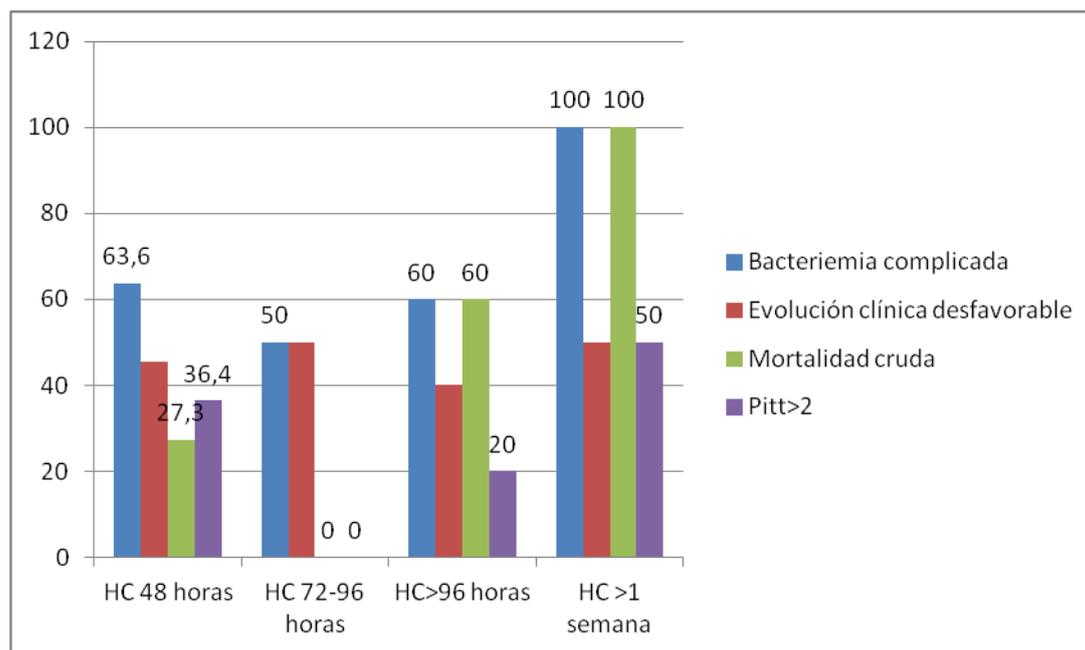


Figura 42: Complicaciones en función de la persistencia de la bacteriemia en adultos

La modificación del tratamiento antibiótico cuando éste no era adecuado, mostró una menor mortalidad cruda y menor mortalidad atribuible que en el grupo que no se modificó el tratamiento o lo modificaron por un opción alternativa diferente al tratamiento de elección, aunque presentó más complicaciones sépticas ($p=0,001$). El subgrupo que cumplió un mayor cumplimiento en porcentaje de las diferentes intervenciones terapéuticas (75-100%) presentó también una menor mortalidad cruda y menor mortalidad atribuible, aunque también presentó más complicaciones sépticas ($p>0,001$). Si nos centramos en variables no modificables (Tabla 36), de todas las enfermedades de base analizadas sólo tener como enfermedad de base enfermedad hepática (cirrosis) se asoció a mayor mortalidad y complicaciones sépticas ($p=0,014$). Un tiempo de positividad menor o igual a 12 horas se asoció a más complicaciones y mortalidad, tanto cruda como atribuible ($p=0,012$). Igual ocurrió si presentaba bacteriemia persistente.

En cuanto a la gravedad basal del paciente, los indicadores de mayor gravedad basal (MacCabe 3: rápidamente fatal) o mayor gravedad de la bacteriemia (Pitt>2) se asocian a mayor mortalidad cruda (ver Tabla 37).

Respecto al foco, presentó mayor mortalidad cruda la endocarditis infecciosa: 100% (3/3), seguido de las bacteriemias primarias: 51,6% (16/30), foco respiratorio: 36,4% (4/11), piel y partes blandas: 21,1% (4/18). La mortalidad atribuible fue también mayor en endocarditis: 66,7% (2/3), seguido de foco respiratorio: 18,2% (2/11), piel y partes blandas 11,1% (2/18), y 6,7% (2/30) en bacteriemias primarias. No presentaron mortalidad relacionada con el episodio infeccioso ni la bacteriemia relacionada con catéter, ni herida quirúrgica, osteoarticular, ni meningitis. En cuanto a metástasis sépticas el mayor porcentaje correspondió a heridas quirúrgicas: 33,3% (1/3), seguido de catéter: 11,8% (4/34), piel y partes blandas: 11,1% (2/18), y respiratorio: 9,1% (1/11). No presentaron metástasis sépticas ni el foco osteoarticular ni meningitis ($p=0,003$).

En los pacientes adultos, excluyendo a los que fallecieron, la mediana de los días de ingreso desde que aparece la bacteriemia hasta el alta hospitalaria fue de 20,26 (0-106) RIQ: 14; al comparar BSAMR con BSAMS mediante la U de Mann-Whitney ésta es $U_{MW}=208,500$, observamos que hay tendencia a la significación ($p=0,062$) siendo el rango promedio en SAMS de 36,66 y en SAMR de 50,65. La mediana de los días de ingreso en total fue 19 (1-152), RIQ: 19. Al comparar el grupo de BSAMS con BSAMR no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 35: Análisis multivariante de las variables modificables asociadas a mala evolución en población adulta . Los datos se expresan como número de casos (porcentaje).

ADULTOS	Complicaciones	Mortalidad	Mortalidad	P
	sépticas	cruda	relacionada	
	n(%)	n(%)	n(%)	
TE inadecuado	5 (10,2)	16(32,7)	3 (6,1)	0,782
TE adecuado	0	3 (30)	1 (10)	0,782
TE alternativo	4 (8,7)	12 (26,1)	4 (8,6)	0,782
No Mod. del ttº	0	3 (27,3)	1 (9,1)	0,001
Mod. a ttº adecuado	9 (14,5)	11 (17,2)	3 (4,8)	0,001
Mod. a ttº alternativo	0	5 (41,7)	1 (8,3)	0,001
Ttº dirigido adecuado	9 (12,5)	14 (18,7)	4 (5,6)	0,001
Ttº dirigido inadecuado	0	2 (40)	1 (20)	0,001
Ttº dirigido alternativo	0	6 (31,6)	1 (5,3)	0,001
Retirada precoz del catéter				
No	5 (9,3)	18 (32,1)	5 (9,3)	0,428
Sí	4 (9,3)	9 (20,9)	1 (2,3)	
Ecocardiografía				
No	1 (2)	18 (36,7)	1 (2)	0,002
Sí	8 (14)	13 (21,7)	7 (12,3)	
Informe microbiología				
No	0	4 (36,4)	2 (18,2)	0,399
Sí	9 (9,5)	27 (27,6)	6 (6,3)	
Cumplimiento calidad				<0,001
75-100%	9 (17)	5 (9,4)	2 (3,8)	
50-74%	1 (2,5)	16 (40)	4 (10)	
0-49%	0	10 (62,5)	2 (12,5)	

TE: tratamiento empírico; Mod.: modificación; ttº: tratamiento

Tabla 36: Análisis multivariante de las variables no modificables asociadas a mala evolución en población adulta. Los datos se expresan como número de casos (porcentaje)

ADULTOS	Complicaciones sépticas n(%)	Mortalidad cruda n(%)	Mortalidad relacionada n(%)	P
Sexo				0,522
Hombre	6 (7,9)	23 (30,3)	7 (9,2)	
Mujer	4 (12,1)	8 (24,2)	1 (3)	
Cirrosis	1 (5,3)	11 (57,9)	2 (10,5)	0,014
Enf neoplásica	1 (4,2)	8 (33,3)	0	0,175
Diabetes	3 (7,5)	9 (22,5)	3 (7,5)	0,568
Insuf renal	5 (14,7)	13 (38,2)	3 (8,8)	0,153
EPOC	1 (7,7)	5 (38,5)	2 (15,4)	0,706
Inmunodepresión	1 (3,7)	10 (37)	3 (11,1)	0,585
Prót.Card/Disp.EV	3 (27,3)	3 (25)	2 (18,2)	0,039
Enf osteoarticular	1 (10)	4 (40)	1 (10)	0,865
Procedimientos invasivos				
No	9 (10,5)	23 (26,7)	7 (8,1)	0,511
Sí	1 (4,3)	8 (34,8)	1 (4,3)	
Adquisición				0,890
Comunitaria	1 (8,3)	5 (35,7)	2 (16,7)	
Nosocomial	5 (8,8)	16 (28,1)	3 (5,3)	
RAS	3 (8,1)	10 (71,9)	3 (8,1)	
Tiempo positividad				
≤ 12 horas	5 (16,7)	11 (35,5)	5 (16,7)	0,022
>12horas	4 (5,3)	20 (25,6)	3 (3,9)	
Procalcitonina				
<2	0	7 (36,8)	2 (10,5)	0,266
≥2	2 (11,1)	9 (50)	4 (22,2)	
CMI vanco				
≥ 1,5	7 (13)	16 (28,6)	3 (5,6)	0,366
<1,5	2 (4,5)	14 (31,1)	5 (11,4)	
Bacteriemia recurrente				
Hemocultivosfinal positivos	0	6 (100)	3 (50)	<0,001
Hemocultivosfinalnegativos	9 (12,5)	12 (16)	2 (2,8)	

Prót.Card/Disp.EV: Prótesis cardíaca y/o dispositivo endocascular; RAS: relacionada con cuidados sanitarios; Vanco: vancomicina.

Tabla 37: Variables clínicas y evolutivas en función de la gravedad basal del paciente en población adulta. Los datos se expresan como número de casos (porcentaje)

ADULTOS	Complicaciones sépticas n (%)	Mortalidad cruda n (%)	Mortalidad atribuible n (%)	P
Índice de Pitt				
Pitt ≤2	8 (9,8)	14 (16,9)	3 (3,7)	<0,001
Pitt >2	1 (4,2)	17 (65,4)	5 (20,8)	
Sepsis grave				
No	7 (8,5)	15 (18,3)	3 (3,7)	<0,001
Sí	3 (11,1)	16(59,3)	5 (18,5)	
Bacteriemia complicada				
No	1 (1,4)	13 (18,1)	1 (1,4)	<0,001
Sí	8 (23,5)	17 (48,6)	7 (20,6)	
Índice Charlson				
≤2	6 (17,1)	4 (11,4)	1 (2,9)	0,023
>2	4 (5,4)	27 (36,5)	7 (9,5)	
MacCabe 1	7 (25,9)	2 (7,4)	2 (7,4)	< 0,001
MacCabe 2	3 (6,3)	6 (12,5)	3 (6,3)	
MacCabe 3	0	23 (67,6)	3 (8,8)	

4.6.2. Evolución de las bacteriemias por *S.aureus* en población pediátrica.

En población infantil en ningún caso hubo un desenlace fatal. Sin embargo sí presentaron complicaciones sépticas el 14,28% (3/21). Sí se observaron diferencias significativas entre varones y mujeres, presentando estas últimas más complicaciones sépticas con un 27,3% (3/11) frente a un 0% de los niños. Ver Tablas 38, 39 y 40.

Con respecto al foco, sin embargo podemos decir que la bacteriemia relacionada con catéter y la de foco osteoarticular tuvieron más complicaciones sépticas con un 33,3% (1/3) y 40% (2/5) respectivamente.

En niños la mediana de los días de ingreso desde que aparece la bacteriemia hasta la alta es de 22 (5-55), IQR:20; al comparar BSAMR con BSAMS mediante la U de Mann-

Whitney se observó que no había diferencias significativas aunque hubo tendencia a la significación ($p=0,064$). Si consideramos los días de ingreso total, la mediana es de 29 días (7-274), IQR: 32; al comparar BSAMR con BSAMS también hay tendencia a la significación, $p=0,072$.

Tabla 38: Análisis multivariante de las variables modificables asociadas a mala evolución en población pediátrica. Los datos se expresan como número de casos (porcentaje).

PEDIATRÍA	Complicaciones sépticas n (%)	Curación n (%)	P
TE inadecuado	1(10)	10 (100)	0,433
TE adecuado	1 (33,3)	3 (100)	0,433
TE alternativo	0	3 (100)	0,433
No Mod. del ttº	0	3 (100)	0,620
Mod. a ttº adecuado	1 (11,1)	9 (100)	
Mod. a ttº alternativo	0	1 (100)	
TTº final adecuado	3 (20)	15 (100)	0,698
TTº final inadecuado	0	2 (100)	
TTº final alternativo	0	1 (100)	
Retirada precoz del catéter			
No	2 (20)	10 (100)	0,869
Sí	1 (16,7)	6(100)	
Ecocardiografía			
No	2 (20)	10 (100)	0,671
Sí	1 (12,5)	8 (100)	
Informe microbiología			
No	0	6 (100)	0,237
Sí	3 (20)	15 (100)	
Cumplimiento calidad			
75-100%	1 (16,7)	6 (100)	0,633
50-74%	2 (20)	10 (100)	
0- 49%	0	4 (100)	

TE: tratamiento empírico; Mod.: modificación; ttº: tratamiento

Tabla 39: Análisis multivariante de las variables no modificables asociadas a mala evolución en población pediátrica . Los datos se expresan como número de casos (porcentaje).

PEDIATRÍA	Complicaciones sépticas n (%)	Curación n (%)	P
Sexo			0,074
Hombre	0	10 (100)	
Mujer	3 (27,3)	11 (100)	
Enfermedad neoplásica	1 (33,3)	3 (100)	0,364
Inmunosupresión	1 (25)	4 (100)	0,570
Adquisición			
Comunitaria	1 (20)	5 (100)	0,916
Nosocomial	1 (12,5)	8 (100)	
RAS	1 (12,5)	8 (100)	
Tiempo positividad			
≤ 12 horas	0	4 (100)	0,364
>12horas	3 (17,6)	17 (100)	
Procalcitonina			
<2	2 (25)	8 (100)	0,224
≥2	0	5 (100)	
CMI vanco			
≥ 1,5	2 (15,4)	13 (100)	0,854
<1,5	1 (12,5)	8 (100)	

Vanco: vancomicina

Tabla 40: Variables clínicas y evolutivas en función de la gravedad basal del paciente en población pediátrica. Los datos se expresan como número de casos (porcentaje)

PEDIATRÍA	Complicaciones sépticas n (%)	Curación n (%)	P
Sepsis grave			
No	3 (18,8)	16 (100)	0,414
Sí	0	3 (100)	
Bacteriemia complicada			
No	1 (6,7)	15 (100)	0,011
Sí	2 (66,7)	3 (100)	

4.7. Evaluación de la influencia de aplicar las recomendaciones en la práctica clínica de las bacteriemias por *S.aureus*

Como se refleja en la Figura 43, tenían más curación aquellos que se cumplían más medidas relacionadas con la calidad en el manejo del paciente. Así,

- los que cumplen entre un 75-100% de medidas tienen un 90,6% (48/53) de curación, un 17% (9/53) de complicaciones y un 3,8% (2/53) de mortalidad atribuible.
- El grupo que cumple entre un 0-49%, presenta un porcentaje de curación mucho menor 37,5% (6/16); ninguna complicación, y 12,5% (2/16) de mortalidad atribuible.
- El grupo que cumple entre un 50-74% de medidas tiene un porcentaje de curación de 60% (24/40), 2,5% de complicaciones (1/40) y 10% (4/40) de mortalidad atribuible.

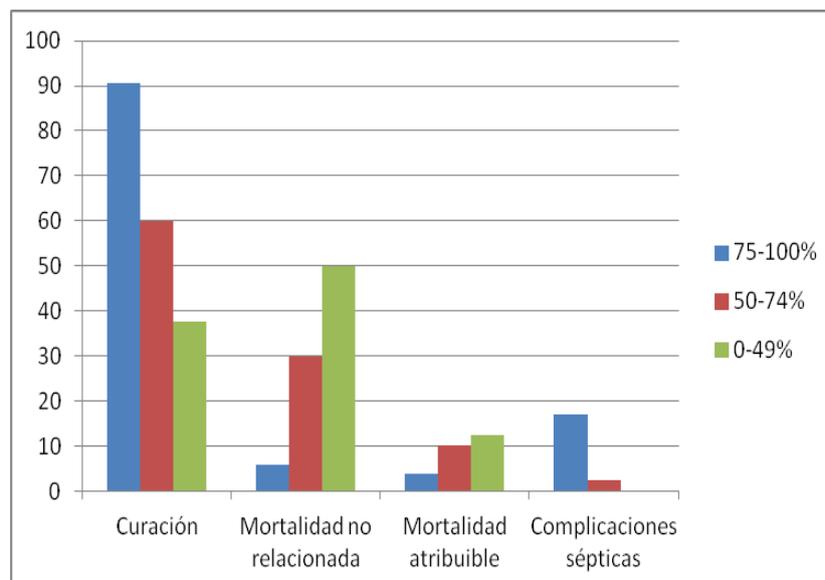


Figura 43: Evolución de las bacteriemias en función del cumplimiento de las medidas terapéuticas recomendadas.

