

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA**



TESIS DOCTORAL

**Infección articular por *Staphylococcus aureus* :
características fenotípicas y genotípicas y correlación clínica**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Irene Muñoz Gallego

Directores

**Fernando Chaves Sánchez
Jaime Lora-Tamayo Morillo-Velarde
Rafael Delgado Vázquez**

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

INFECCIÓN ARTICULAR POR *Staphylococcus aureus*:
CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS Y GENOTÍPICAS Y CORRELACIÓN CLÍNICA

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

IRENE MUÑOZ GALLEGO

DIRECTORES

FERNANDO CHAVES SÁNCHEZ
JAIME LORA-TAMAYO MORILLO-VELARDE
RAFAEL DELGADO VÁZQUEZ

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina



TESIS DOCTORAL

**Infeción articular por *Staphylococcus aureus*:
características fenotípicas y genotípicas y correlación clínica**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Irene Muñoz Gallego

Bajo la dirección de los doctores

Fernando Chaves Sánchez

Jaime Lora-Tamayo Morillo-Velarde

Rafael Delgado Vázquez

Madrid, 2021

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis, porque no habría podido tener otros mejores. A Fernando Chaves porque eres mi maestro y un ejemplo a seguir, además del motor de esta tesis.

A Jaime Lora-Tamayo por transmitirme tu pasión por la clínica de la infección osteoarticular y así dar aún más sentido a este trabajo. A Rafael Delgado por haber confiado siempre en mí y haberme dado tantas oportunidades. Muchas gracias por vuestra dedicación y disponibilidad absolutas.

A Esther Viedma y a Mercedes Murcia, por todas las enseñanzas y el apoyo que me habéis transmitido para poder realizar esta tesis doctoral.

A todos los microbiólogos y especialistas en enfermedades infecciosas de los hospitales de la Comunidad de Madrid que han participado en el diagnóstico y tratamiento de los casos con los que se ha podido realizar este estudio.

A Anders Rhod Larsen del Statens Serum institut (Copenhague, Dinamarca), por haberme dado la oportunidad de realizar una estancia en el Laboratorio Nacional de Referencia de Resistencia a Antimicrobianos y de Estafilococos.

A Virginia Sebastián y a Carlos Garrido-Allepuz, de la empresa Helix BioS, por haberme permitido realizar con ellos mi TFM en Bioinformática.

A Lola Folgueira, por darme la oportunidad de trabajar en el servicio de Microbiología del Hospital Universitario 12 de Octubre y por tus continuas enseñanzas.

A todos mis compañeros del servicio de Microbiología del Hospital Universitario 12 de Octubre: Alhena, Alfredo, Ana, Jennifer, M^a Ángeles Meléndez, M^a Ángeles Orellana, Paula, Patricia, Raúl. Gracias por todo lo que habéis contribuido a mi formación. Me siento afortunada de poder seguir desarrollándome profesionalmente con vosotros.

A Isa, mi amiga de andanzas en Microbiología, muchas gracias por tu apoyo y amistad.

A todo el personal técnico del servicio de Microbiología del Hospital Universitario 12 de Octubre. Gracias por enseñarme tanto y por vuestro cariño. En especial a Amparo, Ana, Bea, Chusa y a “los técnicos del COVID”.

A mis amigos, por su cariño y apoyo, en especial a Alberto, Ana, Bea, Marta, Nerea, Nuria y Silvia.

A mi familia. A mi abuela Isabel, por sus grandes consejos.

A mis padres, por el amor y apoyo únicos, infinitos y esenciales que siempre me habéis dado; por crear el mejor de los entornos para educarme como lo habéis hecho; por todo. A mi hermana, por ser mi gran consejera. A mis sobrinas.

Y a ti, Álex, por tu amor, por el precioso proyecto de vida que tenemos juntos ~

Esta tesis ha sido en parte financiada por el Planes Nacionales de I+D+i 2008-2011 / 2013-2016 / 2019-2020 (Expte PI18/01623) y el Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de investigación Cooperativa, Ministerio de Economía y Competitividad, Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI RD16/0016/0002 and PI15/02013) cofinanciada por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional "Una manera de hacer Europa" y el programa operativo de Crecimiento Inteligente 2014-2020. Este trabajo ha sido apoyado por Ayuda de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).

ÍNDICE

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN.....	7
SUMMARY.....	13
INTRODUCCIÓN.....	19
1. INFECCIÓN ARTICULAR.....	21
1.1. ARTRITIS SÉPTICA NATIVA.....	21
1.1.1. Epidemiología y etiología de la artritis séptica nativa.....	21
1.1.2. Patogenia y presentación clínica de la artritis séptica nativa.....	22
1.1.3. Diagnóstico y tratamiento de la artritis séptica nativa.....	23
1.2. INFECCIÓN PROTÉSICA ARTICULAR.....	25
1.2.1. Epidemiología de la infección protésica articular.....	25
1.2.2. Clasificación de la infección protésica articular: patogenia y presentación clínica.....	26
1.2.3. Etiología de la infección protésica articular	28
1.2.4. Diagnóstico de la infección protésica articular.....	29
1.2.5. Tratamiento de la infección protésica articular.....	31
2. <i>Staphylococcus aureus</i>.....	34
2.1. GENERALIDADES.....	34
2.2. GENOMA DE <i>S. aureus</i>	35
2.2.1. Técnicas moleculares para estudiar el genoma bacteriano.....	38
2.3. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE <i>S. aureus</i>	41
2.4. VIRULENCIA DE <i>S. aureus</i>	42
2.4.1. Regulación de la virulencia de <i>S. aureus</i> y adaptación.....	42
2.4.2. Factores de virulencia.....	45
3. MECANISMOS PATOGENICOS DE LAS INFECCIONES OSTEOARTICULARES CAUSADAS POR <i>S. aureus</i>.....	49
3.1. ETAPAS DE LA INFECCIÓN CAUSADA POR <i>S. aureus</i>	49

3.1.1.	Inicio de la infección.....	50
3.1.2.	Formación de abscesos.....	51
3.1.3.	Infección sistémica.....	52
3.2.	MECANISMO PATOGENICO DE LA ARTRITIS NATIVA CAUSADA POR <i>S. aureus</i>	53
3.3.	MECANISMO PATOGENICO DE LA INFECCIÓN PROTÉSICA ARTICULAR CAUSADA POR <i>S. aureus</i>	56
4.	ANTIBIÓTICOS Y <i>S. aureus</i>	58
4.1.	RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS Y VIRULENCIA.....	62
4.2.	PRINCIPALES ANTIBIÓTICOS USADOS EN EL TRATAMIENTO DE LAS INFECCIONES CAUSADAS POR <i>S. aureus</i>	63
4.2.1.	Penicilina.....	63
4.2.2.	Meticilina.....	63
4.2.3.	Nuevos betalactámicos.....	65
4.2.4.	Vancomicina.....	65
4.2.5.	Daptomicina.....	66
4.2.6.	Lipoglucopeptidos.....	67
4.2.7.	Oxazolidinonas.....	67
4.2.8.	Aminoglucósidos.....	68
4.2.9.	Tetraciclinas.....	68
4.2.10.	Fluoroquinolonas.....	68
4.2.11.	Otros antibióticos.....	69
5.	DIFICULTADES EN EL TRATAMIENTO DE LAS INFECCIONES ARTICULARES CAUSADAS POR <i>S. aureus</i>	70
5.1.	<i>BIOFILM</i>	72
5.1.1.	Formación de <i>biofilm</i>	72
5.1.2.	Antibióticos y <i>biofilm</i>	74
5.2.	BACTERIAS INTRACELULARES.....	76
5.3.	OTRAS FORMAS DE EVASIÓN DEL SISTEMA INMUNE DEL HOSPEDADOR.....	77
	JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS.....	79

OBJETIVOS.....	83
1. OBJETIVO GENERAL.....	85
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	85
MATERIAL Y MÉTODO.....	87
1. DISEÑO DEL ESTUDIO.....	89
1.1. BLOQUE I.....	89
1.2. BLOQUE II.....	89
1.3. BLOQUE III.....	90
2. CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	90
3. SELECCIÓN DE LA MUESTRA.....	91
3.1. PACIENTES.....	95
3.2. CEPAS DE <i>S. aureus</i>	95
4. DATOS CLÍNICOS.....	96
4.1. VARIABLES A ESTUDIO Y DEFINICIONES.....	97
4.1.1. Datos clínicos que se recogieron de los pacientes con artritis séptica nativa producida por <i>S. aureus</i>	97
4.1.2. Datos clínicos que se recogieron de los pacientes con infección protésica articular producida por <i>S. aureus</i>	101
4.2. RECOGIDA DE LA INFORMACIÓN CLÍNICA.....	105
5. CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA Y MOLECULAR DE LAS CEPAS DE <i>S. aureus</i>	106
5.1. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LA INFECCIÓN ARTICULAR E IDENTIFICACIÓN DE <i>S. aureus</i>	106
5.2. PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIBIÓTICOS.....	108
5.2.1. Bacteria planctónica.....	108
5.2.2. Bacteria formadora de <i>biofilm</i>	109
5.3. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA.....	115
5.3.1. Hemólisis.....	115
5.3.1.1. β -hemólisis (α -hemolisina).....	115
5.3.1.2. Hemólisis turbia (β -hemolisina).....	116
5.3.1.3. δ -hemólisis (funcionalidad de <i>agr</i>).....	117

5.3.2.	Fenotipo de las colonias de <i>S. aureus</i>	118
5.3.3.	Formación de <i>biofilm</i>	119
5.3.4.	Sensibilidad al péptido de neutrófilo humano 1.....	120
5.3.5.	Estudio de virulencia en el modelo in vivo de <i>Galleria mellonella</i>	120
5.4.	CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA.....	122
5.4.1.	Electroforesis en gel en campo pulsante (PFGE).....	122
5.4.2.	Tipificación de <i>spa</i>	125
5.4.3.	Tipado por secuenciación de múltiples locus (MLST).....	127
5.4.4.	<i>Microarrays</i> de ADN.....	130
5.4.5.	Secuenciación de genoma completo.....	132
5.4.5.1.	Nombre de las cepas de <i>S. aureus</i>	132
5.4.5.2.	Procedimiento experimental de la secuenciación de genoma completo.....	133
5.4.5.3.	Análisis bioinformático.....	135
6.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	138
	RESULTADOS.....	141
	Bloque I: Artritis séptica nativa producida por <i>S. aureus</i>.....	143
	Estudio retrospectivo de artritis séptica nativa.....	145
1.	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS EPISODIOS DE ARTRITIS SÉPTICA NATIVA.....	145
1.1.	DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA COHORTE.....	145
1.2.	COMPARACIÓN DE LOS EPISODIOS DE ARTRITIS SEGÚN LA SENSIBILIDAD A METICILINA DE LAS CEPAS DE <i>S. aureus</i>	148
1.3.	COMPARACIÓN DE LOS EPISODIOS DE ARTRITIS SEGÚN LA EVOLUCIÓN CLÍNICA DE LOS PACIENTES.....	149
2.	CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DE LAS CEPAS CAUSANTES DE ARTRITIS.....	151
2.1.	CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS Y GENOTÍPICAS.....	151

2.2. COMPARACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DE LAS CEPAS DE <i>S. aureus</i> SEGÚN LA SENSIBILIDAD A METICILINA.....	157
2.3. COMPARACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DE LAS CEPAS DE <i>S. aureus</i> CON EL PRONÓSTICO DE LOS PACIENTES.....	157

Bloque II: Infección protésica articular producida por *S. aureus*.....161

Estudio retrospectivo de infección protésica articular producida por *S. aureus* resistente a meticilina.....163

1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA COHORTE Y ANÁLISIS COMPARATIVO SEGÚN LA EVOLUCIÓN CLÍNICA DE LOS PACIENTES.....	163
2. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DE LAS CEPAS DE <i>S. aureus</i> Y ANÁLISIS COMPARATIVO SEGÚN LA EVOLUCIÓN CLÍNICA DE LOS PACIENTES.....	166
3. SENSIBILIDAD AL PÉPTIDO DE NEUTRÓFILO HUMANO 1 Y VIRULENCIA EN EL MODELO IN VIVO DE <i>Galleria mellonella</i>	170

Estudio prospectivo multicéntrico de infección protésica articular en la Comunidad de Madrid (estudio PISA).....173

1. DESCRIPCIÓN CLÍNICA Y MICROBIOLÓGICA DE LA COHORTE.....	173
2. ANÁLISIS COMPARATIVO SEGÚN LA SENSIBILIDAD A METICILINA.....	185
3. ANÁLISIS COMPARATIVO SEGÚN LA PRESENTACIÓN CLÍNICA.....	185
4. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y MICROBIOLÓGICAS SEGÚN LA EVOLUCIÓN CLÍNICA DE LA INFECCIÓN.....	193
5. SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS EN EL <i>BIOFILM</i> (<i>Calgary biofilm device</i>).....	203

Bloque III: Secuenciación de genoma completo de *S. aureus* causante de infección articular.....209

Caracterización molecular de *S. aureus* causante de infección protésica articular.....211

1. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DE LAS CEPAS DE <i>S. aureus</i>	212
2. RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS Y FACTORES DE VIRULENCIA.....	212
3. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR.....	217
4. ASOCIACIÓN DE GENES CON VARIABLES CLÍNICAS.....	219

5. ANÁLISIS FILOGENÉTICO.....	220
6. ESTUDIO DE VARIANTES ENTRE CEPAS.....	222
Caracterización molecular de <i>S. aureus</i> causante de infección protésica articular persistente y recidivante.....	225
1. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DE LAS CEPAS DE <i>S. aureus</i>	226
2. FACTORES DE VIRULENCIA Y DE RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS.....	229
3. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR.....	231
4. ASOCIACIÓN DE GENES CON VARIABLES CLÍNICAS.....	233
5. ANÁLISIS FILOGENÉTICO.....	233
6. ESTUDIO DE VARIANTES ENTRE CEPAS.....	236
Caracterización molecular del complejo clonal CC5 de <i>S. aureus</i> resistente a meticilina causante de infección articular.....	243
DISCUSIÓN.....	253
1. ARTRITIS SÉPTICA NATIVA PRODUCIDA POR <i>S. aureus</i>	256
2. INFECCIÓN PROTÉSICA ARTICULAR PRODUCIDA POR <i>S. aureus</i>	261
2.1. INFECCIÓN PROTÉSICA ARTICULAR PRODUCIDA POR <i>S. aureus</i> RESISTENTE A METICILINA.....	261
2.2. MICROBIOLOGÍA DE <i>S. aureus</i> PRODUCTOR DE INFECCIÓN PROTÉSICA ARTICULAR.....	263
2.3. PRESENTACIÓN CLÍNICA DE LA INFECCIÓN PROTÉSICA ARTICULAR.....	264
2.4. EVOLUCIÓN CLÍNICA DE LA INFECCIÓN PROTÉSICA ARTICULAR.....	265
2.5. SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS DE <i>S. aureus</i> FORMADOR DE <i>BIOFILM</i> EN LA INFECCIÓN PROTÉSICA ARTICULAR.....	266
3. SECUENCIACIÓN DE GENOMA COMPLETO DE <i>S. aureus</i> CAUSANTE DE INFECCIÓN ARTICULAR.....	268
3.1. GENOMA DE <i>S. aureus</i> CAUSANTE DE INFECCIÓN PROTÉSICA ARTICULAR.....	268
3.2. GENOMA DE <i>S. aureus</i> CAUSANTE DE INFECCIÓN PROTÉSICA ARTICULAR PERSISTENTE Y RECIDIVANTE.....	271

3.3. GENOMA DEL COMPLEJO CLONAL CC5 DE <i>S. aureus</i> RESISTENTE A METICILINA CAUSANTE DE INFECCIÓN ARTICULAR (Artritis nativa y protésica).....	273
CONCLUSIONES.....	277
BIBLIOGRAFÍA.....	283
ANEXOS.....	301
1. ANEXO I. Centros participantes en el estudio prospectivo multicéntrico de infección protésica articular causada por <i>S. aureus</i> en la Comunidad de Madrid (estudio PISA) y numeración de los episodios y cepas.....	303
2. ANEXO II. Informe del Comité Ético de Investigación Clínica.....	304
3. ANEXO III. Formulario de datos de cepas de <i>S. aureus</i> enviadas por cada hospital para el estudio prospectivo multicéntrico de infección protésica articular estafilocócica (estudio PISA).....	306
4. ANEXO IV. Base de datos diseñada para la recogida de datos clínicos de los casos de artritis séptica nativa estafilocócica.....	308
5. ANEXO V. Base de datos diseñada para la recogida de datos clínicos de los casos de infección protésica articular estafilocócica.....	309
6. ANEXO VI. Asociación de genes con variables clínicas de interés en la infección protésica articular (Bloque III de secuenciación de genoma completo).....	311
7. ANEXO VII. Publicaciones en revistas internacionales relacionadas con la tesis doctoral.....	318
8. ANEXO VIII. Comunicaciones presentadas en congresos relacionadas con la tesis doctoral.....	322

TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

INTRODUCCIÓN

- Tabla 1. Descripción general de las técnicas utilizadas para la caracterización molecular de *S. aureus*.
- Tabla 2. Tipos de factores de virulencia de *S. aureus* y síndromes clínicos asociados.
- Tabla 3. Principales genes de virulencia de *S. aureus*.
- Tabla 4. Principales genes de resistencia a los antibióticos de *S. aureus*.

MATERIAL Y MÉTODO

- Tabla 5. Características de los estudios de infección articular causada por *S. aureus* incluidos en la presente tesis doctoral.
- Tabla 6. Concentraciones de rifampicina y levofloxacino esperadas en tejido óseo en humanos adultos.
- Tabla 7. Secuencias de los *primers* usados en la PCR de tipificación de *spa*.
- Tabla 8. Secuencias de los *primers* usados en la PCR para el estudio de MLST.

RESULTADOS

Bloque I: Artritis séptica nativa producida por *S. aureus*.

Estudio retrospectivo de artritis séptica nativa

- Tabla 9. Características clínicas de los pacientes con artritis séptica nativa causada por *S. aureus* y análisis comparativo según la sensibilidad a meticilina.
- Tabla 10. Análisis comparativo de las características clínicas de los pacientes con artritis séptica nativa causada por *S. aureus* según su evolución clínica.
- Tabla 11. Sensibilidad a antimicrobianos y características fenotípicas y genotípicas de las cepas de *S. aureus* y análisis comparativo según la sensibilidad a meticilina.
- Tabla 12. Análisis comparativo de la sensibilidad a antimicrobianos y características fenotípicas y genotípicas de las cepas de *S. aureus* según la evolución clínica de la artritis nativa.

Bloque II: Infección protésica articular producida por *S. aureus*.

Estudio retrospectivo de infección protésica articular producida por *S. aureus* resistente a meticilina

- Tabla 13. Características clínicas de los pacientes con infección protésica articular causada por *S. aureus* resistente a meticilina.
- Tabla 14. Sensibilidad a antimicrobianos y características fenotípicas genotípicas de las cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina causantes de infección protésica articular.
- Tabla 15. Características principales de las cepas seleccionadas de *S. aureus* causantes de infección protésica articular, resistentes a meticilina y pertenecientes al complejo clonal 5 (CC5); junto con la sensibilidad de las cepas al péptido de neutrófilo humano 1 (α -defensina-1) y el tiempo de supervivencia de las larvas de *G. mellonella* a las cepas de *S. aureus*.

Estudio prospectivo multicéntrico de infección protésica articular en la Comunidad de Madrid (estudio PISA)

- Tabla 16. Descripción clínica y microbiológica de la cohorte y análisis comparativo según la sensibilidad a meticilina y la presentación clínica de la infección protésica articular.
- Tabla 17. Análisis comparativo de las características clínicas y microbiológicas (fenotípicas y genotípicas) entre las infecciones protésicas articulares con inicio de síntomas en los primeros 30 días tras el implante, y las infecciones protésicas articulares con inicio de síntomas entre los 30-90 días tras la cirugía; y entre la infección hematógena con hemocultivo positivo y negativo.
- Tabla 18. Análisis comparativo de las características clínicas y microbiológicas (fenotípicas y genotípicas) según la evolución clínica de la infección protésica articular.
- Tabla 19. Concentraciones mínimas de erradicación, inhibitoria y bactericida del *biofilm* (CMEB, CMIB y CMBB) 50 y 90 para oxacilina, daptomicina, levofloxacino (en monoterapia y en combinación con una concentración fija de 5 mg/L de

rifampicina) y rifampicina (en monoterapia y en combinación con una concentración fija de 3 mg/L de rifampicina).

- Tabla 20. Concentración mínima de erradicación de *biofilm* (CMEB) para rifampicina en monoterapia y combinada con levofloxacino según la evolución clínica de la infección.

Bloque III: Secuenciación de genoma completo de *S. aureus* causante de infección articular

Caracterización molecular de *S. aureus* causante de infección protésica articular

- Tabla 21. Resistencia antimicrobiana fenotípica y genotípica de las cepas de *S. aureus* causantes de infección protésica articular.
- Tabla 22. Genes de virulencia en las cepas de *S. aureus* causantes de infección protésica articular.
- Tabla 23. Genes codificantes para adhesinas en las cepas de *S. aureus* causantes de infección protésica articular.
- Tabla 24. Genes implicados en la formación de *biofilm* en las cepas de *S. aureus* causantes de infección protésica articular.
- Tabla 25. Epidemiología molecular de las cepas de *S. aureus* causantes de infección protésica articular y, según ésta, las referencias usadas para cada cepa y análisis bioinformático.
- Tabla 26. Número de variantes de cada cepa con la referencia y de variantes totales de diferencia entre las parejas de cepas de un mismo paciente con infección protésica articular y entre esas parejas de cepas tras el filtrado de variantes por tipo de variante.
- Tabla 27. Variantes entre parejas de cepas de *S. aureus* de un mismo paciente con infección protésica articular.

Caracterización molecular de *S. aureus* causante de infección protésica articular persistente y recidivante

- Tabla 28. Características principales de los pacientes tratados con DAIR con persistencia o recidiva de la infección y con curación.

- Tabla 29. Características microbiológicas de las cepas de *S. aureus* causantes de infección protésica articular tratada con desbridamiento, antibioterapia y retención del implante (DAIR).
- Tabla 30. Genes de virulencia de todas las cepas causantes de los 14 casos de infección protésica articular incluidos en el estudio.
- Tabla 31. Epidemiología molecular de las cepas de *S. aureus* causantes de infección protésica articular persistente o recidivante y con curación y, según ésta, las referencias usadas para cada cepa y análisis bioinformático.
- Tabla 32. Número de variantes de cada cepa causante de infección protésica articular recidivante o persistente con la referencia y número de variantes totales de diferencia entre las parejas de cepas de un mismo paciente y entre esas parejas tras el filtrado de variantes por tipo de variante.
- Tabla 33. Variantes entre parejas de cepas de *S. aureus* de un mismo paciente con infección protésica articular persistente o recidivante.

Caracterización molecular del complejo clonal CC5 de *S. aureus* resistente a meticilina causante de infección articular

- Tabla 34. Características generales de las 38 cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina del complejo clonal CC5 causantes de infección articular y su epidemiología molecular.
- Tabla 35. Resistencia antimicrobiana fenotípica y genotípica de las cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina del complejo clonal CC5 causantes de infección articular.
- Tabla 36. Genes de virulencia de las cepas de *S. aureus* causantes de infección articular.

DISCUSIÓN

- Tabla 37. Series de casos de artritis nativa producida por *S. aureus* publicados en la literatura (2005-2020).

FIGURAS

INTRODUCCIÓN

- Figura 1. Infección de prótesis de rodilla.
- Figura 2. Tinción de Gram de líquido articular de paciente con infección protésica articular causada por *S. aureus* y colonias hemolíticas de *S. aureus* en cultivo de agar sangre.
- Figura 3. Cromosoma de *S. aureus* USA300.
- Figura 4. Tipo de *spa* de *S. aureus* más prevalentes en el mundo.
- Figura 5. Regulación de la virulencia por el sistema *agr*.
- Figura 6. Efectos de la funcionalidad de *agr* en la osteomielitis.
- Figura 7. Factores de virulencia de *S. aureus*.
- Figura 8. Etapas de la infección causada por *S. aureus*.
- Figura 9. Mecanismo de virulencia de *S. aureus* dentro del torrente sanguíneo.
- Figura 10. Fisiopatología de la artritis nativa.
- Figura 11. Mecanismo patogénico de la infección protésica articular.
- Figura 12. Adhesión de *S. aureus* a la superficie de la prótesis.
- Figura 13. Principales mecanismos celulares que ocurren entre la prótesis y el hueso durante la infección protésica articular causada por *S. aureus*.
- Figura 14. Diana de los principales antibióticos usados en el tratamiento de *S. aureus* y mecanismos por los que la bacteria se hace resistente a ellos.
- Figura 15. Evolución de la resistencia a los antibióticos en *S. aureus*.
- Figura 16. Funcionalidad de *agr* y resistencia a los antibióticos en *S. aureus* según el estado del hospedador.
- Figura 17. Prevalencia mundial de *S. aureus* resistente a meticilina.
- Figura 18. Mecanismos de persistencia de la infección protésica articular producida por *S. aureus*.
- Figura 19. *Biofilm* de *S. aureus* adherido a una prótesis. Imagen obtenida mediante microscopía electrónica de barrido.
- Figura 20. Formación de *biofilm* en estafilococos.

- Figura 21. Invasión de las células del hospedador en la infección protésica articular producida por *S. aureus*.

MATERIAL Y MÉTODO

- Figura 22. Artritis séptica nativa e infecciones de implantes ortopédicos causadas por *S. aureus* en el Hospital Universitario 12 de Octubre desde 2005 hasta 2015.
- Figura 23. Casos de infecciones articulares causadas por cepas de *S. aureus* resistentes a metilicina pertenecientes al complejo clonal CC5 que se incluyeron en el estudio.
- Figura 24. Dispositivo de Calgary utilizado en el ensayo. Formación de *biofilm* bacteriano en un pincho (*peg*) del dispositivo Calgary.
- Figura 25. Procedimiento experimental completo del sistema Calgary.
- Figura 26. Preparación del inóculo bacteriano.
- Figura 27. Exposición del *biofilm* bacteriano al antibiótico.
- Figura 28. Neutralización del antibiótico y recuperación de la bacteria superviviente en el *biofilm*.
- Figura 29. β -hemólisis negativa, positiva débil y positiva fuerte de cepas de *S. aureus* en agar sangre.
- Figura 30. Cepa de *S. aureus* con halo turbio por expresión de la β -hemolisina.
- Figura 31. Cepas de *S. aureus* en agar sangre con funcionalidad de *agr* positiva y negativa. En horizontal se encuentra la estría de la cepa de *S. aureus* RN4220, que produce sólo β -hemolisina.
- Figura 32. Colonias de *S. aureus* con fenotipo salvaje y con fenotipo SCV.
- Figura 33. Larva de *G. mellonella* muerta y viva.
- Figura 34. Proceso experimental de la electroforesis en gel en campo pulsante.
- Figura 35. Procedimiento experimental del *microarray*.
- Figura 36. *Microarrays* de ADN en los que se observa el precipitado cuya interpretación aporta los resultados genéticos.
- Figura 37. Esquema del proceso de secuenciación del genoma completo mediante el sistema Illumina: preparación de librerías, formación de *clusters* y secuenciación por síntesis

RESULTADOS

Bloque I: Artritis séptica nativa producida por *S. aureus*.

Estudio retrospectivo de artritis séptica nativa

- Figura 38. Fenotipo β -hemolítico y no β -hemolítico en agar sangre de las cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina pertenecientes a un mismo paciente con artritis nativa.
- Figura 39. Electroforesis en gel en campo pulsante de las cepas de *S. aureus* causantes de artritis nativa.
- Figura 40. Electroforesis en gel en campo pulsante de todas las cepas de *S. aureus* causantes de artritis nativa junto con la sensibilidad a meticilina.

Bloque II: Infección protésica articular producida por *S. aureus*.

Estudio retrospectivo de infección protésica articular producida por *S. aureus* resistente a meticilina

- Figura 41. Electroforesis en gel en campo pulsante de cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina pertenecientes al complejo clonal 5 causantes de infección protésica articular junto con el año de aislamiento de cada cepa y el MLST al que pertenecen.
- Figura 42. Curva de supervivencia de las larvas de *G. mellonella* a las cepas de *S. aureus*

Estudio prospectivo multicéntrico de infección protésica articular en la Comunidad de Madrid (estudio PISA)

- Figura 43. Distribución de la concentración mínima de erradicación del *biofilm* (CMEB) para oxacilina, daptomicina, levofloxacino en monoterapia, levofloxacino en combinación con una concentración fija de 5 mg/L de rifampicina, rifampicina en monoterapia, y rifampicina en combinación con una concentración fija de 3 mg/L de levofloxacino.
- Figura 44. Media geométrica en todos los casos de la concentración mínima de erradicación de *biofilm* (CMEB) de rifampicina para la rifampicina en

monoterapia y en combinación con una concentración fija de 3 mg/L de levofloxacino.

Bloque III: Secuenciación de genoma completo de *S. aureus* causante de infección articular

Caracterización molecular de *S. aureus* causante de infección protésica articular

- Figura 45. Dendrograma filogenético con las cepas de *S. aureus* causantes de infección protésica articular y los principales genes de resistencia a antibióticos y de virulencia.

Caracterización molecular de *S. aureus* causante de infección protésica articular persistente y recidivante

- Figura 46. Colonias de *S. aureus* del caso recidivante 107 mostrando β -hemólisis en agar sangre y halos turbios de hemólisis por expresión de la β -hemolisina.
- Figura 47. Dendrograma filogenético de las 12 cepas de los 6 casos con recidiva o persistencia de la infección tratados con DAIR y de las 8 cepas causantes de infección protésica articular tratada con DAIR que curaron, junto con los principales genes de resistencia a antibióticos y de virulencia.

Caracterización molecular del complejo clonal CC5 de *S. aureus* resistente a meticilina causante de infección articular

- Figura 48. Dendrograma filogenético de las 38 cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina pertenecientes al complejo clonal CC5 causantes de infección articular, junto con los principales genes de resistencia y de virulencia.
- Figura 49. *Heatmap* en el que se muestra el número de SNPs de diferencia entre las cepas de *S. aureus* causantes de infección articular respecto a la cepa de referencia N315.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ACME	Elemento móvil catabólico de arginina, <i>arginine catabolic mobile element</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico, <i>desoxyribonucleic acid</i> (DNA)
Agar SCS	Agar Schaedler con 5% de sangre de carnero
<i>agr</i>	Gen regulador accesorio
ARN	Ácido ribonucleico, <i>ribonucleic acid</i> (RNA)
CA-MRSA	<i>S. aureus</i> resistente a meticilina asociado al ámbito comunitario, <i>community-acquired methicillin-resistant S. aureus</i>
CBD	Dispositivo de <i>biofilm</i> Calgary, <i>Calgary biofilm device</i>
CC	Complejo clonal
CEG	Centro de Epidemiología Genómica
CIOP	Cultivo intraoperatorio positivo
CMBB	Concentración mínima bactericida del <i>biofilm</i>
CMEB	Concentración mínima de erradicación de <i>biofilm</i>
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CMIB	Concentración mínima inhibitoria del <i>biofilm</i>
DAIR	Desbridamiento, antibioterapia y retención del implante
DE	Desviación estándar

DEL	Delección, <i>deletion</i>
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
DO	Densidad óptica
HA-MRSA	<i>S. aureus</i> resistente a meticilina asociados al ámbito hospitalario, <i>health-care associated methicillin-resistant S. aureus</i>
HCR	Relacionado con el cuidado sanitario, <i>health-care related</i>
h-VISA	Hetero-VISA
IC	Intervalo de confianza
IH	Infección hematógena
IL	Interleuquina
INS	Inserción, <i>insertion</i>
IPA	Infección protésica articular
IPC	Infección postquirúrgica crónica
IPP	Infección postquirúrgica precoz
IV	intravenosa
MBS	Sustitución de múltiples bases, <i>multiple-base substitution</i>
MGEs	Elementos genéticos móviles, <i>mobile genetic elements</i>
MLST	Tipado por secuenciación de múltiples locus, <i>multilocus sequencing type</i>
MSCRAMMs	Componentes microbianos de superficie que reconocen moléculas adhesivas de la matriz, <i>microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules</i>
NSYN	SNP no sinónimo, <i>non-synonymus SNP</i>
nt	Nucleótido, <i>nucleotide</i>
pb	Pares de bases, <i>bp</i>

PBS	Tampón fosfato salino, <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Proteína C reactiva o reacción en cadena de la polimerasa
PMNs	Polimorfonucleares
PSM	Modulinas solubles en fenol, <i>phenol-soluble modulins</i>
RIQ	Rango intercuartílico
RM	Resonancia magnética
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SARM	<i>S. aureus</i> resistente a meticilina, <i>methicillin-resistant S. aureus</i> (MRSA)
SASM	<i>S. aureus</i> sensible a meticilina, <i>methicillin-susceptible S. aureus</i> (MSSA)
SCCmec	<i>Staphylococcal cassette chromosome mec</i>
SCV	Variantes de colonia pequeñas, <i>small colony variants</i>
SGC	Secuenciación de genoma completo
SNP	Polimorfismos de un solo nucleótido, <i>single nucleotide polymorphism</i>
ST	Tipo de secuencia, <i>sequence type</i>
SYN	SNP sinónimo, <i>synonymous SNP</i>
TC	Tomografía computarizada
TLR	Receptor tipo <i>Toll</i> , <i>Toll-like receptor</i>
TNF	Factor de necrosis tumoral, <i>tumour necrosis factor</i>
TSB	Caldo de soja tríptica, <i>tryptic soy broth</i> ,
UFC	Unidad formadora de colonia

VISA	<i>S. aureus</i> con resistencia intermedia a vancomicina, <i>vancomycin-intermediate S. aureus</i>
vs	Versus
VSG	Velocidad de sedimentación globular

RESUMEN

RESUMEN

TÍTULO

Infección articular por *Staphylococcus aureus*: características fenotípicas y genotípicas y correlación clínica.

INTRODUCCIÓN

La infección protésica articular (IPA) y la artritis nativa producen una importante morbilidad. Requieren un tratamiento médico-quirúrgico complejo, siendo el fracaso terapéutico elevado. *Staphylococcus aureus* es uno de los principales patógenos causantes de infección articular. Tiene numerosos genes de virulencia codificantes para adhesinas o proteínas formadoras de *biofilm*, que dificultan el tratamiento antibiótico. Uno de los principales reguladores de la virulencia de *S. aureus* es el gen regulador accesorio (*agr*). No existen muchos estudios que hayan profundizado en las características microbiológicas y moleculares de los estafilococos en esta infección, y aún menos en la asociación de éstas con la evolución clínica. El objetivo de esta tesis doctoral fue caracterizar clínica, microbiológica y molecularmente la infección articular producida por *S. aureus* y explorar la asociación de las características (fenotípicas y genotípicas) de la bacteria con la presentación y evolución clínica de los pacientes.

MATERIAL Y MÉTODO

Se desarrollaron tres bloques de estudio de la infección articular producida por *S. aureus*: 1) artritis nativa desde 2005 a 2015 en el Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid (H12O); 2) IPA, que se dividió en un estudio retrospectivo de *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) de 2005 a 2015 en el H12O, y en otro estudio prospectivo (mayo 2016-septiembre 2017) multicéntrico (11 hospitales de Madrid); y, 3) secuenciación de genoma completo (SGC) de *S. aureus*. Se recogió información clínica de los pacientes (comorbilidad, presentación, evolución clínica) y se caracterizaron microbiológica y molecularmente las cepas: pruebas de sensibilidad a antibióticos de la

bacteria planctónica y formadora de *biofilm*; caracterización fenotípica (β -hemólisis, hemólisis turbia y δ -hemólisis [funcionalidad de *agr*]; fenotipo de las colonias, *biofilm*, sensibilidad al péptido de neutrófilo humano 1, estudio de virulencia en *Galleria mellonella*) y caracterización genotípica (electroforesis en gel en campo pulsante, tipificación de *spa*, tipificación por secuenciación de múltiples locus [MLST], *microarrays* de ADN, SGC).

RESULTADOS

En el estudio retrospectivo de artritis nativa se incluyeron 29 pacientes: 7 (24.1%) con infección por SARM y 22 por *S. aureus* sensible a meticilina (SASM). El fracaso terapéutico se produjo en 7/26 pacientes (26.9%) (4/7 [57.1%] con infección por SARM vs 3/19 [15.8%] por SASM). La mortalidad fue mayor en pacientes con infección por SARM (3/7 vs 0/19). El complejo clonal (CC) más frecuente fue el CC5 (38.1%). SASM mostró mayor variabilidad genética (9 CCs) que SARM (3 CCs).