Si hacemos el análisis atendiendo a los diferentes servicios donde se extrajeron los hemocultivos (Figura 44), son los Servicios Médicos, Quirúrgicos y Urgencias, desde donde fueron ingresados en su mayoría en Servicios Médicos, donde se produjo un manejo más adecuado de este tipo de infección.

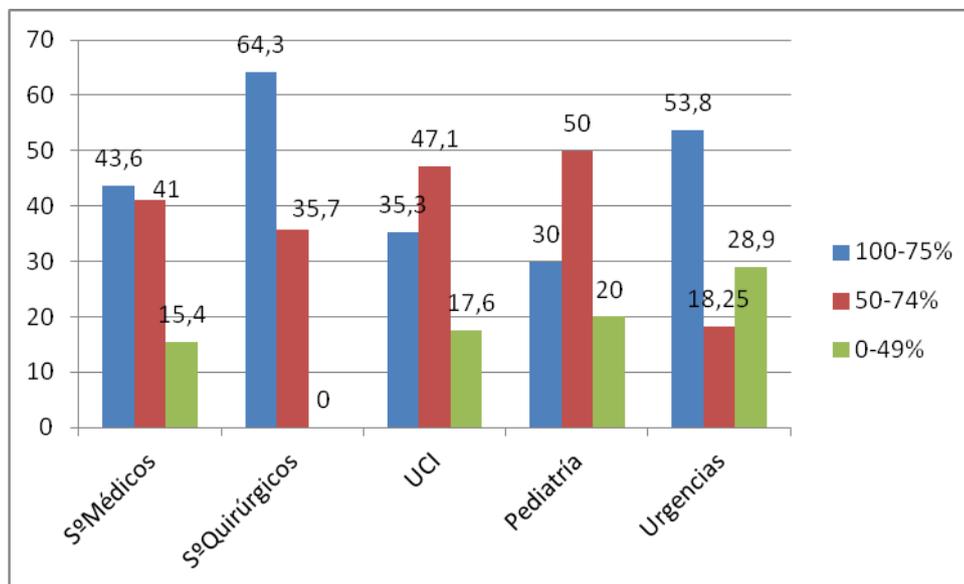


Figura 44: Distribución por Servicios del porcentaje de aplicación de las diferentes medidas de intervención en BSA

Si enfocamos el análisis desde el punto de vista de la gravedad del enfermo (Figura 45), en el grupo que cumple entre el 75-100% de las medidas un 17% (9/53) presenta sepsis grave; un 27,5%(11/40) en el grupo que cumple el 50-74%, y un 43,8% (7/16) en el grupo que cumple el 0-49%. P=0,083)

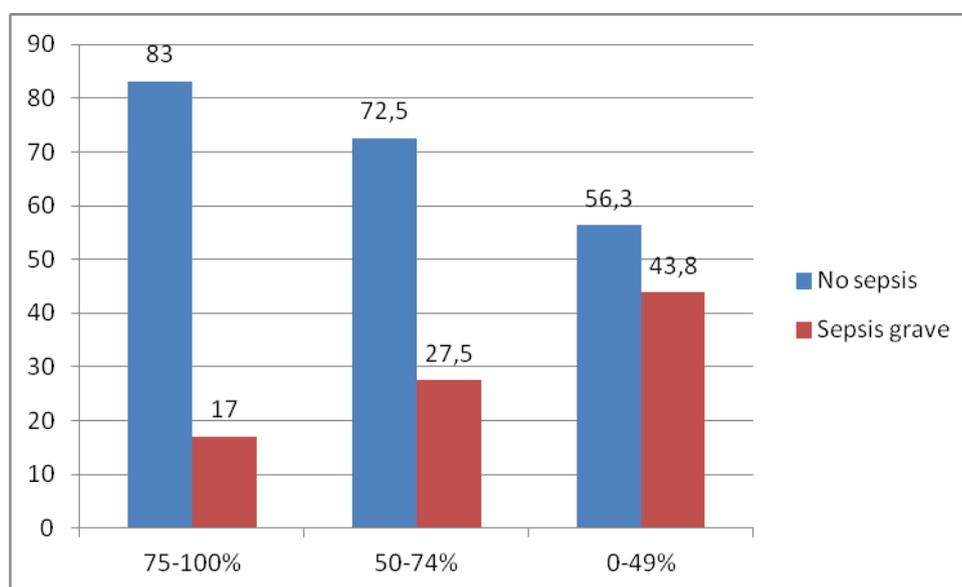


Figura 45: BSA que presentan sepsis grave en cada uno de los grupos de porcentaje de las medidas en el manejo del paciente en población adulta.

En población pediátrica, un 30% de los pacientes cumple entre un 75-100% de las medidas, un 50% entre 50-74% y un 20% entre un 0-49%

Desde el punto de vista de la gravedad del enfermo (Figura 46), en el grupo que cumple entre el 75-100% de las medidas un 0% (0/6) presenta sepsis grave; un 20% (2/10) en el grupo que cumple el 50-74%, y un 33,3% (1/3) en el grupo que cumple el 0-49%. P=0,083)

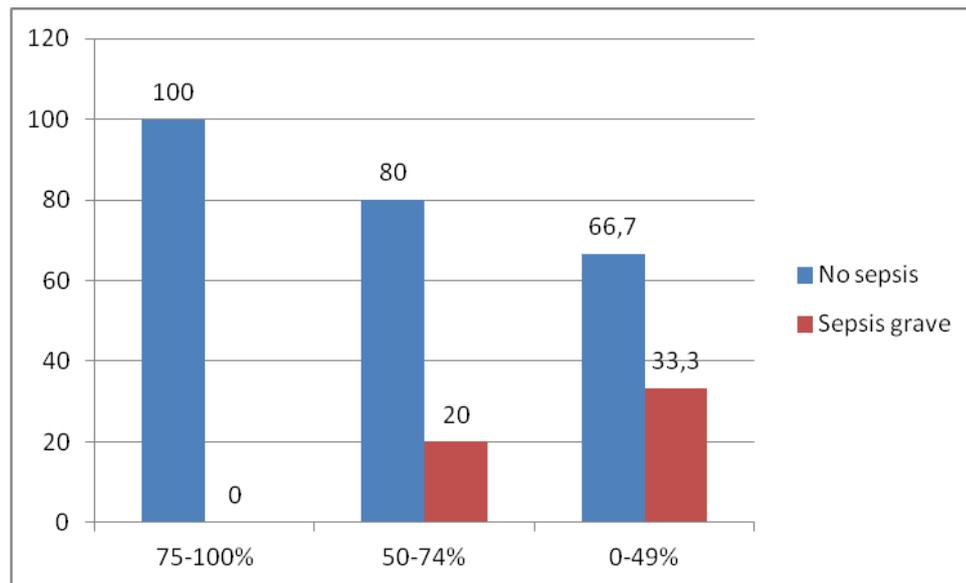


Figura 46: BSA que presentan sepsis grave en cada uno de los grupos de porcentaje de las medidas en el manejo del paciente en población pediátrica.

Evaluada la influencia del manejo del paciente durante el episodio de bacteriemia, en población pediátrica, se mostraron diferencias significativas entre los tres niveles de intervención (0-49%; 50-74%; 75-100%) con $p=0,031$. Las pruebas de contraste indican con precisión que tienen más días de ingreso los pacientes del grupo “0-49%” respecto a los otros dos grupos. En población adulta también hay diferencias significativas al comparar los días de ingreso total en cada uno de los tres grupos ($p=0,009$) teniendo más días de ingreso los que cumplen un menor porcentaje las medidas de intervención.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Las bacteriemias por *Staphylococcus aureus* son un importante problema en la patología infecciosa tanto al considerar las infecciones asociadas a la comunidad como las hospitalarias debido al frecuente desarrollo de complicaciones y a su elevada mortalidad, que oscila entre un 20-40% (López-Cortés LE, 2013). Además, se asocian a un incremento en días de hospitalización y a un aumento del coste derivado de la prolongación de la estancia hospitalaria y de las exploraciones complementarias asociadas. La incidencia de BSA varía según los diferentes centros; en el nuestro la incidencia de BSA correspondiente al año 2012 en el Hospital General fue de 2,1 casos/1000 ingresos y en 2013 de 2,6 casos/1000 ingresos; en el Hospital Infantil fue de 1,6 casos/1000 ingresos en 2012 y 2,5 casos/1000 ingresos en 2013. Estas cifras son inferiores a lo publicado por otros estudios de nuestro país. En la serie de Rodríguez-Creixems, la incidencia de BSA fue de 3,5 casos/ingresos en el año 2005 (Rodríguez-Creixems y col., 2008).

En el caso de las técnicas de epidemiología molecular para evaluar brotes nosocomiales de infección y determinar el número de clones circulantes sería más razonable usar estas herramientas en tiempo real ya que permite la toma de decisiones para mejorar o evitar la diseminación del brote. Tanto en el grupo de BSAMS como en el de BSAMR se realizaron estudios microbiológicos de epidemiología molecular.

Como técnicas fenotípicas de tipificación hemos analizado la fagotipia. Se usa cada vez menos en investigación de brotes por los problemas de baja reproducibilidad y el bajo poder de discriminación que tiene. Sin embargo, el antibiotipo, como técnica de tipificación fenotípica puede ser muy útil en algunas situaciones como sucede cuando se detectan nuevos fenotipos de resistencia diferentes al habitual y que incrementa su aparición sobre todo en algunas áreas hospitalarias concretas (Fernández F y col., 2013).

A) Estudio microbiológico y molecular de los aislamientos de SAMR

Del total de las bacteriemias por *S. aureus* incluidas en el estudio un 16% estaban producidas por cepas resistentes a meticilina, cifra inferior a la encontrada en un estudio publicado por García-Vázquez E y col. en 2007 referente a bacteriemias por *S.aureus* en nuestro mismo centro hospitalario durante un periodo de estudio de tres años (2000 a 2003) en el que las BSAMR supusieron el 38,5%. En los datos correspondientes al EARSS (2010) se publican tasas que van desde el 1% en los países nórdicos hasta un 50% en Portugal, y España presenta tasas entre el 25 y 50% (European Centre for Disease Prevention and Control EARSS Annual Reports. Disponible en <http://ecdc.europa.eu/en/Pages/home.aspx>). Nuestra incidencia es menor que la descrita en el EARSS y que la media descrita por Cuevas y col. en 2008 en 145 hospitales españoles (29,2%).

El 42,8% de todos aislados SAMR fueron resistentes a tres o más antibióticos, y 32,3% fueron resistentes al menos cuatro o más antibióticos. De los 9 patrones de resistencia diferentes, el más frecuente en el periodo de estudio fue el que mostró resistencia a levofloxacino y tobramicina (28,5%) seguido del patrón que afecta a estos cuatro antibióticos: levofloxacino, eritromicina, clindamicina, y tobramicina (23,8%). De los aislados resistentes a tobramicina, ninguno presentó resistencia a gentamicina. Esta resistencia, descrita en otros estudios, está mediada por la presencia del enzima nucleotidiltransferasa o adeniltransferasa denominada ANT(4')(4''). Esta enzima, que está codificada por genes albergados en plásmidos o en transposones, adenila grupos hidroxilos de los aminoglucósidos e inactiva a la tobramicina.

Respecto a los macrólidos, el fenotipo sensible a todos ellos fue el más frecuente (57,14%), seguido de fenotipo de resistencia constitutiva (MLSc) con un 33,3%, y por último el fenotipo M (9,5%).

En el estudio nacional publicado por Vindel A. y cols, (2009) el patrón de resistencia predominante entre los aislados SAMR en España incluía resistencia a ciprofloxacino

y tobramicina (19,2%), seguido de la resistencia a levofloxacino, eritromicina, clindamicina, y tobramicina que presentaron el 16,3% de las cepas. El fenotipo de resistencia a los macrólidos más prevalente en nuestro país fue el M (27,4%) a diferencia de nuestros resultados, que mostraron un 9,5%. En el estudio de Vindel y col. (2009), más del 30% fueron resistentes al menos a 4 antimicrobianos. Las cepas de nuestro estudio son en general más sensibles que el estudio nacional aunque el porcentaje de multirresistencia a 4 o más antibióticos es igual en ambos (más del 30%). Tanto en el citado estudio como en el nuestro, todos los aislados fueron sensibles a vancomicina ($CMI \leq 2$ mg/l) y teicoplanina ($CMI \leq 8$ mg/l).

Algunos estudios han establecido una relación entre la CMI a vancomicina y la evolución de los pacientes (Sakoulas G y col., 2004; Soriano A y col., 2008). En cuanto a la CMI de vancomicina en el total de las cepas SAMR, un (7/21) 33,3% tuvieron $CMI < 1.5$ mg/l y 66,7% (14%) tuvieron $CMI \geq 1.5$ mg/l. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la evolución de la bacteriemia entre los dos grupos, aunque hubo un 13% de complicaciones sépticas en los pacientes con $CMI \geq 1.5$ mg/l, frente a un 4,5% de complicaciones en los pacientes con $CMI < 1.5$ mg/l.

De las 135 cepas SARM del citado estudio nacional, sólo una fue adquirida en la comunidad y también presentó el fenotipo M de resistencia a macrólidos. En nuestro estudio, la cepa A1 comunitaria también presentó el fenotipo M y además fue resistente a levofloxacino.

De acuerdo a varios estudios publicados con anterioridad, la mayoría de las cepas SARM de origen hospitalario o asociadas a la asistencia sanitaria son resistentes a ciprofloxacino; en contraste, las cepas comunitarias son sensibles a este antibiótico. En nuestro estudio, del total de cepas SARM, 19 son resistentes a levofloxacino todas ellas corresponden a infecciones de adquisición nosocomial o RAS.

La caracterización mediante fagotipia de las cepas SAMR aisladas en nuestra serie mostró una distribución heterogénea, sin poder establecer agrupaciones. De ahí la importancia de la tipificación molecular para detectar los clones circulantes y evaluar posibles brotes.

El tipo *SCCmec* más frecuente fue el *SCCmec* IV, concretamente el subtipo *SCCmec*IVc que estuvo presente en un 90,5%. En este dato difiere con el estudio nacional, en el que el subtipo más frecuente fue *SCCmec* IVa con un 70,1% seguido del subtipo *SCCmec*IVc con un 23,9%. Los otros dos aislados presentaron el subtipo *SCCmec* IVh y el *SCCmec* V. El *SCCmec* IVh se aisló de un paciente de 85 años, cuyo foco fue respiratorio (EPOC reagudizado), que tuvo un desenlace fatal con muerte a los tres días de la extracción del hemocultivo. Este subtipo IVh se asocia al clon epidémico EMRSA-15, aislado originalmente en Inglaterra y Gales (Richardson JC y Reith S, 1993). Posteriormente se ha aislado en muchos países como Alemania (Witte W y col., 2001), Australia (Pearman JW y col., 2001) y Portugal (Aires de Sousa M y col., 2005). En España se aisló por primera vez en Tenerife (Perez Roth E y col., 2004 J). El cassette *SCCmec*V se asocia habitualmente con cepas de origen comunitario, con el linaje ST398 y con pacientes en contacto con ganado porcino.

No encontramos ningún aislado *SCCmec* I ni *SCCmec* II, que históricamente se han asociado a multirresistencia antibiótica y suelen asociarse a aislados esporádicos. Debido al pequeño tamaño de la muestra y al elevado número de aislados que corresponden al *SCCmec* tipo IV, el poder de discriminación de esta técnica es limitado.

La tipificación molecular de las 21 cepas de SAMR mediante electroforesis en campo pulsado mostró 12 genotipos diferentes que incluyen dos clones predominantes, E7 y E8. Resultados similares se muestran en el estudio nacional citado anteriormente, donde se publica que los clones mayoritarios E7 y E8 pertenecen al ST125 que continúa siendo responsable de más de la mitad de las infecciones nosocomiales por SAMR en España, hecho que contrasta con la baja prevalencia de este clon en otros países europeos (Vindel A, 2014). Una de las cepa pertenecía al pulsotipo A1 o clon comunitario (subtipo *SCCmec* IVc) que se correspondía al fagogrupo III. Esta cepa presentaba la LPV. Su antibiograma mostró resistencia a levofloxacino y eritromicina (fenotipo M), la CMI a vancomicina por E-test® fue de 1 mg/l. Corresponde a un paciente varón de 68 años con un índice de Charlson de 8 y pronóstico “rápidamente fatal” según los criterios de Mac Cabe Jackson, en el que como enfermedad de base

destaca enfermedad neoplásica con metástasis y antecedentes de cirugía. El foco de la infección fue la herida quirúrgica. A pesar de tener un alto índice de comorbilidad evolucionó hacia la curación del episodio de bacteriemia tras un tratamiento correcto con vancomicina.

Se identificó otro aislado que se correspondió al genotipo E13 (EMRSA15) (subtipo SCCmecIVh) en un paciente con foco respiratorio. De los 6 aislados considerados “esporádicos”, dos muestran el mismo *spa-type*: t067, otros dos el t015, uno el t1346, y otro el t024.

Cuando comparamos los diferentes pulsotipos encontrados por electroforesis mediante *spa-typing*, los clones predominantes (E7 y E8) presentaron diferentes *spa-type*, aunque la mayoría pertenecen al mismo grupo BURP (CC5).

Del análisis de tipificación molecular mediante *spa-typing* en los aislados SAMR en primer lugar encontramos que el *spa-type* t067 fue el más frecuente (42,8%), dato que coincide con el citado estudio publicado por Vindel y col. en 2009. En segundo lugar encontramos un alto grado de clonalidad (o poca dispersión clonal) en los aislados de SAMR, lo que demuestra que la mayoría de los aislados pertenecen a clones pandémicos. La elevada frecuencia de t067 limita el uso de *spa-typing* para estudios de investigación locales lo que hace necesario diferenciar estas cepas por otros métodos de tipificación.

La combinación de la electroforesis en campo de pulso y la asignación de BUR- CC puede predecir el eBURST CC sin hacer necesario la realización de MLST para la tipificación de SAMR como ya ha sido comentado en otras publicaciones (Faria NA y col.,2008). En nuestro estudio encontramos 16 cepas que pertenecen al grupo clonal CC5 (Burst), 2 al CC45, 2 al CC8 (una de ellas fue LPV positiva), y 1 cepa al ST22 EMRSA-15.

A todas las cepas SAMR se les realizó la detección de LPV de las que sólo una fue positiva, que se correspondía con *spa-type*: t024, *spa* CC: CC8, SCCmec IVc, perfil electroforesis A1 (o comunitario). El hecho de tener sólo un aislado con PVL se debe al pequeño tamaño de la muestra de SAMR y a que nos hemos limitado a muestras tomadas de bacteriemias. Ampliando el tamaño y el tipo de muestra incluyendo a

muestras de piel y partes blandas conseguiríamos más prevalencia de PVL+ lo que coincidiría con el incremento de prevalencia de cepas SAMR PVL+ en Europa en los últimos años (Witte WC y col., 2005).

Finalmente, en el caso de las BSAMR no podemos concluir que estuviéramos ante algún tipo de brote porque estos clones son los más frecuentes en España, además carecemos de datos epidemiológicos anteriores para establecer comparaciones. Por tanto, como en el resto de hospitales españoles, estas cepas son endémicas en nuestro centro. Como particularidad, en dos cepas correspondientes al grupo clonal CC45 mostraron un perfil de similitud del 95% con el campo pulsado (denominadas esporádico 1), sí se observaron relaciones epidemiológicas (ambos ingresados en UCI neonatal y aislados en la misma fecha).

En vista de la amplia variedad de métodos disponibles para tipificar SARM, la elección del más adecuado depende de las necesidades y del tipo de estudio que se quiera realizar. Recientemente se han puesto en práctica métodos que combinan la tipificación del cromosoma bacteriano mediante PFGE o por estrategias de secuenciación, con la tipificación del *SCCmec* por PCR, *spa-typing*, o MLST; estos métodos tienen gran especificidad y han resultado muy útiles en estudios epidemiológicos y principalmente, en los del tipo evolutivo.

Inicialmente emplearíamos la PFGE y luego, en los aislamientos que muestran clonalidad, haríamos el análisis de las cepas por *spa-typing* o MLST. Se podría emplear la tipificación *spa* en lugar de PFGE de no ser por los costos en la secuenciación. La tipificación *spa* provee datos concordantes con los obtenidos por MLST o PFGE; sin embargo su uso no obvia la necesidad de efectuar la tipificación del *SCCmec* para determinar la clonalidad de los aislamientos (Cookson B.D., 2007, Jimenez Quiceno N. y col. 2009).

B) Estudio microbiológico y molecular de los aislamientos de *S. aureus* sensibles a meticilina

De las 110 cepas de *S. aureus* sensibles a meticilina, el 3,6% fueron sensibles a todos los antibióticos estudiados; el 64,5% fueron resistentes sólo a penicilina y, presentaban un patrón de multirresistencia a tres o más antibióticos un 19%, siendo 5,4% resistentes a cuatro o más antibióticos. De los 10 patrones de resistencia diferentes, el más frecuente en el periodo de estudio fue la resistencia a penicilina (64,5%) seguido del patrón que afecta a estos tres antibióticos: penicilina, eritromicina y clindamicina (10,9%). Al igual que en las cepas SAMR resistentes a macrólidos, el fenotipo de resistencia constitutiva a macrólidos (MLSc) fue el más frecuente (16,3%) y el fenotipo M de resistencia se observó en el 9,9%.

Es de destacar que, del total de las cepas SAMS, más de la mitad (54,4%) presentaron una CMI a vancomicina ≥ 1.5 mg/l y un 45,5% < 1.5 mg/l. Aunque en algunos estudios se ha observado un peor pronóstico en casos de BSAMS cuando la CMI a vancomicina es $\geq 1,5$ mg/l (Aguado JM y col., 2011; Han JH y col., 2012.), en nuestra serie no se observaron diferencias significativas entre ellas al estudiar la evolución del episodio de bacteriemia. Esto es coincidente con otros estudios (Holmes NE y col., 2011).

Para la tipificación de los aislamientos de SAMS se procedió en primer lugar a realizar el *spa*-typing y en segundo lugar, en aquellos aislados con el mismo *spa*-type y con una posible relación epidemiológica, se realizó la electroforesis en campo pulsado. Del análisis mediante *spa*-typing se encontró una gran dispersión clonal con 70 *spa*-types diferentes. Con la herramienta BURP de *StaphType Software* se obtuvieron 12 clusters que agruparon los *spa*-types predominantes. Del estudio de PFGE en las 22 cepas seleccionadas se encontró que, de los cuatro aislados correspondientes al grupo clonal CC15, dos de ellos tenían el mismo *spa*-type (t116) y además tenían un coeficiente de similitud del 95%. Se trataba de pacientes pediátricos en los no se encontró relación cronológica, ni clínica, ni epidemiológica. De igual modo se encontró un coeficiente de similitud del 95% en cinco aislados correspondientes al

grupo clonal CC002 (*spa-type* t002). Se revisaron las historias clínicas a fin de encontrar alguna relación epidemiológica y tampoco se encontró relación cronológica, ni clínica, ni epidemiológica. En 6 aislados correspondientes al grupo clonal CC012 (t012) se apreció un coeficiente de similitud del 95%, por lo que se procedió a revisar las historias clínicas para encontrar alguna relación epidemiológica. En tres pacientes el foco de la bacteriemia fue una flebitis, aunque cada uno de ellos estuvo ingresado en un servicio clínico diferente. También se observó relación cronológica: dos de ellos presentaron la bacteriemia en el mes de diciembre de 2012, y estos dos casos tuvieron como antecedente haber sido sometidos a un procedimiento invasivo (colonoscopia) y ambos eran pacientes diabéticos. A pesar de la gran dispersión clonal en SAMS hemos encontrado relación epidemiológica y clínica en dos pacientes.

C) Características clínicas y epidemiológicas de las bacteriemias por *S. aureus* en pacientes adultos

Las bacteriemias por *S. aureus* en el el grupo de pacientes adultos fueron más frecuentes en varones y la media de edad fue elevada (PONER). Los pacientes presentaban una importante comorbilidad asociada, como diabetes mellitus, enfermedad neoplásica, tratamiento inmunosupresor, e insuficiencia renal, aunque al comparar el subgrupo de pacientes con BSAMR y BSAMS no se encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto a la edad ni enfermedad de base, sólo destacó una mayor frecuencia de EPOC en los pacientes del primer grupo. Los pacientes con EPOC tienen 3 veces más posibilidades de tener BSAMR. Este dato contrasta con otros estudios en los que el grupo de pacientes con más riesgo de presentar BSAMR es el que presenta diabetes mellitus (Fowler VG y col., 2005; García-Vázquez y col.,2007).

Respecto a los índices que miden la gravedad de la comorbilidad, se encontraron diferencias significativas al comparar los rangos promedios de los dos grupos de población teniendo mayor gravedad de comorbilidad el grupo de BSAMR con

respecto al de BSAMS, dato que coincide con el estudio de García Vázquez y col. en 2007 en el que comparó BSAMR con BSAMS durante un periodo de tres años (2000-2003) en nuestro mismo hospital.

La mayoría de las BSA fueron de adquisición hospitalaria o relacionadas con la asistencia sanitaria, sólo el 13,7% de las bacteriemias fueron adquiridas en la comunidad, siendo todas ellas BSAMS. Más de la mitad de las BSAMR tuvieron una adquisición no nosocomial aunque ninguna de ellas fue estrictamente comunitaria, todas tuvieron relación con la asistencia sanitaria, dato que coincide con lo publicado por Velasco C y col. en 2012. Otros estudios indican que las cepas SAMR comunitarias son aún poco frecuentes en nuestro país (Millán AB y col. 2010; Cháves y col. 2005). En los casos de bacteriemia intrahospitalaria, SAMR representa el 8,8% (5/109), dato inferior a lo publicado por otros hospitales o al estudio EPINE en 2005.

En los pacientes adultos con bacteriemia de adquisición nosocomial casi la mitad de los pacientes la desarrollaron en la primera semana de ingreso, este porcentaje va disminuyendo conforme avanza el tiempo de hospitalización.

En general, en las bacteriemias nosocomiales, la media de los días de ingreso previo al episodio de bacteriemia en SARM fue de 21.09 días, casi cuatro veces mayor que en BSAMS, aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

En nuestro estudio, la gran mayoría de las bacteriemias se diagnosticaron en los hemocultivos tomados en Urgencias y Servicios Médicos, seguido de Pediatría y de las UCIs. El servicio con mayor porcentaje de BSAMR fue Pediatría, seguido de las UCIs y de Urgencias. Llama la atención que sea el Servicio de Pediatría el de mayor porcentaje de BSAMR, lo que nos llevó a descartar un brote en alguna Unidad dentro del servicio. De las 6 bacteriemias, dos presentaron el perfil E7a, una el E8a, y 3 fueron esporádicos (2 CC45 y 1 excluded).

El que tuvo un mayor porcentaje de bacteriemia complicada fue la UCI, seguido de Servicios Quirúrgicos y Servicios Médicos. El Servicio que mostró un menor porcentaje fue Pediatría.

Como sucede con otras series publicadas, de todas las BSA, el síndrome infeccioso de origen más frecuente fue la bacteriemia relacionada con catéter (31.8%), de los que

un 37% fue bacteriemia relacionada con catéter central y un 62% el foco fue flebitis por un catéter periférico, en su mayoría BSAMS. Se justifica por la generalización del uso de los mismos en todos los servicios hospitalarios (Edgeworth JD y col., 1999).

Todas las bacteriemias relacionadas con catéter fueron de adquisición nosocomial o relacionadas con la asistencia sanitaria; es el foco infeccioso que menor porcentaje de sepsis presentó (17,6%) junto con el foco osteoarticular. En cuanto a las complicaciones de la bacteriemia relacionada con catéter, éstas sólo representan un 11,8%, cifra inferior a lo publicado en otras series, en las que este tipo de bacteriemias muestran un elevado porcentaje de complicaciones (Sanabria TJ y col., 1990). Una posible explicación es que en nuestro estudio se analizaron de forma conjunta las BSA asociadas a catéter periférico y a catéter central. Debido a que en nuestro estudio el grupo de las bacteriemias relacionadas con catéter central es menos numeroso que el de BRC periférico, y correspondería a pacientes más graves y con más patología de base, que tendrían por tanto más riesgo de tener complicaciones y de fallecer por una complicación médica que puede o no estar relacionada con la bacteriemia. En otras series, las complicaciones de las BRC son mayores, incrementando los costes del ingreso hospitalario respecto a los pacientes sin bacteriemia (Riu M, y col., 2012). En el estudio de Pujol M y col., (2007), los pacientes con BRC periférico por *S.aureus* presentaron una mayor mortalidad relacionada que los pacientes con BRC por otros microorganismos. En nuestro estudio, la tasa de mortalidad fue baja, y en ningún caso se atribuyó al episodio de bacteriemia, siendo el catéter un foco asociado a buen pronóstico, contrariamente a lo que ocurrió con otros orígenes como el respiratorio o la endocarditis infecciosa (Hill PC y col., 2001; Pea F y col., 2009). El foco que presentó mayor mortalidad cruda fue la endocarditis infecciosa (100%), seguido de las bacteriemias primarias (51,6%), foco respiratorio (36,4%), piel y partes blandas (21,1%). La mortalidad atribuible es también mayor en endocarditis (66,7%), seguido de foco respiratorio (18,2%), piel y partes blandas (11,1%), y bacteriemias primarias (6,7%). No presentan mortalidad relacionada con el episodio infeccioso ni la bacteriemia relacionada con catéter, ni herida quirúrgica, osteoarticular, ni meningitis. Un estudio realizado por (Lodise TP,

2003), las fuentes de bacteriemia asociada a mayor mortalidad incluyeron endocarditis infecciosa, infección endovascular distinta a la relacionada con catéter, infecciones de sistema nervioso central, infección intraabdominal, e infección del tracto respiratorio. En relación al desarrollo de metástasis sépticas, el mayor porcentaje correspondió a heridas quirúrgicas: 33,3%, seguido de catéter: 11,8%, piel y partes blandas: 11,1%, y respiratorio: 9,1%. Cursan con sepsis grave o shock séptico el 36,4% de las bacteriemias de origen respiratorio, el 33,3% de las endocarditis infecciosas, el 33,3% de infecciones de piel y partes blandas, el 33,3% de herida quirúrgica, 19,4% de las de origen desconocido, 17,6% de bacteriemias relacionadas con catéter, el 16,7% de las infecciones osteoarticulares.

No existen criterios de bacteriemia complicada (BC) universalmente conocidos, pero basándonos en lo publicado por López-Cortés y col., (2013), encontramos que un 32,11% (un tercio) de pacientes adultos presentaron al menos un criterio de bacteriemia complicada, cifra inferior al citado estudio (45,4%). Se analizaron diferentes variables y de ellas en las que sí se observó un mayor riesgo de tener una BC fue tener una bacteriemia por SAMR (implica 3,2 veces más riesgo). Además, la bacteriemia complicada tiene 4,7 veces más posibilidades de presentarse con un índice de Pitt mayor de dos, 5,3 veces más probabilidades de shock séptico o sepsis grave, y 11,3 veces más probabilidades de tener un procalcitonina mayor de 2. Aquellos focos que tienen un mayor porcentaje de bacteriemia complicada son endocarditis infecciosa, herida quirúrgica y piel y partes blandas, aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas.

En adultos el porcentaje de sepsis grave o shock séptico en BSAMR es de 31,3% y en BSAMS 22%.

Las tasas de mortalidad de BSA oscilan entre un 20 y un 40% según las series descritas. En nuestro estudio la mortalidad global fue del 23,6% aunque la mortalidad relacionada fue de 7,3%. Al comparar las BSAMR con BSAMS la mortalidad atribuible en BSAMR fue de 14,28% frente a 4,5% en BSAMS. En otros estudios publicados con anterioridad también se observó que la mortalidad en BSAMR es mayor comparada con BSAMS (Shurland y col., 2007; Soriano A y col., 2000; Cosgrove S y col., 2003). En

nuestro estudio, si nos centramos en variables no modificables, en cuanto a enfermedades de base, sólo la enfermedad hepática (cirrosis) se asoció a mayor mortalidad y complicaciones sépticas. En cuanto a la gravedad basal del paciente, los indicadores de mayor gravedad basal (MacCabe 3: rápidamente fatal) y mayor gravedad de la bacteriemia (Pitt>2) se asocian a mayor mortalidad cruda. Según lo publicado por García-Vázquez y col en 2007, las patologías que con más frecuencia se asociaron a mortalidad fueron la diabetes, enfermedad neoplásica y el VIH.

Con respecto a los datos clínicos y marcadores de laboratorio, el 50,9% (sólo la mitad) de los pacientes tienen temperatura superior a 38,2°C, y el 53,27% de la población adulta tiene leucocitosis. Los valores de la procalcitonina son mayores en el subgrupo de pacientes con BSAMR respecto al grupo de BSAMS, con tendencia a la significación, aunque en 61 pacientes no hay datos sobre este parámetro en la analítica, por lo que el resultado estadístico hay que interpretarlo con precaución.