En el estudio retrospectivo de IPA causada por SARM se incluyeron 18 casos. Diez (55.6%) fracasaron terapéuticamente. Todas las cepas pertenecieron al CC5 y todas, excepto una, al ST125. Los genes de evasión del sistema inmune transmitidos por fagos (*chp*, *sak* y *scn*) fueron más frecuentes entre los episodios con fracaso terapéutico (80.0 vs 37.5%). En el estudio prospectivo multicéntrico de IPA se incluyeron 88 pacientes (39.8% hombres, edad 74.7 \pm 14.1 años). Sesenta y cuatro tuvieron infección aguda (postquirúrgica precoz [IPP] y hematógena) y 24 crónica. Veinte casos (22.7%) fueron causados por SARM. Se observó una elevada diversidad genotípica, incluyendo 16 CCs, siendo CC5 el más frecuente (30.7%). La funcionalidad de *agr* fue mayor en la IPP que en la crónica (55.6 vs 28.6%; p=0.041). No se encontraron diferencias entre las IPPs con inicio de síntomas en los 30 días después de la cirugía y aquellos entre los 30-90 días. El fracaso terapéutico (36.5%) fue menor entre los casos manejados con explante protésico. En los casos tratados con desbridamiento y retención de implante, hubo menos fracaso entre los que recibieron rifampicina. Ninguna característica genotípica o fenotípica se asoció al fracaso, excepto la concentración mínima inhibitoria (CMI) a vancomicina \geq 1.5 mg/L (23.1% en el fracaso vs 3.4%; p=0.044). La CMEB₅₀ (concentración mínima de erradicación de *biofilm*) fue >128 mg/L para todos los antibióticos testados y no mostró asociación con el pronóstico.

La SGC mostró diversidad en las características genéticas de las cepas, siendo el clon predominante el CC5 ST125 *spa type* t067, sobre todo en SARM. La prevalencia de genes codificantes para adhesinas y proteínas formadoras de *biofilm* fue elevada. El perfil de resistencia antimicrobiana fenotípico y genotípico se correlacionó en la mayoría de los casos. No se encontró ningún gen asociado a la presentación y evolución clínica de la IPA, pero sí a la resistencia a oxacilina. Las cepas se agruparon filogenéticamente por similitud de CCs y STs. No se encontró ningún gen asociado a la persistencia o recidiva de la IPA respecto a la curación. La comparación entre la cepa inicial y la recidivante o persistente de un mismo paciente mostró modificaciones en genes de resistencia a antibióticos y, principalmente, en adhesinas. En las cepas de SARM CC5 causantes de infección articular se observó mayor presencia del gen de resistencia a aminoglucósidos *aph(3')-III* durante el período 2005-2010 respecto al período 2011-2017 (71.4% vs 33.3%, $p=0.023$), y del gen *ant(6)-Ia* (71.4% vs 33.3%, $p=0.023$). Tampoco se observaron diferencias genómicas significativas entre hospitales ni entre cepas causantes de artritis nativa e IPA.

CONCLUSIONES

En la infección articular se establece una compleja interacción entre el hospedador, el microorganismo y la prótesis en la IPA. El fracaso terapéutico de la infección articular continúa siendo elevado. En la artritis nativa éste fue mayor en los casos producidos por SARM que por SASM.

En la IPA se observó mayor funcionalidad de *agr* en los casos de IPP y no se encontraron diferencias entre esos casos con independencia de la duración de los síntomas. Una comparación exhaustiva de las características clínicas, microbiológicas y moleculares, no mostró factores significativos asociados con el fracaso terapéutico de la IPA producida por *S. aureus*, excepto la CMI a vancomicina, que fue ligeramente superior en las cepas de casos con evolución desfavorable. No obstante, *S. aureus* puede modificar su genotipo durante la evolución clínica de la IPA, adaptándose para recidivar o persistir.

El clon predominante de *S. aureus* en la infección articular es el CC5 ST125 *spa* type t067, sobre todo en SARM. Este clon se ha mantenido estable, no mostrando diferencias genómicas importantes en los últimos 12 años.

SUMMARY

SUMMARY

TITLE

Joint infection by *Staphylococcus aureus*: phenotypic and genotypic characteristics and clinical correlation.

INTRODUCTION

Prosthetic joint infection (PJI) and native arthritis produce significant morbidity. They require complex medical and surgical treatment, with treatment failure being high. *Staphylococcus aureus* is one of the main pathogens causing joint infection. It has numerous virulence genes encoding for adhesins or biofilm-forming proteins, which make antibiotic treatment difficult. One of the main virulence regulators of *S. aureus* is the accessory gene regulator (*agr*). There are not many studies that have delved into the microbiological and molecular characteristics of staphylococci in this infection, and even less in the association of these with the clinical outcome. The objective of this doctoral thesis was to characterize clinically, microbiologically and molecularly the joint infection caused by *S. aureus* and to explore the association of the phenotypic and genotypic characteristics of the bacterium with the clinical presentation and outcome of patients.

MATERIAL AND METHOD

Three different studies of joint infection caused by *S. aureus* were developed: 1) native arthritis from 2005 to 2015 at Hospital Universitario 12 de Octubre in Madrid (H12O); 2) PJI, which was divided into a retrospective study of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) from 2005 to 2015 in H12O, and in another multicentre prospective study (May 2016-September 2017) (11 hospitals in Madrid); and, 3) whole genome sequencing (WGS) of *S. aureus*. Clinical information from patients was collected (comorbidity, clinical presentation, outcome) and the strains were microbiologically and molecularly characterized: antibiotic susceptibility testing of planktonic and biofilm-forming

bacterium; phenotypic characterization (β -haemolysis, turbid haemolysis and δ -haemolysis [*agr* functionality]; colony phenotype, biofilm, human neutrophil peptide 1 susceptibility, study of virulence in *Galleria mellonella*) and genotypic characterization (pulsed field gel electrophoresis, *spa* typing, multi-locus sequencing typing [MLST], DNA microarrays, WGS).

RESULTS

In the retrospective study of native arthritis, 29 patients were included: 7 (24.1%) with MRSA infection and 22 with methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA). Treatment failure occurred in 7/26 patients (26.9%) (4/7 [57.1%] with infection by MRSA vs 3/19 [15.8%] by MSSA). Mortality was higher in patients with MRSA infection (3/7 vs 0/19). The most frequent clonal complex (CC) was CC5 (38.1%). MSSA showed greater genetic variability (9 CCs) than MRSA (3 CCs).

Eighteen cases were included in the retrospective study of PJI caused by MRSA. Ten (55.6%) showed treatment failure. All the strains belonged to CC5 and all, except one, to ST125. Phage-transmitted immune system evasion genes (*chp*, *sak* and *scn*) were more frequent among episodes with treatment failure (80.0 vs 37.5%). In the prospective multicentre study of PJI, 88 patients were included (39.8% men, age 74.7 \pm 14.1 years). Sixty-four had acute infection (early postoperative [EPI] and haematogenous) and 24 chronic infection. Twenty cases (22.7%) were caused by MRSA. A high genotypic diversity was observed, including 16 CCs, with CC5 being the most frequent (30.7%). *agr* functionality was higher in the EPI than in the chronic (55.6 vs 28.6%; $p = 0.041$). No differences were found between the EPIs with onset of symptoms within 30 days after surgery and those between 30-90 days. Treatment failure (36.5%) was lower among the cases managed with prosthesis removal. In cases treated with debridement and implant retention, there was less failure among those who received rifampin. No genotypic or phenotypic characteristic was associated to failure, except the vancomycin minimum inhibitory concentration (MIC) ≥ 1.5 mg/L (23.1% in failure vs 3.4%; $p = 0.044$). The MBEC₅₀ (minimum biofilm eradication concentration) was > 128 mg/L for all the tested antibiotics and showed no association with the prognosis.

WGS showed diversity in the genetic characteristics of the strains, with CC5 ST125 *spa* type t067 being the most frequent clone, especially in MRSA. The prevalence of genes encoding adhesins and biofilm-forming proteins was high. The phenotypic and genotypic antimicrobial resistance profile was correlated in most cases. No genes were found associated with the presentation and clinical outcome of PJI. However, some genes were found associated to oxacillin resistance. The strains were grouped phylogenetically by similarity of CCs and STs. No genes associated with persistence or recurrence of PJI were found with respect to the recovery. The comparison between the initial strain and the recurrent or persistent strain from the same patient showed modifications in antibiotic resistance genes and, mainly, in adhesins. In CC5 MRSA strains causing joint infection, a greater presence of the aminoglycoside resistance gene *aph(3')-III* was observed during the period 2005-2010 compared to the period 2011-2017 (71.4% vs 33.3%, $p = 0.023$), and of the *ant(6)-Ia* gene (71.4% vs 33.3%, $p = 0.023$). Significant genomic differences among hospitals or among strains causing native arthritis and PJI were not observed.

CONCLUSIONS

In joint infection, a complex interaction is established between the host, the microorganism, and the prosthesis in the PJI. The treatment failure of joint infection continues to be high. In native arthritis, this failure was greater in cases caused by MRSA than by MSSA.

In the PJI, greater *agr* functionality was observed in the EPI and no differences were found between these cases regardless of the symptoms duration. A comprehensive comparison of clinical, microbiological and molecular characteristics did not show significant factors associated with treatment failure of *S. aureus* PJI, except the vancomycin MIC, which was slightly higher in cases with unfavourable outcome. However, *S. aureus* can modify its genotype during the clinical evolution of PJI, adapting to recur or persist.

The predominant clone of *S. aureus* in joint infection is CC5 ST125 *spa* type t067, specially in MRSA. This clone has remained stable, showing no significant genomic differences in the last 12 years.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. INFECCIÓN ARTICULAR

Las infecciones articulares son procesos asociados a un difícil tratamiento médico-quirúrgico y a numerosas complicaciones. Su diagnóstico requiere un abordaje multidisciplinar y un diagnóstico rápido y preciso que permita instaurar precozmente el tratamiento adecuado (1).

1.1 ARTRITIS SÉPTICA NATIVA

1.1.1 Epidemiología y etiología de la artritis séptica nativa

La incidencia de la artritis séptica de articulación nativa (no protésica) es de aproximadamente dos casos por 10000 personas al año (2). Supone una emergencia médica que requiere un diagnóstico y tratamiento rápidos porque produce una importante morbilidad y mortalidad (3,4). El factor de riesgo más importante para tener una artritis séptica es tener una enfermedad articular previa como artritis reumatoide, gota, osteoartritis, lupus o un trauma o una cirugía reciente. Los pacientes con artritis reumatoide tienen un elevado riesgo de artritis séptica debido al daño articular y al tratamiento inmunosupresor. Otros factores de riesgo para padecer una artritis séptica nativa son: diabetes mellitus, consumo de drogas intravenosas, cirrosis, enfermedad renal, medicación inmunosupresora, enfermedad cutánea (psoriasis, eccema, úlceras) y una mordedura previa (2,3). Como predictores de un mayor daño articular en la artritis nativa se encuentran: edad mayor de 65 años, enfermedad poliarticular, diabetes mellitus e infección por estreptococos β -hemolíticos. La frecuencia de complicaciones y fracaso terapéutico en la artritis séptica nativa es elevada (40%), y la mortalidad de un 9% (2,5).

Introducción

En cuanto a la etiología, la causa más común de artritis séptica nativa es *Staphylococcus aureus* (52% de los casos), seguido de otras bacterias grampositivas, especialmente el grupo de estreptococos. La frecuencia de bacterias gramnegativas (10-15% de los casos) es mayor en población de edades extremas: en ancianos por una mayor comorbilidad y en niños, en los últimos tiempos, se ha reconocido al bacilo gramnegativo *Kingella kingae*, como una etiología de artritis nativa importante. *Streptococcus pneumoniae* es la causa de, aproximadamente, el 3% de los casos de artritis séptica y *Neisseria gonorrhoeae* del 1%. Éste último microorganismo era una causa frecuente de artritis nativa en adultos jóvenes en Estados Unidos, pero desde los años 80 del siglo XX ha disminuido notablemente su incidencia. Los adictos a droga por vía parenteral, en los que también predomina la infección estafilocócica, son especialmente susceptibles a infecciones bacterianas mixtas y fúngicas, y a microorganismos más inusuales, como *Mycobacterium tuberculosis*. Otra posible etiología de la artritis nativa es *Brucella* spp., asociada al consumo de productos lácteos no pasteurizados (2,3,6).

1.1.2 Patogenia y presentación clínica de la artritis séptica nativa

Las artritis nativas son normalmente de adquisición hematógena, a partir de una bacteriemia (sintónica o subclínica). El sinovio es un tejido vascular que carece de membrana basal protectora, haciéndolo vulnerable a la siembra hematógena. Roturas mínimas en la piel o en las membranas mucosas podrían permitir que estafilococos o estreptococos accedan al torrente sanguíneo. Alternativamente y con menor frecuencia, la artritis séptica es el resultado directo de un trauma penetrante, si bien ésta es la forma más común de infección de pequeñas articulaciones de manos y pies (2). También la cirugía articular (por ejemplo, tras una artroscopia) puede ser la causa de una infección posterior.

El daño articular en la artritis séptica se produce como resultado de la invasión bacteriana, la inflamación y la isquemia tisular. Las enzimas y toxinas bacterianas dañan directamente el cartílago, junto con la reacción de los neutrófilos del hospedador, que liberan especies reactivas de oxígeno y proteasas lisosomales. Las citoquinas participan asimismo en el daño del cartílago y la isquemia también tiene un papel importante en

el daño sinovial. Además, el cartílago es un tejido avascular y altamente dependiente de la difusión de oxígeno y nutrientes desde el sinovio (2).

Como consecuencia de todo lo anterior, los pacientes con artritis séptica se caracterizan por fiebre, calor e inflamación de la articulación, dolor articular e impotencia funcional. Esta presentación clínica aguda se produce principalmente en las artritis causadas por microorganismos piógenos, pero la presentación de la artritis nativa puede ser más subaguda o crónica en infecciones causadas por estafilococos coagulasa negativos (postquirúrgicas), hongos o *M. tuberculosis*. La rodilla es la principal articulación afectada por la artritis séptica (45% de los casos) (2).

1.1.3 Diagnóstico y tratamiento de la artritis séptica nativa

La definición más ampliamente aceptada de artritis séptica es la propuesta por Newman (7), en el que un caso con artritis séptica nativa debe de cumplir al menos uno de los siguientes criterios:

- Aislamiento de un microorganismo de la articulación afectada.
- Aislamiento de un microorganismo en otro lugar, junto con signos de inflamación articular.
- Características clínicas y líquido articular turbio con antibioterapia previa.
- Evidencia histológica o radiológica compatible con artritis séptica.

Idealmente, la artritis séptica nativa debe confirmarse por el diagnóstico microbiológico del líquido sinovial, pero muchas veces el diagnóstico es clínico. En los pacientes con artritis séptica la velocidad de sedimentación globular (VSG), la proteína C reactiva (PCR) y los leucocitos generalmente están elevados. La obtención del líquido sinovial es fundamental para el diagnóstico microbiológico y para obtener el recuento leucocitario porque, a pesar de que no existe un punto de corte definido, la probabilidad de que una artritis nativa sea séptica se incrementa con el recuento leucocitario (si es >50000 células/mm³ es muy sugestivo de artritis séptica) (3,8). La tinción de Gram del líquido sinovial identifica al microorganismo causante de la infección en un 70% de los casos de artritis causadas por grampositivos y en un 40% para las artritis causadas por

Introducción

gramnegativo; mientras que el cultivo microbiológico identifica el microorganismo causante de la infección en un 80% de las artritis. Deben obtenerse también hemocultivos en los casos de sospecha de artritis séptica, ya que al menos un tercio de los pacientes con artritis séptica cursan con bacteriemia y, además, en el 14% de los pacientes el diagnóstico microbiológico se consigue gracias al hemocultivo (2). Siempre se deben de obtener hemocultivos y el líquido sinovial antes de iniciar el tratamiento antibiótico. Las pruebas de imagen como la radiografía simple, la tomografía computarizada (TC) y la resonancia magnética (RM) pueden ser útiles en el diagnóstico de la artritis séptica nativa (3).

El tratamiento de la artritis séptica nativa requiere antibioterapia y drenaje de la articulación. Como la artritis séptica es rápidamente destructiva, el tratamiento empírico debe implantarse lo antes posible según la presentación clínica, los factores de riesgo y la resistencia local a antibióticos. Una vez que el microorganismo es identificado, la terapia se basa en los resultados del estudio de sensibilidad. El tratamiento habitual inicial de la artritis séptica estafilocócica se realiza con cloxacilina o vancomicina, en el caso de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM). En cambio, la ceftriaxona se usa para la infección estreptocócica y la causada por bacterias gramnegativas sensibles. En general, la artritis séptica en el adulto se trata durante 3-4 semanas habitualmente, inicialmente por vía intravenosa y posteriormente con antibióticos orales con buena biodisponibilidad (2,4,9). El desbridamiento de la articulación es esencial en el manejo de la artritis infecciosa. La artrocentesis es menos invasiva que el drenaje quirúrgico (artroscopia o artrotomía). No existe evidencia definitiva para recomendar un abordaje respecto otro y la mayoría de los estudios se centran en articulaciones específicas, pero la artrotomía abierta es preferida en articulaciones de gran tamaño (rodillas, caderas, hombros, etcétera) y en situaciones específicas como en articulaciones con enfermedad articular severa preexistente (4).

1.2 INFECCIÓN PROTÉSICA ARTICULAR

1.2.1 Epidemiología de la infección protésica articular

La implantación de una prótesis articular es una práctica habitual en la mayoría de los hospitales. La infección es la complicación más importante (Figura 1), produciendo una significativa morbilidad en el paciente y un elevado coste hospitalario (10–13). El número de artroplastias implementadas está en aumento a nivel mundial. En España se estima que se realizan anualmente unas 30000 artroplastias (10–14). Las prótesis actuales suelen incluir componentes metálicos (típicamente de cromo-cobalto o titanio) y plásticos (polietilenos ultraligeros). Estos componentes se pueden unir al hueso nativo mediante cemento quirúrgico y/o polimetilmetacrilato (15). La susceptibilidad a la infección se incrementa en estas situaciones en las que existe un cuerpo externo porque favorecen la formación de *biofilm* por los microorganismos (11). La patogénesis de la infección protésica articular (IPA) implica interacción entre el microorganismo, la prótesis y el hospedador (13,15–17).

El uso de profilaxis antimicrobiana preoperatoria ha disminuido la incidencia de IPA (18). En pacientes con reemplazo articular primario, la tasa de infección en los dos primeros años es de 0.3- 1% en prótesis de cadera y hombro, y de 0.4-2% en prótesis de rodilla. La incidencia de IPA en cirugía de revisión es mayor: 3-6% en prótesis de cadera y rodilla (18,19).

Existen muchos factores de riesgo para desarrollar una IPA, como una artroplastia previa, artritis reumatoide, psoriasis, inmunosupresión, terapia con esteroides, déficit nutricional, obesidad, diabetes mellitus, neoplasia y edad avanzada (11,13,18). La bacteriemia es un factor de riesgo para la IPA hematológica, sobre todo tras una bacteriemia por *S. aureus*, en la que se estima que puede producir una IPA en el 34% de los casos (18). Además, el riesgo de infección hematológica parece mayor en el caso de las prótesis de rodilla que en las de cadera (18).

Los pacientes con IPA tienen con frecuencia un grado bajo de satisfacción con los resultados de la cirugía: solamente un 23% quedan satisfechos y un 18% completamente

Introducción

insatisfechos. Las complicaciones quirúrgicas de una IPA disminuye la calidad de vida de estos pacientes (11).



Figura 1. Infección de prótesis de rodilla (20).

1.2.2 Clasificación de la infección protésica articular: patogenia y presentación clínica

La clasificación de la IPA puede establecerse según la patogenia o según el tiempo de manifestación de los síntomas tras el implante de la prótesis (21).

Según la ruta de infección, ésta puede ocurrir a través de varios mecanismos (11,18,21):

- Infección exógena: la inoculación de los microorganismos se produce a través de la herida quirúrgica durante la cirugía o inmediatamente después.
- Infección hematógena: adquirida a través del torrente sanguíneo o linfático desde un foco distante de infección.
- Infección por contigüidad: desde un foco de infección adyacente, como, por ejemplo, una osteomielitis preexistente o una infección de piel y tejidos blandos.

Más frecuentemente, la IPA es clasificada según el tiempo de aparición de los síntomas tras el implante protésico (17):

- Infección postquirúrgica precoz o temprana: ocurre dentro de los 3 primeros meses tras la cirugía; se asume una patogenia exógena.
- Infección postquirúrgica retardada: ocurre entre el tercer mes y los primeros 24 meses tras la cirugía; se asume también una patogenia exógena.
- Infección postquirúrgica tardía: es diagnosticada después de los primeros 24 meses tras la cirugía; se asume habitualmente una patogenia hematógena

También basada en la cronología de la infección, Tsukayama et al proponen una clasificación basada en 4 tipos de IPA (22):

- Infección postquirúrgica precoz: de patogenia exógena y cuyos síntomas comienzan durante el primer mes tras la implantación protésica.
- Infección postquirúrgica tardía o crónica: de patogenia igualmente exógena, pero cuyos síntomas aparecen pasado el primer mes tras la implantación protésica.
- Infección hematógena: se caracteriza por un inicio agudo de los síntomas en la articulación afectada con la prótesis en el contexto de una bacteriemia, documentada o no.
- Cultivos intraoperatorios positivos (CIOP): de patogenia exógena. Es la infección demostrada a partir de los cultivos quirúrgicos durante la revisión de una prótesis indicada por motivos presuntamente no infecciosos.

Estas dos últimas clasificaciones de IPA (realizadas por Zimmerli et al y por Tsukayama et al) son las más ampliamente utilizadas. Entre ambas existen diferencias en los tiempos para considerar una infección postquirúrgica como precoz o crónica (1 vs 3 meses).

Las infecciones precoces se caracterizan por tener un comienzo agudo de signos clínicos como dolor local, eritema, edema, hematoma y fiebre (17,18). Las infecciones retardadas se caracterizan por un dolor articular de instauración subaguda, que puede aumentar con el tiempo, y aflojamiento del implante. También es característica la

aparición de un trayecto fistuloso. Con todo, los signos clínicos de infección podrían estar ausentes en este tipo de IPA. Por tanto, a veces estas infecciones son difíciles de distinguir de un aflojamiento aséptico (18). Por último, las infecciones postquirúrgicas tardías pueden presentarse repentinamente con síntomas sistémicos (en el 30% de los casos) (18).

1.2.3 Etiología de la infección protésica articular

Las infecciones postquirúrgicas precoces y retardadas suelen adquirirse exógenamente. La primera es principalmente causada por microorganismos virulentos como *S. aureus* o *Escherichia coli*, mientras que las retardadas son causadas típicamente por bacterias menos virulentas como estafilococos coagulasa-negativos o *Cutibacterium acnes* (17,21). Las infecciones tardías suelen ocurrir después de un período postquirúrgico sin síntomas y son causadas por una siembra hematógena (21). El microorganismo que más frecuentemente causa infección hematógena asociada a implantes es *S. aureus* (21).

Según el estudio de Benito et al, realizado en 19 hospitales españoles desde 2003 a 2012, la mayoría de casos de IPA es causada por estafilococos (65%), seguido de *Enterobacteriaceae* (20%) (23). Las siguientes seis especies, en orden decreciente, están implicadas en el 80% de todas las IPAs: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* y *Cutibacterium acnes* (23). Otros microorganismos, como micobacterias u hongos, también pueden causar IPA, pero con una frecuencia mucho menor. Las cuatro especies más frecuentemente implicadas en cada tipo de IPA son (23):

- Infección postquirúrgica precoz: *S. aureus* (36%), *S. epidermidis* (16%), *E. coli* (15%) y *P. aeruginosa* (15%).
- Infección hematógena aguda: *S. aureus* (39%), *E. coli* (13%) y *Streptococcus agalactiae* (11%) y estreptococos del grupo viridans (5%).
- Infección postquirúrgica crónica: *S. epidermidis* (33%), *S. aureus* (20%), estafilococos coagulasa negativos (17%) y *C. acnes* (5%).

Las infecciones polimicrobianas se observan en el 10-11% de los casos de IPA. Por otra parte, en el 10-30% de los casos de IPA no se consigue aislar ningún microorganismo, y,

entre otras razones influye la técnica utilizada para el diagnóstico microbiológico y el haber recibido tratamiento antimicrobiano previo (21).

1.2.4 Diagnóstico de la infección protésica articular

La reunión internacional del consenso en infección protésica articular estableció los criterios diagnósticos. Se considera la presencia de IPA cuando se cumpla al menos uno de los siguientes criterios mayores o tres criterios menores (11,24):

- Criterios mayores:
 - Dos cultivos periprotésicos positivos con identificación fenotípica de microorganismos idénticos.
 - Fístula comunicando con la articulación.
- Criterios menores:
 - PCR y VSG elevadas.
 - Leucocitos elevados en líquido sinovial (punto de corte de 1.100-1.700 células/ μ L).
 - Porcentaje elevado de neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) en líquido sinovial (más de 65% neutrofilia).
 - Análisis histológico positivo del tejido periprotésico.
 - Un único cultivo periprotésico positivo.

La artrocentesis es el mejor método prequirúrgico para establecer el diagnóstico de la IPA. La histopatología es sensible en predecir las infecciones con cultivo positivo, pero tiene una precisión moderada en descartar un diagnóstico. La radiografía simple debería de ser el primer método de imagen para el diagnóstico, aunque tiene poca sensibilidad y especificidad, sin poder diferenciar entre lesiones líticas infecciosas y no infecciosas. La TC mejora la detección de reacción perióstica y la presencia de partes blandas adyacentes a la osteólisis, sugestivas de infección. La RM, por su mayor resolución en contraste, mejora la precisión diagnóstica aunque, como en el caso de la TC, las imágenes pueden resultar artefactadas por la presencia del propio implante protésico (11).

Introducción

En cuanto al diagnóstico microbiológico, la identificación del patógeno causante de la IPA es crítica para realizar un tratamiento antimicrobiano adecuado. El líquido sinovial debe ser enviado al laboratorio de microbiología para cultivo. El Gram del líquido sinovial es muy específico (más del 97%) pero tiene una baja sensibilidad (menos del 26%). Esta técnica debería ser realizada, sobre todo, en casos de infección precoz o hematógena (15). Los cultivos de los exudados de las fístulas deben evitarse, debido a que frecuentemente son positivos por la flora habitual de la piel y tienen una baja correlación con los cultivos de muestras quirúrgicas. Las mejores muestras para diagnosticar los microorganismos causantes de IPA son aquellas obtenidas del tejido periprotésico.

En el contexto de la infección crónica, si no se ha realizado un estudio microbiológico preoperatorio, deben tomarse muestras en la cirugía para realizar dicho estudio y la terapia antimicrobiana debería ser interrumpida al menos dos semanas previas a la cirugía. Se deben tomar al menos cinco o seis muestras de tejido periprotésico para cultivo (con incubación en condiciones aerobias y anaerobias), debido a la baja sensibilidad de un único cultivo y para distinguir contaminantes de patógenos. Dos o más cultivos intraoperatorios o la combinación de aspirado preoperatorio y cultivos intraoperatorios con el mismo microorganismo cultivado, deben considerarse como evidencia de IPA (25). No obstante, el cultivo positivo para un microorganismo virulento (como *S. aureus*) en una única muestra de biopsia o líquido sinovial también se considera representativo de una IPA (26).

Dado que los microorganismos forman *biofilm* en la prótesis, si ésta es explantada, es útil su cultivo después de agitar con vórtex o someter a sonicación (1,13,15). También se recomienda el cultivo de muestras líquidas de pacientes con sospecha de IPA en botellas de hemocultivo, debido a que aumenta la sensibilidad del cultivo convencional (1,27,28). Las técnicas moleculares, como la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y secuenciación del ARN (ácido ribonucleico, *ribonucleic acid* [RNA]) ribosómico 16S, resultan de gran utilidad para el diagnóstico de la IPA con cultivo negativo (15).

1.2.5 Tratamiento de la infección protésica articular

Los objetivos del tratamiento de pacientes con IPA son erradicar la infección, aliviar del dolor y, al mismo tiempo, restaurar la función de la articulación. Estos tres objetivos deben considerarse en combinación, ya que a veces lograr uno de ellos podría interferir con otro (12). El manejo de la IPA es complejo y necesita generalmente un tratamiento quirúrgico y un prolongado tratamiento antimicrobiano. Por tanto, requiere una colaboración multidisciplinar entre todos los especialistas médicos y quirúrgicos implicados. (26).

Existen cinco tipos principales de tratamiento quirúrgico de la IPA (16,26,29):

- Desbridamiento, antibioterapia y retención del implante (DAIR): exige un extenso desbridamiento de la articulación, con escisión de tejidos necróticos e infectados, e idealmente debe realizarse un recambio de los componentes móviles de la prótesis (ej. Piezas de polietileno). Es una estrategia pensada para pacientes con infecciones aguda: infecciones precoces con una prótesis fija sin fístula y con poca duración de síntomas. En pacientes que no cumplen estos criterios, pero para los que otra estrategia quirúrgica es inaceptable o de alto riesgo, podrían ser también candidatos a DAIR, considerando el conjunto de la estrategia como probablemente no curativa, e incluyendo además un tratamiento antimicrobiano supresivo.
- Recambio protésico en dos tiempos: implica extirpar todos los componentes protésicos y cemento seguido de un desbridamiento de los tejidos periprotésicos infectados. En un segundo acto quirúrgico transcurridas unas cuantas semanas, en las que el paciente habrá recibido antibioterapia sistémica, se coloca la nueva prótesis, con la esperanza de que el nuevo lecho quirúrgico sea estéril. Con el fin de preservar el espacio articular, en el primer tiempo quirúrgico se suelen usar espaciadores de cementos (articulados o no), impregnados de antibióticos: esto permite proveer el espacio articular de concentraciones elevadas de antibióticos y a la vez evitar la colonización del espaciador. Este tratamiento quirúrgico es

considerado como el *gold standard* en pacientes con infección crónica con una reserva ósea adecuada y que son clínicamente aptos para varias cirugías. También esta opción quirúrgica es muy adecuada para pacientes con fístulas y con infección por microorganismos difíciles de tratar.

- Recambio protésico en un tiempo: implica extraer todos los componentes protésicos y el cemento, desbridamiento óseo y de tejidos blandos e implantación de una nueva prótesis, todo en un solo acto quirúrgico. Puede ser considerado en pacientes con IPA crónica que presentan tejidos blandos en buena situación, ausencia de fístula y buena reserva ósea, siempre y cuando sea conocido el patógeno causante de la infección y éste sea sensible a antimicrobianos con buena actividad frente a *biofilm*.
- Resección sin reimplantación y artrodesis: implica la resección de la prótesis infectada sin reimplantación de una prótesis de revisión. Se puede realizar la artrodesis de la articulación con un fijador externo o un clavo intramedular. En la cadera, puede realizarse una artrodesis sin necesidad de material de síntesis ósea (cirugía de *Girdlestone*). Las indicaciones de este procedimiento quirúrgico son limitadas. Podría considerarse en pacientes con una reserva ósea limitada, poco tejido blando o con infecciones debidas a microorganismos muy resistentes con limitadas opciones terapéuticas; o bien, en paciente excluidos de múltiples cirugías mayores por sus condiciones médicas; o en pacientes en los que un recambio previo en dos tiempos ha fracasado y el riesgo de recurrencia de la infección después de otro recambio es inaceptable.
- Amputación: debe ser la última opción a considerar, pero podría ser apropiada en algunos casos, tales como en aquéllos con infecciones graves que pongan en peligro la vida del paciente, casos con pérdida severa de reserva ósea, con incapacidad de lograr cobertura de tejidos blandos o en casos en los que un intento previo de resección de la artroplastia para controlar la infección haya fracasado.

En cuanto al tratamiento antimicrobiano, hay que considerar que la IPA se caracteriza por la presencia de bacterias embebidas en *biofilm*, en una fase estacionaria de crecimiento y con tolerancia fenotípica a los antibióticos. Aunque todos los grupos de

antimicrobianos pierden efectividad frente a bacterias estacionarias, no todos lo hacen en la misma proporción, y existen por tanto antibióticos con actividad *antibiofilm* más destacada. Aunque cada etiología y cada infección tienen sus particularidades, la rifampicina en el caso de grampositivos (fundamentalmente estafilococos) y las fluoroquinolonas en el de los gramnegativos son los grupos más destacados en las infecciones asociadas a *biofilm*. Sin embargo, aunque la presencia de *biofilm* es lo característico de las IPAs, también es importante considerar la presencia de bacterias en fase planctónica o logarítmica de crecimiento, especialmente cuando la presentación clínica de la IPA es aguda (IPA postquirúrgicas precoces y hematógenas). Después del desbridamiento quirúrgico, debe administrarse un tratamiento antibiótico inicial con buena actividad contra la bacteria planctónica de crecimiento rápido, idealmente betalactámicos, lipopéptidos o glicopéptidos. Dada la biodisponibilidad de estos grupos antimicrobianos, se recomienda la administración intravenosa de este tratamiento inicial durante un tiempo variable que habitualmente dura siete días, antes de cambiar a una terapia antimicrobiana centrada en la bacteria formadora de *biofilm*. Existe una estrategia terapéutica supresiva para los casos de IPA en los que no se puede llevar a cabo un tratamiento quirúrgico o éste va a ser insuficiente para erradicar la infección. Se podrá aplicar en casos de IPA en los que el microorganismo causante de la infección esté identificado y cuando haya disponibles antimicrobianos orales que no sean tóxicos en administración durante largos períodos de tiempo (12).

Las infecciones estafilocócicas manejadas con retención del implante deben tratarse inicialmente (bacteria planctónica), con cloxacilina (o cefazolina) si la cepa es sensible a meticilina, con vancomicina si es resistente, o también pueden tratarse con cloxacilina y daptomicina intravenosas en ambos escenarios. En una segunda fase, el tratamiento de elección de la IPA estafilocócica es una combinación de rifampicina, idealmente con una fluoroquinolona, hasta completar 3-6 meses; aunque algunos estudios sugieren que pautas más cortas de 8 semanas pueden ser igualmente eficaces. Si las fluoroquinolonas no pudieran ser usadas se recomienda una combinación de rifampicina con cotrimoxazol, linezolid, clindamicina, ácido fusídico o daptomicina. Si la rifampicina no

podiera usarse se recomiendan las combinaciones de daptomicina con fosfomicina, cloxacilina, linezolid, cotrimoxazol o levofloxacino; o combinaciones de dos antibióticos orales o monoterapia con levofloxacino, o moxifloxacino, cotrimoxazol, o linezolid (12).

2. *Staphylococcus aureus*

2.1 GENERALIDADES

Staphylococcus aureus fue descubierto por primera vez en 1880 en Aberdeen, Escocia, por el cirujano Alexander Ogston en pacientes con llagas ulceradas. Esta bacteria pertenece al género *Staphylococcus*, y al filo *Firmicutes*. *S. aureus* es la especie con mayor relevancia clínica del género y está presente en la microbiota comensal humana de la mucosa nasal en el 20-40% de la población general. Al microscopio es positivo para la tinción de Gram, mide aproximadamente 0.8 μm de diámetro, y forma cocos que se disponen en "cadenas de uvas" (Figura 2 izquierda). *S. aureus* es una bacteria aerobia o anaerobia y crece de forma óptima a 37 °C y a pH 7.4. Las colonias en la placa de agar sangre son gruesas, brillantes y redondas con un diámetro de 1 a 2 mm. La mayoría de de *S. aureus* son hemolíticos, formando un anillo hemolítico transparente alrededor de las colonias en placas de agar sangre (Figura 2 derecha). Además, *S. aureus* no forma esporas ni flagelos (es inmóvil), posee una cápsula, puede producir un pigmento amarillo dorado y descomponer el manitol. Además, es positivo para la prueba de coagulasa plasmática y la desoxirribonucleasa y fermenta la lactosa (30).