El tiempo de positividad de crecimiento de los hemocultivos tuvo una media de 17,55, y casi un tercio de los pacientes presentaron un tiempo de positividad inferior a 12 horas. En el grupo de pacientes adultos al comparar la gravedad del episodio infeccioso en el grupo de bacteriemias cuyos hemocultivos fueron positivos con un tiempo igual o inferior a 12 horas con aquellos con un tiempo superior a 12 horas, un 33,3% de los hemocultivos con tiempo de positividad igual o menor a 12 horas cursaron con sepsis grave o shock séptico, sin embargo descendió al 19,5% cuando este tiempo fue superior a 12 horas. Además, un tiempo de positividad menor o igual a 12 horas se asoció a más complicaciones y mortalidad, tanto cruda como atribuible.

Según un trabajo realizado por Kassis C y col. en 2009, el tiempo de crecimiento de los hemocultivos se ha evaluado como dato para interpretar el significado de los hemocultivos positivos. En otro estudio firmado por Marra AR y col. en 2006, se evaluó la relación entre tiempo de positividad y la evolución clínica en pacientes adultos con bacteriemias monomicrobianas por *S.aureus*, así un tiempo de positividad inferior a 12 horas está asociado con una mayor tasa de mortalidad y complicaciones respecto a aquellos pacientes con tiempo de positividad superior a 12 horas. Esto puede orientar a los clínicos a la hora de elegir el tratamiento antimicrobiano

adecuado lo más precozmente posible y además proporcionar información pronóstica.

Por tanto, en nuestro estudio se observó que presentaban un mayor riesgo de presentar una BC, no sólo tener una bacteriemia por SAMR como se ha apuntado anteriormente, sino también tener un valor de procalcitonina mayor de 2, un índice de Pitt mayor a 2, tener criterios de sepsis grave o shock séptico, y un tiempo de positividad del hemocultivo mayor o igual de 12 horas.

De forma global en la población adulta el 75,7% de los pacientes tenían realizados hemocultivos de control en cualquier momento de la evolución de la infección, de los que sólo un 7,9% fueron positivos. En el estudio multicéntrico realizado por López-Cortés LE y col. en 2013, los hemocultivos de control variaban de 61,2% a 80,3% en los diferentes hospitales, lo que coincide con nuestra serie. El 29,7% de los hemocultivos extraídos a las 48 horas fueron positivos, 22,2% de los extraídos a las 72 horas, y el 8,8 % de los sacados más allá de 96 horas. Se ha establecido una correlación entre la persistencia de la bacteriemia en el tiempo con el desarrollo de complicaciones, las cuales aumentan en función de la persistencia de la bacteriemia con el tiempo, presentando una evolución clínica desfavorable incluso una mayor mortalidad relacionada con la bacteriemia respecto a los pacientes en los que los hemocultivos de control son negativos. Los hemocultivos de control positivos a las 48-96 horas de haberse iniciado la terapia correcta nos indican la posible presencia de complicaciones como también demuestran diversos estudios. (Fowler VG y col., 2003; Raad II y col., 1992). En adultos observamos que la positividad de los hemocultivos de control a las 48 horas de haber iniciado tratamiento empírico predice una evolución más tórpida lo que debe obligar a un seguimiento más estrecho del paciente. En nuestro estudio se aprecia una clara tendencia a un mayor porcentaje de bacteriemia complicada, de evolución clínica desfavorable y de mortalidad cruda en los pacientes con bacteriemias más prolongadas.

En adultos, globalmente sólo un 11,4% de las bacteriemias reciben un tratamiento empírico correcto según los datos posteriores de sensibilidad. En el grupo de BSAMR, recibe un tratamiento incorrecto el 75% de los pacientes; el porcentaje es similar al

publicado por otras series de nuestro país (76,5%) (Millán AB y col., 2010). En el caso de las BSAMS, sólo el 7,5% recibieron cloxacilina como tratamiento empírico adecuado. Cuando se conoce la sensibilidad *in vitro* el porcentaje de los que recibieron correctamente el tratamiento es de 67,7%. El grupo que finalmente recibió cloxacilina tiene un 82,5% de curación y una mortalidad atribuible del 4,8%, frente al 56% de curación en el grupo que no recibió este fármaco, que presentó un 6,7% de mortalidad atribuible. El recibir un tratamiento diferente de cloxacilina incrementa 3,615 veces el riesgo de tener más mortalidad por causas directamente atribuibles a la bacteriemia.

Si atendemos a la adquisición, en el grupo de pacientes con adquisición nosocomial es donde mayor porcentaje de tratamiento empírico correcto encontramos. La cifra tan elevada de tratamiento empírico inadecuado en todos los casos pero especialmente en las de origen comunitario puede estar justificada por un bajo índice de sospecha basado en que un alto porcentaje de pacientes no presentaban fiebre al inicio. Sin embargo la mortalidad atribuible y la mortalidad cruda (6,1% y 32,7% respectivamente) no son superiores respecto al grupo tratado correctamente (10% y 30% respectivamente), aunque no se observan diferencias significativas. Otro aspecto destacable es la elevada frecuencia de tratamientos empíricos no activos (tratamiento alternativo) con una mortalidad cruda de 26,1% y una mortalidad atribuible de 8,6%. Como ya está demostrado por otros autores, al analizar los factores de riesgo de mortalidad intrahospitalaria relacionados con la infección, la precocidad en la instauración del tratamiento antibiótico correcto influye en evolución favorable (Lodise TP y col., 2003; Soriano A y col., 2000; Ibrahim EH y col., 2000). El clínico puede actuar mediante la instauración precoz de antibiótico adecuado en cuanto se conozca la sensibilidad del microorganismo en los casos en los que el tratamiento empírico no fuese el correcto.

De los pacientes que recibieron un tratamiento diferente al de elección o no reciben ningún antibiótico, en el 11,4% no se modificó el tratamiento; en un 66,6% se modificó al tratamiento correcto o de elección. De forma global, una vez recibido el informe de sensibilidad, el 70,3% de los pacientes adultos recibieron el tratamiento

de elección; estos pacientes presentan mayor porcentaje de curación y menor mortalidad y complicaciones relacionadas que los que se tratan de forma incorrecta.

En los pacientes en los que se realiza de forma más adecuada el seguimiento y se adoptan mayor número de intervenciones tienen más porcentaje de curación como se ha publicado en otros estudios nacionales (López-Cortés y col., 2013; Rodríguez-Baño J y col., 2010). Si enfocamos el análisis desde el punto de vista de la gravedad del enfermo, los pacientes más graves son los que más medidas cumplían.

El subgrupo que cumple un mayor cumplimiento en porcentaje de las diferentes intervenciones terapéuticas (75-100%) presentó también una menor mortalidad cruda y menor mortalidad atribuible, aunque también presentó más complicaciones sépticas.

- Así, los que cumplen entre un 75-100% de medidas tienen un 90,6% de curación, un 17% de complicaciones y un 3,8% de mortalidad atribuible.
- El grupo que cumple entre un 50-74% de medidas tiene un porcentaje de curación de 60%, 2,5% de complicaciones y 10% de mortalidad atribuible.
- El grupo que cumple entre un 0-49%, presenta un porcentaje de curación mucho menor 37,5%; ninguna complicación, y 12,5% de mortalidad atribuible.

Al comparar los días de ingreso total en cada uno de los tres grupos de cumplimiento, tienen más días de ingreso los que cumplen menos medidas.

D) Bacteriemias por *S.aureus* en pacientes pediátricos.

En cuanto a la distribución por edades, el grupo de población correspondiente al Hospital Infantil supone un **15,9%** (21 pacientes). 6 presentaron BSAMR lo que supone el 28,5% de los pacientes pediátricos, cifra mayor que lo que muestran otros estudios. En algunas series, aunque referidas sólo a niños ingresados en UCI neonatal, el 25% de las bacteriemias son BSAMR (Thaden JT y col., 2015). Esta cifra referida a bacteriemias neonatales de origen comunitario desciende al 11% en un estudio multicéntrico realizado en seis países (Hamen DH y col., 2015).

En niños la media de edad fue de 2,69 (SD: 0,811); un 47,6% tenían menos de seis meses de edad. La distribución es igual entre varones y mujeres (10 y 11 pacientes respectivamente).

Podemos destacar que un 15,8% de los niños en los que se pudo revisar la historia tenían enfermedad neoplásica, un 25% presentaron inmunosupresión, y un 5,3% enfermedad renal. Atendiendo a las enfermedades de base ninguna mostró diferencias estadísticamente significativas entre los subgrupos de BSAMR y BSAMS. Sin embargo atendiendo a los factores de riesgo, los niños que llevaban un catéter periférico tenían más riesgo de presentar una BSAMR, con un OR: 3,143 (IC95%: 0,5-17,539).

En población infantil, el 23,8% fue adquirida en la comunidad, siendo el todas ellas BSAMS y ninguna BSAMR. La adquisición nosocomial fue del 38,1% de las que 62,5% fueron BSAMR. Esta cifra es muy superior a la publicada en el estudio EPINE para hospitales españoles en 2005 (30%). La bacteriemia relacionada con cuidados sanitarios (RAS) supuso un 38,1% de las que 12,5% fueron BSAMR. En el grupo de BSAMR ninguna tuvo adquisición estrictamente comunitaria como se observó en el subgrupo de pacientes adultos. En el grupo de BSAMS el 20% fueron nosocomiales, 33,3% comunitarias y 46,7% RAS. En los pacientes pediátricos con bacteriemia de adquisición nosocomial, un 37,5% la desarrolló en la primera semana de ingreso, 0% en la segunda, 12,5% en la tercera, un 25% en la cuarta y un 25% lo hizo posteriormente.

En los pacientes pediátricos, de los 21 niños el síndrome infeccioso más frecuente fue la bacteriemia de origen desconocido (47,6%), seguido del foco osteoarticular (23,8%), bacteriemia relacionada con catéter (14,3%), herida quirúrgica (9,5%) y piel y partes blandas (4,8%). El 20% de las infecciones osteoarticulares presentó sepsis grave o shock séptico, el 20% de las de origen desconocido, y ninguna de las bacteriemias relacionadas con catéter, herida quirúrgica ni piel y partes blandas. La bacteriemia relacionada con catéter y la de foco osteoarticular tuvieron más complicaciones con un 33,3% y 40% respectivamente.

Un 14,28% de los pacientes pediátricos presentan al menos un criterio de bacteriemia complicada; del total de las de las bacteriemias asociadas a catéter, un 66,7% son bacteriemias complicadas y el 20% de las osteoarticulares. Con respecto a la adquisición, el 80% de las osteoarticulares son de origen comunitario así como el 10% de las bacteriemias de foco desconocido. El resto son de adquisición nosocomial o relacionadas con la asistencia sanitaria.

En relación a los marcadores clínicos relacionados con la infección bacteriémica por *S.aureus*, como son la fiebre, leucocitosis, procalcitonina, proteína C reactiva (PCR) y tipo de respuesta inflamatoria sistémica observada, en niños sólo el 47,6% tiene fiebre; un 55,5% tiene leucocitosis; un 38,5% tiene una procalcitonina por encima de 2, y un 55% tiene una PCR mayor o igual de 5. No se encontraron diferencias significativas entre las BSAMR y BSAMS.

En cuanto al debut de la bacteriemia, un 14,2% presentó sepsis grave. En nuestra UCI pediátrica se utilizan dos scores de gravedad, el de PRISM y el de PELOD. Al comparar al grupo de pacientes con sepsis grave/shock séptico frente al grupo de los que no presentaron sepsis o ésta fue leve, no se encontraron diferencias significativas entre el grupo de pacientes con BSARM y BSAMS en ninguno de los dos grupos de población (ni adulta y ni pediátrica) aunque en niños observamos que el porcentaje en BSAMS es prácticamente el doble (66,7%) que respecto a BSAMR (33,3%).

El tiempo de positividad de crecimiento de los hemocultivos pediátricos tuvo una media de 16,34 horas y una mediana de 14,55; casi un quinto de los pacientes (19,04%) presentaron un tiempo de positividad inferior o igual a 12 horas. Sólo un 33,3% (1/3) cursó con sepsis grave o shock séptico cuando fueron positivos en un tiempo igual o menor a 12 horas, y cuando este tiempo fue superior a 12 horas un 12,5% (2/16) evolucionó con sepsis grave o shock séptico, aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas.

El 62% de los niños tienen procesados hemocultivos de control en algún momento de la evolución de la enfermedad y ninguno de ellos fue positivo. En el grupo de BSAMS hay mayor porcentaje (73,3%) de pacientes en los que se indica la extracción de un nuevo hemocultivo respecto a BSAMR (33,3%) con tendencia hacia la significación

estadística. De forma global los adultos tienen procesados hemocultivos de control en el 75,7% mientras que en la población infantil este porcentaje es más bajo: 62%. Sin embargo en los pacientes pediátricos todos los hemocultivos de control fueron negativos

El 18,8% (3/16) reciben un tratamiento empírico adecuado. En el grupo de BSAMR es adecuado en un 25% (1/4) de los pacientes, siendo también adecuado en el 16,6% (2/12) del grupo de BSAMS, aunque en este caso las diferencias no son significativas. En población infantil en ningún caso hubo un desenlace fatal. El 14,28% de los niños presentó complicaciones sépticas, aunque este dato no se relacionó con un tratamiento empírico inadecuado, a diferencia de lo que se ha publicado en otros estudios, según Thaden JT y col., 2015, el tratamiento empírico inadecuado en BSAMR en una UCI neonatal se asoció a un incremento de mortalidad (OR: 2,03; IC95%: 1,08-3,82), sin embargo en BSAMS el recibir tratamiento empírico inadecuado no se asoció a un aumento de mortalidad.

En niños la mediana de los días de ingreso desde que aparece la bacteriemia hasta la alta es de 22 (5-55), RIQ: 20; al comparar BSAMR con BSAMS, observamos que hay tendencia a la significación ($p=0,064$), el rango promedio en BSAMS es menor que en BSAMR. Si consideramos los días de ingreso total la mediana es de 29 días (7-274), RIQ: 32; al comparar BSAMR con BSAMS también hay tendencia a la significación, el rango promedio en BSAMS es inferior que en BSAMR.

En población pediátrica, en el 80% de los pacientes se cumple más del 50% de las medidas globales de manejo de la bacteriemia. Realizamos este mismo análisis desde el punto de vista de la gravedad del enfermo, en los pacientes más graves se cumplen más criterios considerados de buen manejo.

Al estudiar como influyen las medidas tomadas en el manejo del paciente en los días de ingreso sí hay diferencias significativas, el grupo que cumple 0-49% de las medidas tiene más días de ingreso que los otros dos grupos.

Nuestro estudio tiene como principal limitación el tamaño muestral, sobre todo en población pediátrica. No se ha tratado de comparar en ningún momento a los dos

grupos de población, adulta y pediátrica, en primer lugar por las diferencias entre ellos y en segundo lugar porque el tamaño de la muestra es muy diferente.

Otra limitación es que se trata de un estudio retrospectivo, con los inconvenientes que ello conlleva.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. El porcentaje de resistencia a meticilina en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de hemocultivos durante los años 2012 y 2013 fue de 16%, con un elevado porcentaje de resistencia a levofloxacino (85.7%). En cepas SAMS, el 95,4 % fueron resistentes a penicilina. Presentaron resistencia a tres o más antibióticos el 19.1%.
2. Entre las cepas de SAMR el clon ST125-mecIV fue el más frecuente. Solo se detectó leucocidina de Panton Valentine en una cepa correspondiente al clon ST8-mec IVc.
3. Aunque no se encontraron diferencias significativas en la patología subyacente que presentaron los grupos de pacientes con BSARM y BSAMS, excepto en pacientes con EPOC que tienen tres veces más riesgo de desarrollar BSAMR, la gravedad de la comorbilidad en pacientes con BSAMR fue superior, siendo la diferencia estadísticamente significativa.
4. Tanto en adultos como en pacientes pediátricos la mayoría de BSA fueron de adquisición nosocomial o relacionadas con la asistencia sanitaria. Ninguna bacteriemia por SAMR fue de adquisición comunitaria.
5. En adultos el foco de origen más frecuente fue la bacteriemia relacionada con el catéter, particularmente el catéter periférico. En niños el foco más frecuente fue la bacteriemia primaria. En este último grupo de población ser portador de un catéter periférico supuso más riesgo de presentar una BSAMR.
6. En adultos, sólo la mitad de los pacientes presentaron temperatura superior a 38,2°C (50,9) y leucocitosis (53,3%). Los valores de la procalcitonina fueron superiores en el subgrupo de pacientes con BSAMR. El porcentaje de niños con fiebre fue superior (71.4%).
7. Un tiempo de positividad del hemocultivo menor o igual de 12 horas se asoció a más complicaciones y mortalidad, tanto cruda como atribuible.

8. El riesgo de bacteriemia complicada fue 3,2 veces superior en las BSAMR, así como el presentar sepsis grave o shock séptico.
9. La mortalidad global en adultos fue de 23,6% con un 7,3% de mortalidad atribuible presentando cifras superiores en BSAMR respecto a BSAMS.
10. La caracterización fenotípica mediante fagotipia no permitió establecer agrupaciones ni en cepas de SAMR ni en SAMS
11. Entre las cepas de SAMR, el spa-tipo más frecuente en nuestro hospital, al igual que en el resto de nuestro país, fue el t067. Debido al alto porcentaje de t067 consideramos que el spa-typing debería combinarse con el campo pulsado y así aportar mayor poder discriminatorio y de tipificación para estudios epidémicos locales y a largo plazo. Mediante electroforesis en campo pulsado se encontraron 12 pulstipos diferentes aunque que la mayoría (47.6%), se agruparon en dos genotipos: E7 y E8a.
12. Tras el estudio con spa-typing de las cepas SAMS, se encontró gran dispersión clonal. Después de realizar el campo pulsado, sólo en dos casos se encontró relación clínica y epidemiológica.
13. Un porcentaje elevado de pacientes con BSA recibió tratamiento empírico inadecuado, justificado, en parte, por un bajo índice de sospecha dado el alto porcentaje de pacientes que no presentaron fiebre al inicio, tanto en adultos como en niños.
14. En relación al grado de cumplimiento de las intervenciones clínicas aplicadas en el manejo de los pacientes con BSA, en casi la mitad de los pacientes se cumplieron del 75 al 100%.
15. Entre estas medidas, en la población adulta se procesaron más hemocultivos de control que en los pacientes pediátricos. En los niños todos los hemocultivos de control fueron negativos. En adultos, la positividad de los hemocultivos de control a las 48 horas de haber iniciado el tratamiento empírico fue predictor de una evolución más tórpida, lo que debe obligar a un seguimiento más cercano del paciente.

16. Los pacientes en los que se cumplieron más medidas correctas en el manejo clínico del proceso infeccioso, presentaron más porcentaje de curación. Los pacientes más graves son los que más medidas cumplían. En niños no hubo ningún caso de mortalidad. El subgrupo que cumple menos medidas tiene más días de ingreso, tanto en niños como en adultos.

BIBLIOGRAFÍA

Aguado JM, San-Juan R, Lalueza A, Sanz P, RodríguezÓtero J, Gómez-González C y col. 2011. High vancomycin MIC and complicated methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Emerg Infect Dis*; 17(6): 1099-102.

Aires de Sousa M, Sanches IR, Ferro ML, Vaz MJ, Saraiva Z, Tendeiro T y col. 1998. Intercontinental of a multidrug-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone. *J Clin Microbiol*. 36: 2590-2596.

Aires de Sousa M, De Lencastre H. 2004. Bridges from hospitals to the laboratory genetic portraits of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones. *FEMS Immunol Med Microbiol*; 40:101-111.

Aires de Sousa M, Conceição T, Simas C, De Lencastre H. 2005. Comparison of genetics backgrounds of methicillin resistant and susceptible *Staphylococcus aureus* isolates from portuguese hospitals and the community. *J Clin Microb*; 43: 5151-5157.

Akopyants NS, Fradkov A, Diatchenko L, Hill JE, Siebert PD, Lukyanov SA, y col. 1998. PCR-based subtractive hybridization and differences in gene content among strains of *Helicobacter pylori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:13108-13.

Adler A, Temper V, Block CS, Abramson N, and Moses AE. 1999. GenBank nº. AY508231-Panton-Valentine Leukocidin producing *Staphylococcus aureus* . *Clin Infect Dis*; 29:1128-32

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

Arciola CR, Visai L, Testoni F, Arciola S, Campoccia D, Speziale P. 2011. Concise Survey of *Staphylococcus aureus* Virulence Factors that Promote Adhesion and Damage to Peri-Implant Tissues. *Int J Artif Organs*; 34: 771-780.

Assicot M, Gendrel D, Carsin H, Raymond J, Guilbaud J, Bohoun C. 1993. High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection. *Lancet*; 341: 515-518

Bannerman TL, Peacock SJ. 2007. *Staphylococcus*, *Micrococcus* and other catalase positive cocci. En Murray PR, Baron EJ, Jorgesen JH, Landry MI, Pfaller MA (eds). Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology. Washington DC; 9: 390-411

Bates DW, Sands K, Miller E, Lanken PN, Hibberd PL, Graman PS. 1997. Predicting bacteremia in patients with sepsis syndrome. Academic military Center Consortium Sepsis Project working group. J Infect Dis; 176 (6): 1538-51

Batista N, Gutiérrez I, Lara M, Laich F, Méndez S. 2008. Evaluación del método de difusión en disco de 30 µg de cefoxitina en la detección de resistencia a meticilina en aislamientos seleccionados de *Staphylococcus aureus*. Rev Esp Quimioter; 21 (4): 213-216.

Berbari EF, Osmon DR, Duffy MC, Harmssen RN, Mandrekar JN, Hanssen AD. 2006. Outcome of prosthetic joint infection in patients with rheumatoid arthritis: the impact of medical and surgical therapy in 200 episodes. Clin Infect Dis; 42 (2): 216-23.

Berger-Bachi B. 1998. Role of fem factors in methicillin resistance. Drug Resist Updat; 1 (5): 325-335.

Biedenbach DJ, Moet GJ, Jones RN. 2004. Occurrence and antimicrobial resistance pattern comparisons among bloodstream infection isolates from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2002). Diagn Microbiol Infect Dis; 50: 59-69

Blair JE, Williams REO. 1961. Phage typing of staphylococci. Bull. W. H. O; 24: 771-784.

Blot SI, Depuydt P, Annemans L, Benoit d, Hoste E, De Waele JJ. 2005. Clinical and economic outcomes in critically ill patients with nosocomial catheter-related bloodstream infections. Clin Infect Dis; 41 (11) : 1591-98.

Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA. 1992. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. Chest; 101 (6): 1644-55.

Bradley SF. 1999. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: long-term care concerns. Am J Med; 106, 2S-10S; discussion 48S-52S.

Brandt CM, Sistrunk WW, Duffy MC, Hanssen AD, Steckelberg JM, Ilstrup DM, 1997. *Staphylococcus aureus* prosthetic joint infection treated with debridement and prosthesis retention. Clin Infect Dis; 24(5):914-9.

Brun-Buisson C, Doyon F, Carlet J. 1996. Bacteremia and severe sepsis in adults: a multicenter prospective survey in ICUs and wards of 24 hospitals. French Bacteremia-Sepsis Study Group. Am J Respir Crit Care Med; 154(3):617-24.

Cameron DR, Howden BP, Peleg AY, 2011. The Interface between Antibiotic Resistance and Virulence in *Staphylococcus aureus* and its Impact upon Clinical Outcomes. Clin Infect Dis; 53, 576-582.

Carnicer-Pont D, Bailey KA, Mason BW, Walker AM, Evans MR, Salmon RL. 2006. Risk factors for hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia: a case-control study. Epidemiol Infect; 134: 1167-73

Casewell MW, Hill RL. 1986. The carrier state: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother; 18 Suppl A: 1-12.

Ceccarelli G, d'Ettorre G, Vullo V. 2011. Purulent Meningitis as an Unusual Presentation of *Staphylococcus aureus* Endocarditis: A Case Report and Literature Review. Case Report Med; 735265.

Centers for Disease Control and Prevention. 2002. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) system report. Am J Infect Control; 30: 458-475

Cercenado E, Cuevas O, Marín M, Bouza E, Trincado P, Boquete T y col. 2008. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Madrid, Spain: transcontinental importation and polyclonal emergence of Pantón-Valentine leukocidin-positive isolates. Diagn Microbiol Infect Dis; 61: 143-149.

Cercenado E, Ruiz de Gopegui E. 2008a. *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina de origen comunitario. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 26 (S13): 19-24.

Cisneros-Herreros JM, Cobo-Reinoso J, Pujol-Rojo M, Rodriguez-Baño J, Salavert-Lletí M. 2007. Guía para el diagnóstico y tratamiento del paciente con bacteriemia. Guías de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 25 (2): 111-30.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2013. Performance Standards for antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty third informational supplement. (CLSI document M100-S23)

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

Cookson BD, Robinson DA, Monk AB, Murchan S, Deplano A, De Ryck R y col. 2007. Evaluation of molecular typing methods in characterizing a European collection of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains: the HARMONY collection. *Clin Microbiol*; 45(6):1830-7

Correa L, Pittet D. 2000. Problems and solutions in hospital-acquired bacteremia. *J Hosp Infect*; 46(2):89-95.

Cosgrove S, Sakoulas G, Perencevich EN, Schwaber MJ, Karchmer AW, Carmeli Y. 2003. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta analysis. *Clin Infect Dis*; 36: 53-59.

Cueto M, Pascual A. 2009. Microbiología y patogenia de las infecciones. En Pahissa A, Soler H, Soto A, Matos L, Serrano E, Roig MA eds. Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. 1ªed. Barcelona (España): Marge Books edss; 2009: 15-29.

Cuevas O, Cercenado E, Bouza E, Castellares C, Trincado P, Cabrera R y col. 2007. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Spain: a multicentre prevalence study (2002). Clin Microbiol Infect; 13: 250-256.

Cuevas O, Cercenado E, Goyanes M.J, Vindel A, Trincado P, Boquete T y col. Grupo Español para el Estudio de Estafilococo, 2008. *Staphylococcus* spp. in Spain: Present Situation and Evolution of Antimicrobial Resistance (1986-2006). Enferm Infecc Microbiol Clin; 26: 269-277.

Chambers HF, Korzeniowski OM, Sande MA 1983. *Staphylococcus aureus* endocarditis: clinical manifestations in addicts and nonaddicts. Medicine (Baltimore); 62 (3): 170-7.

Chambers HF. 1997. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. Clin Microbiol Rev 10; (4): 781-791.

Chamis AL, Peterson GE, Cabell CH, Corey GR, Sorrentino RA, Greenfield RA. 2001. *Staphylococcus aureus* bacteremia in patients with permanent pacemakers or implantable cardioverter-defibrillators. Circulation; 104 (9): 1029-33.

Chang FY, MacDonald BB, Peacock JE J, Musher DM, Triplett P, Mylotte JM. 2003. A prospective multicenter study of *Staphylococcus aureus* bacteremia: incidence of endocarditis, risk factors for mortality and clinical impact of methicillin resistance. Medicine (Baltimore); 82(5):322-332.

Chang FY, Peacock JE, Jr., Musher DM, Triplett P, MacDonald BB, Mylotte JM. 2003a. *Staphylococcus aureus* bacteremia: recurrence and the impact of antibiotic treatment in a prospective multicenter study. Medicine (Baltimore); 82(5):333-9.

Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie CR. 1987. A new method of classifying prognosis comorbidity in longitudinal studies: development and validation. J Chron Dis; 40: 373-83.

Chaves F, García Martínez J, de Miguel S, Sanz F, Otero JR. 2005. Epidemiology and clonality of methicillin-resistant and methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* causing bacteremia in a tertiary care hospital in Spain. *Infect Control Hosp Epidemiol*; 26: 150-6.

Cheng M, Antignac A, Kim C, Tomas A. 2008. A comparative study of the susceptibilities of major epidemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to oxacillin and to the new broad-spectrum cephalosporin ceftobiprole. *Antimicrob Agents Chemother*; 52: 2709-17.

Chiesa C, Panero A, Rossi N, Stegano M, de Guisti M, Osborn JF y col. 1998. Reliability of procalcitonin concentrations for the diagnosis of sepsis in critically ill neonates. *Clin Infect Dis*; 26: 664-672.

Chung M, De Lencastre H, Matthews P, Tomasz A, Adamson I, Aires de Sousa M, y col. 2000. Multilaboratory project Collaborators. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis: comparison of results obtained in a multilaboratory effort using identical protocols and MRSA strains. *Microb Drug Resist*. 6: 189-98.

Danner RL, Hartman BJ. 1987 Update on spinal epidural abscess: 35 cases and review of the literature. *Rev Infect Dis*; 9 (2): 265-74.

De Lencastre H, Severina EP, Milch H, Thege MK, Tomasz A. 1997. Wide geographic distribution of an unique methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone in Hungarian hospitals. *Clin Microbiol Infect*; 3: 289-96.

Del Río A, Gasch O, Moreno A, Pena C, Cuquet J, Soy D y col. 2014. Efficacy and safety of fosfomicin plus imipenem as rescue therapy for complicated bacteremia and endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A multicenter clinical trial. *Clin Infect Dis*; 59 (8): 1105-12.

De Saxe, MJ, and C M Notley. 1979. Experiences with typing of coagulase-negative staphylococci and micrococci. *In* G. Pulverer, P. B. Hecko, and G. Peters (ed.). *Phage typing of coagulase-negative staphylococci*; (1): 46-59.

Decker CF, Tuazon CU. 1994. *Staphylococcus aureus* pericarditis in HIV-infected patients. Chest; 105-115

Deresinski S, 2005. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: An Evolutionary, Epidemiologic, and Therapeutic Odyssey. Clin. Infect. Dis. 40, 562-573.

Deuremberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich AW, Bruggeman CA, Stobberingh EE. 2007. Clin Microbiol Infect; 13:222-235.

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

Domínguez MA, De Lencastre H, Liñares J, Tomasz A. 1994. Spread and maintenance of a dominant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone during an outbreak of MRSA disease in Spanish hospital. J Clin Microbiol; 32: 2081-2087.

Domínguez-Luzón MA, Rodríguez-Baño J. 2006. Infecciones por estafilococos. In: Moreno S, editor. Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. E d . Médica Panamericana, Madrid; 253-262.

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

Dubost JJ, Fis I, Denis P, Lopitax R, Soubrier M, Ristori JM y col. 1993 Polyarticular septic arthritis. Medicine (Baltimore); 72 (5): 296-310.

Durack DT, Lukes AS, Bright DK. 1994. New criteria for diagnosis of infective endocarditis: utilization of specific echocardiographic findings. Duke Endocarditis Service. Am J Med; 96 (3): 200-9.

EARSS: European Antimicrobial Resistance Surveillance Network. Available at <http://ecdc.europa.eu/en/Pages/home.aspx>.

Edgeworth JD, Treacher DF, EyKyn SJ. 1999. A 25th year study of nosocomial bacteremia in an adult intensive care unit. *Crit Care Med*; 27: 1421-8.

Ehni WF, Reller LB. 1989. Short-course therapy for catheter-associated *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Arch Intern Med*; 149(3): 533-6.

El-Ahdab F, Benjamin DK, Jr., Wang A, Cabell CH, Chu VH, Stryjewski ME y col. 2005. Risk of endocarditis among patients with prosthetic valves and *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Am J Med*; 118 (3): 225-9.

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

EPINE (Estudio de prevalencia de las infecciones nosocomiales). Sociedad Española de Medicina Preventiva, Salud Pública e Higiene. Disponible en <http://hws.vhebron.net/epine/>

Espersen F, Frimodt-Moller N, Thamdrup Rosdahl V, Skinhoj P, Bentzon MW. 1991. Changing pattern of bone and joint infections due to *Staphylococcus aureus*: study of cases of bacteremia in Denmark, 1959-1988. *Rev Infect Dis*; 13 (3): 347-58.

Faria NA, Carrico JA, Oliveira DC, Ramirez M, De Lencastre H. 2008. Analysis of typing methods for epidemiological surveillance of both methicillin-resistant and methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol*; 46: 136-144.

Fatkenheuer G, Preuss M, Salzberger B, Schmeisser N, Cornely OA, Wisplinghoff H y col. 2004. Long-term outcome and quality of care of patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 23 (3): 157-62.

Fernández-Guerrero ML, De Górgolas M. 2006. Comparative activity of cloxacilin and vancomycin against methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* experimental endocarditis. J Antimicrob Chemother; 58 (5): 1066-9.

Fernández F, López L, Pascual A. 2013. Técnicas de tipificación molecular para la vigilancia y control de la infección. Enferm Infecc Microbiol Clin; 31 (Supl 1): 20-25.

Fichtenbaum CJ, Dunagan WC, Powderly WG. 1995. Bacteremia in hospitalized patients infected with human immunodeficiency virus: a case control study of risk factors and outcome. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol; 8 (1): 51-7

Figueiredo AMS, Ha E, Kreiwirth BN, De Lencastre H, Noel GH, Senterfit L y col. 1991. In vivo stability of heterogeneous expression classes in clinical isolates of methicillin-resistant staphylococci. J Infect Dis; 164: 883-887.