S. aureus contiene con un gran repertorio de factores de virulencia, que le permiten producir una gran variedad de infecciones en el ser humano (31,32). La entrada de *S. aureus* en el torrente sanguíneo ocurre frecuentemente por la colonización de catéteres intravenosos o heridas. *S. aureus* tiene gran habilidad para escapar del torrente sanguíneo y producir una infección secundaria en prácticamente cualquier tejido, produciendo una amplia variedad de infecciones como endocarditis, abscesos tisulares, meningitis, osteomielitis y artritis séptica. En conjunto, la mortalidad de la bacteriemia producida por *S. aureus* es del 10-30% de los casos, de ahí la importancia de realizar un tratamiento lo más rápidamente posible (33).

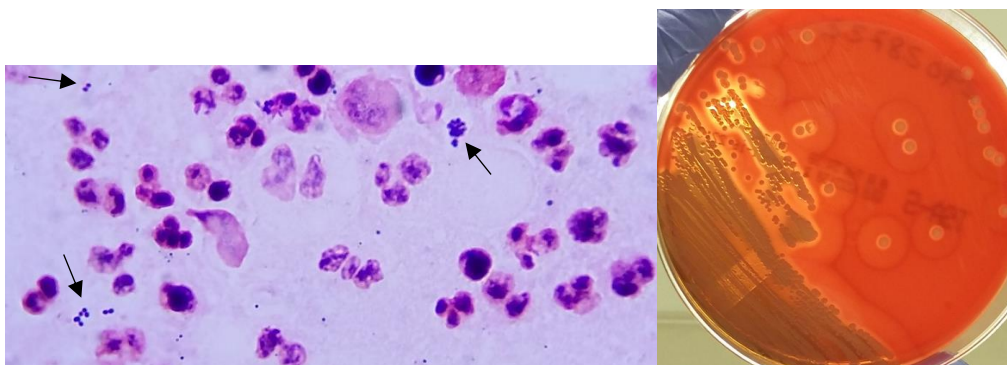


Figura 2. Tinción de Gram de líquido articular de paciente con infección protésica articular causada por *S. aureus* (izquierda. *S. aureus* está señalado con flechas) y colonias hemolíticas de *S. aureus* en cultivo de agar sangre (derecha).

2.2 GENOMA DE *S. aureus*

S. aureus es un microorganismo versátil y de gran diversidad genética, con un tamaño medio de genoma de 2.8 millones de bases (Mb) (34). El genoma se puede clasificar en genoma core y accesorio. El genoma core es el conjunto de genes presentes en el genoma de todas las cepas (generalmente contiene información genética esencial relacionada con el metabolismo celular y la replicación). Comprende aproximadamente el 75% del genoma de *S. aureus* y está muy conservado. El genoma accesorio comprende el 25% restante del genoma y es responsable de la diversidad genética, donde se encuentran los genes responsables de regular la virulencia, de la evasión del sistema inmune y de la resistencia antibiótica. El genoma accesorio está formado por muchos elementos genéticos móviles (MGEs, elementos genéticos móviles, *mobile genetic elements*) como islas de patogenicidad, bacteriófagos, *cassettes* cromosómicos, transposones y plásmidos, que se adquieren por transferencia horizontal entre cepas. La ganancia y pérdida de determinantes de virulencia que portan los MGEs tienen un papel muy importante en la adaptación, virulencia y supervivencia bacteriana (35–37).

En la Figura 3 se observa una representación del genoma de *S. aureus*. Cada círculo concéntrico, numerado desde el círculo más externo al círculo más interno, representa los datos genómicos de la cepa FPR3757 de *S. aureus* USA300 y la comparación con las

Introducción

cepas de *S. aureus* COL, N315, MW2 y MRSA252. El primer y segundo círculo representan secuencias de codificación predichas en las hebras positiva y negativa, respectivamente, coloreadas por categorías funcionales: salmón, biosíntesis de aminoácidos; azul claro, biosíntesis de cofactores y transportadores; verde claro, envoltura celular; rojo, procesos celulares; marrón, metabolismo intermediario central; amarillo, metabolismo del ADN (ácido desoxirribonucleico, *desoxyribonucleic acid* [DNA]); verde, metabolismo energético; morado, metabolismo de ácidos grasos y fosfolípidos; rosa, metabolismo proteico; naranja, purinas, pirimidinas, nucleósidos y nucleótidos; azul, funciones reguladoras; gris, transcripción; verde azulado, proteínas de transporte y unión; negro, proteínas hipotéticas e hipotéticas conservadas. El tercer círculo muestra rARN (ácido ribonucleico ribosómico) (rojo), sARN (ácido ribonucleico pequeño, regulatorio) (azul) y tARN (ácido ribonucleico de transferencia) (verde). El cuarto (USA300 cepa FPR3757), quinto (cepa COL), sexto (N315), séptimo (cepa MW2) y octavo (cepa MRSA252) círculos muestran islas del genoma involucradas en patogenicidad (verde o rojo), profago (negro), SCC*mec* (*staphylococcal cassette chromosome mec*) (azul) y ACME (elemento móvil catabólico de arginina, *arginine catabolic mobile element*) (azul claro). El noveno círculo muestra los SNPs (*single nucleotide polymorphism*, polimorfismos de un solo nucleótido) totales por 5 kb en comparación con la cepa COL de *S. aureus*. Los círculos décimo y undécimo representan el número de SNPs sinónimos y no sinónimos en las secuencias codificantes, respectivamente, en comparación con la cepa COL (38).

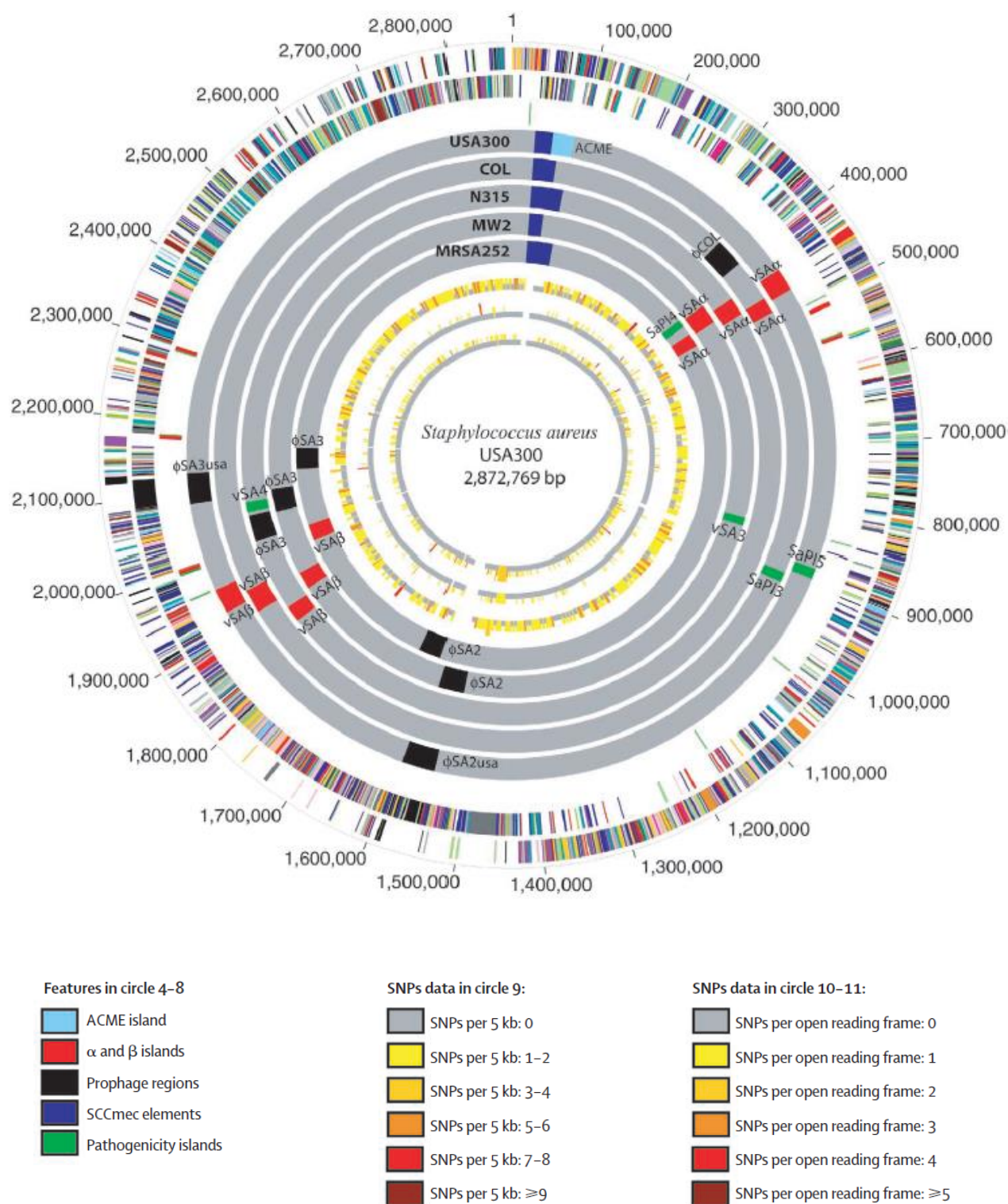


Figura 3. Cromosoma de *S. aureus* USA300 (38).

2.2.1 Técnicas moleculares para estudiar el genoma bacteriano

Un gran avance en la aproximación de la investigación de las infecciones se consiguió con la introducción de las técnicas de biología molecular. La PCR generó una gran revolución en 1984, ya que supuso una nueva forma de detectar rápidamente genes que codifican para proteínas implicadas en la resistencia a antibióticos o para factores de virulencia (39). Gradualmente, se desarrollaron nuevos métodos que permitieron la caracterización molecular y genotipado de cepas (Tabla 1).

En 1991 la electroforesis en gel en campo pulsante (PFGE, *pulsed field gel electrophoresis*) hizo posible la identificación y tipificación bacteriana en estudios epidemiológicos, como en el caso de brotes epidémicos. En una PFGE se digiere el ADN genómico con enzimas de restricción específicas y los fragmentos de ADN obtenidos se separan en un gel mediante electroforesis en campo pulsante, que permite la separación de los fragmentos según su tamaño (39,40).

El método de tipado por secuenciación de múltiples locus (MLST, *multilocus sequencing types*) es un método basado en la secuenciación de ADN que se introdujo en 1998. Mediante este método se amplifican y secuencian fragmentos variables de siete genes conservados de cada cepa. La identificación de cada uno de los siete alelos genera un perfil alélico que define lo que se conoce como tipo de secuencia o *sequence type* (ST). El MLST es fundamental para identificar clones en poblaciones bacterianas. La gran variedad genética de *S. aureus* se organiza de forma útil en complejos clonales (CCs). El CC es un grupo de cepas con MLST que sólo difieren en uno (o a veces dos) de los siete sitios MLST. Las cepas que forman parte de un mismo CC descienden de un ancestro común y tienen mucha menos diversidad entre ellas que con cepas de un CC diferente (36,40).

Para *S. aureus* existe el método de tipificación de *spa* (*spa typing*), que permite tipificar las cepas mediante el gen *spa*, que codifica para la proteína A de *S. aureus*. Concretamente, se analiza la secuencia de la región polimórfica X del locus *spa*, constituido por un número variable de repeticiones de 24 pares de bases (pb). En esta técnica se amplifica y secuencia esa región repetida del gen *spa* y el *spa type* se determina por el orden de esas repeticiones (39,41).

Otro elemento importante en el estudio epidemiológico del SARM es el elemento genético móvil *SCCmec* (*staphylococcal cassette chromosome mec*) (23 a 68 kb). Existen doce tipos diferentes de *SCCmec* (I-XII), que han sido identificados y clasificados según el tipo del complejo *ccr* (*cassette chromosome recombinase*). Todos los tipos de *SCCmec* contienen el gen *mecA*, a excepción del tipo XI, que contiene el gen *mecC* (31,37,42).

La PFGE, aunque es muy laboriosa, es la técnica de referencia de tipificación molecular debido a que tiene un elevado poder de discriminación. Tras la PFGE, la técnica de tipificación molecular más discriminativa es el *spa typing*, y después el MLST, según el cual se asignan los CCs (40,43,44).

Los *arrays* de ADN son unos sistemas muy eficientes con los que se puede realizar una extensa evaluación de secuencias de ADN mediante hibridación, con sondas (oligonucleótidos o fragmentos de ADN) que están fijas a un sustrato sólido (39). En los últimos años, la secuenciación de genoma completo (SGC) ha permitido obtener cada vez más información sobre el genoma bacteriano, permitiendo realizar estudios más completos. La SGC cada vez está más disponible, tanto en investigación como en diagnóstico clínico, revolucionando la microbiología y complementando los estudios fenotípicos. La SGC puede proporcionar en un único proceso analítico la identificación bacteriana, la detección de resistencia a antimicrobianos y de factores de virulencia y la tipificación bacteriana y relación entre especies mediante estudios filogenéticos analizando variantes entre cepas (42).

Tabla 1. Descripción general de las técnicas utilizadas para la caracterización molecular de *S. aureus*. Modificado de Turner et al (37)

Técnica	Metodología	Ventajas	Desventajas
PFGE	El ADN es fragmentado por enzimas de restricción y los fragmentos resultantes son separados por un campo eléctrico que cambia periódicamente de dirección	Muy discriminatorio, ampliamente disponible y de bajo coste relativamente	Laborioso, variabilidad entre laboratorios, no muy adecuado a largo plazo o para estudiar la epidemiología global
MLST	Comparación de secuencias parciales de siete genes conservados. Base de datos estandarizada de MLST. Las cepas se definen por combinaciones particulares de alelos	Altamente discriminatorio y reproducible, adecuado para estudiar a largo plazo la epidemiología	Caro y laborioso
<i>Spa</i> typing	Análisis de la secuencia de la región polimórfica X del locus <i>spa</i> , constituido por un número variable de repeticiones de 24 pb. Bases de datos internacionales (Ridom o eGenomics)	Rápido y adecuado para investigación de brotes	Moderadamente caro (aunque menos costoso que MLST)
SCCmec typing	Técnica basada en PCR en la que los tipos de SCCmec se asignan a determinados alotipos de los genes <i>ccr</i> y <i>mecA</i>	Menos caro que MLST o secuenciación de genoma completo	Uso limitado a SARM. Los tipos de SCCmec se encuentran en evolución y algunos recientemente descubiertos no se detectan con los métodos actuales
SGC	Análisis de la secuencia completa del genoma para variantes de un solo nucleótido	Preciso y altamente discriminatorio	Costoso. Se requiere extenso análisis de datos y conocimientos de bioinformática

Abreviaturas: ADN, ácido desoxirribonucleico; MLST, tipado por secuenciación de múltiples locus, *multilocus sequencing typing*; pb, pares de bases; PFGE, electroforesis en gel en campo pulsante, *pulsed field gel electrophoresis*; SARM, *S. aureus* resistente a meticilina; SCCmec, *staphylococcal cassette chromosome mec*; SGC, secuenciación de genoma completo.

2.3 EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *S. aureus*

Los CCs predominantes de *S. aureus* son CC5, CC8, CC398 y CC30, que constituyen el 94% de los genomas de *S. aureus* (36,37). El SASM muestra una mayor diversidad genética que el SARM, cuya variabilidad difiere considerablemente más entre países con tipos de *spa* dominantes formando *clusters* geográficos característicos (45). Los tipos de *spa* más ampliamente distribuidos en el mundo son el t008 y el t002. Los tipos de *spa* más prevalentes por continentes son los siguientes: t032, t008 y t002 en Europa; t037 y t002 en Asia; t008, t002, y t242 en América; t037, t084, y t064 en África; y t020 en Australia (Figura 4). Los tipos de SCCmec más prevalentes en Europa y América son el IV y el II; en Asia el III y el II; en África el IV y el V; y en Australia el IV y el III (46).

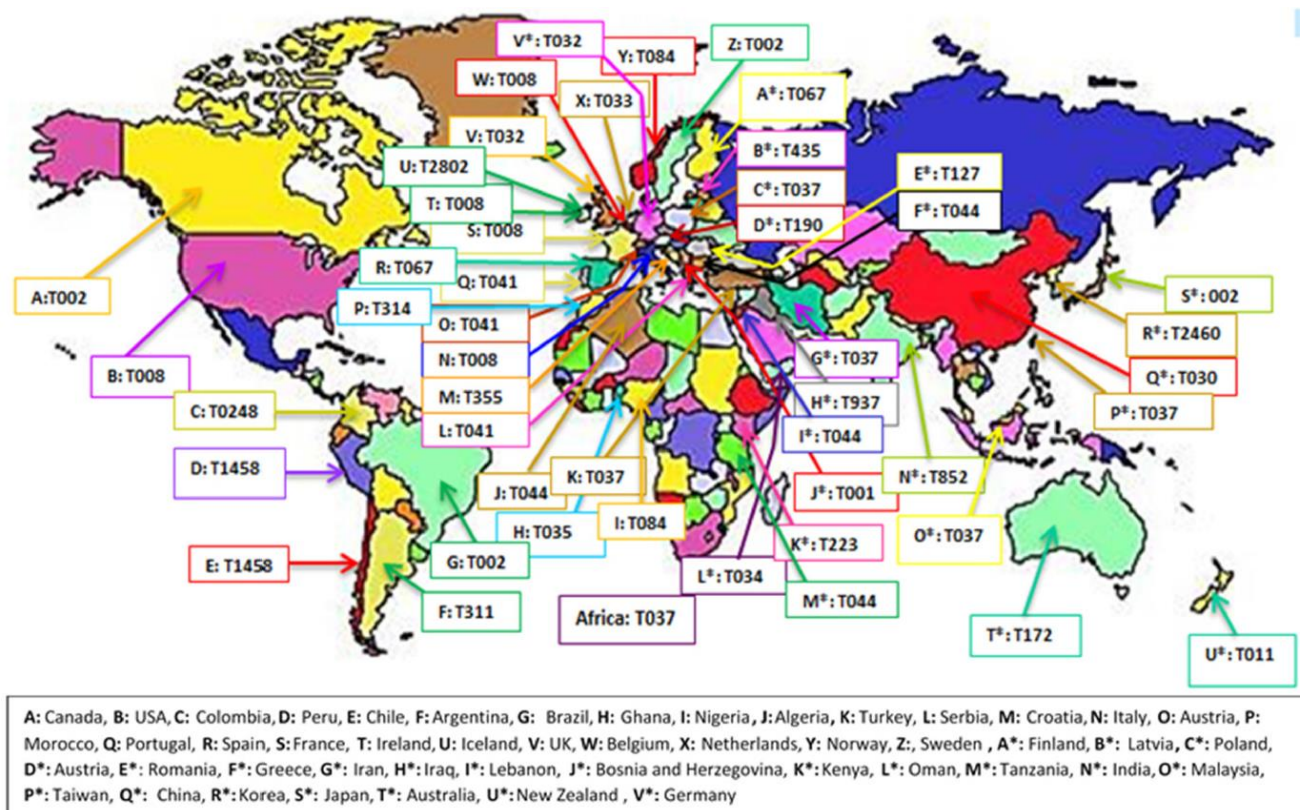


Figura 4. Tipos de *spa* de *S. aureus* más prevalentes en el mundo (46).

El clon de *S. aureus* predominante en España es el CC5, ST125, *spa type* t067 y el tipo de *agr* mayoritario es el tipo II. (47–49). En España los tipos de *spa* más frecuentes entre los SASM y su proporción relativa son: t002 (12.4%), t012 y t067 (8.0%) y t015 (4.5%). Entre los SARM, los tipos de *spa* más frecuentes en España son: t067 (47.3%), t002 (15.4%) y t008 (7.7%) (45). Dentro del SARM, predomina el SCCmec IV (48).

Existen pocos estudios que hayan profundizado en la epidemiología molecular de *S. aureus* causante de infección articular, sin embargo, algunos de ellos han destacado la importancia del complejo clonal CC5 como causante de infección articular (50,51).

2.4 VIRULENCIA DE *S. aureus*

2.4.1 Regulación de la virulencia de *S. aureus* y adaptación

La mayoría de los factores de virulencia de *S. aureus* son regulados principalmente por el sistema *agr* (gen regulador accesorio) (Figura 5). Este operón consiste en dos unidades transcripcionales divergentes, RNAII y RNAIII, cuya transcripción conduce a los promotores P2 y P3, respectivamente. La expresión de P2 produce los componentes de un sistema *quorum-sensing* (*agrB*, D, C, A) y la expresión de P3 produce la molécula efectora de *agr* RNAIII (33,52). El *quorum-sensing* es la regulación genética dependiente del ambiente y de la densidad poblacional que ocurre a través de la comunicación entre células (52). Existen cuatro variantes alélicas de *agr* (tipos I-IV), cada uno de los cuales codifica un péptido autoinductor (AIP, *autoinductor peptide*) distinto, que son precursores peptídicos de la señal del *quorum-sensing*. El mecanismo de RNAIII es responsable de la regulación postranscripcional de múltiples factores de virulencia, mediando un cambio de la expresión de proteínas asociadas a la superficie celular y de toxinas secretoras (33). El *agr* principalmente activa los factores de virulencia secretoras e inhibe las proteínas de la superficie celular en *S. aureus* (53). En el inicio de la infección, la baja densidad celular y, consecuentemente, la baja expresión de *agr* produce un incremento en la producción de proteínas de superficie requeridos para la colonización inicial de los tejidos. Una vez establecida, la bacteria alcanza una elevada densidad celular, requiriendo una mayor protección de las defensas del hospedador, que se consigue con una activación de *agr* que activa la síntesis de proteínas secretoras que permiten la diseminación y progresión de la enfermedad. (52). Entre las proteínas

secretoras que activa el *agr* se encuentran toxinas (α , β , γ y δ -hemolisina y las leucocidinas LPV [leucocidinas como la de Panton-Valentine], LukDE y LukGH), superantígenos (TSST [toxina del shock tóxico] y enterotoxinas), lipasas, proteasas y nucleasas. Por el contrario, la inhibición del *agr* conduce a un aumento en la formación de *biofilm*, aumentando la expresión de las adhesinas (como la proteína A [Spa] y la proteína de unión a fibronectina [FnBP]) y disminuyendo la producción de proteasas. De esta manera, la bacteria puede colonizar dispositivos médicos.

La pérdida de funcionalidad de *agr* también aumenta la supervivencia de los estafilococos en el interior de las células, donde está más protegido del sistema inmune y de la acción de algunos antibióticos. Además, la disminución en la producción de toxinas mediada por *agr* produce una respuesta inmune más débil. Esto es ejemplificado por la emergencia de variantes de colonia pequeñas (SCVs, *small colony variants*), que está muy asociadas a infecciones crónicas y persistentes o recidivantes (33,52,53).

Además del sistema regulador *agr*, existen otros sistemas de regulación en *S. aureus*, como el sistema LuxS (52), los reguladores de la familia Sar, como SarA, y el factor alternativo sigma, SigB. Estos últimos, junto con el *agr*, tienen un papel fundamental en la regulación de la formación de *biofilm* (54,55). SarA es un regulador citoplasmático que induce exoproteínas y reprime a *spa*. SigB es un factor sigma (componente de la ARN polimerasa) en fase estacionaria e inhibe la actividad del *agr* (56).

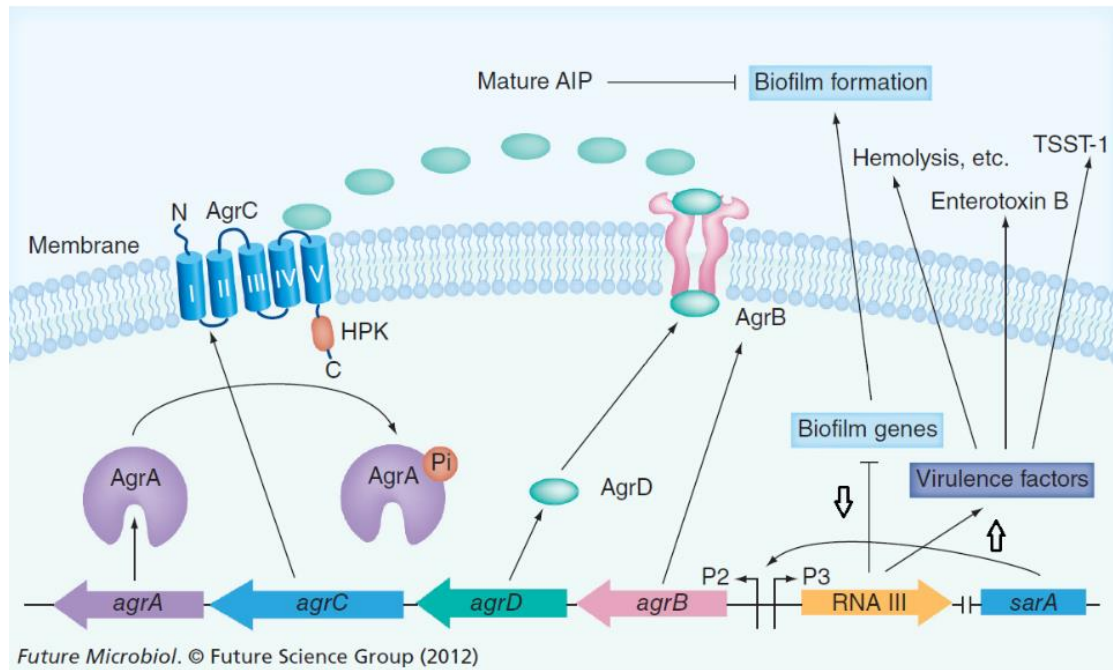


Figura 5. Regulación de virulencia por el sistema *agr*. Modificado de Hao et al (57).

En la Figura 6 se observa el papel del *agr* en la osteomielitis. Las cepas de *S. aureus* producen factores de virulencia que incluyen proteínas citotóxicas, como modulinas solubles en fenol (PSMs, *phenol-soluble modulins*) y LPV que se insertan en las membranas de neutrófilos y células óseas para inducir la muerte celular de una manera dependiente de *agr*. Las cepas de *S. aureus* con elevada expresión de *agr* también producen α -hemolisina o α -toxina (Hla), que induce la producción de citoquinas proinflamatorias y mejora la resorción ósea. Además, la producción de proteína análoga al complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (Map) provoca la supresión de la inmunidad de las células T. Las cepas de *S. aureus* con mutaciones en el *agr* se encuentran frecuentemente en infecciones crónicas, por lo que las bacterias exhiben características que permiten una colonización persistente. La coagulasa (Coa) y la proteína de unión al factor de von Willebrand (vWbp) contribuyen a la formación de matriz de fibrina que facilita la unión bacteriana. La proteína estafilocócica A (SpA) aumenta en ausencia de RNAIII y tiene funciones inmunomoduladoras (58).

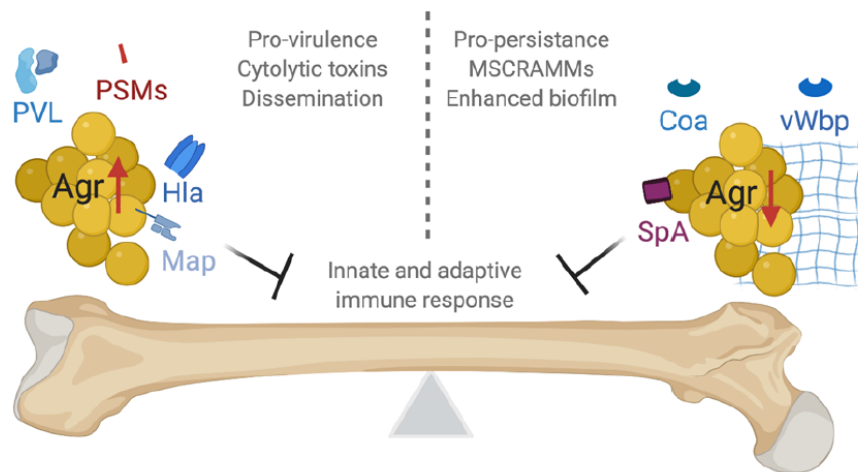


Figura 6. Efectos de la funcionalidad de *agr* en la osteomielitis (58).

2.4.2 Factores de virulencia

S. aureus tiene un gran número de factores de virulencia (Figura 7) con múltiples funciones que le permiten desarrollar su patogenicidad causando diversos tipos de infección (37). Estos factores de virulencia son estructurales o productos secretados.

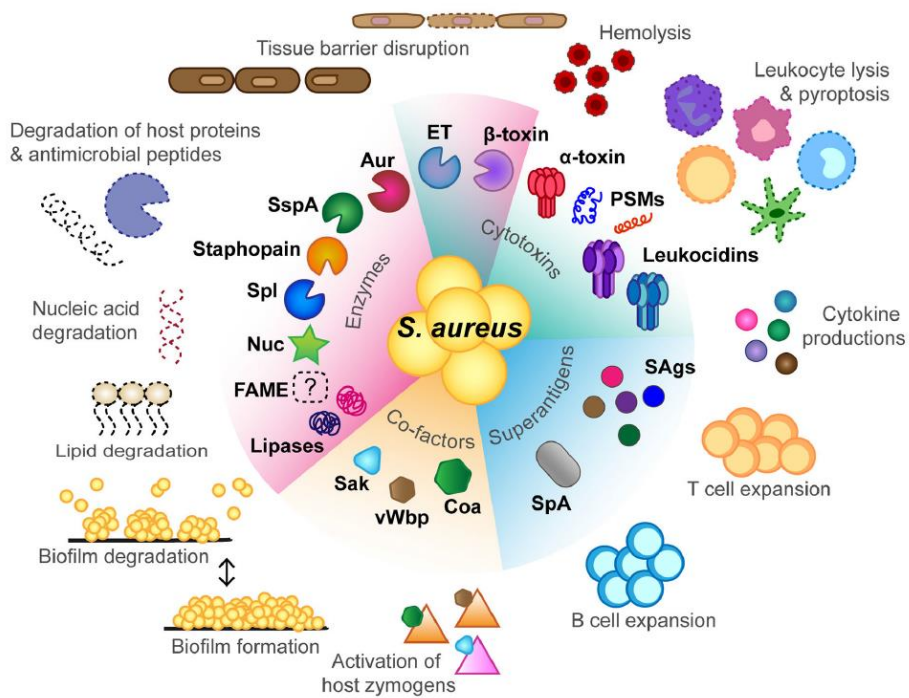


Figura 7. Factores de virulencia de *S. aureus* (59).

Introducción

En la Tabla 2 se resumen los principales factores de virulencia de *S. aureus* y las infecciones a las que están asociados. Cabe destacar que en los estafilococos un único factor de virulencia puede desempeñar varias funciones en la patogénesis y que múltiples factores de virulencia pueden desarrollar la misma función. Además, la distribución de algunos factores de virulencia está relacionada con el tipo clonal, mientras que la presencia de otros no está relacionada con el *background* genético. Para establecer la infección, *S. aureus* tiene un gran número de proteínas de superficie llamadas MSCRAMMs (componentes microbianos de superficie que reconocen moléculas adhesivas de la matriz, *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*) que participan en la adherencia a los tejidos del hospedador o a materiales protésicos, si éstos están presentes. *S. aureus* también posee mecanismos para evadir el sistema inmune del hospedador durante la infección. Además, produce citotoxinas como leucocidinas que causan la destrucción de leucocitos formando poros en la membrana celular. Durante la infección *S. aureus* produce numerosas enzimas, como proteasas, lipasas y elastasas, que le permiten invadir y destruir tejidos y metastatizar a otros sitios. *S. aureus* también es capaz de producir shock séptico mediante superantígenos que activan el sistema inmune del hospedador y los mecanismos de coagulación (60).

Tabla 2. Tipos de factores de virulencia de *S. aureus* y síndromes clínicos asociados (60).

Tipo de factores de virulencia	Factores de virulencia	Genes	Síndromes clínicos asociados
Implicados en adherencia	MSCRAMMs (<i>clumping factors, fibronectin-binding proteins, collagen, bone sialoprotein-binding proteins</i>)	<i>clfA, clfB, fnbA, fnbB, cna, sdr, bbp</i>	Endocarditis, osteomielitis, artritis séptica y prótesis y infecciones del catéter
Implicados en persistencia	Acumulación de <i>biofilm</i> (polisacárido de adhesión intercelular), SCV y persistencia intracelular	<i>ica</i> locus, mutación de <i>hemB</i>	Infecciones recurrentes, fibrosis quística, y síndromes descritos arriba en la adherencia
Implicados en la evasión/destrucción de las defensas del hospedador	Leucocidinas (LPV, γ -toxina), polisacáridos capsulares (5, 8), proteína A, CHIPS, Eap, PSMs	<i>lukS-PV, lukFPV, hlg, cap5 y 8, spa, chp, eap, psm-α</i>	Infecciones invasivas de la piel y neumonía necrotizante (las cepas de CA-MRSA que causan estos son a menudo LPV positivas) abscesos (asociado a polisacáridos capsulares)
Implicados en la invasión/penetración tisular	Enterotoxinas, toxina 1 del síndrome del shock tóxico, toxinas exfoliativas A y B, α -toxina, peptidoglicano, ácido lipoteicoico	<i>sea-q</i> (no <i>sef</i>), <i>tst, eta, etb, hla</i>	Intoxicación alimentaria, síndrome del shock tóxico, síndrome de la piel escaldada, impétigo bulloso y sepsis
Con implicaciones poco definidas en la virulencia	Coagulasa, ACME, bacteriocina	<i>cluster arc, cluster opp-3, bsa</i>	

Abreviaturas: ACME, elemento móvil catabólico de arginina; CA-MRSA, *S. aureus* resistente a metilina asociado al ámbito comunitario community-acquired methicillin-resistant *S. aureus*; CHIPS, proteína de inhibición de la quimiotaxis; LPV, leucocidinas como la de Pantón-Valentine; MSCRAMMs, componentes microbianos de superficie que reconocen moléculas adhesivas de la matriz; PSMs, modulinas solubles en fenol; SCV, variantes de colonia pequeñas.

Introducción

En la Tabla 3 se observan los principales genes de virulencia de *S. aureus* agrupados por su papel patogénico y la descripción de los mismos.

Tabla 3. Principales genes de virulencia de *S. aureus* (31,42,54,60).

Virulencia	Gen	Descripción
Proteasas	<i>splA</i>	Serine protease SplA
	<i>splB</i>	Serine protease SplB
	<i>aur</i>	Zinc metalloproteinase aureolysin
Toxinas superantigénicas	<i>tst1</i>	Toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1)
	<i>se(a-q)</i>	Enterotoxins types (a-q)
Leucocidinas	<i>lukE</i>	Leukotoxin LukE
	<i>lukD</i>	Leukotoxin LukD
	<i>lukF-PV</i>	Panton Valentine leukocidin F component
	<i>lukS-PV</i>	Panton Valentine leukocidin S component
	<i>hlg</i>	γ -hemolysin
Hemolisinas	<i>hla</i>	α -hemolysin
	<i>hlb</i>	β -hemolysin
Polisacáridos capsulares	<i>cap5</i>	Capsular polysaccharide 5
	<i>cap8</i>	Capsular polysaccharide 8
Fagos-Hlb	<i>scn</i>	Staphylococcal complement inhibitor SCIN
	<i>sak</i>	Staphylokinase
	<i>chp</i>	Chemotaxis-inhibiting protein CHIPS
MSCRAMMs (componentes microbianos de superficie que reconocen moléculas adhesivas de la matriz)	<i>clfA</i>	Clumping factor A
	<i>clfB</i>	Clumping factor B
	<i>cna</i>	Collagen adhesin
	<i>fnbA</i>	Fibronectin-binding protein A
	<i>fnbB</i>	Fibronectin-binding protein B
	<i>ebpS</i>	Elastin binding protein
	<i>spa</i>	Protein A
	<i>sdrC</i>	Fibrinogen-binding protein SdrC
	<i>sdrD</i>	Fibrinogen-binding protein SdrD
<i>bbp</i>	Bone sialoprotein-binding protein	

Proteínas extracelulares	<i>coA</i>	Staphylocoagulase
	<i>efb</i>	Fibrinogen-binding protein
Formación de <i>biofilm</i>	<i>atl</i>	Bifunctional autolysin
Antiadhesina	<i>pls</i>	Surface protein
Motivo LPXTG	<i>sasG</i>	Putative surface protein
Adhesina polisacárida intracelular (PIA)	<i>icaB</i>	Intercellular adhesion protein B
	<i>icaC</i>	Intercellular adhesion protein C
	<i>icaD</i>	Intercellular adhesion protein D
Biosíntesis de PIA y regulación de formación de <i>biofilm</i>	<i>icaR</i>	Ica operon transcriptional regulator IcaR
Regulación de formación de <i>biofilm</i>	<i>rbf</i>	Ribosome-binding factor A
	<i>tcaR</i>	HTH-type transcriptional regulator TcaR
	<i>sigB</i>	RNA polymerase sigma factor SigB

3. MECANISMOS PATOGENICOS DE LAS INFECCIONES OSTEOARTICULARES CAUSADAS POR *S. aureus*

3.1 ETAPAS DE LA INFECCIÓN CAUSADA POR *S. aureus*

En la Figura 8 se observan las etapas de la infección causada por *S. aureus*: inicio de la infección (Figura 8a), formación de abscesos (Figura 8b) e infección sistémica (Figura 8c). A continuación, se van a detallar cada una de estas etapas.