Figueiredo LT, Ruiz-Junior E, Schirmbeck T. 2001. Infective endocarditis (IE) first diagnosed at autopsy: analysis of 31 cases in Ribeirao Preto, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo; 43 (4): 213-6.

Finkelstein R, Dobel JD, Nagler A, Merzbach D. 1984. *Staphylococcus aureus* bacteremia and endocarditis: comparison of nosocomial and community-acquired infection. J Med; 15: 193.

Fiori B, D'Inzeo T, Di Florio V, De Maio F, De Angelis G, Giaquinto A y col. 2014. Performance of two resin-containing blood culture media in the detection of blood stream infections and in direct matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) Broth assays for isolate identification clinical comparison of the BacT/Alert Plus and Bactec Plus systems. J Clin Microbiol; 52 (10): 3558-67.

Fitzgerald JR, Sturdevant DE, Mackie SM, Gill SR, Musser JM. 2001. Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus*: insights into the origin of methicillin-resistant strains and the toxic shock syndrome epidemic. Proc Natl Acad Sci; 98 (15): 8821-8826.

Flayhart D, Borek AP, Wakefield T, Dick J, Carroll KC. 2007. Comparison of BACTEC PLUS blood culture media to BacT/ALERT FA blood culture media for detection of bacterial pathogens in samples containing therapeutic levels of antibiotics. *J Clin Microbiol*; 45 (3): 816-21.

Forrest GN, Mankes K, Jabra-Rizk MA, Weekes E, Johnson JK, Lincalis DP y col. 2006. *Peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization-based identification of Candida albicans and its impact on mortality and antifungal therapy costs*. *J Clin Microbiol*; 44 (9): 3381-3.

Fowler VG, Jr., Justice A, Moore C, Benjamin DK, Jr., Woods CW, Campbell S y col. 2005. Risk factors for hematogenous complications of intravascular catheter-associated *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Infect Dis*; 40 (5): 695-703.

Fowler VG, Jr., Kong LK, Corey GR, Gottlieb GS, McClelland RS, Sexton DJ y col. 1999. Recurrent *Staphylococcus aureus* bacteremia: pulsed-field gel electrophoresis findings in 29 patients. *J Infect Dis*; 179 (5): 1157-61.

Fowler VG, Jr., Olsen MK, Corey GR, Woods CW, Cabell CH, Reller LB y col. 2003. Clinical identifiers of complicated *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Arch Intern Med*; 163 (17): 2066-72.

Fowler VG, Jr., Shah M, Gesty-Palmer D, Marr KA, McClelland RS y col. 2000. Prospective analysis of *Staphylococcus aureus* bacteremia in nonneutropenic adults with malignancy. *J Clin Oncol* ;18 (5): 1110-5.

Fowler VG, Jr., Boucher HW, Corey GR, Abrutyn E, Karchmer AW, Rupp ME y col. 2006. Daptomycin versus standard therapy for bacteremia and endocarditis caused by *Staphylococcus aureus*. *New Eng J Med*; 355 (7): 653-65.

Friedman ND, Kayek S, Stout JE, Mac Garry SA, Trivette SL, Briggs P. 2002. Health-care associated bloodstream infections in adult: A reason to change the accepted definition of community-acquired infections. *Ann Inter. Med.*; 137:791-7.

García de Guadiana L, Esteban P, Jiménez R, Hernando A, Ortín A, Rebollo S, Albaladejo MD. 2014. Diagnostic accuracy of presepsin (soluble CD14 subtype) for prediction of bacteremia in patients with systemic inflammatory response syndrome in the Emergency Department. *Clin Biochemist*; 47: 505-508.

García-Garrote F, Cercenado E, Marín M, Bal M, Trincado P, Corredoira J y col. 2014. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the *mecC* gene: emergence in Spain and report of a fatal case of bacteraemia. *J Antimicrob Chemother*; 69 (1): 45-50.

García-Vázquez E, Gómez J, Baños R, Canteras M, Ruiz J, Baños V y col. 2007. Estudio comparativo de pacientes con bacteriemia por *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina frente a *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina: epidemiología y factores pronósticos. *Med Clin (Barc)*; 128 (18): 681-6.

Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. 1998. CDC definitions for nosocomial infections. *Am J Infect Control*; 16: 128-40.

Geha DJ, Uhl JR, Gustaferrero CA, Persing DH. 1994. Multiplex PCR for identification of methicillin-resistant staphylococci in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol*; 32 (7): 1768-72.

Gemmell CG, Edwards DI, Fraise AP, Gould FK, Ridgway GL, Warren RE, y col. 2006. Guidelines for the prophylaxis and treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection in the UK. *J Antimicrob Chemother*; 57 (4): 589-608.

Genestier AL, Michallet MC, Prevost G, Bellot G, Chalabreysse L, Peyrol S y col. 2005. *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine Leukocidin Directly Targets Mitochondria and Induces Bax-Independent Apoptosis of Human Neutrophils. *J Clin Invest*; 115: 3117-3127.

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

Ghanem GA, Boktour M, Warneke C, Pham-Williams T, Kassis C, Bahna P y col. 2007. Catheter-related *Staphylococcus aureus* bacteremia in cancer patients: high rate of complications with therapeutic implications. *Medicine (Baltimore)*; 86 (1): 54-60.

Giacometti A, Cirioni O, Schimizzi AM, Del Prete MS, Barchiesi F, D'Errico MM y col. 2000. Epidemiology and microbiology of surgical wound infections. *J Clin Microbiol*; 38 (2): 918-22.

Giesbrecht P, Kersten T, Maidhof H, Wecke J. 1998. Staphylococcal cell wall: morphogenesis and fatal variations in the presence of penicillin. *Microbiol Mol Biol Rev*; 62 (4): 1371-1414.

Goering RV, McDougal LK, Fosheim GE, Bonnstetter KK, Wolter DJ, y col. 2007. Epidemiologic distribution of the arginine catabolic mobile element among selected methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates. *J Clin Microbiol*; 45 (6): 1981-1984.

Goering RV, Winters MA. 1992. Rapid method for epidemiological evaluation of gram-positive cocci by field inversion gel electrophoresis. *J Clin Microbiol*; 30: 577-580.

Gómez J y Gobernado M. 2013. Enfoque clínico de los grandes síndromes infecciosos. 5ª Ed. Ergon.

Gonzalez-Barca E, Carratala J, Mykietiuik A, Fernandez-Sevilla A, Gudiol F. 2001. Predisposing factors and outcome of *Staphylococcus aureus* bacteremia in neutropenic patients with cancer. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 20 (2): 117-9.

Gordon RJ, Lowy F.D. 2008. Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. *Clin Infect Dis*; 46: Suppl 5, S350-9.

Grundmann H, Aires de Sousa M, Boyce J, Tiemersma E. 2006. Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as public-health threat. *Lancet*; 368: 874-885.

Gudiol F, Aguado JM, Almirante B, Bouza E, Cercenado E, Domínguez MA y col. 2015. Diagnosis and treatment of bacteremia and endocarditis due to *Staphylococcus aureus*. A clinical guideline from the Spanish Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (SEIMC). *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2015.03.015>

Gunnarsson G, Friedman LS, Wanke C. 1994. Liver abscesses due to *Staphylococcus aureus* in a patient with AIDS who underwent small bowel biopsy: case report and review. *Clin Infect Dis*; 18: 802

Hall KK, Lyman JA. 2006. Updated review of blood culture contamination. *Clin Microbiol Rev*; 19 (4): 788-802

Hamen DH, Darmstadt GL, Carlin JB, Zaidi AK, Yeboah-Antwi K, Saha SK y col. 2015. Young infants clinical signs study group. Etiology of bacteremia in Young infants in six countries. *Pediatr Infect Dis J*; 34 (1-8).

Han JH, Mascitti KB, Edelstein PH, Bilker WB, Lautenbach E. 2012. Effect of reduced vancomycin susceptibility on clinical and economic outcomes in *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Antimicrob Agent Chemother*; 56 (10): 5164-70.

Harmsen D, Claus H, Witte W, Rothgänger J, Claus H. 2003. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for *spa* repeat determination and database management. *J Clin Microbiol*; 41 (12): 5442-5448.

Harstein AI, Mulligan ME, Morthland VH, Kwok RY. 1992. Recurrent *Staphylococcus aureus* bacteremia. *J Clin Microbiol*; 30 (3): 670-4.

Hauck CR., Ohlsen K. 2006. Sticky connections: extracellular matrix protein recognition and integrin-mediated cellular invasion by *Staphylococcus aureus*. *Curr Opin Microbiol*; 9 (1): 5-11.

Hecht SR, Berger M. 1992. Right-sided endocarditis in intravenous drug users. Prognostic features in 102 episodes. *Ann Intern Med*; 117 (7): 560-6.

Henegariu O, Heerema N, Dlouhy, Vance GH, Vogt PH. 1997. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques*; 23: 504-511.

Hill PC, Birch M, Chambers S, Drinkovic D, Ellis-Pegler RB, Everts R. 2001. Prospective study of 424 cases of *Staphylococcus aureus* bacteremia: determination of factors affecting incidence and mortality. *Intern Med J*; 31: 97-103

Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, Kawasaki S, Hosoda Y, Hori S y col. 1997. Dissemination in Japanese Hospitals of Strains of *Staphylococcus aureus* Heterogeneously Resistant to Vancomycin. *Lancet*; 350: 1670-1673.

Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, Ito T. 2001. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends in Microbiology*; 9: 486-493.

Hoban DJ, Biedenbach DJ, Mutnick AH, Jones RN. 2003. Pathogen of occurrence and susceptibility patterns associated with pneumonia in hospitalized patients in North America: results of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Study (2000). *Diagn Microbiol Infect Dis*; 45 (4): 279-85.

Hoan B, Paul-Dauphin A, Hestin D, Kessler M. 1998. EPIBACDIAL: a multicenter prospective study of risk factors for bacteremia in chronic hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol*; 9 (5): 869-76.

Holmes NE, Turnidge JD, Munckhof WJ, Robinson JO, Korman TM, O'Sullivan MV y col. Antibiotic choice may not explain poorer outcomes in patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia and high vancomycin minimum inhibitory concentrations. 2011. *J Infect Dis*; 204 (3): 340-7.

Horvath LL, George J, Murray CK, Harrison LS; Hospenthal DR. 2004. Direct comparison of the BACTEC 9240 and BacT/ALERT 3D automated blood culture systems for candida growth detection. *J Clin Microbiol*; 42 (1): 115-8.

Ibrahim EH, Sherman G, Ward S, Fraser VJ, Kollef MH. The influence of inadequate antimicrobial treatment of bloodstream infections on patient outcomes in the ICU setting. *Chest* 2000; 118 (1): 146-55.

Ito T, Katayama Y, Hiramatsu K. 1999. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrob Agents Chemother*; 43:1449-1458.

Ito T, Katayama Y, Asada K, Mori N, Tsutsumimoto K, Tiensasitorn C y col. 2001. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*; 45 (5):1323-1336.

Iverson AR, Boyd KL, McAuley JL, Plano LR, Hart ME, McCullers JA. 2011. Influenza Virus Primes Mice for Pneumonia from *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis*; 203: 880-888.

IWG-SCC (International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements). 2009. Classification of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*): guidelines for reporting novel SCC*mec* elements. *Antimicrob Agents Chemother*; 53 (12): 4961-4967.

Jacqueline C, Caillon J, le Mabecque V, Miegville AF, Ge Y, Biek D. 2009. In vivo activity of a novel anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* cephalosporin, ceftaroline, against vancomycin-susceptible and resistant *Enterococcus faecalis* strains in a rabbit endocarditis model: a comparative study with linezolid and vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother*; 53: 5300-2

Jean G, Charra B, Chazot C, Vanel T, Terrat JC, Hurot JM y col. 2002. Risk factor analysis for long-term tunneled dialysis catheter-related bacteremias. *Nephron*;91(3):399-405.

Jensen AG, Espersen F, Skinhoj P, Rosdahl VT, Frimodt-Moller N. 1993. *Staphylococcus aureus* meningitis. A review of 104 nationwide, consecutive cases. *Arch Intern Med*; 153 (16): 1902-8.

Jensen AG, Wachmann CH, Espersen F, Scheibel J, Skinhoj P, Frimodt-Moller N. 2002. Treatment and outcome of *Staphylococcus aureus* bacteremia: a prospective study of 278 cases. Arch Intern Med; 162 (1): 25-32.

Jensen AG, Wachmann CH, Poulsen KB, Espersen F, Scheibel J, Skinhoj P y col. 1999. Risk factors for hospital-acquired *Staphylococcus aureus* bacteremia. Arch Intern Med; (13): 1437-44.

Jevons MP. 1961. Celbenin resistant Staphylococci. Br Med J; 14; 1 (5219): 124–125.

Jimenez Quiceno N, Correa Ochoa MM. 2009. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina: bases moleculares de la Resistencia, epidemiología y tipificación. Iatreia; 22: 147-158.

Julander I. 1985. Unfavourable prognostic factors in *Staphylococcus aureus* septicemia and endocarditis. Scand J Infect Dis; 17 (2): 179-87.

Kaatz GW, Lundstrom TS, Seo SM. 2006. Mechanisms of daptomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. Int J Antimicrob Agents; 28 (4): 280-287.

Kaech C, Elzi L, Sendi P, Frei R, Laifer G, Bassetti S y col. 2006. Course and Outcome of *Staphylococcus aureus* Bacteraemia: A Retrospective Analysis of 308 Episodes in a Swiss Tertiary-Care Centre. Clin Microbiol Infect; 12: 345-352.

Kaneko J, Kamio Y. 2004. Bacterial two-component and hetero-heptameric pore-forming cytolytic toxins: structures, pore-forming mechanism, and organization of the genes. Biosci Biotechnol Biochem; 68 (5): 981-1003.

Kaplan MH, Tenenbaum MJ. 1982. *Staphylococcus aureus*: cellular biology and clinical application. Am J Med: 72-248

Kassis C, Rangaraj G, Jiang Y, Hachem RY, Raad I. 2009. Differentiating culture samples representing coagulase-negative staphylococcal bacteremia from those representing contamination by use of time-to-positivity and quantitative blood culture methods. *J Clin Microbiol*; 47 (10): 3255-60.

Kehrenberg C, Cuny C, Strommenger B, Schwarz S, Witte W. 2009. Methicillin-resistant and susceptible *Staphylococcus aureus* of clonal lineales ST 398 y ST9 from Swine carry the multidrug resistance gene *cfr*. *Antimicrob Agents Chemoth*; 53: 779-781.

Kessler M, Hoen B, Mayeux D, Hestin D, Fontenaille C. 1993. Bacteremia in patients on chronic hemodialysis. A multicenter prospective survey. *Nephron*; 64 (1): 95-100.

Khan SA and Novick RP. 1980. Terminal nucleotide sequences of Tn551, a transposon specific erythromycin resistance in *Staphylococcus aureus*: homology with Tn3. *Plasmid*; 4: 148-154.

Kilgore M, Brossette S. 2008. Cost of bloodstream infections. *Am J Infect Control*; 36 (10): S172-173.

Klevens RM, Morrison MA, Fridkin S.K, Reingold A, Petit S, Gershman K y col. 2006. Active Bacterial Core Surveillance of the Emerging Infections Program Network. Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Healthcare Risk Factors. *Emerg Infect Dis*; 12: 1991-1993.

Kloos WE, Bannerman TL. 1995. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: Murray PR, Baron EJ y col. eds. *Manual of Clinical Microbiology* . 6th ed. Washington, DC: ASM Press; 282-298.

Kloos WE, Schelifer KH, Goetz F. 1992. The genus *Staphylococcus*. In: Balows A, Trüper HG y col. eds. *The Prokaryotes*. 2nd edition. New York: Springer-Verlag; 1369-1420

Kluytmans J, Van Belkum A, Verbrugh H. 1997. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanism, and associated risks. *Clin Microbiol Rev*; 10 (3): 505-520.

Korzeniowski O, Sande MA. 1982. Combination antimicrobial therapy for *Staphylococcus aureus* endocarditis in patients addicted to parenteral drugs and in nonaddicts: A prospective study. *Ann Intern Med*; 97 (4): 496-503.

Kreienbuehl L, Charbonney E, Eggimann P. 2011. Community-acquired necrotizing pneumonia due to methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* secreting Pantón-Valentine leukocidin: a review of case reports. *Ann Intensive Care*; 1 (1): 52.

Kriesel K, Boyd K, Langenberg P, Roghmann MC. 2006. Risk factors for recurrence in patients with *Staphylococcus aureus* infections complicated by bacteremia. *Diagn Microbiol Infect Dis*; 55 (3): 179-84.

Ladhani S, Joannou CL, Lochrie DP, Evans RW, Poston SM. 1999. Clinical, microbial, and biochemical aspects of the exfoliative toxins causing staphylococcal scalded-skin syndrome. *Clin Microbiol Rev*; 12 (2): 224-242.

Lan R, Reeves PR. 2000. Intraspecies variation in bacterial genomes: the need for a species genome concept. *Trends Microbiol*; 8 (9): 396-401.

Laupland KB, Church DL, Mucenski M, Sutherland LR, Davies HD. 2003. Population-based study of the epidemiology of and the risk factors for invasive *Staphylococcus aureus* infections. *J Infect Dis*; 187 (9): 1452-1459

Lautenschlager S, Herzog C, Zimmerli W. 1993. Course and outcome of bacteremia due to *Staphylococcus aureus*: evaluation of different clinical case definitions. *Clin Infect Dis*; 16: 567.

León C, García-Castrillo L, Moya MS, Artigas A, Borges M, Candel FJ y col. 2007. Documento de consenso (SEMES-SEMICYUC). Recomendaciones del manejo diagnóstico terapéutico inicial y multidisciplinario de la sepsis grave en los servicios de urgencias hospitalarios. *Emerg*; 19: 260-272.

Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, y col. 2003. SCCM / ESICM / ACCP / ATS / SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med*; 31 (4): 1250-6

Lina G, Bohach G, Nair S, Hiramatsu K, Jouvin-Marche E, y col. 2004. Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. *J Infect Dis*; 189: 2334-2336.

Lindsay JA, Holden MT. 2006. Understanding the rise of the superbug: investigation of the evolution and genomic variation of *Staphylococcus aureus*. *Funct Integr Genomics*; 6: 186-201.

Lizarralde E, Gutierrez A, Martinez P, Franco R, García N, Miguel F. 2004. Bacteriemia adquirida em La comunidad: elaboración de um modelo de predicción clínica em pacientes ingresados em um servicio de medicina interna. *Med Clin (Barc)*; 123 (7): 241-6.

Lodise TP, Mc Kinnon PS, Swiderski L, Rybak MJ. 2003. Outcomes analysis of delayed antibiotic treatment for hospital-acquired *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Infect Dis*; 36: 1418-23.

Loncaric I, Küber Heiss A, Posautz A, Stalder L, Hoffmann D, Rosengarten R y col. 2013. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus* spp. Carrying the gene *mecC*, isolated from wildlife. *J Antimicrob Chemother*; 68: 2222-2225.

López Cortés LE, Del toro MD, Gálvez J, Bereciartua E, Fariñas, MC, Sanz M y col. 2013. Impact of an evidence-based bundle intervention in the quality of care management and outcome of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Inf Dis*; 57: 1225-1233.

Loza E, Planes A, Rodriguez-Creixems M. 2003. Procedimientos en microbiología clínica. Hemocultivos (3a). Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC); 1-20.

Lynch JP. 2001. 3rd. Hospital-acquired pneumonia: risk factors, microbiology, and treatment. *Chest*; 119 (2 Suppl): 373S-384S.

- Lyon BR**, May JW, Skurray RA. 1984. Tn4001: a gentamicin and kanamycin resistance transposon in *Staphylococcus aureus*. Mol Gen Genet; 193 (3): 554-556.
- Ma XX**, Ito T, Tiensasitorn C, Jamklang M, Chongtrakool P, Boyle-Vavra y col. 2002. Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. Antimicrob Agents Chemother; 46: 1147-1152.
- Mac Cabe W**, Jackson CG. 1962. Gram Negative Bacteriemia. Etiology and ecology. Arch Intern Med; 847-64.
- Malanoski GJ**, Samore MH, Pefanis A, Karchmer AW. 1995. *Staphylococcus aureus* catheter-associated bacteremia. Minimal effective therapy and unusual infectious complications associated with arterial sheath catheters. Arch Intern Med; 155 (11): 1161-66.
- Mancini N**, Carletti S, Ghidoli N, Cichero P, Burioni R, Clementi M. 2010. *The era of molecular and other non-culture-based methods in diagnosis of sepsis*. Clin Microbiol Rev; 23 (1): 235-51.
- Maradona JA**, Cartón JA, López-Alonso J y col. 1992. Comparative study of community versus hospital-acquired *Staphylococcus aureus* bacteremia. Eur J Med; 1:113
- Markowitz N**, Quinn EL, Saravolatz LD. 1992. Trimethoprim-sulfamethoxazole compared with vancomycin for the treatment of *Staphylococcus aureus* infection. Ann Intern Med; 117 (5): 390-8.
- Marr KA**, Sexton DJ, Conlon PJ, Corey GR, Schwab SJ, Kirkland KB. 1997. Catheter-related bacteremia and outcome of attempted catheter salvage in patients undergoing hemodialysis. Ann Intern Med; 127 (4): 275-80.
- Marra AR**, Edmond MB, Forbes BA, Wenzel RP, Bearman G. 2006. Time to blood culture positivity as a predictor of clinical outcome of *Staphylococcus aureus* bloodstream infection. J Clin Microbiol; 44 (4): 1342-46.

Mazmanian SK, Ton-That H, Schneewind O. 2001. Sortase-catalyzed anchoring of surface proteins to the cell wall *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol*; 40: 1049-1057

Mellmann A, Weniger T, Berssenbrugge C, Rothganger J, Sammeth M, Stoye J y col. 2007. Based upon repeat pattern (BURP): an algorithm to characterize the long-term evolution of *Staphylococcus aureus* populations based on Spa polymorphisms. *BMC Microbiol*; 7:98.

Milheiro C, Oliveira DC, De Lencastre H. 2007. Update to the Multiplex PCR Strategy for Assignment of *mec* Element Types in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother. Sep*; 51 (9): 3374–3377.

Milheiro C, Oliveira DC, De Lencastre H. 2007a. Multiplex PCR strategy for subtyping the staphylococcal cassette chromosome *mec* type IV in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: 'SCC*mec* IV multiplex'. *J Antimicrob Chemother.*; 60 (1): 42-8.

Millán AB, Domínguez MA, Borraz C, González MP, Almirante B, Cercenado E y col.; GEIH/GEMARA/REIPI. 2010. Bacteriemias de presentación comunitaria y nosocomial por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en hospitales españoles. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 28: 336-341.

Minnaganti VR, Cunha BA. 2001. Infections associated with uremia and dialysis. *Infect Dis Clin North Am*; 15 (2): 385-406.

Miro JM, Entenza JM, Del Río A, Velasco M, Castaneda X, García de la María C y col. 2012. High-dose daptomycin plus fosfomicin is safe and effective in treating methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* endocarditis. *Antimicrob Agent Chemother*; 56 (8): 4511-5.

Mitani N, Koizumi A, Sano R, Masutani T, Murakawa K. 2005. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by PCR-RFLP and its usefulness in an epidemiological study of an outbreak. *Japa Journan Infect Disease*; 58 (4): 250-2

Mitchell DH, Howden BP. 2005. Diagnosis and management of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Inter Med J*; 35 :S17-24.

- Mlynczyk A**, Mlynczyk G, Jeliaszewicz J. 1998. The genome of *Staphylococcus aureus*: a review. Zentralbl Bacteriol; 287 (4): 277-314
- Molina JM**, Córdoba J, Ramírez P, Gobernado M. 2008. Detección automática de bacterias y hongos en sangre. Enferm Infecc Microbiol Clin; 26 Suppl 9:75-80.
- Moore PCL**, Lindsay JA. 2002. Molecular characterization of the dominant UK methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains, EMRSA-15 and EMRSA-16. J Med Microbiol; 51: 516-21.
- Moreillon P**, Que YA. 2004. Infective endocarditis. Lancet; 363 (9403): 139-49.
- Muñoz P**, Simarro N, Rivera M, Alonso R, Alcalá L, Bouza E. 2004. Evaluation of procalcitonin as a marker of infection in a nonselected sample of febrile hospitalized patients. Diagn Microbiol Infect Dis; 49 (4): 237-41.
- Murchan S**, Kaufmann ME, Deplano A, De Ryck R, Struelens M, y col. 2003. Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its applications for tracing the spread of related strains. J Clin Microbiol; 41 (4): 1574-1585
- Murphy EL**, Huwyler L, Bastos MC. 1985. Trasposon Tn554: Complete nucleotide sequence and isolation of transposition-defective and antibiotic-sensitive mutants. EMBO J; 4: 3357-3365.
- Murray PR**, Roshetal KS, Pfaller MA, 2005. *Staphylococcus* y organismos relacionados. En Microbiología Médica. Elsevier-Mosby, Madrid; 5: 221-36.
- Mylotte JM**, McDermott C, Spooner JA. 1987. Prospective study of 114 consecutive episodes of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Rev Infect Dis; 9 (5): 891-907.

Nadji G, Remadi JP, Coviaux F, Mirode AA, Brahim A, Enriquez-Sarano M y col. 2005. Comparison of clinical and morphological characteristics of *Staphylococcus aureus* endocarditis with endocarditis caused by other pathogens. *Heart*; 91 (7): 932-7.

Naimi TS, Le Dell K, Como-Sabetti K, Borchardt S, Boxrud D. 2003. Comparison of community- and health care-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infection. *JAMA*; 290 (22): 2976-84.

Ogston A. 1883. *Micrococcus* poisoning. *J Anat Physiol (London)*; 17: 24-58.

Oliveira DC, and De Lencastre H. 2002. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*; 46: 2155-2161.

Oliveira DC, Tomasz A, De Lencastre H. 2001. The evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: identification of two ancestral genetic backgrounds and the associated *mec* elements. *Microb Drug Resist*; 7: 349-361.

O'Neill E, Pozzi C, Houston P, Humphreys H, Robinson DA. 2008. A novel *Staphylococcus aureus* biofilm phenoty pemediated by the fibronectin-binding proteins FnBPA and FnBPB. *J Bacteriol*; 90: 3835-3850.

Paterson DL, Ko WC, Von-Gottberg M, Mohapatra S, Casellas JM, Goossens H y col. 2004. International prospective study of *Klebsiella pneumoniae* Bacteriemia: Implications of extended-spectrum-lactamase production in nosocomial infections. *Ann Inter Med*; 140: 26-32.

Paul M, Andreassen S, Nielsen AD, Taconelli E, Almanasreh N, Fraser A. 2006. Prediction of bacteremia using TREAT, a computerized decision-support system. *Clin Infect Dis*; 42 (9): 1274-82.

Paul M, Zemer-Wassercug N, Talker O, Lishtzinsky Y, Lev B, Samra Z y col. 2011. Are all beta-lactams similarly effective in the treatment of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* bacteremia?. Clin Microbiol and Infect Dis; 17 (10): 1581-6.

Pea F, Viale P. 2009. Is the minimum inhibitory concentration of vancomycin an infallible predictor of the clinical outcome of *Staphylococcus aureus* bacteremia treated with vancomycin?. Clin Infect Dis; 49: 642-3.

Peacock SJ, Moore CE, Justice A, Kantzanou M, Story L, Mackie K y col. 2002. Virulent combinations of adhesion and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. Infect Immun; 70: 4987-96.

Pearman JW, Coombs GW, Grubb WB, O'Brien F. 2001. A British epidemic strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (UK EMRSA-15) has become established in Australia. Med J Aust; 174: 662.

Pérez-Roth E, Lorenzo-Díaz F, Batista N, Moreno A, Méndez-Álvarez S. 2004. Tracking methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones during a five year period (1998-2002) in a Spanish Hospital. J Clin Microbiol; 42: 4649-4656.

Piechowicz L, Garbacz K, Galinski J. 2008. *Staphylococcal aureus* of phage type 187 isolated from people occurred to be a genes carrier of enterotoxin C and toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1). Int J Hyg Environ Health; 211 (3-4): 273-282.

Pigrau C, Rodriguez D, Planes AM, Almirante B, Larrosa N, Ribera E y col. 2003. Management of catheter related *Staphylococcus aureus* bacteremia: when may sonographic study be unnecessary? Eur J Clin Microbiol Infect Dis; 22: 173-19.

Pintado V, Meseguer MA, Fortun J, Cobo J, Navas E, Quereda C y col. 2002. Clinical study of 44 cases of *Staphylococcus aureus* meningitis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis; 21 (12): 864-8.

Prats G. 2005. Protocolos técnicos. Microbiología Clínica. Panamericana, Buenos Aires, Argentina; 334-335.

Price LB, Stegger M, Hasman H, Aziz M, Larsen J, Andersen PS y col. 2012. *Staphylococcus aureus* CC398: Host Adaptation and Emergence of Methicillin Resistance in Livestock. mBio; 3:e00305-11.

“Protocolos consensuados de tratamiento antibiótico 2013” del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca. Quinta edición. Comisión de Infecciones y Política de antibióticos.

Pujol M, Hornero A, Saballs M, Argerich MJ, Verdaguer R, Císnal M. 2007. Clinical epidemiology and outcomes of peripheral venous catheter-related bloodstream infections at a university-affiliated hospital. J Hosp Infect; 67:22-29.

Quagliarello B, Cespedes C, Miller M. 2002. Strains of *Staphylococcus aureus* obtained from drug used networks are closely linked. Clin Infect Dis; 35:671.

Raad II, Narro J, Khan A, Tarrand J, Vartivarian S, Bodey GP. 1992. Serious complications of vascular catheter-related *Staphylococcus aureus* bacteremia in cancer patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis; 11 (8): 675-82.

Raad II, Sabbagh MF. 1992a. Optimal duration of therapy for catheter-related *Staphylococcus aureus* bacteremia: a study of 55 cases and review. Clin Infect Dis; 14 (1): 75-82.

Reimer LG, Wilson ML, Weinstein MP. 1997. Update on detection of bacteremia and fungemia. Clin Microbiol Rev; 10 (3): 444-65.

Richardson JC, Reith S. 1993. Characterization of a strain of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (EMRSA-15) by conventional and molecular methods. J Hosp Infect; 25: 45-52

Ringberg H, Thoren A, Lilja B. 2000. Metastatic complications of *Staphylococcus aureus* septicemia. To seek is to find. Infection; 28 (3): 132-6.

Riu M, Terradas R, Sala M, Comas M, Knobel H, Grau S y col. 2012. Costs associated with nosocomial bacteriemias in a University Hospital. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 30: 137-42.

Rodríguez-Baño J, Millan AB, Dominguez MA, Almirante B, Cercenado E, Padilla B y col. 2006. GEIH/GEMARA/REIPI. Control of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Spanish Hospitals. A Survey from the MRSA 2003 GEIH/GEMARA/REIPI Project. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 24: 149-156.

Rodríguez-Baño J, Pascual A, Gálvez J, Muniain MA, Ríos MI, Martínez-Martínez L. 2003. Bacteriemias por *Acinetobacter baumannii*: características clínicas y pronósticas. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 21: 242-7.

Rodríguez-Baño J, De Cueto M, Retamar P. 2010. Current management of bloodstream infections. *Expert Rev Anti Infect Ther*; 8: 815-29.

Rodríguez-Creixems M, Alcalá L, Muñoz P, Cercenado E, Vicente T, Bouza E. 2008. Bloodstream infections: evolution and trends in the microbiology workload, incidence, and etiology, 1985-2006. *Medicine (Baltimore)*; 87 (4): 234-49.

Rodríguez-Luzon MA, Rodríguez Baño, J. Infecciones por estafilococos. 2005. En Ausina Ruiz V, Moreno Guillen S (ed). *Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. Panamericana, Madrid, 253-82.

Rouch DA, Messerotti LJ, Loo LS, Jackson CA, Skurray RA. 1989. Trimethoprim resistance transposon Tn4003 from *Staphylococcus aureus* encodes genes for a dihydrofolate reductase and thymidylate synthetase flanked by three copies of IS257. *Mol. Microbiol*; 3 (2): 161-75.

Rowland SJ, Dyke KHG. 1989. Characterization of the staphylococcal beta-lactamase transposon Tn552. *EMBO J*; 8: 2761-2773.

Sa-Leao R, Santos Sanches I, Dias D, Peres I, Barros MR, De lencastre H. 1999. Detection of fan archaic clone of *Staphylococcus aureus* with low-level resistance to methicillin in a pediatric hospital in Portugal and in a international samples: relics of a formerly widely disseminated strain?. J Clin Microbiol; 37: 1913-1920.

Sakoulas G, Moise-Broder PA, Schettag J, Forrest A, Moellering RC Jr, Eliopoulos GM. 2004. Relationship of MIC and bactericidal activity to efficacy of vancomycin for treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. J Clin Microbiol; 42 (6): 2398-402.

Sanabria TJ, Alpert JS, Goldberg R, Pape LA, Cheeseman SH. 1990. Increasing frequency of staphylococcal infective endocarditis. Experience at a university hospital, 1981 through 1988. Arch Intern Med; 150 (6): 1305-9.