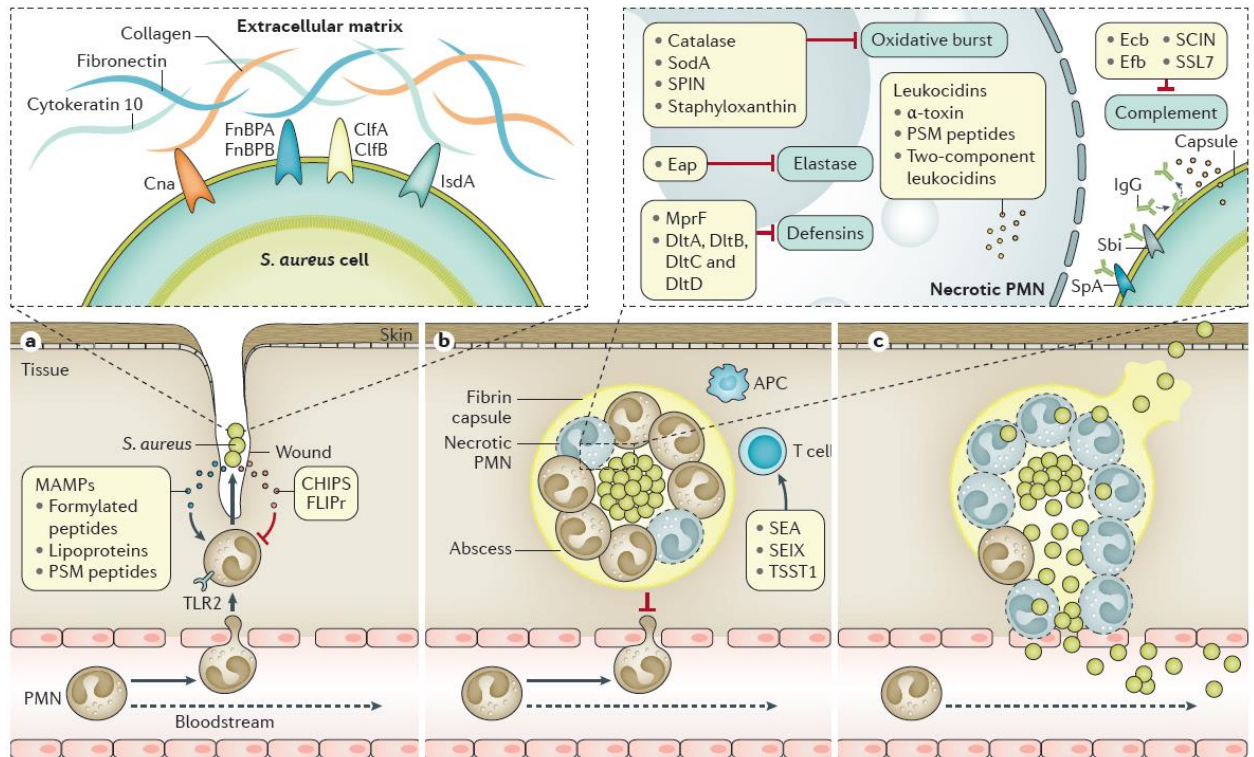


Figura 8. Etapas de la infección causada por *S. aureus* (31). A: inicio de la infección, B: formación de abscesos, C; infección sistémica. Abreviaturas: CHIPS, *chemotaxis inhibitory protein of S. aureus*; Clf, *clumping factor*; Cna, *collagen adhesin*; Dlt, *d-alanine transfer*; Eap, *extracellular adherence protein*; Ecb, *extracellular complement-binding protein*; Efb, *fibrinogen-binding protein*; Fc, *crystallizable fragment*; FLIPr, *FPRL1 inhibitory protein*; FnBP, *fibronectin-binding protein*; IgG, *immunoglobulin G*; IsdA, *iron-regulated surface determinant protein A*; MAMP, *S. aureus microorganism-associated molecular pattern*; MprF, *multiple peptide resistance factor*; PMN, *polymorphonuclear leukocyte*; PSM, *phenol-soluble modulín*; PVL, *Panton–Valentine leucocidín*; Sbi, *Immunoglobulin-binding protein*; SCIN, *staphylococcal complement inhibitor*; SEA, *enterotoxin type A*; SEIX, *staphylococcal enterotoxin-like X*; SodA, *superoxide dismutase*; SpA, *Staphylococcus protein A*; SPIN, *staphylococcal peroxidase inhibitor*; SSL7, *staphylococcal superantigen-like protein 7*; TLR, *Toll-like receptor 2*; TSST1, *toxic shock syndrome toxin 1*.

3.1.1 Inicio de la infección

S. aureus posee proteínas de superficie que se unen a las proteínas de la matriz extracelular y hacen que la bacteria se pueda adherir a tejidos y multiplicarse en ellos (Figura 8a). Entre estas proteínas de superficie destacan la proteína A y B de unión a fibronectina (*fibronectin binding protein*, FnBPA y FnBPB), el *clumping factor* A y B (ClfA y ClfB) y la proteína de unión a colágeno (*collagen adhesin*, Cna). Además, *S. aureus* tiene una gran capacidad de formar un aglomerado adherente de microorganismos

embebidos en una matriz extracelular, llamado *biofilm*, en superficies artificiales plásticas o metálicas. Esta habilidad hace que *S. aureus* sea uno de los principales causantes de infecciones asociadas a dispositivos médicos como catéteres, prótesis y neumonía asociada a ventilación mecánica. (31).

3.1.2 Formación de abscesos

La proteína coagulasa de *S. aureus* permite la formación de una pseudocápsula de fibrina que rodea a la bacteria y de un infiltrado de leucocitos PMNs, evitando así la afluencia de más leucocitos (Figura 8b). *S. aureus* puede impedir la opsonización, por ejemplo, por la inhibición de la cascada del complemento. Además, *S. aureus* puede sobrevivir tras la fagocitosis de los PMNs destruyéndolos con las toxinas citolíticas: péptidos formadores de poros (PSMs), α -hemolisinas y LPV. La inflamación masiva producida por los PMNs se aumenta aún más por las toxinas superantigénicas de *S. aureus*, como la TSST, que se une al complejo mayor de histocompatibilidad de clase II de las células presentadoras de antígeno y activa células T inespecíficamente, causando una hiperinflamación sistémica (tormenta de citoquinas) (31).

S. aureus tiene una gran variedad de toxinas citolíticas que lisan glóbulos rojos y/o leucocitos (hemolisinas y leucotoxinas, respectivamente). La Hla es probablemente la toxina mejor conocida de *S. aureus*. Lisa los glóbulos rojos y leucocitos, como monocitos y linfocitos T y B, pero no neutrófilos.

Otra toxina de *S. aureus* es la β -hemolisina o β -toxina (Hlb), que es una esfingomielinasa que degrada la esfingomielina que está presente en múltiples células del hospedador, provocando su lisis. En muchas cepas de *S. aureus* el gen que codifica para la β -hemolisina (*hlb*) está interrumpido por una isla de patogenicidad.

La δ -hemolisina o δ -toxina es un miembro de la familia de las PSMs, que tienen múltiples funciones en la patogenia estafilocócica.

La LPV está codificada por los genes *lukF-PV* y *lukS-PV* y se encuentra en la mayoría de cepas de SARMs asociadas al ámbito comunitario (CA-MRSA, *community-acquired methicillin-resistant S. aureus*) (35).

3.1.3 Infección sistémica

Los abscesos pueden liberar pus y bacterias hacia el torrente sanguíneo causando bacteriemia (Figura 8c). *S. aureus* puede salir del torrente sanguíneo y producir infección en otros tejidos. Cuando la bacteria está en la luz vascular puede adherirse a la superficie endotelial y a las plaquetas, y esta adhesión puede producir endocarditis y formar abscesos metastásicos. Se puede producir una inflamación sistémica fulminante, sepsis y fallo multiorgánico (31).

En la Figura 9 se representa el mecanismo de virulencia de *S. aureus* dentro del torrente sanguíneo. Después de su llegada a la sangre, *S. aureus* secuestra el sistema de coagulación del hospedador para crear grupos de bacterias recubiertas con fibrinógeno del huésped (A). La inflamación hace que las células endoteliales expongan moléculas adhesivas (factor de von Willebrand, vWf), que actúan como anclas para los agregados de *S. aureus* con las plaquetas y para las células inmunitarias que pueden portar bacterias intracelulares (B). En áreas donde las células endoteliales están dañadas, la matriz rica en colágeno queda expuesta, uniéndose al vWf circulante e iniciando la coagulación, lo que produce el depósito de coágulos de fibrina. La exposición del colágeno, vWf y fibrina permite la adhesión de los agregados de *S. aureus* circulantes (C). Los grupos de *S. aureus* adheridos al endotelio secretan toxinas que activan aún más la señalización inflamatoria en el endotelio o lo dañan directamente (D). La α -toxina secretada también causa la agregación de las plaquetas y produce la formación de microtrombos, que potencialmente obstruyen a los vasos más pequeños (E) (61).

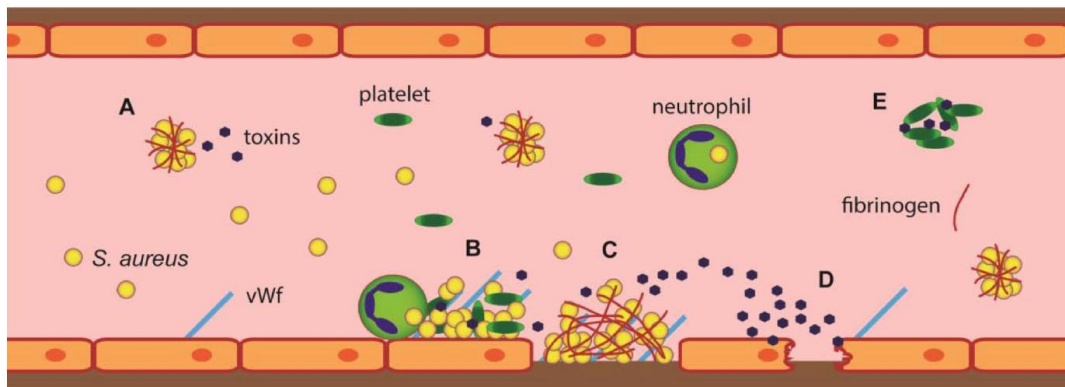


Figura 9. Mecanismo de virulencia de *S. aureus* dentro del torrente sanguíneo (61).

3.2 MECANISMO PATOGENICO DE LA ARTRITIS NATIVA CAUSADA POR *S. aureus*

En la Figura 10 se representa la fisiopatología y el daño involucrado en la artritis nativa. La membrana sinovial tiene una arquitectura compleja con una densa vascularización por la que pueden acceder grandes moléculas como el ácido hialurónico para lubricar el cartílago articular. Por el continuo contacto con la sangre o linfa pueden entrar también a la membrana sinovial bacterias o fagocitos portadores de bacterias. Una vez dentro del espacio sinovial, las bacterias se adhieren a las células sinoviales del tejido articular. Además, *S. aureus* exhibe tropismo tisular por la membrana sinovial. Los MSCRAMMs que produce *S. aureus* (ClfA, ClfB, Cna, SdrC, D y E, FnBPA, FnBPB, Bbp, Ebp) juegan un papel vital en la adherencia de los cocos a la matriz articular (62).

Una vez adheridas, las bacterias se multiplican en la membrana sinovial y forman aglomerados similares al *biofilm*. En la formación de estos aglomerados bacterianos destacan el papel del fibrinógeno y de la fibronectina del hospedador. Estas bacterias pueden tener un fenotipo de SCV con un crecimiento lento y con la capacidad de persistir intracelularmente dentro de los osteoblastos, fibroblastos, neutrófilos, etcétera. Esta propiedad permite a la bacteria evadir el ataque del sistema inmune del hospedador, a la vez que muestra una peor respuesta a la antibioterapia administrada.

Introducción

Los agregados bacterianos en el *biofilm* se acumulan en el líquido sinovial y los tejidos cercanos actúan como nichos de bacterias que luego podrían poblar otras zonas generando nuevos focos de infección. Además, *S. aureus* secreta factores de virulencia como enterotoxinas, proteína A, polisacárido capsular (interviene en la evasión de la fagocitosis y en la supervivencia intracelular de cepas capsulares) y la TSST-1, que actúa como superantígeno y activa de forma no específica un gran número de células T, contribuyendo a la progresión de la enfermedad. La α -hemolisina también causa coagulación sanguínea, agregación plaquetaria, adherencia de neutrófilos y degradación del ADN de los linfocitos. Algunas cepas de *S. aureus* expresan la LPV que le permiten sobrevivir dentro de los neutrófilos e incluso multiplicarse (62).

Después de la siembra bacteriana, los productos bacterianos y las toxinas inician la cascada inflamatoria caracterizada por la afluencia de células del sistema inmune, neutrófilos, la activación de macrófagos y la liberación de citoquinas inflamatorias como IL (interleuquina)-1 β , IL-6, TNF (factor de necrosis tumoral, *tumour necrosis factor*)- α y MIP (proteínas inflamatorias de macrófagos, *macrophage inflammatory proteins*)-2. Los receptores tipo *Toll* (TLR, *Toll-like receptor*) juegan un papel clave como proteínas transmembrana implicadas en el reconocimiento de patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMPs, *microorganism-associated molecular pattern*) y la expresión de TLR produce la translocación nuclear y la activación de factores de transcripción que promueven aún más la secreción de citoquinas proinflamatorias e infiltración de neutrófilos. Estas citoquinas reclutan más células fagocíticas y también aumentan la proteína C reactiva del hospedador que a su vez activa el sistema del complemento. La fagocitosis de bacterias por macrófagos, la liberación de enzimas lisosomales y especies reactivas de oxígeno (ROS) y una mayor inducción de citoquinas, producen enrojecimiento, hinchazón y dolor. Esta reacción inflamatoria producida por el hospedador es protectora y junto con la terapia antibiótica puede ayudar a contener la propagación de la infección. Sin embargo, si la infección no se elimina, continúa la lucha entre el sistema inmune del hospedador y las bacterias, y el sistema inmune puede empeorar en lugar de mejorar la evolución de la artritis séptica. Pronto, las células T también comienzan a llegar a la cavidad articular y se activan por la presentación de antígenos por células del hospedador. La gran afluencia de células T, células B y

macrófagos causan engrosamiento de la membrana sinovial. Los altos niveles de citoquinas inducen la liberación de metaloproteinasas de la matriz del hospedador (estromelinas y colagenasas) y enzimas lisosomales, que aumentan la degradación articular. A medida que la presión intraarticular aumenta, la vasculatura sinovial puede comprimirse con trombosis y el daño continuo al cartílago articular puede llegar a impedir el suministro de sangre y oxígeno. Esto puede extenderse a la articulación ósea generando un daño grave en el crecimiento óseo, especialmente en los niños, y causando una lesión permanente en el cartílago (62).

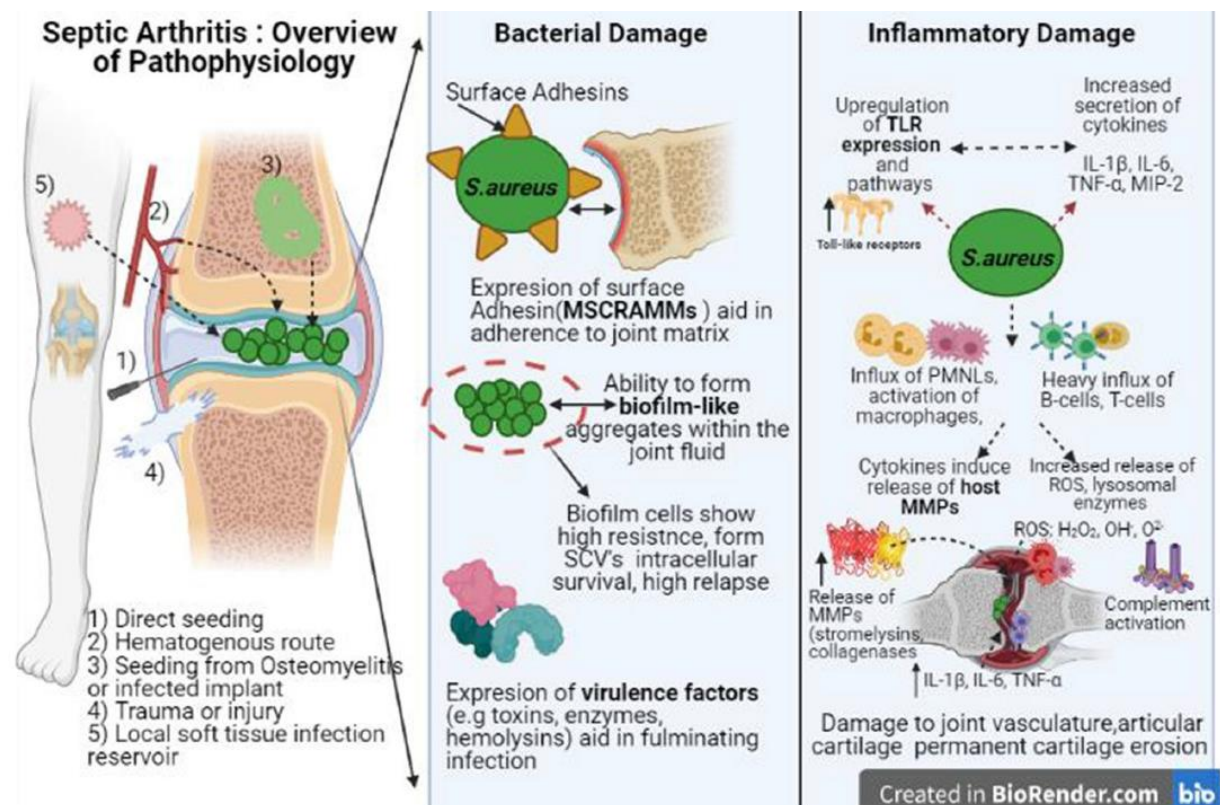


Figura 10. Fisiopatología de la artritis séptica. Abreviaturas: MMPs, metaloproteinasas de la matriz; MSCRAMMs: componentes microbianos de superficie que reconocen moléculas adhesivas de la matriz; ROS: especies reactivas de oxígeno; TLR: receptores tipo *Toll*, *Toll-like receptor* (62).

3.3 MECANISMO PATOGENICO DE LA INFECCIÓN PROTÉSICA ARTICULAR CAUSADA POR *S. aureus*

Los mecanismos patogénicos de la IPA son similares a los de la artritis nativa, produciendo daño óseo y articular, pero, además, participa en la patogénesis el material protésico, al que se adhieren aún más las bacterias formando *biofilm* (Figura 11). La presencia de un cuerpo extraño disminuye la dosis mínima infectiva de *S. aureus* más de 100000 veces (18).

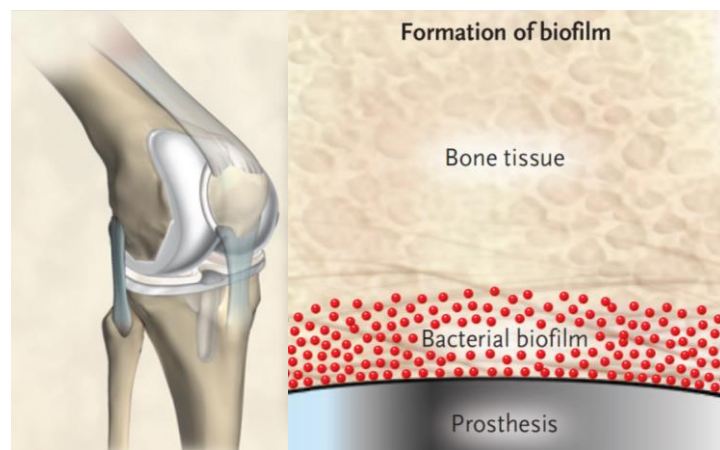


Figura 11. Mecanismo patogénico de la infección protésica articular (13).

La patogénesis de la IPA implica la interacción entre el microorganismo, la prótesis y el hospedador. La adherencia de *S. aureus* a la superficie protésica es rápida y mediada por factores no específicos; como tensión superficial, interacciones electrostáticas, hidrofílicas o hidrofóbicas; y por la presencia de ligandos de los tejidos del hospedador como fibronectina, fibrinógeno y colágeno, a los que la bacteria se une mediante los MSCRAMMs como *fnbA*, *fnbB* y *cna* (Figura 12). La fase inicial de adherencia es seguida por otra fase acumulativa en la que las células bacterianas se unen unas a otras y forman el *biofilm*, un proceso en el que está muy implicado la adhesina polisacárida intracelular (PIA), producida por el locus genético de adhesión intercelular (*ica*, *intercellular adhesion*) (18).

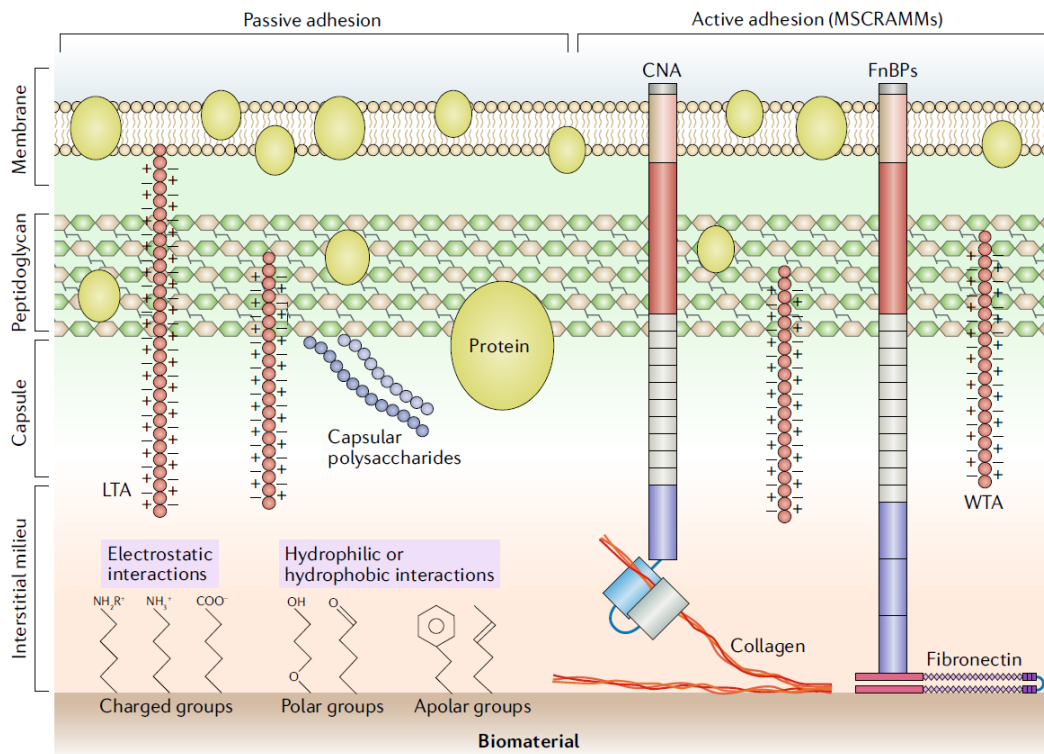


Figura 12. Adhesión de *S. aureus* a la superficie de la prótesis. Abreviaturas: CNA: adhesina de unión a colágeno; FnBPs, proteínas de unión a fibronectina; LTA, ácido lipoteicoico; MSCRAMMs, componentes microbianos de superficie que reconocen moléculas adhesivas de la matriz; WTA, ácido teicoico de pared (63).

En la Figura 13 se observan los mecanismos celulares que ocurren entre la prótesis y el hueso. El *biofilm* bacteriano adherido a la prótesis puede interactuar con los neutrófilos PMNs y los linfocitos T, lo que conduce a la producción de citoquinas proinflamatorias. Las células supresoras de la médula ósea que se reclutan durante la IPA pueden regular la respuesta inmunitaria, especialmente inhibiendo la proliferación de linfocitos T. Los PMNs reclutados pueden expresar RANKL (ligando de RANK [receptor activador del factor nuclear κ B]). El *biofilm* estafilocócico también puede inducir la apoptosis de los osteoblastos (64).

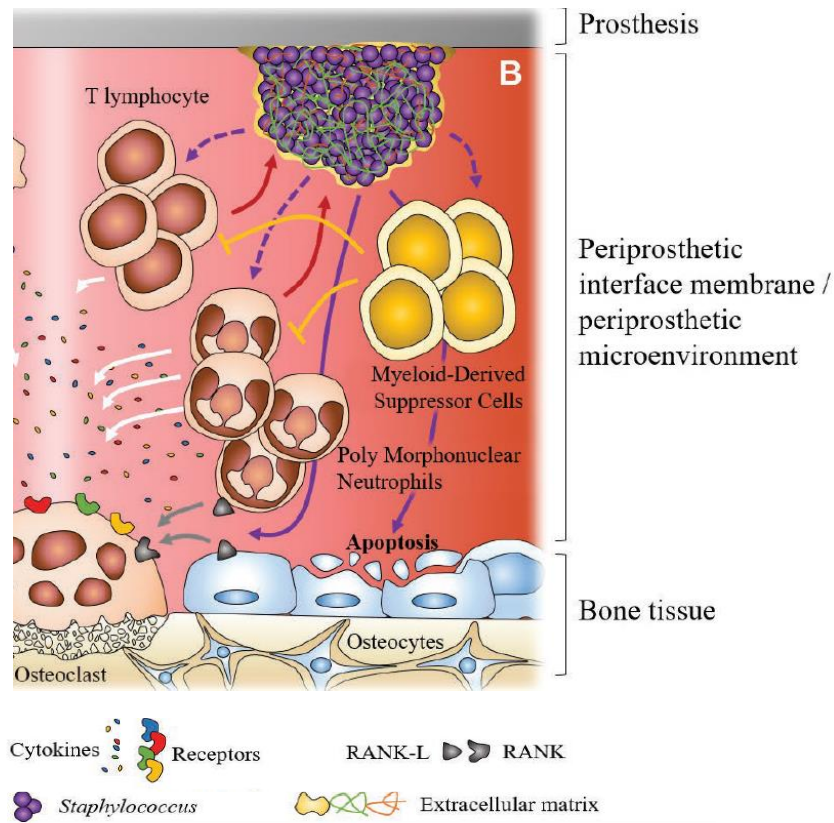


Figura 13. Principales mecanismos celulares que ocurren entre la prótesis y el hueso durante la infección protésica articular causada por *S. aureus*. Abreviaturas: RANK, receptor activador del factor nuclear kB; RANKL, ligando de RANK (64).

4. ANTIBIÓTICOS Y *S. aureus*

Las principales dianas de los antibióticos en los estafilococos son: la envoltura celular, el ribosoma y los ácidos nucleicos (65) (Figura 14).

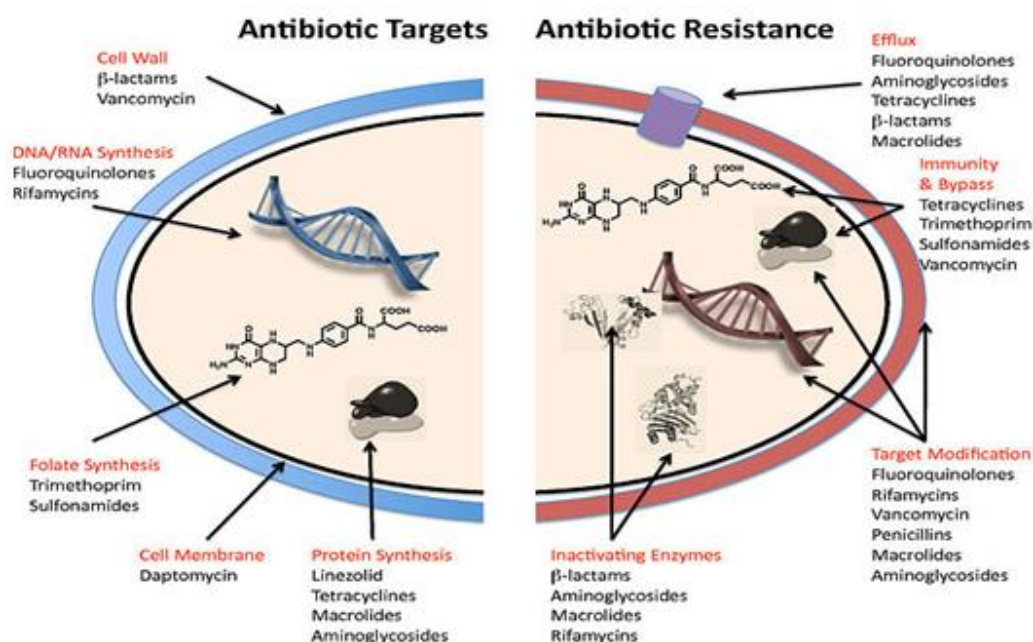


Figura 14. Diana de los principales antibióticos usados en el tratamiento de *S. aureus* y mecanismos por los que la bacteria se hace resistente a ellos (66).

A lo largo del tiempo ha aumentado la incidencia de la resistencia a los antibióticos por *S. aureus* (Figura 15). Fleming descubrió la penicilina en la década de 1940 y fue pionero en el tratamiento de las infecciones con antibióticos, pero en 1950 se extendió la resistencia a la penicilina en *S. aureus* debido a una penicilinasas, que puede hidrolizar el anillo betalactámico de la penicilina. Más tarde, se desarrolló una nueva penicilina semisintética resistente a la penicilinasas denominada meticilina, que controló eficazmente la infección por *S. aureus* resistente a la penicilina. Sin embargo, su uso provocó a la aparición de la resistencia a meticilina, que fue reportada por primera vez a principios de los años 60 del siglo XX. Desde entonces, muchos países han experimentado un aumento de la incidencia de SARM. La vancomicina se convirtió en el fármaco de elección para el tratamiento de la infección severa causada por SARM, sin embargo, también existen actualmente cepas de *S. aureus* resistentes a la vancomicina (30,31).

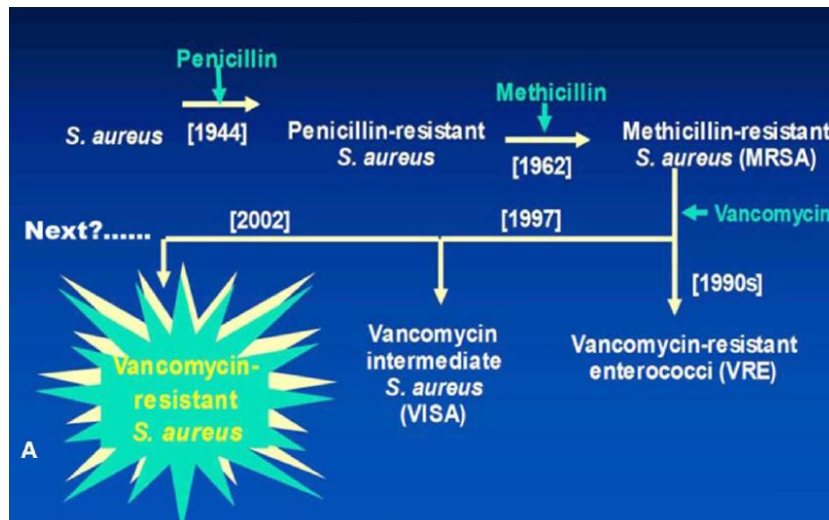


Figura 15. Evolución de la resistencia a los antibióticos en *S. aureus* (30).

La resistencia puede desarrollarse por transferencia horizontal de determinantes de resistencia codificados por elementos genéticos móviles como plásmidos, transposones o el SCCmec; o por mutaciones en el cromosoma. En la Figura 14 se encuentran los principales mecanismos de resistencia a los antibióticos en *S. aureus*. La resistencia adquirida horizontalmente puede ocurrir por uno de los siguientes mecanismos: modificación enzimática del fármaco e inactivación, modificación enzimática del sitio de unión del fármaco, expulsión del fármaco, mecanismos que implican la adquisición de una nueva diana resistente al fármaco, desplazamiento del fármaco para proteger la diana. La adquisición de resistencia por mutación puede resultar de: la alteración de la diana del fármaco que éste se una, la desrepresión de bombas de eflujo de resistencia a múltiples fármacos codificadas cromosómicamente y múltiples mutaciones que alteran la estructura y composición de la pared celular y/o membrana para reducir el acceso del fármaco a su diana (65).

En la Tabla 4 se observan los principales genes de resistencia a los antibióticos en *S. aureus*.

Tabla 4. Principales genes de resistencia a los antibióticos de *S. aureus* (42,65,67).

Clase de antibiótico	Gen	Descripción
Betalactámicos	<i>blaZ</i>	Betalactamase
	<i>mecA</i>	PBP2a family beta-lactam-resistant peptidoglycan transpeptidase MecA
Vancomicina	<i>vanA</i>	Vancomycin resistance gene
Aminoglucósidos	<i>aac(6')-aph(2'')</i>	Bifunctional aminoglycoside N-acetyltransferase AAC (6')-Ie/aminoglycoside O-phosphotransferase APH (2'')-Ia
	<i>aphA</i>	Aminoglycoside 3'-phosphotransferase
	<i>ant</i>	Streptomycin 3''-adenylyltransferase
Fluoroquinolonas	<i>norA</i>	Quinolone resistance protein NorA
	Mutación <i>gyrA</i>	DNA gyrase subunit A
	Mutación <i>gria</i>	DNA topoisomerase IV subunit A
Macrólidos	<i>erm(A)</i>	Erythromycin ribosome methylation protein A
	<i>erm(B)</i>	Erythromycin ribosome methylation protein B
	<i>erm(C)</i>	Erythromycin ribosome methylation protein C
Macrólidos, lincosamidas, estreptogramina B	<i>msr(A)</i>	ABC-F type ribosomal protection protein Msr(A)
Tetraciclinas	<i>tetK</i>	Tetracycline efflux protein
	<i>tetM</i>	Ribosomal protection protein associated with tetracycline resistance
Trimetoprim	<i>dfrA</i>	Dihydrofolate reductase A
	Mutación <i>dfrB</i>	Dihydrofolate reductase

	<i>dfrC</i>	Dihydrofolate reductase C
Fosfomicina	<i>fosB</i>	Fosfomycin resistance protein FosB
Mupirocina	<i>mupA</i>	Isoleucyl-tRNA synthetase
	Mutación <i>fusA</i>	Elongation factor G
Ácido fusídico	<i>fusB</i>	Fusidic acid resistance gene B
	<i>fusC</i>	Fusidic acid resistance gene C
Rifampicina	Mutación <i>rpoB</i>	DNA-directed RNA polymerase subunit beta

4.1 RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS Y VIRULENCIA

S. aureus tiene una gran capacidad de adquirir resistencia a múltiples clases de antibióticos, complicando así el tratamiento. La resistencia a ciertos antibióticos, como a meticilina y vancomicina, también ha sido asociada a una pérdida de funcionalidad de *agr*, sugiriendo una compensación entre la resistencia antibiótica y la virulencia. En condiciones de una elevada exposición a antibióticos, como en el ambiente hospitalario, en el que además hay una población bastante susceptible, podría ser ventajoso para *S. aureus* sacrificar la actividad del *agr* por la resistencia a antibióticos. En cambio, en una población sana, *S. aureus* probablemente requiera un *agr* más funcional, que además se asocia a una mayor sensibilidad a antibióticos (68) (Figura 16).

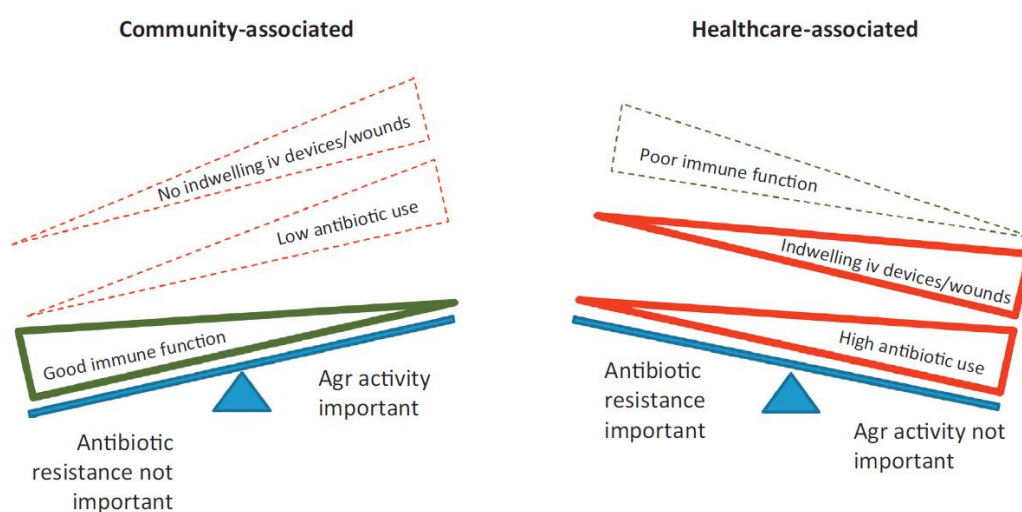


Figura 16. Funcionalidad de *agr* y resistencia a los antibióticos en *S. aureus* según el estado del hospedador (68).

4.2 PRINCIPALES ANTIBIÓTICOS USADOS EN EL TRATAMIENTO DE LAS INFECCIONES CAUSADAS POR *S. aureus*

4.2.1 Penicilina

Desde que en 1942 se descubrieron las primeras cepas de *S. aureus* resistentes a penicilina esta resistencia no ha dejado de extenderse y a finales de la década de los 60 del siglo XX un 80% de todas las cepas eran resistentes a este antibiótico. La resistencia a penicilina está mediada por el gen *blaZ*, que codifica para la betalactamasa que hidroliza el anillo betalactámico de los antibióticos (69). Actualmente más de un 90% de las cepas estafilocócicas producen betalactamasas de tipo penicilinasas.

4.2.2 Meticilina

La meticilina es un antibiótico betalactámico que actúa inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana evitando la formación de enlaces cruzados entre las cadenas poliméricas del peptidoglicano. Las cepas de *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) producen una proteína de unión a penicilina (PBP, *penicillin-binding protein*) alterada (PBP2a), que provoca una disminución de la afinidad por los betalactámicos. Esta

Introducción

proteína está codificada por el gen adquirido *mecA*, que está integrado en el elemento genético móvil llamado *SCCmec* (*staphylococcal cassette chromosome mec*). También genes como el *mecC*, homólogo del gen *mecA*, confieren resistencia a meticilina. En las últimas décadas se han extendido los clones de SARM. Al principio el SARM era más común en el ámbito hospitalario (HA-MRSA, *hospital-acquired methicillin-resistant S. aureus*), pero los nuevos clones se establecen también en el ámbito comunitario (CA-MRSA) y pueden infectar a personas sin factores predisponentes nosocomiales clásicos. Desde mediados de los años 2000, el SARM también se ha asociado al contacto con el ganado (LA-MRSA, *livestock-associated methicillin-resistant S. aureus*) (31,32,70).

Existe una importante variabilidad geográfica en la prevalencia de SARM en el mundo, desde una baja prevalencia en Escandinavia a la prevalencia más alta en zonas de América y Asia (Figura 17). Los datos de Europa también muestran una tendencia hacia un incremento de la prevalencia de SARM, aunque es muy variable: desde menos del 3% en países nórdicos hasta el 25-50% en el sur del continente (Portugal, España, Italia y Grecia) (31).

Aunque la mayoría de los aislados de SARM son sensibles a la vancomicina y a los antibióticos introducidos más recientemente como daptomicina, linezolid, tedizolid, ceftarolina y ceftobiprol, existe riesgo de aparición de cepas resistentes a estos antibióticos. Por tanto, es importante identificar nuevos agentes que inhiban dianas bien establecidas y/o procesos celulares esenciales de SARM (71).

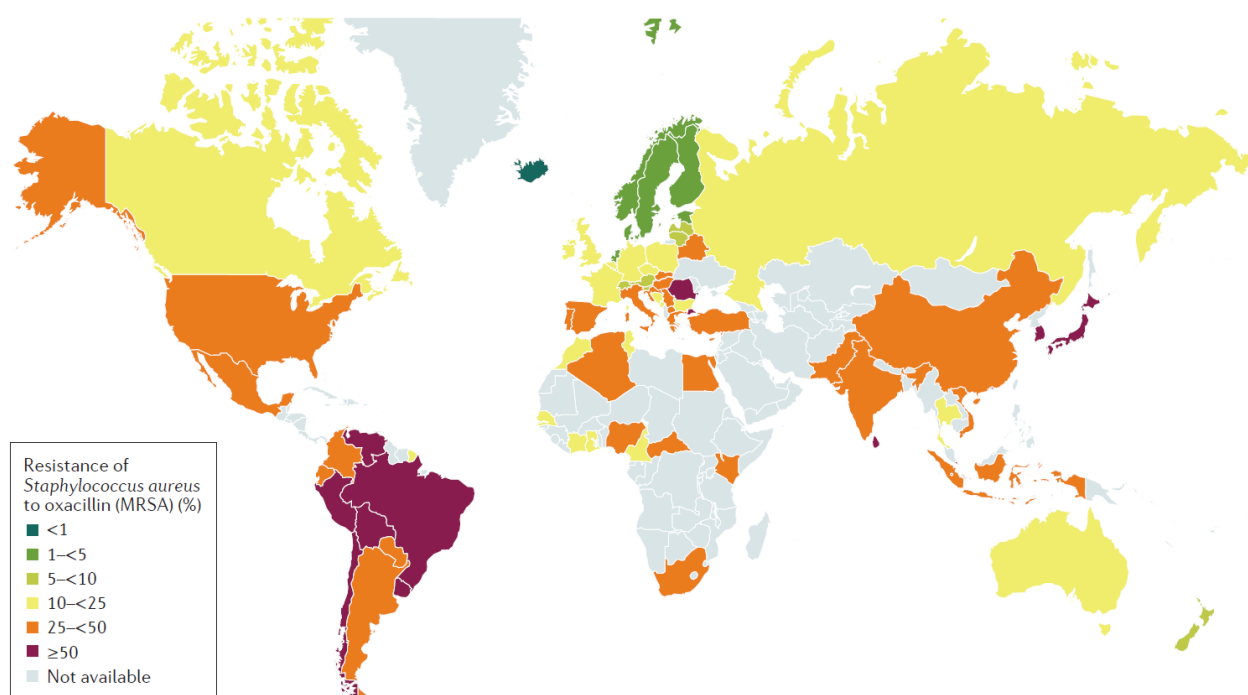


Figura 17. Prevalencia mundial de *S. aureus* resistente a meticilina (31).

4.2.3 Nuevos betalactámicos

La ceftarolina y el ceftobiprol son las llamadas “cefalosporina de quinta generación”. Ambos antibióticos son activos frente a SARM porque se unen con alta afinidad a la PBP2a. Como todos los betalactámicos, la unión a las PBPs bloquea la capacidad de esas enzimas para catalizar la función transpeptidasa que es necesaria para la síntesis de la pared celular. Ambos antibióticos son también activos frente a cepas resistentes a vancomicina y a daptomicina. La resistencia a estas cefalosporinas se debe principalmente a mutaciones en el gen *mecA*, produciendo cambios en la secuencia de aminoácidos de la PBP2a (72).

4.2.4 Vancomicina

La vancomicina es un antibiótico glucopéptido que inhibe la síntesis de la pared celular en bacterias sensibles mediante una unión de gran afinidad con el extremo D-alanil-D-alanina de las unidades precursoras de la pared celular. Además, afecta la permeabilidad de la membrana celular bacteriana y a la síntesis de ARN. La aparición de resistencia a la

Introducción

vancomicina resulta muy problemática, debido al uso generalizado de este antibiótico para el tratamiento de infecciones producidas por SARM. *S. aureus* expone dos formas de resistencia a la vancomicina: intermedia o de alto nivel de resistencia. Las cepas con un nivel de resistencia intermedio a vancomicina (VISA, *S. aureus* con resistencia intermedia a vancomicina, *vancomycin-intermediate S. aureus*) tienden a emerger con ciclos prolongados o repetidos de tratamiento con vancomicina. Dentro de una población, múltiples mutaciones diferentes confieren diferentes grados de resistencia a la vancomicina (heterorresistencia). Una presión sostenida en el tiempo (por ejemplo, una terapia prolongada con vancomicina) selecciona cepas que han acumulado gradualmente múltiples mutaciones y han adquirido sucesivamente una CMI (concentración mínima inhibitoria) más alta a la vancomicina. La mayoría de las mutaciones documentadas en las cepas VISA alteran el core genoma relacionado con la biosíntesis celular y autólisis de la pared. Varias de esas mutaciones, como en los genes *yycH*, *mprF* y *dltA*, también confieren resistencia cruzada a la daptomicina. Las cepas VISA se caracterizan por una pared celular más gruesa y varios estudios indican que estas cepas muestran una menor virulencia debido a una disfuncionalidad de *agr*. A diferencia de VISA, la resistencia a vancomicina de alto nivel se produce a través de la transferencia de plásmido del operón *vanA* de *Enterococcus faecalis* resistente a la vancomicina, que modifica la estructura de los precursores del peptidoglicano. Afortunadamente, esta última forma de resistencia es poco frecuente en *S. aureus* (37,70).

4.2.5 Daptomicina

La daptomicina es un lipopéptido que surgió como alternativa al tratamiento de infecciones graves por SARM resistentes a vancomicina. La daptomicina se une, en presencia de iones de Calcio (Ca^{2+}), a las membranas bacterianas de las células tanto en fase de crecimiento como estacionaria, causando una despolarización y conduciendo a una rápida inhibición de la síntesis de proteínas, de ADN y de ARN. Se han detectado mutantes resistentes a daptomicina en el curso del tratamiento con altas concentraciones de este antibiótico en los que se han observado: mayor fluidez de la membrana, aumento de la carga positiva en la superficie, reducción de la sensibilidad a la despolarización producida por la daptomicina y una disminución de la superficie de

unión a la daptomicina. Estas alteraciones pueden deberse a mutaciones en los genes *mprF*, *dsp1*, *asp23*, *dltA* y *vraSR* (72).

4.2.6 Lipogluco péptidos

Los lipogluco péptidos dalbavancina, oritavancina y telavancina son derivados semisintéticos de los gluco péptidos (vancomicina y teicoplanina) (72). El mecanismo de acción de los lipogluco péptidos es similar a la de los gluco péptidos, pero son más potentes y se anclan a la membrana celular aumentando la concentración local del antibiótico. Como ocurre en los gluco péptidos, la modificación de la diana es el mecanismo más frecuente de resistencia (gen *vanA*). La resistencia a los lipogluco péptidos es rara y se ha descrito recientemente para la dalbavancina. La estructura de la dalbavancina le permite tener una vida media muy elevada, permitiendo su administración una vez a la semana, sin embargo, esto permite la emergencia de resistencia cuando los microorganismos son expuestos a niveles subterapéuticos del fármaco (72).

4.2.7 Oxazolidinonas

Las oxazolidinonas como linezolid y tedizolid impiden la síntesis proteica de la bacteria bloqueando la formación del complejo de iniciación 70S al unirse al ARNr (ácido ribonucleico ribosómico) 23S. Tedizolid tiene una actividad más potente que linezolid ya que interacciona más fuertemente con la diana y mantiene la actividad en algunos casos de resistencia a linezolid. La resistencia a estos antibióticos es poco frecuente y se produce por modificación de la diana mediante tres mecanismos distintos. El más común es mediante mutaciones puntuales en el gen que codifica al ARNr 23S. Los otros mecanismos de resistencia son: mutaciones en los genes que codifican las proteínas ribosomales L3 y L4 y la adquisición del gen *cfr* (*chloramphenicol-florfenicol resistance*) (72).

4.2.8 Aminoglucósidos

Los aminoglucósidos interrumpen la síntesis de proteínas bacterianas uniéndose al sitio A del ARNr 16S de la subunidad 30S del ribosoma. La toxicidad y resistencia a estos antibióticos limitan su uso en el tratamiento de *S. aureus*. El mecanismo de resistencia más frecuente se produce por enzimas modificadoras de aminoglucósidos que actúan inactivando a los aminoglucósidos. Hay más de 100 enzimas modificadoras descritas y son codificadas por genes que se encuentran frecuentemente en plásmidos y transposones. Tres de estas enzimas (bifunctional aminoglycoside N-acetyltransferase AAC (6')-Ie/aminoglycoside O-phosphotransferase APH (2'')-Ia [AAC(6')-APH(2'')]); aminoglycoside 3'-phosphotransferase [APHA] y streptomycin 3''-adenylyltransferase [ANT]) confieren resistencia a uno o más aminoglucósidos usados en la práctica clínica, incluyendo gentamicina, tobramicina y amikacina (72).

4.2.9 Tetraciclinas

Las tetraciclinas inhiben la síntesis de proteínas bacterianas fijándose a la subunidad 30S del ribosoma. De este modo se impide el acceso de los aminoacil-t-ARNs, que no pueden unirse a la proteína que se está sintetizando. Hay diversos mecanismos de resistencia a las tetraciclinas, pero el principal es la adquisición de los genes *tet* y *otr*. El gen más común es *tetA* que confiere resistencia a doxiciclina y tetraciclina. Otros genes comunes son *tetK* y *tetM*. La resistencia a tigeciclina se ha observado en una cepa de SARM con mutaciones en el gen *rpsJ* (72).

4.2.10 Fluoroquinolonas

Las fluoroquinolonas, como ciprofloxacino, levofloxacino, la más activa moxifloxacino y la más reciente delafloxacino, inhiben la ADN girasa y la topoisomerasa IV y, por tanto, la replicación y transcripción del ADN. Delafloxacino tiene una CMI más baja en *S. aureus* que otras fluoroquinolonas y puede inhibir a la topoisomerasa IV o la ADN girasa, o a ambas enzimas. Además, tiene actividad contra el *biofilm* y las bacterias intracelulares, pero su actividad depende del pH. La resistencia a fluoroquinolonas se debe a menudo a mutaciones puntuales en las enzimas diana o la acción de bombas de eflujo en las células bacterianas. En *S. aureus* la resistencia está mediada usualmente por mutaciones

en la subunidad ParC de la topoisomerasa IV. Las bombas de eflujo activas contra fluoroquinolonas que son más comunes en *S. aureus* son NorA, NorB, NorC, MdeA, QacA y QacB (72). Las fluoroquinolonas destacan por su actividad intracelular, por lo que son importantes en el tratamiento de infecciones en las que se desarrolla un reservorio bacteriano intracelular, como en las infecciones articulares (73,74).

4.2.11 Otros antibióticos

La mupirocina inhibe la síntesis de las proteínas bacterianas mediante la unión a la isoleucil-tRNA sintetasa de la bacteria, impidiendo la incorporación de la isoleucina a las proteínas. La resistencia de bajo nivel a mupirocina se debe a mutaciones en el gen cromosómico *ileS*, que codifica la síntesis de la enzima isoleucil t-ARN sintetasa, alterando en consecuencia su centro activo y disminuyendo su afinidad por la mupirocina. La resistencia de alto nivel se debe a la adquisición de un gen adicional, de localización plasmídica (*ileS2* o *mupA*) que codifica una isoleucil t-ARN sintetasa sin afinidad por la mupirocina (75).

La rifampicina se une a la ARN polimerasa de la bacteria bloqueando la transcripción. La monoterapia con rifampicina es problemática por la rápida emergencia de resistencia de alto nivel, por lo que se debe usar junto con otros antibióticos. La resistencia a rifampicina se debe a mutaciones en el gen *rpoB*, que codifica para la subunidad beta de la ARN polimerasa (65). La rifampicina es un antibiótico muy importante en el tratamiento de infecciones con gran formación de *biofilm*, como es el caso de las infecciones articulares (73,76).

Los macrólidos, como eritromicina y claritromicina, inhiben la síntesis proteica bacteriana al unirse a la subunidad 50S del ribosoma. La resistencia a macrólidos se produce por modificación de la diana, por modificación del fármaco por enzimas o por bombas de eflujo. La clindamicina es una lincosamida que también se une a la subunidad 50S del ribosoma bacteriano y su resistencia se produce por los mismos mecanismos que en los macrólidos (65).

Introducción

La fosfomicina inhibe el enzima fosfoenolpiruvato sintetasa, inhibiendo la síntesis del peptidoglicano, esencial en la pared bacteriana. La resistencia a fosfomicina puede producirse por distintos mecanismos: mutaciones en los genes que codifican para los transportadores que median la entrada de la fosfomicina a las células bacterianas (*glpT* y *uhpT*), mutaciones en el gen *murA* que disminuyen la afinidad a la fosfomicina y enzimas modificadoras de fosfomicina (*fosA*, *fosB*, *fosC*, *fosX*) (77).

Las sulfonamidas, como el sulfametoxazol, y el trimetoprim inhiben la síntesis del ácido fólico, inhibiendo la dihidropteroato sintasa y la dihidrofolato reductasa, respectivamente. El sulfametoxazol y el trimetoprim se administran conjuntamente en la formulación de cotrimoxazol y, de esta forma, ambos antibióticos actúan sinérgicamente. La resistencia a ambos fármacos se produce por modificación de sus dianas (65).

El ácido fusídico inhibe la síntesis de proteínas bacterianas por inhibición del factor de elongación G y su resistencia se debe a los genes *fusB* y *fusC* que codifican proteínas que se unen al factor de elongación G o a mutaciones puntuales en el gen que codifica para ese factor (*fusA*) (65).

5. DIFICULTADES EN EL TRATAMIENTO DE LAS INFECCIONES ARTICULARES CAUSADAS POR *S. aureus*

A pesar de la combinación de un adecuado tratamiento antibiótico y quirúrgico, las infecciones articulares por *S. aureus* son muy difíciles de curar y tienen una elevada tasa de persistencia pudiendo evolucionar a una infección crónica. La persistencia y cronificación de la infección se asocia a una adaptación fenotípica de la bacteria que conduce a una disminución de la virulencia y a una evasión del sistema inmune del hospedador, persistiendo la infección en el interior de los osteoblastos y formando *biofilm* (78).

En la Figura 18 se representan los mecanismos de persistencia de la IPA causada por *S. aureus*. (1) Después de la cirugía, el hueso libera varios factores, como magnesio, induciendo un entorno donde se puede desarrollar el *biofilm* de *S. aureus*. (2) El *biofilm* se va formando por la unión de bacterias mediante una matriz compuesta

principalmente de exopolisacáridos, ADN extracelular (eDNA) y proteínas. (3) El acceso a las bacterias formadoras de *biofilm* de las células del sistema inmune del hospedador está dificultada por el *biofilm*. (4) La estructura del *biofilm* induce la formación de gradientes de difusión de nutrientes y oxígeno, que se encuentran en concentraciones más altas en las capas superiores del *biofilm*, y un gradiente opuesto de desechos metabólicos que se acumulan en las capas más profundas. (5). Las señales de comunicación son producidas y capturadas por bacterias (*quorum sensing*). Estas señales regulan la actividad del metabolismo y la producción de factores de virulencia. (6) Los antibióticos penetran parcialmente en el *biofilm*, localizándose a mayor concentración en la parte superior y a concentraciones progresivamente más bajas en la zona más profunda. Por tanto, mientras que las bacterias activas en las zonas superiores mueren eficientemente, en las zonas inferiores se alcanzan concentraciones subinhibitorias de los antibióticos que permiten que las bacterias sobrevivan, especialmente aquellas con metabolismos lentos, y persistan. (7) *S. aureus* también puede persistir en abscesos en los tejidos próximos al hueso, o (8) internalizado dentro de las células óseas como los osteoblastos, o incluso colonizando la red lacuno-canalicular de los osteocitos (OLCN). Estas estrategias permiten que *S. aureus* evada el sistema inmune del hospedador y pueda actuar como fuente para futuras infecciones (79).

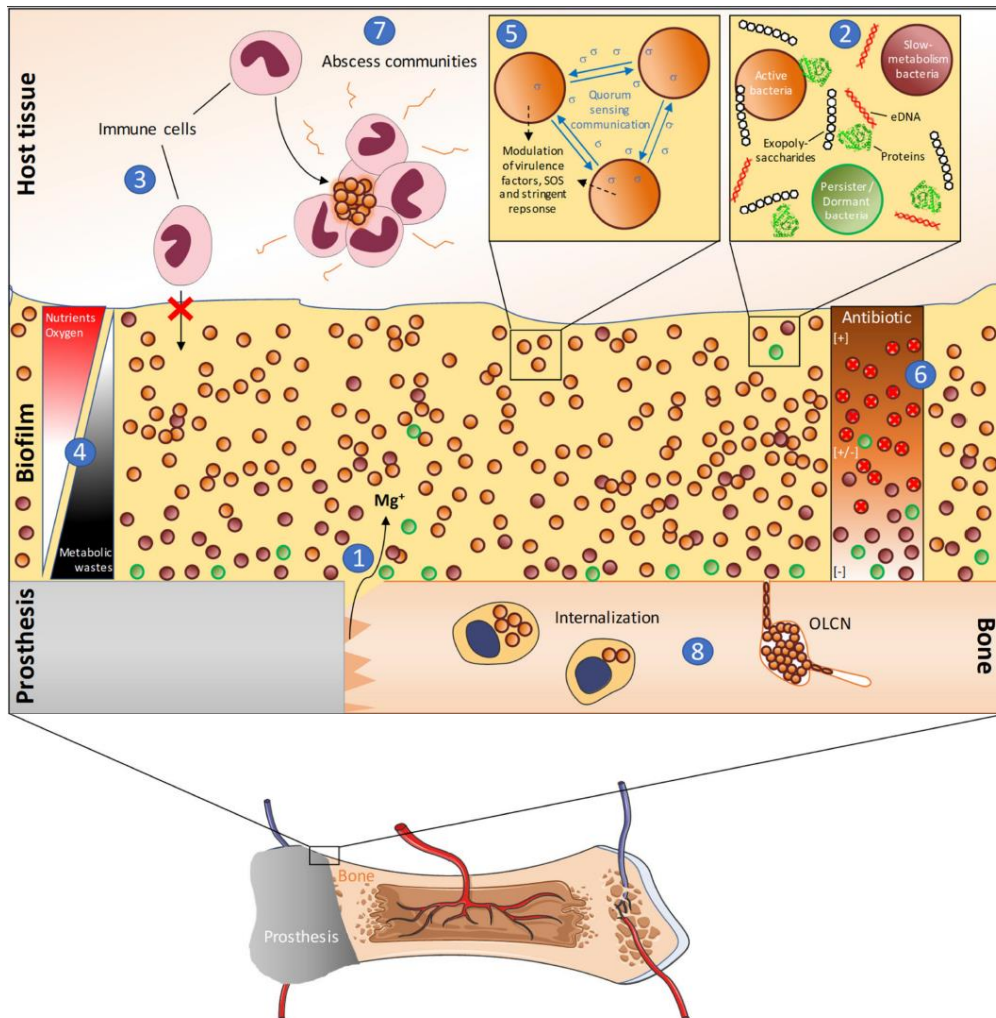


Figura 18. Mecanismos de persistencia de la infección protésica articular producida por *S. aureus* (79).

5.1 **BIOFILM**

5.1.1 **Formación de *biofilm***

La formación de *biofilm* es característica de la patogénesis de la IPA. Los materiales de los que están hechos las prótesis articulares (titanio y sus aleaciones, acero inoxidable, cromo-cobalto y biomateriales poliméricos) y los cementos de polimetilmetacrilato son susceptibles a ser colonizados por bacterias formadoras de *biofilm*. El *biofilm* es una estructura formada por la agregación de células microbianas embebidas en una matriz producida por los mismos microorganismos y que se adhiere a una superficie (19)

(GbejuadeActaOrth2015) (Figura 19). El *biofilm* dificulta el efecto de los antimicrobianos y de las defensas del hospedador en *S. aureus* (31).

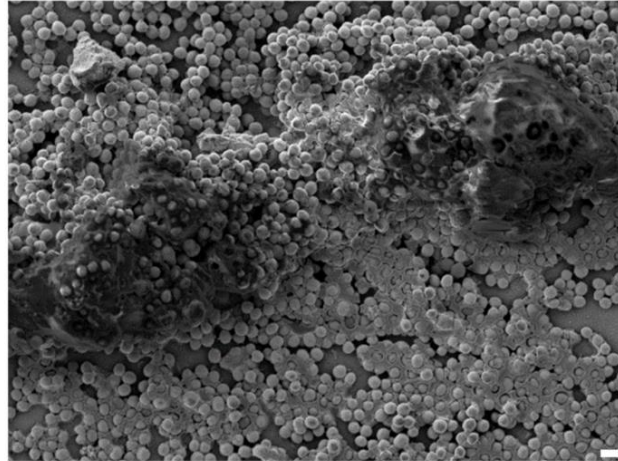


Figura 19. *Biofilm* de *S. aureus* adherido a una prótesis. Imagen obtenida mediante microscopía electrónica de barrido. Barra de la escala: 1 μm (79).

La formación de *biofilm* ocurre en varias etapas (Figura 20) (54):

1. Unión de los microorganismos a superficies recubiertas de proteínas de la matriz del hospedador y agregación en estructuras multicelulares: la prótesis se cubre rápidamente por una matriz formada por proteínas del hospedador, como colágeno, fibronectina y fibrinógeno. Después proteínas específicas de los estafilococos interactúan con esas proteínas humanas de la matriz formando microcolonias. Entre estas proteínas de la superficie de los estafilococos, las más importantes son las MSCRAMMs, entre las que destacan las proteínas ClfA, ClfB, FnBPA y FnBPB.
2. Maduración y proliferación: las microcolonias formadas anteriormente crecen y, además, secretan moléculas poliméricas (exopolisacáridos, proteínas, ácidos teicoicos y ADN (ácido desoxirribonucleico) extracelular [eADN] que proviene de células muertas) que forman la matriz del *biofilm*. Uno de los exopolisacáridos

principales del *biofilm* es la PIA. La biosíntesis de PIA se realiza por el locus *ica*, (*intercellular adhesion*), que consta de los genes *icaA*, *icaD*, *icaB* e *icaC*.

3. Dispersión. Enzimas diversos, como nucleasas y proteasas, y las PSMs degradan los polímeros del *biofilm*. El desprendimiento del *biofilm* facilita la diseminación sistémica y las complicaciones que conllevan las infecciones asociadas a dispositivos médicos. Las PSMs tienen un papel importante tanto en la estructuración como en la dispersión del *biofilm*.

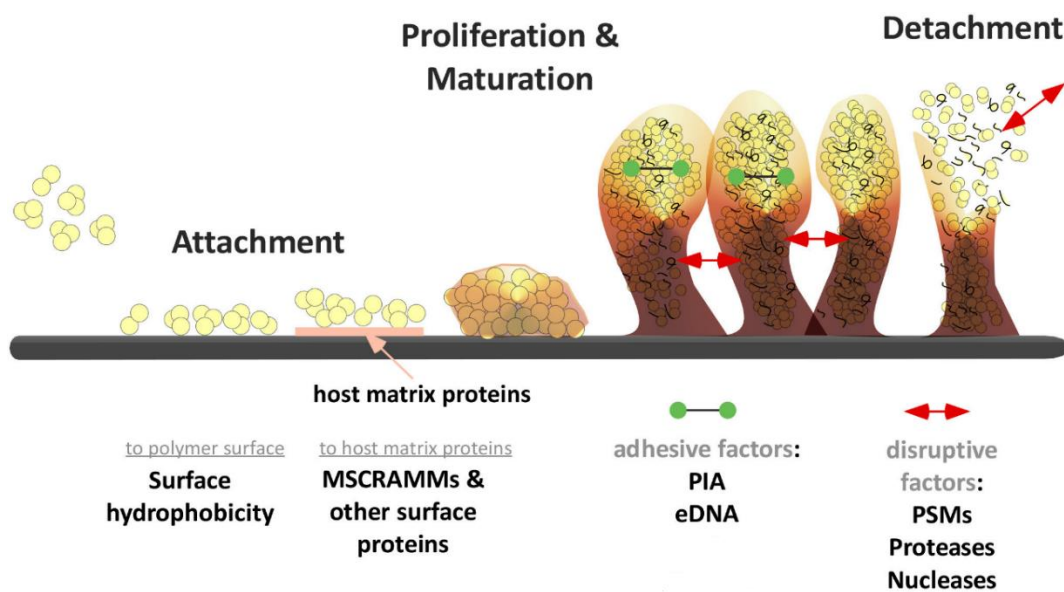


Figura 20. Formación de *biofilm* en estafilococos (54).

5.1.2 Antibióticos y *biofilm*

En un modelo in vitro de *biofilm* estafilocócico se encuentran cuatro estados metabólicos distintos: células en fase de crecimiento aeróbico, fermentativo, células latentes (incluyendo células de crecimiento muy lento y persistentes) y células muertas. Una de las características más importantes del *biofilm* es su elevada tolerancia a agentes antimicrobianos, ya que pueden tolerar hasta 100-1000 veces más de concentración de antibióticos y desinfectantes que su contrapartida planctónica. Algunos de los mecanismos que contribuyen a la resistencia del *biofilm* a los antimicrobianos son los siguientes: disminución de la penetración del fármaco, diferente tasa de crecimiento y

de gradiente de nutrientes dentro del *biofilm*, fenómeno de persistencia (variantes latentes, con un nivel metabólico bajo y tasas muy bajas de división celular) e inducción de mutaciones de resistencia y de transferencia horizontal de genes de resistencia entre bacterias debido a la elevada densidad celular del *biofilm* (55,80–82).

Los métodos de estudio de sensibilidad a los antibióticos que se usan en la práctica clínica (métodos de difusión en agar con disco o tiras de gradiente de antibióticos [Etest en el caso de BioMérieux] y métodos de dilución) sólo son de utilidad para determinar la sensibilidad en las bacterias planctónicas y no en las formadoras de biofilm. Existen varios métodos para ensayar la sensibilidad a antibióticos del *biofilm*: sistemas cerrados (método de placa de microtitulación, método de Calgary [CBD, dispositivo de *biofilm* Calgary, *Calgary biofilm device*]) y sistemas abiertos (celda de flujo, reactor del CDC [Centro de Control de Enfermedades, *Center for Disease Control*]). A pesar de que las bacterias del *biofilm* son más resistentes a los antibióticos que las planctónicas, los puntos de corte para las bacterias formadoras de *biofilm* no están definidos. La ausencia actual de estandarización de los métodos, parámetros e interpretación de los resultados de sensibilidad a antimicrobianos en *biofilm* limita la aplicación de los datos obtenidos en el ámbito clínico (76,82).

Los principales antibióticos que tienen capacidad de penetrar en el *biofilm* son rifampicina, daptomicina, linezolid, levofloxacin, amikacina y vancomicina (55). La rifampicina es el pilar del tratamiento de las infecciones osteoarticulares por *S. aureus* por varios motivos: es un antibiótico bactericida para las cepas sensibles, tiene un largo efecto postantibiótico, puede difundir muy fácilmente dentro de las células y dentro de los *biofilms* bacterianos donde sigue siendo bactericida y, además, la rifampicina puede actuar en bacterias latentes con baja tasa de división porque inhibe la ARN polimerasa bacteriana, bloqueando la síntesis de las proteínas bacterianas. Sin embargo, existe un gran riesgo de emergencia de mutantes resistentes a rifampicina, por lo que requiere la administración conjunta con otros antibióticos (73,76,83). Se ha demostrado que los regímenes de tratamiento con combinaciones de rifampicina son exitosos en infecciones en las que el *biofilm* es inmaduro y la carga bacteriana es baja, por tanto, deberían

reservarse para pacientes tratados con DAIR que cumplen las siguientes condiciones: infección estafilocócica de corta duración, piel y tejidos blandos en buenas condiciones, implante estable y sensibilidad a rifampicina documentada. El mayor desafío en la práctica clínica es la dosificación y duración del tratamiento (74). Las fluoroquinolonas (levofloxacino) son los antibióticos con los que la rifampicina se combina más frecuentemente en el tratamiento de la infección osteoarticular por *S. aureus*. Las fluoroquinolonas tienen una excelente biodisponibilidad oral y un importante efecto postantibiótico y actividad intracelular (73,74,84–86). En los últimos años han surgido nuevos antibióticos activos contra el *biofilm*, como dalbavancina y ceftarolina, que además presentan actividad contra el SARM (87,88). En la actualidad se encuentran en estudio diferentes estrategias para combatir el *biofilm* que forma *S. aureus*: moléculas que interfieren en el sistema de *quorum sensing* del *agr*, moléculas que degradan la matriz del *biofilm* o que tienen actividad bactericida contra las bacterias formadoras de *biofilm*, la modificación de los materiales que componen los implantes para impedir la adherencia bacteriana a los mismos, la aplicación de nanopartículas capaces de liberar antibióticos y el uso de bacteriófagos, que son virus que infectan a células bacterianas (80).

5.2 BACTERIAS INTRACELULARES

Las bacterias pueden evadir tanto a los antibióticos como a las defensas del hospedador “escondiéndose” en el interior de las células de éste (Figura 21). Hasta un 8% de las células de *S. aureus* invaden fagocitos no profesionales como los osteoblastos. La internalización de *S. aureus* en ellos está mediada por la fibronectina, que forma un puente entre la FnBP estafilocócica y la integrina $\alpha 5\beta 1$ de los osteoblastos. Esta interacción activa al ligando de apoptosis de factor de necrosis tumoral (TRAIL), que induce la apoptosis de osteoblastos y la destrucción ósea. Además de esconderse en los osteoblastos, *S. aureus* también puede colonizar la red lacuno-canalicular de los osteocitos (89). Por tanto, para el tratamiento de la IPA producida por *S. aureus* resulta de gran utilidad antimicrobianos con actividad intracelular, como el levofloxacino (73,86).

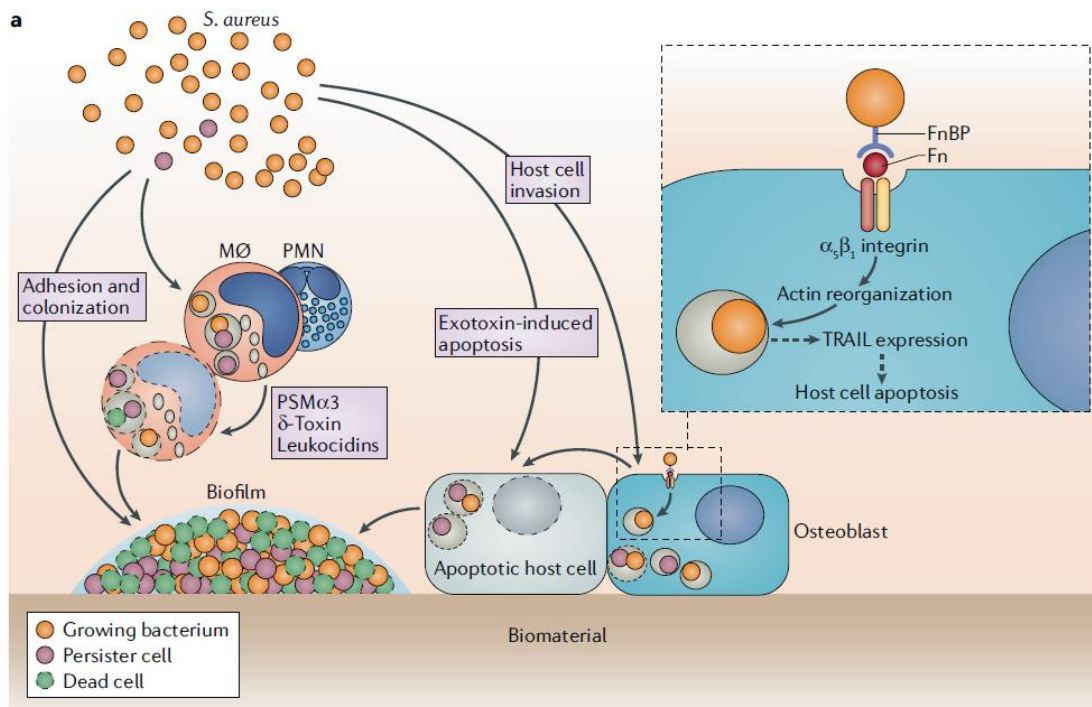


Figura 21. Invasión de las células del hospedador en la infección protésica articular producida por *S. aureus* (89).

Los fenotipos SCV pueden localizarse intracelularmente evadiendo el sistema inmune y facilitando la persistencia de la infección. Las colonias de las SCVs son más pequeñas y, generalmente, no pigmentadas y no hemolíticas. Se caracterizan por un crecimiento lento y por la secreción de factores citotóxicos a bajos niveles, que permite que las bacterias internalizadas sobrevivan durante largos períodos de tiempo. (90–92).

5.3 OTRAS FORMAS DE EVASIÓN DEL SISTEMA INMUNE DEL HOSPEDADOR

Además de los mecanismos descritos anteriormente que utiliza *S. aureus* para evadir el sistema inmune del hospedador (capacidad de formar *biofilm* y de internalizarse en las células), esta bacteria posee otras características que le ayudan a esa evasión, principalmente la cápsula antifagocítica (de tipo 5 u 8) y la proteína A (SpA), que se une a la porción Fc de la inmunoglobulina evitando así la opsonización (60). *S. aureus* induce

Introducción

la lisis de leucocitos con toxinas, como las γ -hemolisinas HlgAB y HlgCB, y la LPV, y varios PSMs.

El 90% de las cepas de *S. aureus* aisladas de muestras clínicas de humanos contienen un fago, integrado en la β -hemolisina, que porta un *cluster* de evasión del sistema inmune. Este *cluster* siempre codifica para la molécula SCIN (inhibidor estafilocócico del complemento, *staphylococcal complement inhibitor*) (codificado por el gen *scn*), que impide la opsonización y fagocitosis y, por tanto, la muerte de *S. aureus* producida por los neutrófilos humanos. Además de la molécula SCIN, el *cluster* puede portar diferentes combinaciones de otros genes que también intervienen en la evasión del sistema inmune: SAK (estafiloquinasa, *staphylokinase*) y CHIPS (proteína de inhibición de la quimiotaxis, *chemotaxis-inhibiting protein*) y SEA (enterotoxina A) (93–95).

JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

La patogénesis de la infección articular es bastante compleja, sobre todo de la IPA, ya que implica la interacción entre el microorganismo, la prótesis y el hospedador (13,15–17). Esto contribuye a la complejidad del manejo terapéutico de la infección articular, que debe ser médico y quirúrgico, requiriendo un abordaje multidisciplinar (1). Aun así, la tasa de fracaso terapéutico de estas infecciones es bastante elevada (superior al 20% en la IPA causada por *S. aureus* (96,97). Además, con el incremento en el número de artroplastias, la frecuencia de la IPA está aumentando (10–13).

S. aureus, uno de los principales microorganismos causantes de infección articular (2,23), es una bacteria versátil capaz de producir distintos tipos de infección articular y, además, con diferentes presentaciones clínicas (21,22). Esta variedad se debe, probablemente, al gran número de factores de virulencia que tiene este microorganismo, regulados principalmente por el sistema regulador accesorio *agr* (52). A pesar de que en la evolución clínica de la infección articular intervienen numerosos factores, los estudios previos se han centrado en la búsqueda de factores clínicos indicadores de la evolución clínica de los pacientes con artritis protésica y nativa causada por *S. aureus* (96–102). Sin embargo, muy pocos han estudiado las características microbiológicas y los factores de virulencia y moleculares de *S. aureus* en estas infecciones (50,103) y aún menos, han analizado el impacto que esos factores microbiológicos pueden tener en la presentación y evolución clínica de los pacientes con infección articular (51,78,104–106). Se dispone de muy poca información en cuanto a las posibles causas de alteración del sistema *agr* y de su posible papel en la evolución de la infección articular. También existe poca información sobre la posible asociación de determinados genotipos de *S. aureus* y la mayor o menor gravedad de las infecciones, o con un diferente mecanismo patogénico. Algunos estudios han sugerido cierta asociación entre los complejos clonales CC5 y CC30 con la presencia de infecciones osteoarticulares (50,107).

Justificación e hipótesis

La hipótesis de la presente tesis es que la infección articular producida por *S. aureus* es de gran complejidad, y que algunas características fenotípicas y genotípicas del microorganismo pueden tener influencia en la presentación y en la evolución clínica de la infección. El conocimiento de estos factores podría ser útil para profundizar en el mecanismo patogénico de la infección articular causada por *S. aureus* y, en consecuencia, podría ayudar en la toma de decisiones terapéuticas mejorando el manejo clínico de los pacientes con esta infección.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar clínica y microbiológicamente la infección articular (artritis séptica nativa e IPA) producida por *S. aureus* y explorar la asociación de las características microbiológicas (fenotípicas y genotípicas) de la bacteria con la presentación y evolución clínica de los pacientes.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar las características clínicas y microbiológicas de la artritis séptica nativa producida por *S. aureus*, determinando la influencia de las características genotípicas y fenotípicas de la bacteria en la presentación y evolución clínica de los pacientes.
 - 1.1. Caracterización clínica de los pacientes con artritis séptica nativa causada por *S. aureus*.
 - 1.2. Caracterización fenotípica y genotípica de las cepas de *S. aureus* causantes de artritis séptica nativa.
 - 1.3. Estudio de la influencia de la presencia de determinados rasgos fenotípicos y genotípicos de las cepas de *S. aureus* en la evolución clínica de los pacientes con artritis nativa.
2. Analizar las características clínicas y microbiológicas de la IPA producida por *S. aureus*, determinando la influencia de las características genotípicas y fenotípicas de la bacteria en la presentación y evolución clínica de los pacientes.
 - 2.1. Caracterización clínica de los pacientes con IPA causada por *S. aureus*.
 - 2.2. Caracterización fenotípica y genotípica de las cepas de *S. aureus* causantes de IPA.

Objetivos

- 2.3. Estudio de la sensibilidad a antimicrobianos en *biofilm* producido por las cepas de *S. aureus* causantes de IPA
- 2.4. Estudio de la influencia de la presencia de determinados rasgos fenotípicos y genotípicos de las cepas de *S. aureus* en la presentación clínica de la IPA.
- 2.5. Estudio de la influencia de la presencia de determinados rasgos fenotípicos, incluida la sensibilidad a antimicrobianos en *biofilm*, y genotípicos de las cepas de *S. aureus* en la evolución clínica de los pacientes con IPA.
- 2.6. Análisis específico de los episodios de IPA causada por *S. aureus* resistente a metilicina, incluyendo la caracterización fenotípica y genotípica de las cepas, así como el estudio de la influencia de la presencia de determinados rasgos fenotípicos y genotípicos en la evolución clínica de los pacientes con IPA.
3. Caracterizar en profundidad el genoma de *S. aureus* causante de infección articular (artritis séptica nativa e IPA) mediante secuenciación de genoma completo.
 - 3.1. Estudiar la relación entre las características genéticas de *S. aureus* y la presentación y evolución clínica de la IPA.
 - 3.2. Comparar las características genéticas de cepas de *S. aureus* causantes de IPA persistente o recidivante respecto a cepas causantes de IPA con evolución clínica favorable y análisis de los cambios genéticos que se producen en las cepas de *S. aureus* durante la evolución clínica de la IPA.
 - 3.3. Investigar la posible asociación del contenido genético de cepas de SARM pertenecientes al complejo clonal principal, CC5, al tipo de infección articular (artritis nativa o IPA), al hospital de procedencia y a su evolución en el tiempo.

MATERIAL Y MÉTODO

MATERIAL Y MÉTODO

1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Se desarrollaron tres bloques de estudio para responder a cada uno de los tres objetivos específicos de la presente tesis doctoral, respectivamente

1.1 BLOQUE I

Estudio retrospectivo de artritis séptica nativa producida por *S. aureus*: estudio desarrollado durante el período de 2005 a 2015 en el Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid. Este hospital cuenta con unas 1300 camas y presta servicio a una población de 550000 personas del sur de Madrid. Este estudio respondió a los objetivos específicos 1.1, 1.2 y 1.3, descritos en el apartado anterior.

1.2 BLOQUE II

Estudio de **IPA** producida por *S. aureus*. Este bloque se compone de dos estudios:

- **Estudio retrospectivo de IPA producida por SARM** durante el período de 2005 a 2015 en el Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid. Se trata de un estudio piloto en un solo hospital y centrado en los casos de IPA producidos por SARM, por el aumento de la incidencia de SARM en los últimos tiempos y por la mayor dificultad en el manejo terapéutico que genera la resistencia a los antibióticos. Este estudio respondió al objetivo específico 2.6.
- **Estudio prospectivo multicéntrico de IPA producida por *S. aureus*** durante el período de mayo de 2016 a septiembre de 2017 en la Comunidad de Madrid (estudio PISA: *Prosthesis Infection by Staphylococcus aureus*). En este estudio se reunió una cohorte prospectiva de pacientes con IPA por *S. aureus* mediante la participación de 11 hospitales de la Comunidad de Madrid (Anexo I), para profundizar en la patogénesis de esta infección. Este estudio respondió a los objetivos específicos 2.1 a 2.5.

1.3 BLOQUE III

Secuenciación de genoma completo (SGC) de *S. aureus* causante de infección articular. Se secuenció el genoma completo de cepas de *S. aureus* de los bloques de estudio anteriores con el objetivo de profundizar en los factores moleculares de estas cepas. Este bloque de estudio se llevó a cabo en paralelo al estudio prospectivo PISA y conforme aumentó la disponibilidad de la técnica de SGC, con las ventajas que tiene respecto a los *microarrays* de ADN.

Este bloque se compone de tres estudios:

- Caracterización molecular de *S. aureus* causante de IPA. Este estudio respondió al objetivo específico 3.1.
- Caracterización molecular de *S. aureus* causante de IPA persistente y recidivante. Este estudio respondió al objetivo específico 3.2.
- Caracterización molecular del complejo clonal CC5 de SARM causante de infección articular (artritis nativa y protésica). Este estudio respondió al objetivo específico 3.3.

2. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Los diferentes estudios desarrollados en la presente tesis fueron aprobados por el Comité de Ética de Investigación Clínica del Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid: Nº CEI 16/188, Proyecto de Investigación TP 16/0092 (Anexo II). Los datos de cada una de las variables clínicas se recogieron directamente de la historia clínica de los pacientes por parte de los investigadores. Se adoptó un procedimiento de disociación seguro con cualquier dato que permitiera su asociación con la identidad del paciente. Por ello, no fue necesaria la incorporación de consentimiento informado tal y como se indica en la normativa vigente (BOE 310 de 25 de diciembre de 2009). Todos los datos se procesaron de forma confidencial, y se garantizó la protección de datos según los principios de la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, y del Real Decreto 1720/2007, de 21 de diciembre. También se garantizaron los derechos de los pacientes según la declaración de Helsinki actualizada.

3. SELECCIÓN DE LA MUESTRA

En la Tabla 5 se describen los diferentes estudios de infección articular producida por *S. aureus* incluidos en la presente tesis doctoral.

Tabla 5. Características de los estudios de infección articular causada por *S. aureus* incluidos en la presente tesis doctoral.

Bloque de estudio	Estudios	Número pacientes	Cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>		Número hospitales	Período de tiempo
			Número cepas	Resistencia a meticilina		
Bloque I: artritis nativa	Retrospectivo artritis nativas	29	21 ^a	14 SASM y 7 SARM	1 ^e	2005-2015
Bloque II: IPA	Retrospectivo IPA	18	18 ^b	SARM	1 ^e	2005-2015
	Prospectivo IPA (PISA)	88	88 ^b	68 SASM y 20 SARM	11 ^f	Mayo 2016- Septiembre 2017
Bloque III: SGC infección articular (artritis nativa e IPA)	IPA	45	49 ^c	29 SASM y 20 SARM (de estudio PISA)	11 ^f	Mayo 2016- Septiembre 2017
	IPA persistente y recidivante	14	20 ^d	18 SASM y 2 SARM (de estudio PISA)	4 ^g	Mayo 2016- Septiembre 2017
	Artritis nativa e IPA	38	38 ^b	SARM CC5 (5 de bloque I y 33 de bloque II [18 del estudio retrospectivo y 15 del estudio PISA])	8 ^h	2005- mayo2017

Abreviaturas: CC, complejo clonal; IPA, infección protésica articular; PISA, *prosthesis infection by Staphylococcus aureus*; SARM, *S. aureus* resistente a meticilina; SASM, *S. aureus* sensible a meticilina; SGC, secuenciación de genoma completo.

^a De los 29 pacientes de este estudio, sólo se incluyeron 21 cepas de *S. aureus* disponibles, todas ellas aisladas en el cultivo de diagnóstico de la infección.

^b Se incluyó una cepa por paciente, todas ellas aisladas en el cultivo de diagnóstico de la infección.

^c En 4 casos se incluyeron 2 cepas de *S. aureus*.

Material y método

^d Se incluyeron las dos cepas aisladas de 6 casos con IPA persistente y recidivante y 8 cepas de 8 casos que evolucionaron favorablemente.

^e Hospital Universitario 12 de Octubre.

^f Hospital Universitario 12 de Octubre, Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Hospital Universitario La Paz, Hospital Universitario Clínico San Carlos, Hospital Universitario Príncipe de Asturias, Hospital Universitario de Getafe, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Hospital Universitario de La Princesa, Hospital Universitario Rey Juan Carlos y Hospital Universitario Puerta de Hierro.

^g Hospital Universitario 12 de Octubre, Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz, Hospital Universitario La Paz y Hospital Universitario Ramón y Cajal.

^h Hospital Universitario 12 de Octubre, Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Hospital Universitario La Paz, Hospital Universitario Clínico San Carlos, Hospital Universitario Príncipe de Asturias, Hospital Universitario de Getafe y Hospital Universitario de La Princesa.

La identificación de los casos para los estudios retrospectivos de artritis séptica nativa y de IPA causadas por *S. aureus* desde 2005 hasta 2015 en el Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid se realizó mediante la revisión previa de la base de datos del Servicio de Microbiología del hospital, obteniéndose los casos de infección articular por *S. aureus* en dicho período (artritis séptica nativa e infección de implantes ortopédicos) (Figura 22). El material de osteosíntesis hace referencia a los implantes ortopédicos usados en cirugía osteoarticular para estabilizar fragmentos óseos mediante implantes metálicos en contacto con el hueso (tornillos, placas, clavos intramedulares). El material de osteotaxis hace referencia a los fijadores externos que estabilizan las fracturas.

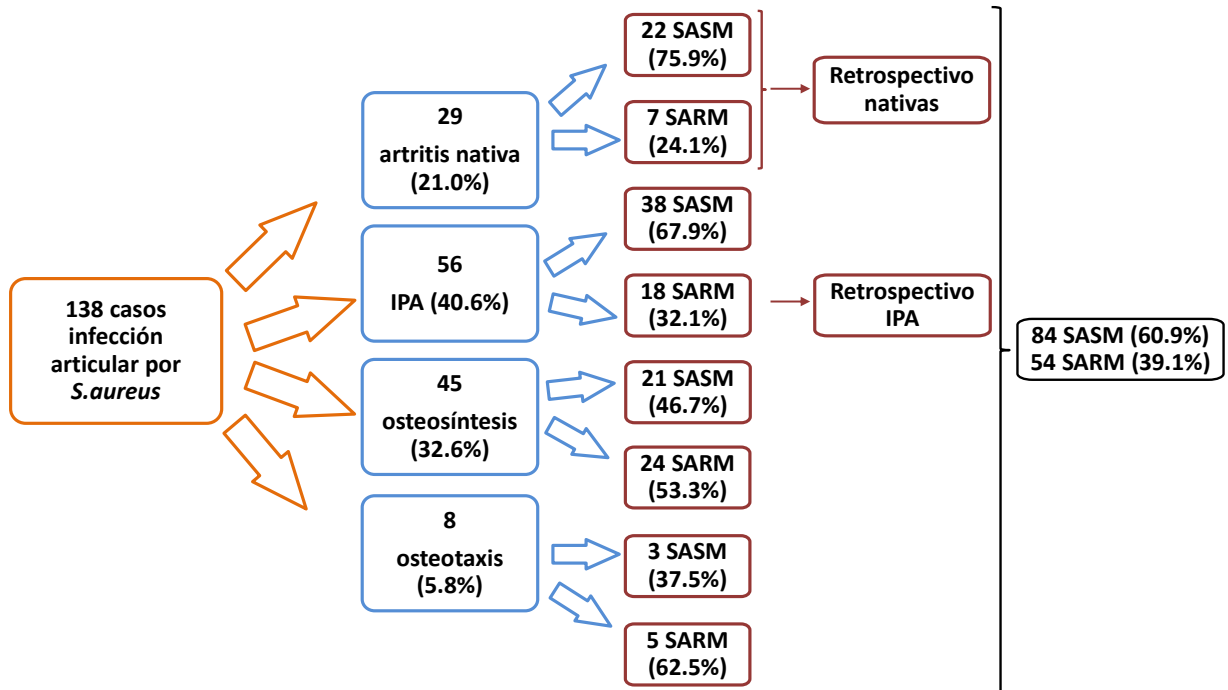


Figura 22. Artritis séptica nativa e infecciones de implantes ortopédicos causadas por *S. aureus* en el Hospital Universitario 12 de Octubre desde 2005 hasta 2015. Abreviaturas: IPA, infección protésica articular; SARM, *S. aureus* resistente a meticilina; SASM, *S. aureus* sensible a meticilina.

En el estudio retrospectivo de artritis séptica nativa causadas por *S. aureus* se incluyeron los 29 casos, pero para los estudios microbiológicos sólo se pudo disponer de 14 de las 22 cepas de SASM y de todas las cepas de SARM (n=7). En el estudio retrospectivo de IPA se incluyeron los 18 casos de IPA producida por SARM y todas las cepas correspondientes.

En el estudio prospectivo multicéntrico de IPA producida por *S. aureus* (estudio PISA) los casos fueron recogidos por cada uno de los 11 hospitales participantes y los datos clínicos de los pacientes y las cepas de *S. aureus* fueron enviados al centro promotor (Hospital Universitario 12 de Octubre) para su estudio y análisis.

La selección de las cepas de *S. aureus* que se incluyeron en el bloque III de SGC fue el siguiente para los diferentes estudios:

Material y método

- Caracterización molecular de *S. aureus* causante de IPA: se seleccionó al azar una muestra representativa de los casos incluidos en el estudio PISA para profundizar en el análisis del genoma de *S. aureus*.
- Caracterización molecular de *S. aureus* causante de IPA persistente y recidivante: se incluyeron las dos cepas de todos los pacientes del estudio PISA con IPA persistente o recidivante tratada con DAIR (desbridamiento, antibioterapia y retención del implante) (12 cepas de 6 pacientes) y 8 cepas seleccionadas de 8 pacientes del estudio PISA con IPA que también fue tratada con DAIR, pero evolucionó favorablemente.
- Caracterización molecular del complejo clonal CC5 de SARM causante de infección articular. Debido a que el complejo clonal CC5 es el CC predominante en la infección articular y en España, se realizó este estudio multicéntrico en el que se incluyeron las cepas de SARM pertenecientes al complejo clonal CC5 del bloque I y del estudio retrospectivo de IPA del bloque II y las cepas de SARM pertenecientes al complejo clonal CC5 del estudio PISA del bloque II disponibles hasta la fecha de mayo de 2017 (Figura 23).

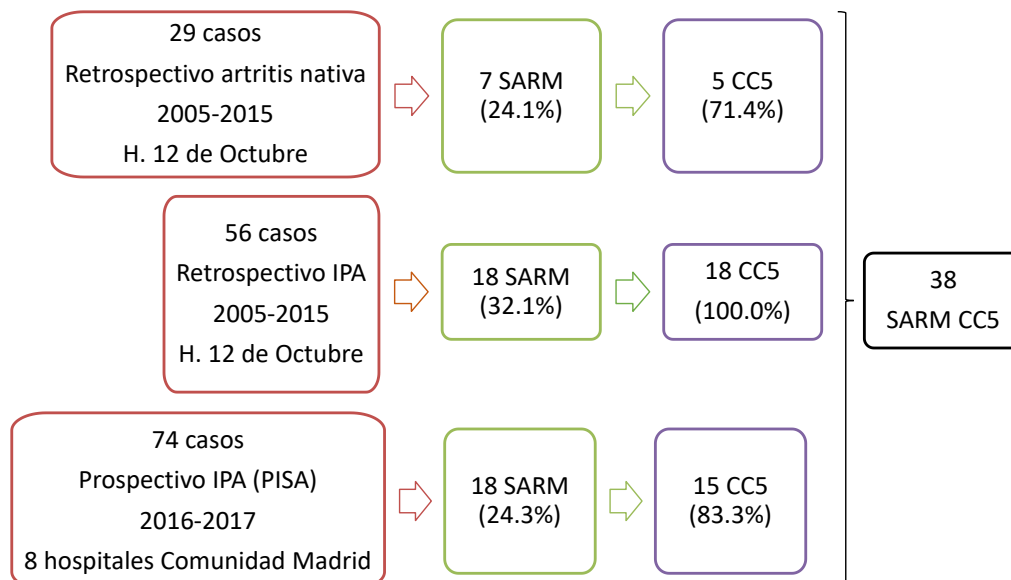


Figura 23. Casos de infecciones articulares causadas por cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina pertenecientes al complejo clonal CC5 que se incluyeron en este estudio, procedentes de los tres estudios anteriormente descritos en la presente tesis doctoral. Abreviaturas: IPA, infección protésica articular, SARM: *S. aureus* resistente a meticilina.

3.1 PACIENTES

Se incluyeron a los pacientes mayores de 18 años con artritis séptica nativa o IPA producida por *S. aureus*.

La artritis séptica nativa estafilocócica se definió como los casos en los que *S. aureus* fue aislado de líquido articular, cultivos intraoperatorios y/o hemocultivos (108), junto con un cuadro clínico compatible con artritis: dolor local que lleva a pérdida de funcionalidad y presencia de signos inflamatorios (eritema caliente), derrame articular, y fiebre (109). En el estudio de artritis séptica nativa también se incluyeron los casos producidos tras un trauma o una cirugía articular, siempre que no se hubiera implantado un dispositivo ortopédico.

La IPA estafilocócica se definió con la presencia de uno o más cultivos (quirúrgico, de líquido articular o hemocultivo) positivos para *S. aureus*, junto con una presentación clínica compatible con IPA (como dolor articular, eritema, presencia de fístula, purulencia alrededor de la prótesis, y/o signos inflamatorios locales) (26,102).

3.2 CEPAS DE *S. aureus*

Se recogieron las cepas de *S. aureus* obtenidas del líquido articular, biopsia articular, hemocultivo u otra muestra clínica relevante para la artritis séptica nativa y la IPA (material protésico). También se incluyeron las cepas de *S. aureus* obtenidas durante la evolución clínica del paciente, por infección persistente o por recidiva de la infección. Las infecciones polimicrobianas fueron igualmente incluidas en los estudios, si bien sólo se analizó la cepa de *S. aureus*. Las cepas de los estudios retrospectivos se recuperaron de su conservación en congelación a -80 °C.

En el estudio PISA las cepas de *S. aureus* fueron identificadas por los investigadores de cada hospital participante, donde también se analizó la sensibilidad a los antibióticos. Todas las cepas fueron enviadas por cada hospital participante al Hospital Universitario 12 de Octubre junto con una ficha estandarizada de recogida de datos microbiológicos de las pruebas de rutina de sensibilidad a antibióticos realizadas por cada hospital (Anexo III). Las cepas de *S. aureus* fueron subcultivadas en una placa de agar sangre y

para el envío de la cepa se utilizó una torunda con medio de transporte Amies o bien se envió la placa de agar sangre sellada. Para nombrar las cepas se estableció una codificación que está recogida en el Anexo I.

4. DATOS CLÍNICOS

Se recogieron datos demográficos, clínicos (características basales, factores de riesgo, presentación clínica) y de tratamiento (antimicrobiano y quirúrgico) de los pacientes con infección articular producida por *S. aureus* revisando las historias clínicas de los pacientes.

El manejo terapéutico de los pacientes con artritis séptica nativa fue decidido por el equipo médico multidisciplinar de cada hospital, según las recomendaciones vigentes (4,9). El tratamiento antimicrobiano empírico se inició rápidamente tras realizar la toma de muestras para estudio microbiológico (líquido articular y/o hemocultivo) y se realizó habitualmente administrando cloxacilina y/o ceftriaxona. En pacientes con alergia a betalactámicos o con factores de riesgo de infección por SARM se administró vancomicina. Después se estableció el tratamiento antibiótico según los resultados de las pruebas de sensibilidad a antimicrobianos. La indicación de drenaje quirúrgico varió según la articulación afectada (sobre todo se en las grandes articulaciones), la presentación clínica y el equipo médico.

El manejo terapéutico de los pacientes con IPA fue decidido por el equipo médico multidisciplinar de cada paciente de forma individualizada, según las recomendaciones vigentes (12,17,26). Los pacientes con infección aguda, una prótesis estable y un tejido periprotésico en buenas condiciones fueron considerados para DAIR. En caso contrario, se consideró el explante de la prótesis. El tratamiento empírico inicial fue habitualmente de amplio espectro, siendo posteriormente ajustado de acuerdo con las pruebas de sensibilidad a antimicrobianos, dando preferencia a las combinaciones con rifampicina.

4.1 VARIABLES A ESTUDIO Y DEFINICIONES

4.1.1 Datos clínicos que se recogieron de los pacientes con artritis séptica nativa producida por *S. aureus* (100,101).

- Sexo y fecha de nacimiento
- Comorbilidad:
 - Diabetes mellitus (sí/no): cualquier paciente que recibía tratamiento antidiabético (antigluceciantes orales o insulina).
 - Insuficiencia renal crónica (sí/no): cifra basal de creatinina >150 µmol/L (>1.7 mg/dL).
 - Tratamiento inmunosupresor (sí/no): cualquier paciente que recibía tratamiento habitual con glucocorticoides (cualquier dosis) u otros inmunosupresores.
 - Cáncer (sí/no): cualquier forma neoplásica maligna activa (tumores sólidos y hematológicos), si existía enfermedad residual, si el paciente estaba bajo tratamiento quimioterápico o radioterápico (o lo había estado en los seis meses previos al episodio de artritis séptica nativa).
 - Cirrosis hepática (sí/no): casos de hepatopatía crónica que presentaban datos clínicos (ascitis, encefalopatía hepática, ictericia) o analíticos (hiperbilirrubinemia, coagulopatía, hipoalbuminemia) compatibles con insuficiencia hepática.
 - Enfermedad pulmonar crónica (sí/no), incluyendo enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma y enfermedades intersticiales pulmonares.
 - Cardiopatía crónica (sí/no), incluyendo insuficiencia cardíaca crónica, valvulopatía o arritmias.
 - Demencia (sí/no) de acuerdo a valoraciones previas del médico de cabecera, especialistas, o cuando el cuadro era evidente para sus médicos tratantes.

Material y método

- Hemiplejía (sí/no): incluyendo cualquier secuela grave de enfermedad cerebro-vascular.
- Dermopatía (sí/no): incluyendo cualquier dermatopatía crónica (psoriasis, dermatitis atópica, conectivopatías con afectación cutánea...).
- Bacteriemia previa por *S. aureus* (sí/no) y fecha.
- VIH (sí/no) y estado inmunitario.
- Adicción a drogas por vía parenteral (ADVP) (sí/no) y si era activo.
- Reumatismo (sí/no): enfermedad reumática de base (artritis reumatoide, espondiloartropatía, lupus, vasculitis, esclerodermia, síndrome de Sjögren, síndrome *overlap*, otras) (110).
- Artritis microcristalina (sí/no) y el tipo (gota, pirofosfato cálcico, hidroxapatita, mixta).
- Traumatismo previo sobre la articulación (sí/no) en las cuatro semanas precedentes al episodio de artritis.
- Cirugía previa sobre la articulación (sí/no): tipo y fecha.
- Institucionalización (sí/no), en pacientes que vivían en residencias sanitarias o geriátricas.
- Ingreso antes de la artritis (sí/no): apuntar fecha de alta, o bien fecha de ingreso si era un episodio nosocomial.
- Clasificación de la artritis séptica nativa según el contacto del paciente con el sistema sanitario según los criterios de Friedman et al (111):
 - Infección nosocomial (sí/no): infección adquirida durante la estancia en un hospital cuando el paciente lleva ingresado 48 horas o más.
 - Infección relacionada con el cuidado sanitario (*health-care related*, HCR) (sí/no):
 - Paciente institucionalizado.
 - Que había acudido a un Hospital de Día para medicación IV, había recibido quimioterapia IV o se había realizado hemodiálisis en los últimos treinta días.

- Que había recibido atención domiciliaria sanitaria incluyendo tratamiento IV en los últimos treinta días.
- Hospitalizado durante más de cuarenta y ocho horas hasta un año antes de la infección (112) (modificado de Friedman et al, que considera como HCR la hospitalización en los últimos noventa días).
- Infección adquirida en la comunidad: infección diagnosticada al ingreso hospitalario o en las 48 horas siguientes al ingreso, para pacientes que no cumplían los criterios de infección HCR.
- Presentación clínica:
 - Fecha de inicio de los síntomas.
 - Poliarticular (sí/no): si estaba afectada más de una articulación.
 - Localización articular.
 - Fiebre (sí/no): si se documentaba temperatura $>38^{\circ}\text{C}$ durante el diagnóstico de la infección.
 - Signos inflamatorios (sí/no): si había presencia de eritema, aumento de volumen articular y de partes blandas, derrame articular o calor local.
 - Hipotensión arterial (sí/no): <90 mmHg (referido a tensión sistólica)
 - Leucocitos al diagnóstico: cifra de la primera consulta.
 - PCR al diagnóstico: cifra de la primera consulta.
 - VSG al diagnóstico.
 - Bacteriemia al diagnóstico (sí/no): hemocultivos del episodio positivos para *S. aureus*.
 - Polimicrobiana (sí/no): si participaban otros microorganismos, especificando cuáles.
- Datos de la artrocentesis:
 - Artrocentesis diagnóstica (sí/no) (o si no, los datos de la cirugía).
 - Aspecto (del líquido articular): normal, hemático, turbio o purulento.
 - Leucocitos (recuento leucocitario).
 - Porcentaje de PMNs del recuento leucocitario.

Material y método

- Glucosa del líquido articular.
- Cristales en líquido articular (gota, pirofosfato, hidroxapatita...).
- Gram (referido a *S. aureus*): positivo, negativo o no realizado.
- Cultivo (referido a *S. aureus*): positivo, negativo o no realizado.
- Tratamiento:
 - Tratamiento quirúrgico:
 - Cirugías: ninguna, artrotomía o artroscopia.
 - Fechas de las cirugías.
 - Número de artrocentesis terapéuticas durante todo el tratamiento.
 - Tratamiento antibiótico: regímenes antibióticos recibidos con la fecha de inicio y de fin de cada uno de ellos. También se recogió la fecha de tratamiento oral definitivo, en la que todos los antibióticos se administraron por vía oral, sin volver a administrar por vía IV.
- Seguimiento: se define como el tiempo de seguimiento hasta el fracaso o hasta la última visita de seguimiento. Se recogió a los 6, 12 y 24 meses:
 - Fecha concreta de seguimiento.
 - Evolución clínica de la infección y evolución microbiológica:
 - Curación.
 - Persistencia: en ningún momento llegan a desaparecer los signos inflamatorios, especialmente si persisten positivos los cultivos de *S. aureus*.
 - Recidiva: si mejoran los síntomas o desaparecen, pero al cabo de un tiempo reaparecen, y los cultivos son negativos, o bien positivos para *S. aureus*.
 - Superinfección: persistencia o recidiva, pero con cultivos positivos para otros microorganismos.
 - Secuela en el momento de valoración:
 - No secuelas.
 - Dolor, siempre que fue relevante y sobre todo si precisó analgesia.

- Impotencia funcional: si había limitación significativa del arco de movimiento articular, apuntando los grados de movimiento, o dificultad en la vida diaria.
- Prótesis: si se colocó una prótesis articular.

En las infecciones sobre articulación nativa, se consideró fracaso terapéutico cualquier situación en la que no se consiguió la curación de la infección: persistencia o recidiva de la infección estafilocócica tras completar el tratamiento antibiótico, la muerte relacionada con la infección, la necesidad de antibioterapia supresiva, o la necesidad de implantar una prótesis articular debido a las secuelas de la infección.

4.1.2 Datos clínicos que se recogieron de los pacientes con IPA producida por *S. aureus* (96)

- Sexo y fecha de nacimiento.
- Comorbilidad:
 - Diabetes mellitus (sí/no).
 - Insuficiencia renal crónica (sí/no).
 - Artritis reumatoide (sí/no).
 - Tratamiento inmunosupresor (sí/no).
 - Cáncer (sí/no).
 - Cirrosis hepática (sí/no).
 - Enfermedad pulmonar crónica (sí/no).
 - Cardiopatía crónica (sí/no).
- Características de la prótesis:
 - Localización: cadera (artroplastia total o hemiarthroplastia), rodilla, hombro, otras.
 - Número de prótesis: primaria o de revisión (secundaria, terciaria, cuarta...).
 - Fecha de implantación de la prótesis o de la última revisión/recambio por motivos no infecciosos.

Material y método

- Presentación clínica:
 - Fecha de inicio de los síntomas: con esta fecha se definieron los tiempos de infección y de inicio del tratamiento.
 - Clasificación de la infección modificada de Tsukayama et al (22) en el estudio retrospectivo de IPA producida por SARM:
 - Postquirúrgica precoz: inicio de los síntomas en los primeros 30 días después de la colocación de la prótesis.
 - Postquirúrgica crónica o tardía: inicio de los síntomas pasados los primeros 30 días desde la colocación de la prótesis.
 - Hematógena: infección de presentación aguda, en cualquier momento tras la colocación de la prótesis, en el contexto de una bacteriemia (documentada o no). Si un caso era considerado como infección hematógena era excluido de la infección postquirúrgica precoz o tardía.
 - CIOP: aislamiento de *S. aureus* en los cultivos tomados durante el recambio en un tiempo de una prótesis que se había recambiado sin sospechar la existencia de infección (22).
 - Infección por contigüidad (no incluida en la descripción de Tsukayama, y sin embargo una realidad clínica): infección a partir de un foco supurado contiguo (por ejemplo, infección de prótesis de rodilla en el curso de una celulitis infecciosa) (113).

En el estudio prospectivo multicéntrico de IPA producida por *S. aureus* (estudio PISA), se utilizó la misma clasificación de la IPA, pero considerando que la infección postquirúrgica precoz es aquella cuyo inicio de síntomas se produce en los primeros 90 días después de la colocación de la prótesis y la crónica pasados esos primeros 90 días (y no 30 días). En el estudio retrospectivo de IPA, ésta se clasificó en infección aguda y crónica. En la infección aguda se incluyó a la infección postquirúrgica precoz (inicio de los síntomas en los primeros 30 días después de la implantación de la prótesis) y a la infección hematógena.

En la infección crónica se incluyó a la infección postquirúrgica crónica o tardía y a la infección con CIOP.

- Fiebre (sí/no): si se documenta temperatura >37 °C durante el diagnóstico de la infección.
 - Dolor (sí/no).
 - Signos inflamatorios (sí/no).
 - Fístula (sí/no): presencia de trayecto fistuloso.
 - Descarga purulenta (sí/no): presencia de exudado macroscópicamente purulento ya sea por la herida quirúrgica o por un trayecto fistuloso.
 - Recuento leucocitario en el momento del diagnóstico.
 - PCR en el momento del diagnóstico y antes de la cirugía terapéutica.
 - Radiografía al diagnóstico: normal, signos de radiolucencia o aflojamiento y signos de osteomielitis.
- Datos microbiológicos elementales:
- Sensibilidad de *S. aureus* a meticilina: sensible o resistente.
 - Bacteriemia (sí/no).
 - Infección polimicrobiana (sí/no): si había presencia de otros microorganismos en los cultivos valorables (hemocultivos, líquido sinovial, muestras intraoperatorias).
- Tratamiento:
- Tratamiento quirúrgico:
 - Tipo de cirugía: no cirugía, desbridamiento con retención del implante, recambio protésico en un tiempo, recambio protésico en dos tiempos (primera cirugía), recambio protésico en dos tiempos (segunda cirugía), cirugía de artrodesis y amputación.
 - Fecha de la cirugía.
 - Recambio de los componentes móviles (sí/no; sólo para las cirugías de desbridamiento) (ej. pieza de polietileno, cabeza femoral en las prótesis de cadera).

Material y método

- Colocación de espaciador de cemento (sí/no; sólo para las cirugías de explante protésico). En caso afirmativo, se especificaba el antibiótico.
- Tratamiento antibiótico hasta cada cirugía con la fecha de inicio y de fin, recogiendo expresamente si se había tratado con rifampicina.
- Seguimiento: se realizó durante un mínimo de un año, hasta fallecimiento, fracaso terapéutico o pérdida de seguimiento.
 - Fecha del último control: al margen de si la IPA se había curado o no.
 - Evolución de la infección: curación, persistencia estafilocócica tras más de siete días del inicio del tratamiento antimicrobiano, superinfección por otros microorganismos o persistencia estafilocócica y superinfección por otros microorganismos.
 - Necesidad de antibioterapia supresiva (sí/no): combinación antibiótica y fecha de inicio.
 - PCR en la última visita de seguimiento.
 - Funcionalidad en la última visita de seguimiento (para las prótesis de extremidades inferiores): si caminaba sin ayuda, precisaba un apoyo (bastón o muleta), precisaba dos apoyos (bastones, muletas o un andador); no caminaba (silla de ruedas o encamado).
 - Radiografía (última disponible): del mismo modo que la radiografía al diagnóstico.
 - Mortalidad (sí/no): si estaba relacionada con la infección y la fecha de la muerte.
- Resumen del seguimiento: curación de la infección por *S. aureus*, superinfección por otros microorganismos y explantación de la prótesis.
 - Curación de la infección estafilocócica (sí/no): curación al margen de si se había tenido que retirar la prótesis, o amputar al paciente, o que existiera superinfección por otros microorganismos.
 - Superinfección por otros microorganismos durante el episodio (sí/no), especificando el microorganismo.

- Si hubo que explantar la prótesis (sí/no) y el motivo del explante: infección sin indicación de retención, persistencia o recidiva estafilocócica, infección por otros microorganismos, persistencia o recidiva estafilocócica e infección por otros microorganismos, inviabilidad de tejidos blandos, aflojamiento aséptico u otros motivos ortopédicos no infecciosos. Se definió persistencia como aquel caso de IPA con un segundo aislamiento de *S. aureus* en un paciente durante el tratamiento antibiótico (tras más de siete días del inicio del tratamiento antimicrobiano) y recidiva como aquel caso de IPA con un segundo aislamiento en un paciente sin tratamiento antibiótico.

De forma global, en las IPAs se consideró fracaso terapéutico cualquier situación en la que no se consiguió el objetivo de curación de la infección con una prótesis articular funcional. Esto incluye la persistencia o recidiva de la infección estafilocócica y la muerte relacionada con la infección (muerte por cualquier causa dentro de los 90 días después de la cirugía). En las IPAs manejadas con retención del implante, también se incluyó la necesidad de terapia de rescate, como un desbridamiento adicional pasados 30 días desde la primera cirugía, la necesidad de un explante protésico para controlar la infección o la antibioterapia supresiva. En las IPAs manejadas con explante protésico (infecciones crónicas) el fracaso terapéutico también incluyó la imposibilidad de volver a implantar una nueva prótesis.

4.2 RECOGIDA DE LA INFORMACIÓN CLÍNICA

Las variables clínicas a estudiar de los pacientes se recogieron mediante bases de datos estandarizadas que se diseñaron *ad hoc* con el programa Microsoft Access (Anexo IV para la recogida de datos clínicos de pacientes con artritis séptica nativa y Anexo V para la recogida de datos clínicos de pacientes con IPA). En el estudio PISA los investigadores clínicos de cada hospital participante cumplimentaban la información clínica de los pacientes rellenando el Anexo V.

5. CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA Y MOLECULAR DE LAS CEPAS DE *S. aureus*

En este apartado se describen simultáneamente los métodos utilizados en los tres bloques de la presente tesis doctoral. En cada procedimiento se especifica en qué cepas de los bloques I y II se realizaron, debido a que las cepas incluidas en el bloque III se seleccionaron de los bloques anteriores; en el bloque III se realizó, además, la SGC de las cepas que se incluyeron.

5.1 DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LA INFECCIÓN ARTICULAR E IDENTIFICACIÓN DE *S. aureus*

Para el diagnóstico microbiológico de la infección articular, tanto de artritis nativa como de IPA, se procesaron en el laboratorio de Microbiología muestras de líquido articular y de sangre. Además, en el caso de la IPA también se procesaron entre 5 y 6 biopsias de tejido periprotésico de cada paciente y material protésico.

Las muestras se trataron según los procedimientos de cada uno de los laboratorios de Microbiología que participaron en el estudio. Las muestras de biopsias y material protésico fueron pretratadas antes de su siembra en los medios de cultivo correspondientes. Las muestras de biopsias se cortaron en trozos en una placa de Petri estéril con un bisturí estéril y los distintos fragmentos se homogeneizaron en un mortero estéril con 1-2 mL de caldo de cultivo. En el caso de las muestras de material protésico, se añadió al recipiente que lo contenía un volumen de tampón PBS (tampón fosfato salino, *phosphate buffered saline*) necesario para cubrir la prótesis y, después, se agitó el recipiente intensamente en vórtex durante 30 segundos. En algunos laboratorios se realizó la sonicación del material protésico (114).

Las muestras de biopsias y material protésico, tras ser tratadas como se ha expuesto anteriormente, y las muestras de líquido articular se sembraron en los medios de cultivo sólidos (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francia) de agar sangre (agar Columbia con sangre de carnero al 5%), agar chocolate, agar MacConkey y agar Schaedler con 5% de sangre de carnero (agar SCS) para cultivo de bacterias anaerobias, y también se sembraron en

el medio líquido de enriquecimiento tioglicolato. Los medios de cultivo de agar sangre y MacConkey fueron incubados al menos durante 7 días a 37 °C; el agar chocolate al menos durante 7 días a 37 °C en atmósfera con 5% de CO₂ y el agar SCS al menos durante 7 días a 37 °C en atmósfera de anaerobiosis. El medio de tioglicolato fue incubado al menos durante 10 días a 37 °C. Si a los 10 días el medio permanecía transparente, se subcultivaba a los medios sólidos de agar sangre, chocolate y SCS. A las muestras de biopsia y de líquido articular también se les realizaba una extensión de Gram. Las muestras de sangre fueron inoculadas en botellas de hemocultivos que se incubaron en el sistema BacT/ALERT 3D (Biomérieux, Marcy-l'Étoile, Francia) hasta 5 días. Por último, si había cantidad de líquido articular suficiente, éste se recibía en el laboratorio también inoculado en botellas de hemocultivos.

Las cepas de *S. aureus* fueron identificadas fenotípicamente por presentar un color amarillento y β -hemólisis en las colonias en medios de cultivo sólidos. La identificación fue confirmada mediante diferentes técnicas según su disponibilidad a lo largo del tiempo. Inicialmente mediante Pastorex Staph-plus (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, EEUU), que es una prueba rápida de aglutinación en portaobjeto para la detección simultánea de la afinidad para el fibrinógeno (*clumping factor*), de la proteína A y de los polisacáridos capsulares de *S. aureus*. El reactivo está compuesto por partículas de látex sensibilizadas con fibrinógeno e IgG, así como con anticuerpos monoclonales específicos desarrollados contra los polisacáridos capsulares de *S. aureus*. La identificación también se realizaba mediante las pruebas bioquímicas de MicroScan Walkway® (Beckman Coulter, Indianapolis, EEUU). A partir de 2014, se identificaron las cepas de *S. aureus* mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) (desorción/ionización láser asistida por una matriz con detección de masas por tiempo de vuelo, *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight*), según las instrucciones del fabricante. La identificación de todas las cepas de la presente tesis doctoral se confirmó mediante MALDI-TOF, tanto de las cepas del Hospital Universitario 12 de Octubre que fueron descongeladas, como de las cepas que aportaron otros hospitales y que venían ya identificadas en el laboratorio de Microbiología de origen.

5.2 PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIBIÓTICOS

5.2.1 Bacteria planctónica

El estudio de sensibilidad a antibióticos de las cepas de *S. aureus* en estado planctónico se realizó mediante el sistema automatizado de microdilución en caldo MicroScan Walkway® (Siemens, Sacramento, California, EEUU) y la interpretación se realizó según los criterios de EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*, Comité europeo de pruebas de sensibilidad a antimicrobianos). Los antibióticos que se estudiaron fueron: penicilina, oxacilina, vancomicina, teicoplanina, daptomicina, linezolid, eritromicina, clindamicina, gentamicina, rifampicina, cotrimoxazol, ciprofloxacino, levofloxacino, fosfomicina, mupirocina y ácido fusídico. La sensibilidad a estos antibióticos se realizó en cada hospital participante y después se comprobó en el Hospital Universitario 12 de Octubre.

Además, se determinó la CMI de vancomicina (Biomerieux, Marcy-l'Étoile, Francia), daptomicina (Biomerieux, Marcy-l'Étoile, Francia) y dalbavancina (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi (Te), Italia) por el método de difusión en agar con tiras de gradiente de antibióticos, siguiendo las recomendaciones y criterios de EUCAST. Se sembró una suspensión de la bacteria con una turbidez al 0.5 McFarland en placa de Mueller-Hinton (Biomerieux, Marcy-l'Étoile, Francia) que se incubó con las tiras de antibióticos a 37 °C durante 24 horas. También se estudió la presencia de cepas con resistencia fenotípica heterogénea a vancomicina (hetero-VISA, h-VISA) en aquellas cepas con una CMI a vancomicina por Etest ≥ 1.5 mg/L y en las cepas persistentes y recidivantes de un mismo paciente. Se analizó mediante el macrométodo de Etest (115), que consiste en la siembra de una suspensión de la bacteria con una turbidez al 2.0 McFarland en el medio sólido BHI (infusión de cerebro y corazón, *brain heart infusion*) (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, EEUU), junto con un Etest de vancomicina y otro de teicoplanina e incubación a 37 °C durante 48 horas. Se consideraron h-VISA las cepas que presentaron una CMI de vancomicina y teicoplanina ≥ 8 mg/L.

La sensibilidad a los antibióticos mediante el sistema automatizado de microdilución en caldo y la CMI a vancomicina y a daptomicina se determinaron en todas las cepas de *S. aureus* de la presente tesis doctoral. La CMI a dalbavancina se determinó en el estudio

retrospectivo de IPA del bloque II y la resistencia fenotípica heterogénea a vancomicina se analizó en el estudio prospectivo multicéntrico de IPA del bloque II (estudio PISA).

5.2.2 Bacteria formadora de *biofilm*

El estudio de sensibilidad a antibióticos de las cepas de *S. aureus* formadoras de *biofilm* se realizó mediante el método de Calgary (CBD) para los antibióticos oxacilina, daptomicina, levofloxacino y rifampicina (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, EEUU). El dispositivo que se utilizó como CBD fue la placa MBEC *Biofilm Inoculator* (Innovotech, Edmonton, AB, Canada), que consiste en una placa de microtitulación de 96 pocillos con una tapa que contiene 96 pinchos de poliestireno que encajan en cada uno de los pocillos. En los pinchos de la tapa es donde se va a adherir la bacteria formando el *biofilm*, que se va a poner en contacto con el antibiótico que se encuentra en los pocillos en diferentes concentraciones. Las células dispersadas, que se desprenden de la superficie del *biofilm*, sirven como inóculo para determinar las CMIs del *biofilm* (Figura 24) (116).

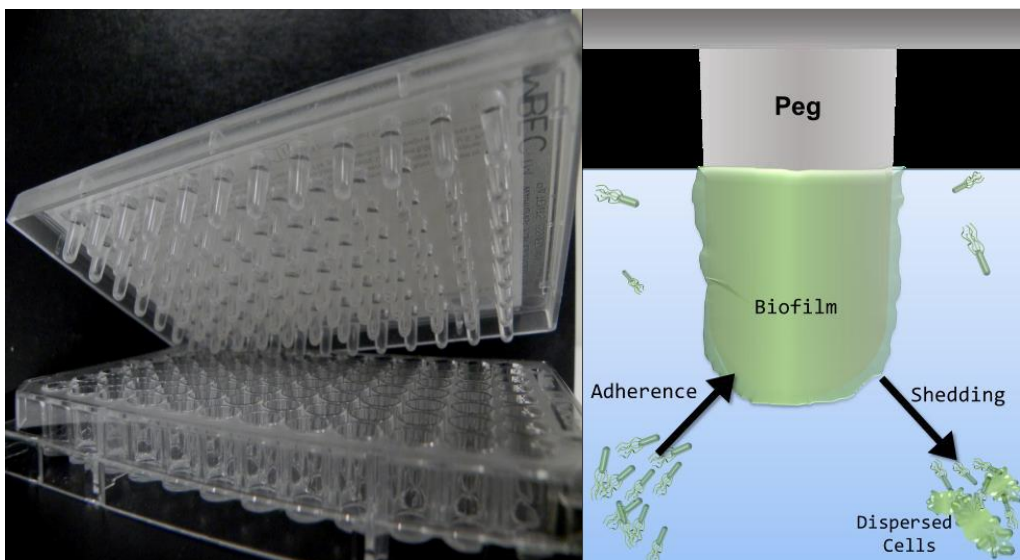


Figura 24. Dispositivo Calgary utilizado en el ensayo (izquierda). Formación de *biofilm* bacteriano en un pincho (*peg*) del dispositivo Calgary (derecha) (116).

Material y método

Los parámetros de sensibilidad a los antibióticos que se determinaron en el *biofilm* fueron los siguientes (14,116):

- CMEB (concentración mínima de erradicación de *biofilm*; *minimal biofilm eradication concentration*, MBEC): concentración más baja de antibiótico necesaria para erradicar el *biofilm*, o, en otras palabras, la menor concentración de agente antimicrobiano que previene el crecimiento visible en el medio de recuperación de las células del *biofilm*.
- CMIB (concentración mínima inhibitoria del *biofilm*; *minimal biofilm inhibitory concentration*, MBIC): es la concentración más baja de antibiótico que da lugar a una diferencia de DO a una longitud de onda de 650 nm $\leq 10\%$ de la media de lectura de dos pocillos de controles positivos. La CMIB también se puede definir como la concentración más baja de antimicrobiano que inhibe el crecimiento de las células dispersadas del *biofilm*.
- CMBB (concentración mínima bactericida del *biofilm*; *minimal biofilm biocidal concentration*, MBBC): concentración más baja de antibiótico que elimina el 99.9% de las células recuperadas de un cultivo de *biofilm* en comparación con el crecimiento control, o, en otras palabras, la menor concentración de agente antimicrobiano que elimina el 99.9% de las células dispersadas del *biofilm*.

El procedimiento experimental de CBD que se realizó fue el siguiente (14,116–119):

Se utilizó la cepa *S. aureus* ATCC 29213 como cepa control. Una columna de la placa del CBD se usó como control de esterilidad (sin inóculo bacteriano ni antibiótico) y otra como control de crecimiento (sin antibiótico). El esquema del procedimiento experimental completo del dispositivo CBD se encuentra en la Figura 25.

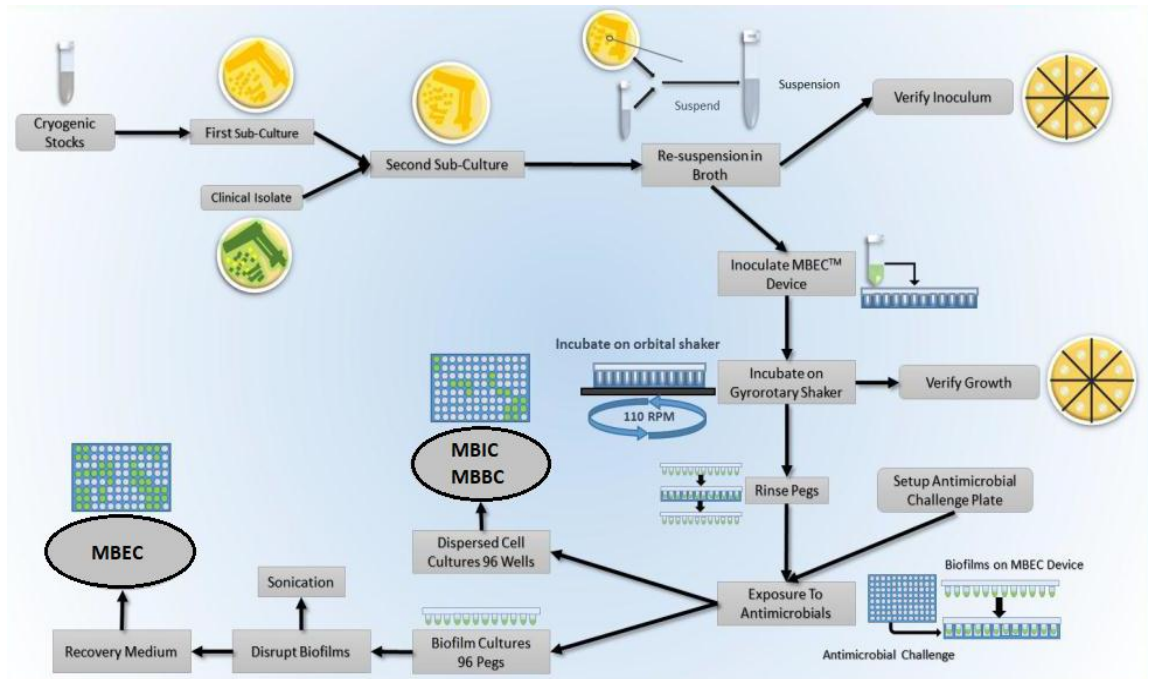


Figura 25. Procedimiento experimental completo del sistema Calgary. Modificado de Innovotech (116).

A continuación, se describe detalladamente el procedimiento experimental de CBD:

1. Preparación del inóculo bacteriano (Figura 26): tras cultivar a la cepa bacteriana en agar sangre e incubación a 37 °C durante 24 horas, se preparó una suspensión bacteriana con una turbidez al 1.0 McFarland en TSB (caldo de soja tréptica, *tryptic soy broth*) 1% glucosa (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, EEUU) y se diluyó 30 veces para obtener una suspensión bacteriana de 1×10^7 UFCs (unidades formadoras de colonias)/mL. El inóculo bacteriano fue verificado realizando diluciones seriadas y posterior cultivo y recuento de UFCs.

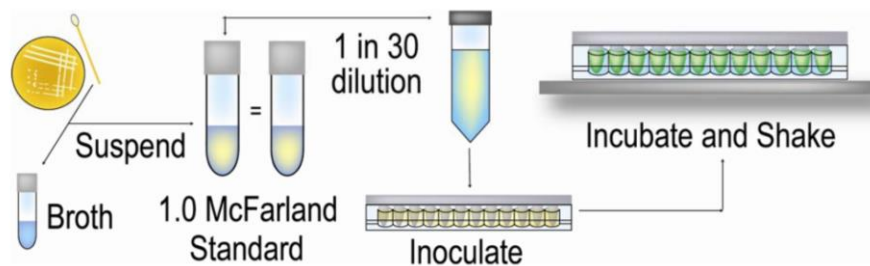


Figura 26. Preparación del inóculo bacteriano (Manual2HarrisonJ_MBECinnovotech) (120).

2. Inoculación bacteriana y formación de *biofilm*: se añadió a cada pocillo de la base de la placa del CBD 150 μ L del inóculo bacteriano y se incubó a 37 °C en agitación (110 rpm) durante 24 horas.
3. Preparación de la placa de antibióticos.

Los antibióticos de los que se analizó la sensibilidad de las cepas de *S. aureus* formadoras de *biofilm* fueron oxacilina, daptomicina, levofloxacino y rifampicina. La solución stock de cada antibiótico fue preparada según las instrucciones del CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*, Instituto de normas clínicas y de laboratorio). Después se preparó una solución de cada antibiótico a la concentración máxima que se analizó (256 mg/L) en caldo Mueller-Hinton (Becton Dickinson, Franklin Lakes, Nueva Jersey, EEUU) para oxacilina levofloxacino y rifampicina y en caldo Mueller-Hinton ajustado con 50 mg/L de calcio (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, EEUU) para la daptomicina. A continuación, se preparó una placa de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, EEUU) con las diluciones seriadas de cada antibiótico desde 256 hasta 0.5 mg/L en caldo Mueller-Hinton (ajustado con calcio para daptomicina).

También se estudió la sensibilidad de las cepas de *S. aureus* formadoras de *biofilm* a la combinación de levofloxacino y rifampicina:

- Rifampicina (en un rango de concentraciones de 0.5-256 mg/L) con una concentración fija de 3 mg/L de levofloxacino.

- Levofloxacin (en un rango de concentraciones de 0.5-256 mg/L) con una concentración fija de 5 mg/L de rifampicina.

Las concentraciones usadas de rifampicina y levofloxacin fueron aquellas que se esperan en el tejido óseo (Tabla 6).

Tabla 6. Concentraciones de rifampicina y levofloxacin esperadas en tejido óseo en humanos adultos.

	Dosis ^a (mg)	C _{max} ^b (mg/L)	Unión a proteínas plasmáticas (%)	Concentración en hueso ^c (mg/L)	Referencias
Rifampicina	600	12.5	80	5	(76,121,122)
Levofloxacin	750	8	30	3	(123–125)

^a Dosis terapéutica estándar que se administra a humanos.

^b Concentración máxima en suero después de la administración del antimicrobiano.

^c Concentración de antibiótico libre esperada en hueso teniendo en cuenta la unión a proteínas plasmáticas y la acumulación del fármaco.

4. Eliminación de las células dispersadas del *biofilm*: se transfirió la tapa con pinchos de la placa del CBD, con el *biofilm* ya formado en ellos, a una placa de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano con suero fisiológico salino (NaCl 0.9%).
5. Control de crecimiento de *biofilm*: se realizó en varios pinchos de la placa del CBD, entre ellos de la columna de control de crecimiento de la cepa control ATCC 29213, para comprobar que la densidad de la suspensión era la adecuada (10^4 - 10^6 UFC/mL por pincho). Se desprendieron los pinchos y cada uno se introdujo en un tubo con agua estéril que se sometió a sonicación a intensidad elevada. Se realizaron diluciones seriadas y posterior cultivo y recuento de UFCs.
6. Puesta en contacto del *biofilm* con los antibióticos (Figura 27): tras la eliminación de las células dispersadas del *biofilm*, se transfirió la tapa con pinchos de la placa

Material y método

del CBD a la base de la placa de microtitulación preparada con las diluciones de antibióticos y se incubó estáticamente a 37 °C durante 24 horas.

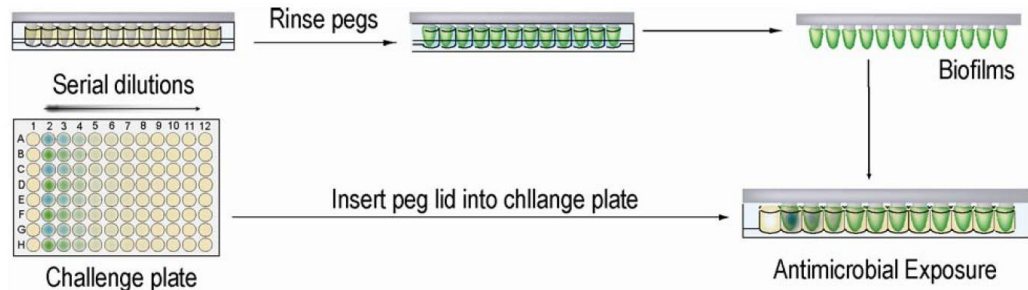


Figura 27. Exposición del *biofilm* bacteriano al antibiótico (120).

7. Determinación de la CMEB (Figura 28).

- Neutralización del antibiótico: al acabar las 24 h de incubación del *biofilm* con el antibiótico, se transfirió la tapa con pinchos de la placa del CBD primero a una placa de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano con suero fisiológico salino (solución neutralizadora) y después a otra placa también con suero fisiológico salino. La placa de microtitulación con antibióticos se reservó para determinar la CMIB y la CMBB más adelante.
- Recuperación de la bacteria superviviente en el *biofilm*: se transfirió la tapa con pinchos del Calgary desde la segunda placa neutralizadora a una placa de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano con caldo Mueller-Hinton, ajustado con calcio en el caso de la daptomicina, (medio de recuperación). La tapa con pinchos en el medio de recuperación se sometió a sonicación a intensidad elevada durante 5 minutos. Después se incubó la placa con el medio de recuperación (ya sin la tapa con pinchos) a 37 °C durante 24 horas y se realizó la medida de la CMEB visualmente por la turbidez del medio.

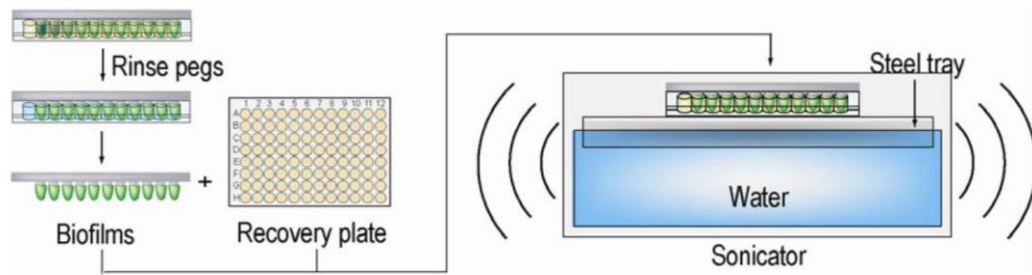


Figura 28. Neutralización del antibiótico y recuperación de la bacteria superviviente en el *biofilm* (120).

8. Determinación de la CMIB visualmente por la turbidez del medio en la placa de microtitulación con las diluciones seriadas de antibióticos.
9. Determinación de la CMBB: se añadió 20 μL de cada pocillo de la base con los antibióticos a cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano con 180 μL de caldo Mueller-Hinton (ajustado con calcio en el caso de la daptomicina). Después se incubó a 37 °C durante 24 horas y se realizó la medida de la CMBB visualmente por la turbidez del medio.

El estudio de sensibilidad a antibióticos de las cepas de *S. aureus* formadoras de *biofilm* se realizó en las cepas de pacientes tratados con DAIR del estudio prospectivo multicéntrico de IPA del bloque II (estudio PISA) y para los antibióticos administrados durante un período de tiempo significativo (≥ 14 días en el primer mes tras el DAIR y/o ≥ 21 días durante todo el tratamiento).

5.3 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

5.3.1 Hemólisis

5.3.1.1 β -hemólisis (α -hemolisina)

Se analizó la β -hemólisis debida a la actividad de la α -hemolisina (Hla) que producían las cepas de *S. aureus* en agar sangre tras su incubación a 37 °C durante 16 horas. La β -hemólisis fue definida como la presencia de un halo claro (hemólisis completa) en el agar sangre alrededor de las colonias bacteriana y fue evaluada visualmente por dos

Material y método

observadores diferentes (126). La hemólisis fue categorizada en negativa, positiva débil y positiva fuerte (Figura 29). La β -hemólisis se analizó en todas las cepas de *S. aureus* de la presente tesis doctoral.

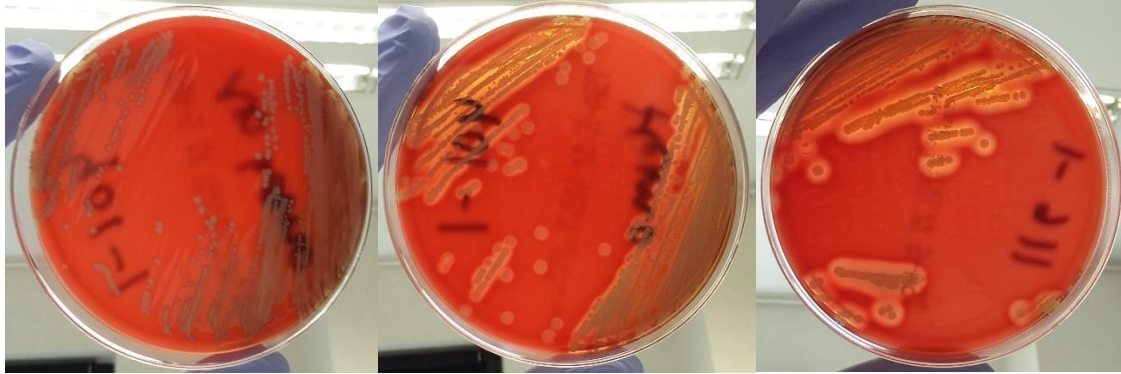


Figura 29. β -hemólisis negativa, positiva débil y positiva fuerte (de izquierda a derecha) de cepas de *S. aureus* en agar sangre.

5.3.1.2 Hemólisis turbia (β -hemolisina)

Se observaron las cepas productoras de halos turbios de hemólisis rodeando a las colonias de *S. aureus* en agar sangre por expresión de la β -hemolisina (Hlb) (Figura 30) (126). El 90% de las cepas de *S. aureus* aisladas de muestras clínicas de humanos contienen un fago, integrado en la β -hemolisina, que porta un *cluster* de evasión del sistema inmune. Por tanto, en las cepas que no presentan este fago se puede expresar la β -hemolisina (95,127), mostrando, además de β -hemólisis, halos turbios de hemólisis en agar sangre. Los halos turbios de hemólisis se analizaron en todas las cepas de *S. aureus* de la presente tesis doctoral.



Figura 30. Cepa de *S. aureus* con halo turbio por expresión de la β -hemolisina.

5.3.1.3 δ -hemólisis (funcionalidad de *agr*)

El RNAIII codifica para la δ -hemolisina y, por tanto, la expresión de la δ -hemolisina indica funcionalidad de *agr*. De este modo, la funcionalidad de operón *agr* se midió por la producción de δ -hemolisina, cuya lisis es aumentada por la β -hemolisina (128).

Se sembró en agar sangre una estría de la cepa a estudiar de forma perpendicular a otra estría de la cepa de *S. aureus* RN4220, que produce sólo β -hemolisina y se incubó a 37 °C durante 24 horas. Un área de hemólisis aumentada en la intersección de la cepa β -hemolítica RN4220 con la cepa a estudio fue interpretada como indicativo de producción de δ -hemolisina, y, por tanto, de un *agr* funcional. La disfuncionalidad de *agr* se definió como ausencia completa de δ -hemólisis. La funcionalidad de *agr* fue categorizada en negativa, positiva débil o positiva fuerte (Figura 31). La funcionalidad de *agr* se analizó en todas las cepas de *S. aureus* de la presente tesis doctoral.



Figura 31. Cepas de *S. aureus* en agar sangre con funcionalidad de *agr* positiva (izquierda) y negativa (derecha). En horizontal se encuentra la estría de la cepa de *S. aureus* RN4220, que produce sólo β -hemolisina.

5.3.2 Fenotipo de las colonias de *S. aureus*

Se observó el fenotipo que presentaban las colonias de *S. aureus* tras incubación en agar sangre a 37 °C durante 24 horas. Se distinguió entre el fenotipo salvaje de colonia (habitual) y otros fenotipos no salvajes como el fenotipo SCV y el fenotipo mucoso. Una colonia con fenotipo salvaje mide de 1 a 3 mm tras 24 horas de incubación y una colonia SCV mide un décimo del tamaño de una colonia con fenotipo salvaje. Además, las colonias con fenotipo SCV no suelen presentar pigmentación ni hemólisis, o ambas son muy reducidas, a diferencia de las colonias con fenotipo salvaje (91). Las diferencias entre ambos fenotipos pueden observarse en la Figura 32. El fenotipo de las colonias se analizó en todas las cepas de *S. aureus* de la presente tesis doctoral.



Figura 32. Colonias de *S. aureus* con fenotipo salvaje (izquierda) en agar sangre y con fenotipo SCV (derecha).

5.3.3 Formación de *biofilm*

La cuantificación de la biomasa del *biofilm* se evaluó por el método de cristal violeta (129). El procedimiento experimental fue el siguiente:

1. Pase a agar sangre de las cepas a estudiar, incluyendo la cepa *S. aureus* ATCC25923 e incubación a 37 °C durante 24 horas.
2. Preparación de una suspensión de la bacteria con una turbidez al 0.5 McFarland en suero fisiológico salino.
3. Dilución de la suspensión anterior a 1:100 en caldo TSB suplementado con 1% de glucosa.
4. Transferencia de 200 µL de la dilución anterior por triplicado a los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano. El control negativo era sólo medio de cultivo, sin bacteria.
5. Incubación de la placa de microtitulación a 37 °C durante 24 horas.
6. Tres lavados con 200 µL de agua destilada.
7. Tinción con 200 µL de cristal violeta (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, EEUU) al 0.7% durante 1 minuto.
8. Tres lavados con 200 µL de agua destilada y dejar que se sequen los pocillos.
9. Disolución del colorante en 200 µL de ácido acético glacial (PanReac AppliChem, Cataluña, España) al 33% (disolución decolorante).
10. Medición de la DO a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro.

El experimento se repitió en cada cepa por triplicado y los resultados se interpretaron según los criterios de Stepanovic et al, que tiene en cuenta el valor de densidad óptica (DO) obtenido respecto a un control negativo para categorizar la formación de *biofilm* en no productor, productor débil, productor moderado y productor fuerte de *biofilm* (130). La formación de *biofilm* se analizó en todas las cepas de *S. aureus* de la presente tesis doctoral.

5.3.4 Sensibilidad al péptido de neutrófilo humano 1

El estudio de la sensibilidad de las cepas de *S. aureus* al péptido de neutrófilo humano 1 (α -defensina-1) se realizó con el siguiente procedimiento experimental (131):

1. Pase a agar sangre de las cepas a estudiar e incubación a 37 °C durante 24 horas.
2. Preparación de una suspensión de la bacteria con una turbidez al 0.5 McFarland ($\approx 10^8$ UFC/mL) en fosfato monopotásico (KH_2PO_4) (10 mM, pH=7.4) con 1% de caldo BHI (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, EEUU).
3. Dilución de la suspensión anterior, en fosfato monopotásico con 1% de caldo BHI, hasta preparar dos diluciones de la cepa bacteriana de 10^5 UFC/mL.
4. A partir de una de las diluciones bacterianas de 10^5 UFC/mL se preparó, en fosfato monopotásico con 1% de caldo BHI, una dilución de 10^3 UFC/mL que se cultivó y se contaron las UFCs para determinar el inóculo en la dilución de 10^5 UFC/mL (inóculo inicial, bacteria sin péptido).
5. A la otra dilución bacteriana de 10^5 UFC/mL se le añadió 10 $\mu\text{g/mL}$ del péptido (Peptide Institute, Inc., Osaka, Japón) disuelto en PBS. Se incubó a 37 °C durante 2 horas la bacteria con el péptido y después se cultivó y se contaron las UFCs (inóculo final, tras incubación de la bacteria con el péptido).
6. Análisis del porcentaje de supervivencia de la cepa bacteriana al péptido a partir de las UFCs iniciales y finales.

El experimento se repitió en cada cepa por triplicado. El estudio de sensibilidad al péptido de neutrófilo humano 1 se realizó en una selección de cepas del estudio retrospectivo de IPA del bloque II.

5.3.5 Estudio de virulencia en el modelo in vivo de *Galleria mellonella*

El modelo de invertebrado *G. mellonella* fue usado como modelo in vivo de estudio de la virulencia producida por las cepas de *S. aureus*. El procedimiento experimental que se realizó fue el siguiente (132):

1. Selección de larvas de *G. mellonella* (Bichosa, Galicia, España) de unos 400 mg de peso. Se utilizaron 15 larvas por cada cepa problema para ser inyectadas con

ella, 15 larvas para inyectar con la cepa inactivada a 95 °C durante 10 minutos (control para descartar cualquier reacción no infecciosa debida a los componentes de *S. aureus*), 15 larvas para inyectar con PBS (control del trauma físico debido al pinchazo) y 15 larvas como control sin inyectar. Tras la selección de las larvas, se incubaron a 37 °C durante 24 horas en placas de Petri. Se realizó el cultivo de las cepas a estudiar en agar sangre e incubación a 37 °C durante 24 horas.

2. Tras el lavado con etanol al 70% del hemocele de cada larva, se inocularon con jeringa Hamilton por el hemocele 10 µL de una suspensión bacteriana de 10⁸ UFC/mL en PBS. Se comprobó ese inóculo bacteriano inicial haciendo diluciones seriadas y contando las UFCs tras su cultivo. También se comprobó que la cepa inactivada no crecía en cultivo.
3. Incubación de las larvas a 37 °C y recuento cada 24 horas de las larvas muertas durante 5 días. Las larvas de color negro (por melanización) y que no respondían a estímulos se consideraron muertas (Figura 33).

El experimento se repitió en cada cepa por triplicado. Cada experimento se consideró como inválido si morían más de dos larvas en los controles. El estudio de virulencia en *G. mellonella* se realizó en una selección de cepas del estudio retrospectivo de IPA del bloque II.



Figura 33. Larva de *G. mellonella* muerta (arriba, negra) y viva (abajo) (133).

5.4 CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA

5.4.1 Electroforesis en gel en campo pulsante (PFGE)

El procedimiento experimental que se siguió para realizar la tipificación molecular mediante PFGE se encuentra esquematizado en la Figura 34 y fue el siguiente (134):

1. Preparación de las muestras: se inoculó en caldo de cultivo LB (Luria-Bertani) (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, EEUU) colonia de las cepas de *S. aureus* de un cultivo en agar sangre y se incubó el LB a 37 °C durante 18 horas en agitación a 200 rpm.
2. Preparación de los insertos de agarosa.
 - Se centrifugaron 0.5 mL de la suspensión bacteriana durante 2 min a 8000 rpm.
 - El sedimento se resuspendió en 0.5 mL de buffer PIV (0.01 mM Tris-HCl [pH=8], 1 M NaCl) (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, EEUU) y se centrifugó de nuevo.
 - El *pellet* se resuspendió en 200 µL de buffer PIV. Se ajustó la concentración bacteriana por lectura de la DO. Para ello se añadió 1 mL de PIV a 5 µL de la suspensión bacteriana y se midió la DO a una longitud de onda de 620 nm en un espectrofotómetro. Mediante la siguiente fórmula se calculó el volumen de buffer PIV que había que añadir a cada suspensión bacteriana para que todas tuvieran la misma concentración: $\text{Volumen de PIV} = (40 \times \text{DO}_{620} \times 210) - 210$.
 - Una vez añadido el volumen de buffer PIV necesario, se mezclaron 200 µL de la suspensión anterior con 200 µL de agarosa de bajo punto de fusión (Bio-Rad®, Hercules, California, EEUU) al 2% en un buffer TBE 0.5x (Tris-HCl 50 mM, H₃BO₃ 50 mM, EDTA 0.2 mM) (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, EEUU). Se inoculó la mezcla en los moldes y los insertos de agarosa se dejaron solidificar durante una hora a 4 °C.
3. Lisis celular.
 - Los insertos de agarosa se transfirieron a un tubo con 1 mL de solución de lisis (935 µL de EC [6 mM Tris-HCl pH=8, 1 M NaCl, 0.1 M EDTA pH=8, 0.2%

desoxicolato sódico, 0.5 % sarcosyl], 10 µL de lisozima [100 µg/mL], 50 µL de lisostafina [50 µg/mL] y 5 µL de RNasa [10 mg/mL] (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, EEUU). Se incubó a 37 °C durante 5 horas.

- Se retiró la solución de lisis y se añadió a los insertos de agarosa 1 mL de una solución compuesta por proteinasa-K (10 mg/mL) (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, EEUU) y buffer ES (0.5 M EDTA pH=9, 1% sarcosyl). Se incubó a 50 °C durante 18 horas.
 - Se aspiró la solución de proteinasa-K y se lavaron los insertos de agarosa cuatro veces con 10 mL de buffer TE 1x (10 mM Tris-HCl pH=8, 0.1 M EDTA pH=8) (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, EEUU) en agitación a temperatura ambiente.
4. Digestión del ADN: se añadieron a los insertos de agarosa 300 µL de solución de restricción (3 µL de *Sma*I [60 U], 30 µL de buffer *Sma*I [Biolabs, New England, EEUU] y 267 µL de agua estéril) y se incubaron en termobloque a 25 °C durante 18 horas. *Sma*I es la enzima de restricción.
5. Electroforesis en gel de agarosa.
- Se preparó un gel de agarosa (Bio-Rad®, Hercules, California, EEUU) al 1% en un buffer TBE 0.5x.
 - Se cargó el gel con los insertos de agarosa. En los pocillos extremos del gel se puso un marcador de peso molecular *Lambda Ladder* (Bio-Rad®, Hercules, California, EEUU). Una vez cargado el gel, se sellaron los pocillos con agarosa y se colocó gel en el sistema CHEF-DR III (Bio-Rad®, Hercules, California, EEUU) para realizar la electroforesis utilizando como tampón el buffer TBE 0.5x y con las siguientes condiciones: bloque I (tiempo inicial de 5 segundos, tiempo final de 15 segundos, tiempo de ejecución de 11.5 horas, temperatura de 14 °C y voltaje de 6 V/cm) y bloque II (tiempo inicial de 15 segundos, tiempo final de 40 segundos, tiempo de ejecución de 11.5 horas, temperatura de 14 °C y voltaje de 6 V/cm).
6. Teñido e interpretación de los resultados.

Material y método

- Se tiñó el gel con GelRed (Biotium, Fremont, California, EEUU) en agitación a temperatura ambiente. Después se lavó el gel con agua destilada.
- Se fotografiaron los patrones electroforéticos de las cepas analizadas mediante observación del gel en un transiluminador de luz ultravioleta.
- El análisis de los patrones de macrorrestricción obtenidos para cada una de las cepas analizadas se realizó con el programa informático BioNumerics (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica). El algoritmo matemático utilizado fue el método de agrupación por pares no ponderados utilizando promedios, UPGMA (*unweighted pair group method using arithmetic averages*). Para la asignación de pulsotipos se seleccionó el coeficiente de Dice, un porcentaje de tolerancia entre bandas del 1.8% y un porcentaje de optimización del 0.5%. Un coeficiente de similitud de 0.75 fue utilizado para definir un patrón de PFGE, siguiendo los criterios descritos por Tenover (135).

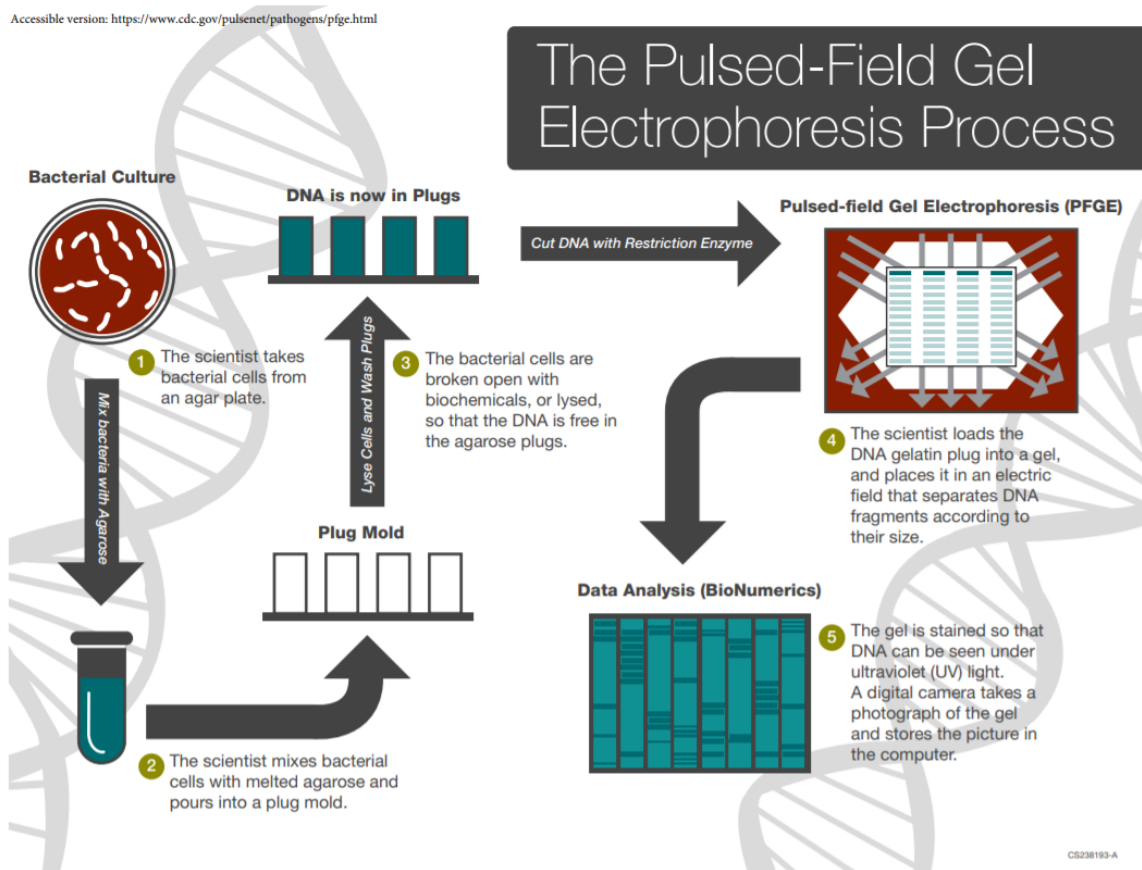


Figura 34. Proceso experimental de la electroforesis en gel en campo pulsante (136).

La PFGE se realizó en las cepas de *S. aureus* del bloque I (artritis nativa) y en las del estudio retrospectivo de IPA del bloque II.

5.4.2 Tipificación de *spa*

La tipificación de *spa* de las cepas de *S. aureus* se realizó mediante un proceso que incluye una PCR, la visualización de los fragmentos de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa y posterior secuenciación del ADN (137). Para la separación y visualización de los fragmentos de ADN amplificados en la PCR se realizó una electroforesis por corriente continua en gel de agarosa. La electroforesis se basa en que la carga negativa del ADN a pH neutro va a condicionar su migración hacia el lado positivo cuando se somete a un campo eléctrico. La velocidad de migración es inversamente proporcional al logaritmo del peso molecular, lo que permite valorar el tamaño de diferentes fragmentos de ADN frente a un patrón de tamaños adecuados (marcadores de peso molecular). Por otro lado, existe una relación directa entre el logaritmo de la movilidad electroforética y porosidad del gel. La secuenciación se realizó por el método de Sanger, que se basa la síntesis de una cadena de ADN mediante una ADN polimerasa y dideoxinucleótidos generando fragmentos de ADN de diferentes longitudes marcados con fluoróforos que se separan mediante electroforesis en geles de poliacrilamida o en polímeros especiales en el caso de la electroforesis capilar. El procedimiento experimental que se siguió para la tipificación del gen *spa* de las cepas de *S. aureus* fue el siguiente:

1. Extracción del ADN: una colonia bacteriana, cultivada en agar sangre tras 24 h de incubación a 37 °C, se inoculó en 250 µL de agua de grado PCR. Se incubó a 96 °C durante 10 minutos y después se centrifugó a 4500 rpm durante 3 minutos a 10 °C. El ADN extraído se obtuvo del sobrenadante.
2. Amplificación del gen: se realizó una PCR múltiple, en la que, además de amplificarse en gen *spa*, se amplificaron los genes *mecA*, *scn*, *lukF-PV* (marcador de la LPV) y la variante del sistema de modificación restricción *sau1-hsdS1* específica del complejo clonal CC398. La reacción de la PCR se llevó a cabo en un

Material y método

volumen final de 13 μ L que contenían 1 x Qiagen Multiplex PCR Master Mix (Hilden, Alemania), 2 μ M de cada *primer* o cebador (Tabla 7) y 1 μ L del ADN extraído. Las condiciones de amplificación usadas en el termociclador fueron: un ciclo de desnaturalización a 94 °C durante 15 minutos, seguido de 25 ciclos de amplificación (desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, hibridación a 59 °C durante 1 minuto y extensión a 72 °C durante 1 minuto), seguido de un ciclo de extensión a 72 °C durante 10 minutos.

Tabla 7. Secuencias de los *primers* usados en la PCR de tipificación de *spa*.

Gen	Primers	Secuencias (5'-3')	Tamaño del amplificado (pb)	Referencia
<i>spa</i>	<i>spa</i> -1113f	TAAAGACGATCCTTCGGTGAGC	Variable (180-600)	(138)
	<i>spa</i> -1514r	CAGCAGTAGTGCCGTTTGCTT		
<i>mecA</i>	<i>mecA</i> P4	TCCAGATTACAACCTTCACCAGG	162	(139)
	<i>mecA</i> P7	CCACTTCATATCTTGTAACG		
<i>scn</i>	<i>scn</i> -F1	TACTTGCGGGAACCTTAGCAA	130	(140)
	<i>scn</i> -R1	AATTCATTAGCTAACTTTTCGTTTTGA		
<i>lukF-PV</i>	<i>pvl</i> -FP	GCTGGACAAAACCTTCTTGGAATAT	83	(141)
	<i>pvl</i> -RP	GATAGGACACCAATAAATTCTGGATTG		
<i>sau1-hsdS1</i>	FP2 <i>sau1</i>	GAGAATGATTTTGTATAACCCTAG	106	(140,142)
	CC398r1	CAGTATAAAGAGGTGACATG ACCCCT		

3. Electroforesis en gel de agarosa: 5 μ L del producto de la PCR se mezclaron con 10 μ L de agua de grado PCR y los 15 μ L se cargaron en un gel de agarosa al 2% (E-Gel® 48, Invitrogen, Carlsbad, California, EEUU). También se cargó el gel con 10 μ L del marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (100-1500 pb) (Invitrogen, Carlsbad, California, EEUU). Los fragmentos de ADN fueron separados mediante electroforesis en el sistema Mother E-Base (Invitrogen, Carlsbad, California, EEUU) a 100 V durante 20 minutos. Las bandas de ADN se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta,

4. Purificación del ADN amplificado de la PCR: se añadió 1 µL de ilustra ExoProStar (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) a 1.5 µL de ADN amplificado (de forma duplicada por cada muestra para la posterior secuenciación *forward* y *reverse*). Incubación a 37 °C durante 15 minutos y después a 80 °C durante otros 15 minutos. ilustra ExoProStar contiene fosfatasa alcalina y exonucleasa para degradar *primers* y nucleótidos de reacciones de amplificación.
5. Secuenciación del ADN: se realizó la PCR de secuenciación para cada cadena de ADN con el kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied biosystems, Foster City, California, EEUU). Al ADN amplificado y purificado se le añadió 16.5 µL de la *mix* de secuenciación (1 µL de BigDye v3.1, 2 µL de buffer 5x, 0.5 µL del *primer spa forward/reverse* a 10 µM y 13 µL de agua de grado PCR). Las condiciones de amplificación en el termociclador fueron: una predesnaturalización a 96 °C durante 3 minutos y después 24 ciclos (desnaturalización a 96 °C durante 30 segundos, alineamiento a 55 °C durante 30 segundos y extensión a 60 °C durante 4 minutos). El producto de la reacción de secuenciación se purificó con una solución de 45 µL de SAM y 10 µL de XTerminator (Applied biosystems, Foster City, California, EEUU) en agitación. Finalmente, las muestras se introdujeron en el secuenciador ABI PRISM 3130 (Applied biosystems, Foster City, California, EEUU).
6. Análisis de las secuencias obtenidas: el tipo de *spa* se asignó usando el programa informático Ridom Staph Type (Ridom GmbH, Münster, Alemania), que permite editar las secuencias *forward* y *reverse*, en caso necesario, y después las compara con una base de datos para asignar el tipo de *spa* (44).

La tipificación de *spa* mediante este método se realizó en las cepas de *S. aureus* del estudio del bloque III de caracterización molecular del complejo clonal CC5 de SARM causante de infección articular en la Comunidad de Madrid.

5.4.3 Tipado por secuenciación de múltiples locus (MLST)

El tipado por secuenciación de múltiples locus se realizó siguiendo el protocolo descrito por Enright et al (143), que incluye una PCR a tiempo real y posterior secuenciación del

Material y método

ADN. El procedimiento experimental que se realizó para el estudio de MLST de las cepas de *S. aureus* fue el siguiente:

1. Extracción del ADN: la extracción del ADN se realizó a partir de colonias cultivadas en agar sangre en el sistema automático QIAcube (Qiagen, Hilden, Alemania), según las instrucciones del fabricante. Las cepas de *S. aureus* fueron sometidas a un tratamiento previo con lisozima (20 mg/mL).
2. Amplificación de los genes: mediante PCR se amplificaron los fragmentos internos de los 7 genes metabólicos utilizando los *primers* diseñados por Enright et al (143), que se encuentran descritos en la Tabla 8. La PCR se realizó en un volumen de 20 μ l con el reactivo Light Cycler Start DNA Master SYBR Green I (Roche, Basilea, Suiza). La mezcla de reactivos de PCR para cada muestra incluía: 2 μ L del ADN extraído, 2 μ L de DNA master SYBRgreen (10x), 2.4 μ L de MgCl₂ (4mM), 0.5 μ l de cada primer *forward* y *reverse* (20 μ M), 1 μ l de la enzima UDG (uracil DNA glicosilasa) (1 U/ μ L) (Roche, Basilea, Suiza) y 11.6 μ l de agua de grado PCR. La amplificación y detección del producto amplificado se realizó en un termociclador de PCR en tiempo real (Light Cycler, Roche, Basilea, Suiza). El ciclo térmico utilizado para la amplificación fue: un ciclo de desnaturalización a 95 °C durante 10 minutos, seguido de 35 ciclos de amplificación (primero a 95 °C durante 10 segundos para desnaturalizar, seguido de una temperatura de 55 °C durante 8 segundos para la hibridación y una temperatura de 72 °C durante 20 segundos para la fase de extensión), seguido de un ciclo de extensión durante 3 minutos a 72 °C , y por último un ciclo de desnaturalización mediante la aplicación de un gradiente de temperaturas desde 50 °C hasta 95 °C, para así monitorizar la cinética de disociación de los fragmentos amplificados y determinar la temperatura de fusión.

Tabla 8. Secuencias de los *primers* usados en la PCR para el estudio de MLST.

Gen	Primers	Secuencias (5'-3')	Tamaño del amplificado (pb)
Carbamate kinase (<i>arcC</i>)	<i>arcC</i> -Up <i>arcC</i> -Dn	TTGATTCACCAGCGCGTATTGTC AGGTATCTGCTTCAATCAGCG	456
Shikimate deshydrogenase (<i>aroE</i>)	<i>aroE</i> -Up <i>aroE</i> -Dn	ATCGGAAATCCTATTTACATTC GGTGTGTATTAATAACGATATC	456
Glycerol kinase (<i>glpF</i>)	<i>glpF</i> -Up <i>glpF</i> -Dn	CTAGGAACTGCAATCTTAATCC TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC	465
Guanylate kinase (<i>gmk</i>)	<i>gmk</i> -Up <i>gmk</i> -Dn	ATCGTTTTATCGGGACCATC TCATTAACTACAACGTAATCGTA	429
Phosphate acetyltransferase (<i>pta</i>)	<i>pta</i> -Up <i>pta</i> -Dn	GTTAAAATCGTATTACCTGAAGG GACCCTTTTGTTGAAAAGCTTAA	474
Triosephosphate isomerase (<i>tpi</i>)	<i>tpi</i> -Up <i>tpi</i> -Dn	TCGTTTATTCTGAACGTCGTGAA TTTGACCTTCTAACAATTGTAC	402
Acetyl coenzyme A acetyltransferase (<i>yqiL</i>)	<i>yqiL</i> -Up <i>yqiL</i> -Dn	CAGCATACAGGACACCTATTGGC CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC	516

- Purificación del ADN amplificado de la PCR con ExoSAP-IT (Applied biosystems, Foster City, California, EEUU), según las instrucciones del fabricante.
- Secuenciación del ADN: las reacciones de secuenciación para cada cadena de ADN se realizaron en un volumen final de 10 µL: 4 µL de ADN amplificado y purificado, 2.5 µL del reactivo BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied biosystems, Foster City, California, EEUU), 1 µL del *primer spa forward/reverse* a 4 µM y 2.5 µL de agua de grado PCR. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador con las siguientes condiciones: primero una temperatura de 96 °C durante 1 minuto, seguido de 35 ciclos de 96 °C durante 10 segundos, 50 °C durante 5 segundos, y 60 °C durante 4 minutos. El producto de la reacción de secuenciación se purificó mediante la precipitación con etanol 100% y acetato sódico 3 M (pH=4.6), y posteriormente con etanol al

Material y método

70%. Tras un proceso de centrifugación el sedimento se resuspendió en formamida y, tras volver a centrifugar, las muestras se introdujeron en el secuenciador ABI PRISM 3100 (Applied biosystems, Foster City, California, EEUU).

5. Análisis de las secuencias obtenidas: los STs se asignaron usando la base de datos de MLST para *S. aureus* (<https://pubmlst.org/saureus/>).

El análisis de MLST mediante este método se realizó en las cepas de *S. aureus* del estudio retrospectivo de IPA del bloque II.

5.4.4 *Microarrays de ADN*

Para determinar los principales genes de virulencia y de resistencia a antibióticos de las cepas de *S. aureus* se utilizaron *microarrays* de ADN basados en la plataforma ArrayTube (144,145). Se usó el array *S. aureus* Genotyping Kit 2.0 (Alere, Jena, Alemania), que contiene 336 sondas que cubren las variantes alélicas de unos 185 genes distintos que incluyen marcadores de especies, genes de resistencia a antibióticos, genes de virulencia y marcadores de CC y de los tipos de *agr* (I-IV). El procedimiento experimental se encuentra esquematizado en la Figura 35.

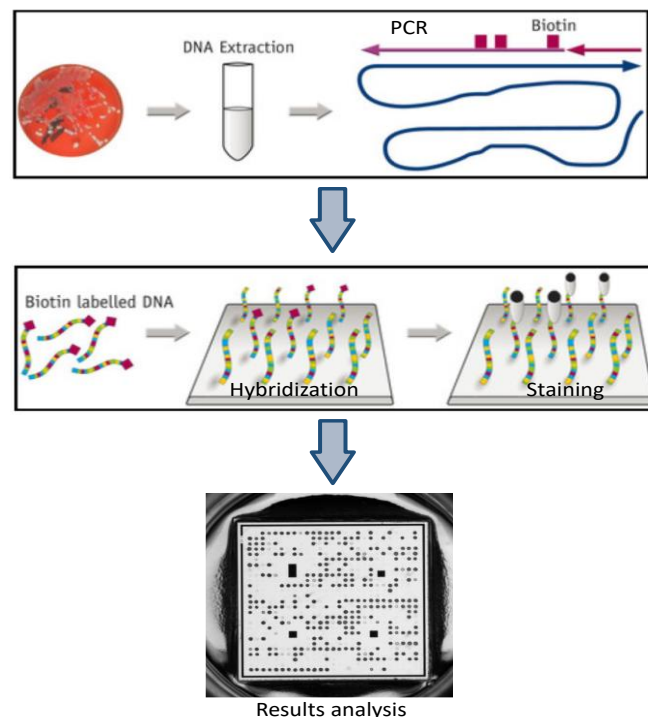


Figura 35. Procedimiento experimental del *microarray*. Modificado de Alere (146).

El procedimiento experimental del *microarray* de ADN se realizó según las instrucciones del fabricante y se describe a continuación:

1. Extracción del ADN: se realizó usando el kit de extracción DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen, Hilden, Alemania) a partir de colonias de *S. aureus* cultivadas en agar sangre.
2. Cuantificación del ADN: se determinó la concentración de ADN midiendo la DO a 260 y a 280 nm en el espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EEUU). La relación entre ambas absorbancias debe ser de aproximadamente 1.8 para asegurar un buen grado de pureza. La concentración de ADN se ajustó al rango de 500 a 1500 ng/ μ L.
3. Amplificación del ADN mediante una reacción de PCR lineal y marcado con biotina en un termociclador.
4. Hibridación con las sondas de ADN: el ADN amplificado y marcado con biotina se transfirió a la membrana del *microarray* con las sondas de ADN, para la hibridación del ADN con dichas sondas.
5. Detección del producto de hibridación: se incubó la membrana de *microarray* con un conjugado de HRP (peroxidasa de rábano picante, *horseradish peroxidase*) que se une a la biotina del ADN amplificado unido a las sondas. Después se añadió el sustrato de HRP. La actividad peroxidasa provoca la aparición de un producto insoluble que precipita sobre las zonas del *microarray* en las que ha habido hibridación (Figura 36).



Figura 36. *Microarrays* de ADN en los que se observa el precipitado cuya interpretación aporta los resultados genéticos.

6. Análisis de los resultados: la lectura e interpretación de los resultados se realizó con un aparato que provee el fabricante llamado Clondiag ArrayMate. Este instrumento mide la luz transmitida y de este modo detecta y cuantifica el precipitado que se ha formado al hibridar el ADN con las sondas específicas. Posteriormente se capturó la imagen de la membrana del *microarray* y mediante un *software* específico, proporcionado por el fabricante, se interpretaron los resultados.

El *microarray* de ADN se realizó en todas las cepas de *S. aureus* de la presente tesis doctoral.

5.4.5 Secuenciación de genoma completo

La SGC se realizó en las cepas del bloque III (SGC de *S. aureus* causante de infección articular).

5.4.5.1 Nombre de las cepas de *S. aureus*

A las cepas de *S. aureus* incluidas en los dos primeros estudios del bloque III se les asignó un código numérico identificativo de tres dígitos seguidos de un guion y otro dígito. El primer dígito identificaba al hospital, el segundo y tercero al número de cepa enviada por cada hospital y el dígito posterior al guion al número de episodio (número 1 para las primeras cepas aisladas y un 2 para las segundas [cepa de persistencia o de recidiva de la IPA]).

En el estudio de cepas de SARM pertenecientes al complejo clonal CC5 las cepas fueron nombradas con las iniciales SA (de *Staphylococcus aureus*), seguido de la letra i y de un número para su rápida identificación; después de una barra baja aparecen dos números que se corresponden con el año de la cepa (por ejemplo 09 se corresponde con el año 2009), y, por último, aparece una H de hospital y un número que se corresponde con el identificador del hospital.

5.4.5.2 Procedimiento experimental de la secuenciación de genoma completo

El procedimiento experimental que se siguió para secuenciar los genomas completos de las cepas de *S. aureus* fue el siguiente:

1. Extracción de ADN.

Se añadió la colonia bacteriana cultivada en agar sangre a 180 μL de una solución de lisis (134 μL de TE 1x, 36 μL de lysozima [100 mg/mL] y 10 μL de lisostafina [100 $\mu\text{g}/\text{mL}$]) y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. El resto del proceso de extracción se realizó con el kit de extracción DNeasy Blood & Tissue kit de Qiagen:

- Después de la solución de lisis, se añadieron 220 μL de una solución de 200 μL de buffer AL y 20 μL de proteinasa K y se incubó a 56 °C durante 30 minutos.
 - Se añadieron 200 μL de EtOH (96-99%) y después se transfirió la mezcla a una columna (*DNeasy mini spin column*), que se centrifugó a 8000 rpm y a 4 °C durante 1 minuto.
 - Se añadieron a cada columna 500 μL de buffer AW1 y se volvió a centrifugar durante a 8000 rpm y a 4 °C durante 1 minuto.
 - Se añadieron a cada columna 500 μL de buffer AW2 y se centrifugó a 14000 rpm y a 4 °C durante 3 minutos.
 - Se añadieron 100 μL de buffer AE a la membrana de cada columna y se incubó temperatura ambiente durante 1 minuto.
 - Por último, se centrifugaron las columnas a 8000 rpm y a 4 °C durante 1 minuto y en el eluido se obtuvo el ADN.
2. Medida de la concentración del ADN extraído en fluorómetro Qubit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EEUU), según las instrucciones del fabricante, para medir de forma muy sensible y específica el ADN bicatenario.
3. Preparación de librerías con el protocolo de Nextera XT de Illumina (San Diego, California, EEUU) (Figura 37). Este procedimiento se externalizó en la empresa Fisabio (Valencia, España) para las cepas de los dos primeros estudios de SGC, y

se llevó a cabo con el robot Microlab STAR de Hamilton (Reno, Nevada, estados Unidos). Primero se realizó la tagmentación del ADN (fragmentación del ADN usando transposasas) y posteriormente su amplificación mediante PCR en un termociclador para indexar índices y *barcodes* a los fragmentos de ADN. EL ADN amplificado fue purificado mediante esferas magnéticas (AMPure XP [Beckman Coulter, Indianapolis, EEUU]) y después se sometió a un control de calidad en el que se midió la concentración de ADN mediante el fluorómetro FLUOstar Omega (BMG Labtech, Ortenberg, Alemania) y se determinó el tamaño de los fragmentos de ADN en el sistema Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, California, EEUU). Posteriormente se normalizaron las librerías y se realizó un *pool* (juntar las librerías de ADN de las diferentes muestras) y desnaturalización del ADN.

4. Formación de *clusters* y secuenciación por síntesis (Figura 37) mediante el sistema Illumina en la plataforma NextSeq con el reactivo NextSeq 500/550 High Output kit v2.5 (150 ciclos) (Illumina), para generar una cobertura de ~100x y lecturas de 150 pb *paired end* (secuenciación de ambos extremos de cada fragmento de ADN). El proceso de secuenciación de Illumina se realiza por síntesis: para la formación de *clusters* las cadenas de ADN monocatenarias se unen a la superficie de los canales de la celda de flujo donde se produce la amplificación en puente dando lugar a ADN de cadena doble. Después se desnaturalizan las moléculas de ADN de cadena doble, y el ADN se amplifica produciendo varios millones de *clusters* de doble cadena de ADN en cada canal de la celda de flujo. Finalmente se lleva a cabo la secuenciación por síntesis de los *clusters*, en la que, por cada ciclo de secuenciación, un único desoxinucleótido trifosfato (dNTP) se añade a la cadena de ADN. El dNTP marcado actúa como terminador de la polimerización, detectando la fluorescencia después de la adición de cada dNTP marcado e identificando la base según la intensidad de la señal de cada ciclo. Mediante el proceso de *basecalling* esas señales se convierten en las bases correspondientes de la secuencia, generando millones de lecturas que representan a todos los fragmentos de ADN.

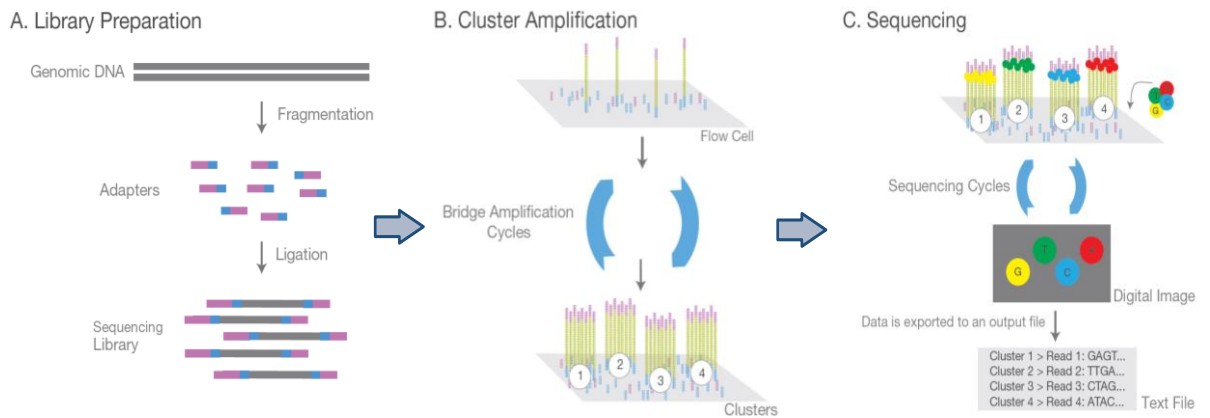


Figura 37. Esquema del proceso de secuenciación del genoma completo mediante el sistema Illumina: preparación de librerías, formación de *clusters* y secuenciación por síntesis (147).

5.4.5.3 Análisis bioinformático

El análisis bioinformático se inició con el análisis de calidad de los ficheros FASTQ mediante el programa *FastQC* (versión 0.11.8) (148). Después se llevó a cabo el estudio de clonalidad para el que se realizó el análisis del MLST de las cepas mediante la web del Centro de Epidemiología Genómica (CEG) (*MLST*, versión 2.0) (149). Según el MLST, se seleccionó la cepa de referencia más adecuada para cada cepa a analizar, del mismo CC o del CC más parecido posible, para algunos de los análisis posteriores (150,151). Los resultados de ST y la selección de las cepas de referencia para cada cepa y estudio se encuentran en las Tablas 25 y 31 de los resultados del bloque III de la presente tesis doctoral. El análisis bioinformático a partir de los FASTQ se realizó mediante dos vías diferentes: anotación de los genomas y estudio de asociación de genes con diferentes variables clínicas de interés en la infección articular, por otro lado, análisis de filogenia y estudio de variantes.

1. Anotación del genoma y estudio de asociación de genes con variables clínicas de interés.
 - Ensamblado del genoma a partir de los ficheros FASTQ: se realizó mediante el servidor web del CEG (*SPAdes*, versión 3.9) (152), obteniendo los

Material y método

ensamblados en formato FASTA, cuya calidad se analizó mediante *QUAST* (Quality Assessment Tool for Genome Assemblies), versión 5.0.2 (153).

- Anotación del genoma: la anotación del genoma se realizó de dos formas diferentes:
 - En los dos primeros estudios del bloque III de SGC (caracterización molecular de *S. aureus* causante de IPA y de IPA persistente y recidivante) la anotación del genoma se realizó mediante *Prokka* (versión 1.13.3) (154) a partir de los ficheros FASTA. Se utilizó un genoma de referencia del Centro nacional para información biotecnológica (NCBI, National Center for Biotechnology Information) para cada cepa para mejorar la anotación del genoma.
 - En el tercer estudio del bloque de SGC (estudio de caracterización molecular del complejo clonal CC5 de SARM causante de infección articular) la anotación del genoma se realizó a través de los programas web RAST (*Rapid Annotation using Subsystem Technology*) (versión 2.0) (155), que identificó genes de resistencia a antibióticos y de virulencia y, también, con los programas del CEG, *ResFinder* (versión 3.0) (ZankariJAC2012) (156) y *VirulenceFinder* (versión 1.5) (157) se identificaron genes de resistencia a antibióticos y de virulencia, respectivamente.

En los tres estudios los genes de resistencia a antibióticos fueron también cribados a través del servidor web *Mykrobe* (versión 6.1) (158), que también aporta información sobre la presencia de mutaciones en genes de resistencia a antibióticos.

- Además, en los dos primeros estudios, centrados en la IPA, se realizó un análisis de asociación de genes de virulencia y de resistencia a antibióticos con variables clínicas de interés en la infección articular. A través de *Roary* (versión 3.11.2) (159) se calculó el pangenoma de todas las cepas a partir de los ficheros de anotación de *Prokka*. Mediante *Scoary* (versión 1.6.16) (160) se llevó a cabo el estudio de asociación entre la presencia y ausencia de todos

genes del genoma (obtenido con *Roary*) con las variables clínicas (*microbial pan-GWAS*).

- Estudio de la epidemiología molecular de las cepas se completó (*SCCmec* y *spa type*) mediante el servidor web del CEG (*SCCmecFinder*, versión 1.2 y *spaTyper*, versión 1.0) (41,161).
2. Análisis filogenético y estudio de variantes.
- El análisis filogenético se realizó de dos formas:
 - En los dos primeros estudios, centrados en la IPA, se realizó la llamada de variantes de las cepas respecto a la referencia con el *pipeline* de *Snippy* (versión 4.4.0) (<https://github.com/tseemann/snippy>) (162). Se analizó la calidad de los ficheros BAM obtenidos por *Snippy* con *Samtools* (versión 1.7) (163) y *QualiMap* (versión 2.2.1) (164). A partir del fichero *core.full.aln*, obtenido de *Snippy*, se eliminaron las regiones recombinantes del ADN bacteriano mediante *Gubbins* (versión 2.4.1) (165) y después se infirió el dendrograma filogenético por *maximum likelihood* con 1000 réplicas mediante *IQ-TREE* (versión 1.6.11) (166,167). Mediante este programa se obtuvo un fichero en formato NEWICK que se cargó en *iTOL (interactive tree of life)*, versión 5.5 (168,169), para obtener el dendrograma en formato gráfico.
 - En el estudio de caracterización molecular del complejo clonal CC5 de SARM causante de infección articular la identificación de SNPs (*single nucleotide polymorphism*, polimorfismos de un solo nucleótido) se realizó mediante *NASP (the Northern Arizona SNP pipeline)* (versión 1.1.2) (170) y se analizó la filogenia con *RAxML (Randomized accelerated maximum likelihood)* (versión 8.2.10) (171). Finalmente, el dendrograma filogenético y *heatmap* se obtuvo mediante *Geneious* (172).

La cepa de referencia que se usó para realizar el árbol filogenético en los tres estudios fue la N315 (GenBank: BA000018.3), perteneciente al complejo clonal

CC5, ya que la mayoría de las cepas pertenecían a ese CC (todas las cepas en el caso del tercer estudio).

- Además, en los dos primeros estudios de IPA se analizaron detalladamente las variantes entre cepas de *S. aureus* para conocer