Sandre RM, Shafran SD. 1996. Infective endocarditis: review of 135 cases over 9 years. Clin Infect Dis 1996; 22 (2): 276-86.

Sanford MD, Widmer AF, Bale MJ, Jones RN, Wenzel RP. 1994. Efficient detection and long-term persistence of the carriage of methicillin-resistance *Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis. 19 (6): 1123-8.

Sethi S. 2002. Bacterial pneumonia. Managing a deadly complication of influenza in older adults with comorbid disease. Geriatrics; 57 (3): 56-61.

Shane AL, Hansen NI, Stoll BJ, Bell EF, Sanchez PJ, Shankaran S y col. 2012. The Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. Methicillin-Resistant and Susceptible *Staphylococcus aureus* Bacteremia and Meningitis in Preterm Infants. Pediatrics; 129, e914-e922.

Shaw KJ, Rather PN, Hare RS, Miller GH. 1993. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. Microbiol Rev; 57 (1): 138-163.

- Shivakumar AG**, Dubnau D. 1981. Characterization of a plasmid-specified ribosome methylase associated with macrolide resistance. *Nucleic Acids Res*; 9 (11): 2549-2562.
- Shopsin B**, Gómez M, Montgomery S, Smith D, Waddington M, Dodge D. 1999. Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol*; 37: 3556-3563.
- Shore A**, Deasy EC, Slikers P, Brennan G, O'Connell B, Monecke S y col. 2011. Detection of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* type XI carrying highly divergent *mecA*, *mecI*, *mec R1*, *blaZ*, and *ccr* Genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*; 55: 3765-3773.
- Shorr AF**, Tabak JP, Killian AD, Gupta V, Liu LZ, Kollef MH. 2006. Healthcare associated bloodstream infection: a distinct entity? Insights from a large U.S. database. *Crit care Med*; 34: 2588-95.
- Shurland S**, Zhan M, Bradhan DD, Roghmann CC. 2007. Comparison of mortality risk associated with bacteremia due to methocillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *Infect Control Hosp Epidemiol*; 28 (3): 273.
- Singh N**, Paterson DL, Chang FY, Gayowski T, Squier C, Wagener MM. 2000. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the other emerging resistant gram-positive coccus among liver transplant recipients. *Clin Infect Dis*; 30(2): 322-7.
- Sivakumar B** , Vijaysegaran P, Chaudhuri A, Crawford S, Ottley M. 2012. Daptomycin resistance in prosthetic joint infections. *Orthopedics*.; 35(4): 603-6.
- Small PM**, Chambers HF. 1990. Vancomycin for *Staphylococcus aureus* endocarditis in intravenous drug users. *Antimicrob Agents Chemother*; 34 (6): 1227-31.
- Soriano A**, Martínez JA, Mensa J, Marco F, Almela M, Moreno Martínez A. 2000. Pathogenic significance of methicillin resistance for patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Inf Dis*; 30: 368-73.

Soriano A, Marco F, Martínez JA, Pisos E, Almela M, Dimova VP y col. 2008. Influence of vancomycin minimum inhibitory concentration on the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. Clin Infect Dis; 46 (2):193-200.

Soriano A, Mensa J. 2011. Is transesophageal echocardiography dispensable in hospital-acquired *Staphylococcus aureus* bacteremia?. Clin Infect Dis; 53 (1): 10-12.

Speziale P, Pietrocola G, Rindi S, Provenzano M, Provenza G. 2009. Structural and functional role of *Staphylococcus aureus* surface components recognizing adhesive matrix molecules of the host. Future Microbiol.; 4 (10): 1337-1352.

Stegger M, Anderson P, Kearns A, Pichon B, Holmes MA, Edwards G y col. 2012. Rapid detection, differentiation and typing of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* harbouring either *mecA* or the new *mecA* homologue *mecA_{LGA 251}*. Clin Microbiol Infect; 18: 395-400.

Steinberg JP, Clark CC, Hackman BO. 1996. Nosocomial and community-acquired *Staphylococcus aureus* bacteremias from 1980 to 1993: impact of intravascular devices and methicillin resistance. Clin Infect Dis; 23 (2):255-9.

Stewart GT, Holt RJ. 1963. Resistance to the newer Penicillins. Br Med J; 16 (1): 5328-465.

Stocker M, Fontana M, Helou S, Wegscheider K, Berger TM. 2010. Effect of procalcitonin-guided decision making on duration of antibiotic therapy in suspected neonatal early onset sepsis: prospective randomized intervention trial. Neonatol; 97: 165-174.

Strommenger B, Kettlitz C, Werner G, Witte W. 2003. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol; 41 (9): 4089-94.

Swanstrom M, and Adams MH. 1951. Agar layer method for production of high titer phage stocks. Proc Soc Exp Biol Med; 78: 372-375.

- Sykes R**, 2010. The 2009 Garrod Lecture: The Evolution of Antimicrobial Resistance: A Darwinian Perspective. *J. Antimicrob. Chemother*; 65: 1842-1852.
- Tacconelli E**, Venkataraman I, De Girolami PC, Dagata EM. 2004. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia diagnosed at hospital admission: distinguishing between community-acquired versus healthcare-associated strains. *J Antimicrob Chemother*; 53: 474-9.
- Tagalakis V**, Kahn SR, Libman M, Blostein M. 2002. The epidemiology of peripheral vein infusion thrombophlebitis: a critical review. *Am J. Med*; 113: 146-151
- Tenover FC**, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH y col. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*; 33: 2233-2239.
- Thaden JT**, Ericson JE, Cross H, Bergin SP, Messina JA, Fowler VG Jr y col. 2015. Antibacterial Resistance Leadership Group. Survival benefit of empirical therapy for *Staphylococcus aureus* bloodstream infections in infants. *Pediatr Infect Dis J*; 31 (8).
- Thwaites G**, Auckland C, Barlow G, Cunningham R, Davies G, Edgeworth J, y col. Adjunctive rifampicin to reduce early mortality from *Staphylococcus aureus* bacteremia (ARREST): study protocol for a randomized controlled trial. 2012. *Trials*; 13:241.
- Torre-Cisneros J**, Herrero C, Canas E, Reguera JM, De la Mata M, Gómez-Bravo MA. 2002. High mortality related with *Staphylococcus aureus* bacteremia after liver transplantation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 21(5): 385-8.
- Torres C**, Cercenado, E. 2010. Lectura interpretada del antibiograma en gram positivos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 28 (8): 541-553
- Tsiodras S**, Gold HS, Sakoulas G, Eliopoulos GM, Wennersten C. 2001. Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *Lancet*; 358 (9277): 207-208.

Tuazon CU, Sheagren JN. 1974. Increased rate of carriage of *Staphylococcus aureus* among narcotic addicts. J Infect Dis; 129:725-30.

Vallés J, Leon C, Alvarez-Lerma F. 1997. Nosocomial bacteremia in critically ill patients: a multicenter study evaluating epidemiology and prognosis. Spanish Collaborative Group for Infections in Intensive Care Units of Sociedad Española de Medicina Intensiva y Unidades Coronarias (SEMIUC). Clin Infect Dis; 24 (3): 387-95.

Van Hal SJ, Mathur G, Kelly J, Aronis C, Cranney GB, Jones PD. 2005. The role of transthoracic echocardiography in excluding left sided infective endocarditis in *Staphylococcus aureus* bacteremia. J Infect; 51: 218-21.

Van Hal SJ, Paterson DL., Gosbell IB. 2011. Emergence of daptomycin resistance following vancomycin-unresponsive *Staphylococcus aureus* bacteraemia in a daptomycin-naïve patient. Eur J Clin Microbiol Infect Dis.; 30 (5): 603-610.

Van Wamel W, Rooijackers S, Ruyken M, van Kessel K, Van Strijp J. 2006. The innate immune modulators staphylococcal complement inhibitor and chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* are located on β -hemolysin-converting bacteriophages. J Bacteriol. 188 (4): 1310-1315.

Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, Lina G, Nimmo GR, Heffernan H. 2003. Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Carrying Pantone-Valentine Leukocidin Genes: Worldwide Emergence. Emerg Infect Dis; 9: 978-984.

Varshney AK, Martinez LR, Hamilton SM, Bryant AE, Levi MH, Gialanella P y col. 2010. Augmented production of Pantone-Valentine leukocidin toxin in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* is associated with worse outcome in a murine skin infection model. J Infect Dis; 201 (1): 92-6.

Velasco C, López-Cortés LE, Caballero FJ, Lepe JA, De Cueto M, Molina J y col. 2012. Grupo SAMR. SAEI/SAMPAC. Clinical and molecular epidemiology of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* causing bacteremia in Southern Spain. J Hosp Infect; (4): 257-63.

Verhagen DW, Van Der Meer JT, Hamming T, De Jong MD, Speelman P. 2003. Management of patients with *Staphylococcus aureus* bacteraemia in a university hospital: a retrospective study. Scand J Infect Dis; 35 (8): 459-63.

Vindel A, Trincado P, Gómez E, Cabrera R, Boquete T, Sola C y col. 2006. Prevalence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Spanish hospitals between 1996 and 2002. J Clin Microbiol; 44: 266-270.

Vindel A, Cuevas O, Cercenado E, Marcos C, Bautista V, Castellares C y col. 2009. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Spain: Molecular Epidemiology and utility of different typing methods. J Clin Microbiol; 47 (6): 1620-1627.

Vindel A, Trincado P, Cuevas O, Ballesteros C, Bouza E, Cercenado E. 2014. Molecular epidemiology of community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in Spain: 2004-12. J Antimicrob Chemother; 69: 2913-2919.

Von Eiff C, Becker K, Machka K, Stammer H, Peters G. 2001. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Study group. N Engl J Med; 344: 11-16.

Voyich JM, Otto M, Mathema B, Braughton KR, Whitney AR, Welty D. 2006. Is Pantone-Valentine Leukocidin the Major Virulence Determinant in Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Disease? J Infect Dis; 194: 1761-1770.

Watts A, Ke D, Wang Q, Pillay A. 2005. *Staphylococcus aureus* Strain that express serotype 5 or serotype 8 capsular polysaccharides differs in virulence. Infect Immun; 73: 3502-3511.

Weinstein MP, Reller LB, Murphy JR, Lichtenstein KA. 1983. The clinical significance of positive blood cultures: a comprehensive analysis of 500 episodes of bacteremia and fungemia in adults. Laboratory and epidemiology observations. Rev Infect Dis; 5(1):35-53.

Weinstein MP, Towns ML, Quartey SM, Mirrett S, Reimer LG, Parmigiani G. 1997. The clinical significance of positive blood cultures in the 1990s: a prospective comprehensive evaluation of the microbiology, epidemiology, and outcome of bacteremia and fungemia in adults. *Clin Infect Dis*; 24 (4): 584-602.

Weinstein MP. 2003. Blood culture contamination: persisting problems and partial progress. *J Clin Microbiol*; 41 (6): 2275-8.

Weinstein MP. 1986. Life-threatening complications of infective endocarditis and their management. *Arch Intern Med*; 146 (5): 953-7.

Wenzel RP, Edmond MB. 2001. The impact of hospital-acquired bloodstream infections. *Emerg Infect Dis*; 7: 174-177.

Wenzel RP. 2007. Health-care associated infections: major issues in the early years of the 21st century. *Clin Infect Dis*; 45 (Supl 1): S85-8.

Wertheim HF, Vos MC, Ott A. 2004. Risk and outcome of nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteremia in nasal carriers versus non carriers. *Lancet*; 364-703.

Williams REO, Rippon JE. 1952. Bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*. *J. Hyg. (Cambridge)*; 50: 320-353.

Wilson ML, Weinstein MP, Reller LB. 1994. Automated blood culture system. *Clin Lab Med*; 14 (1): 149-69.

Witte W, Enright M, Schmitz FJ, Cuni C, Bräulke C, Heuck D. 2001. Characteristics of a new epidemic MRSA in Germany ancestral to United Kingdom EMRSA 15. *Int J Med Microbiol*; 290: 677-682

Witte W, Bräulke C, Cuni C, Strommenger B, Werner G, Heuck D y col. 2005. Emergence of methicilin resistant *Staphylococcus aureus* with Panton Valentine leukocidin genes in central Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 24: 1-5.

Yu VL, Goetz A, Wagener M, Smith PB, Rihs JD, Hanchett J. 1986. *Staphylococcus aureus* carriage and infection in patients on hemodialysis. Efficacy of antibiotic prophylaxis. N Engl J Med; 315 (2): 91-6.

Zhang K, McClure J, Elsayed S, Louie T, Conly J. 2005. Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome *mec* types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol; 43 (10): 5026-5033.

Zimmerli W, Widmer AF, Blatter M, Frei R, Ochsner PE. 1998. Role of rifampin for treatment of orthopedic implant-related staphylococcal infections: a randomized controlled trial. Foreign-Body Infection (FBI) Study Group. JAMA; 279 (19): 1537-41.

ANEXO I



S.aureus

Apellidos, Nombre			Nº Historia:	
Sexo: <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> H	Edad:	Fecha ingreso:	Fecha alta:	Días ingreso:

A EPISODIO DE BACTERIEMIA

Numero muestra		Fecha de extracción	
TIEMPO positividad		Servicio de extracción	
NUM de hemos positivos		Extracción Catéter	Extracción VP
POLIMICROBIANA			
OTRAS MUESTRAS CON AUREUS			
HEMOCULTIVOS DE CONTROL			
S OXACILINA			
Antibiograma			
CMI VANCO			
CMI TEICO		DAPTO	
CMI MUPIROCINA		CMI FUCSIDICO	
AMINOGLICOSIDOS			

B. CARACTERISTICAS CLINICAS

ADQUISICION COMUNITARIA <input type="checkbox"/>	ADQUISICION NOSOCOMIAL <input type="checkbox"/>	RCS <input type="checkbox"/>	
FIEBRE			
LEUCOCITOSIS			
PCR/Procalcitonina			
SEPSIS/Pitt			
MOTIVO DE INGRESO			
SINDROMES INFECCIOSOS	1.	2.	3.
RETIRADA DEL CATETER			
ECOCARDIO			
OTRAS PRUEBAS COMPL			
ATB 1	INICIO	FIN	ADECUADO
ATB2	INICIO	FIN	
ATB3	INICIO	FIN	
TTº EMPIRICO			
TTº TRAS CONOCER ATB			
DURACION Y DOSIS			ADECUADO
NUEVO CATETER PARA ATB			
EFFECTOS SECUN ATB			
EVOLUCION			
COMPLICACIONES			
POSTBACTERIEMICA			

SUPERVIVENCIA 30 DIAS			
SUPERVIVENCIA 6 MES			
SUPERVIVENCIA 12 MESES			
EXITUS FECHA			
MALA EVOLUCION RELACIONADA			
DIAS INGRESO PREVIO AL EPISODIO			
DIAS INGRESO EN TOTAL			

C. ENFERMEDAD DE BASE Y FACTORES PREDISONENTES

MALNUTRICION		HTA	
ADVP		DIABETES	
LEUCEMIA/LINFOMA		INSUFICIEN RENAL	
CANCER		DIALISIS	
NEUTROPENIA		CIRROSIS	
		EPOC	
ESPLENECTOMIA		CATETER vascular	
INMUNOSUPRESION		SONDA VESICAL	
VIH		PROCEDIM INVASIVOS	
RADIOTERAPIA		NEFROSTOMIA	
QUIMITERAPIA		TRAQUEOSTOMIA	
CORTICOIDES		ILEOSTOMIA	
TRANSPLANTE		PROTESIS CARDIACA	
ANTECEDENTES INGRESO UCI		MARCAPASOS	
VENTILACION MECANICA		PROTESIS ARTICULAR	
NUTRICION PARENTERAL		MATERIAL OSTEOSINTESIS	
QUEMADURAS		OSTEOPATIA	
HERIDAS		ENF TEJ CONECTIVO	
CIRUGIA PREVIA			
COLONIZACION POR S.A			

E. de base: No fatal U. fatal (muerte 5 años) R. fatal en (2 meses)

Indice de Charlson: (Sumar: **1 punto:** Infarto de micoardio, E.coronaria, I. Cardiaca, Arritmia, HTA, E.Vascular Periférica, E.Cerebrovascular, Demencia, EPOC, E. conectivas, E. tromboembólica, Alcoholismo, Hepatopatía leve (incluye la hepatitis crónica), Ulcus péptico, Diabetes mellitus sin afectación de órganos. **2 puntos:** Hemiplejía, E. Renal moderada-severa, Diabetes con afectación de órganos, leucemia aguda o crónica, linfoma, Tumor sin metastasis. **6 puntos:** SIDA, tumor sólido con metástasis)

Manejo de BSA

Ecocardiograma:

Retirada de Cateter venoso central:

Hemocultivo de control a las 48 horas:

TTº empírico correcto: -cloxa si MS: y duración adecuada:

Modificación Ttº:

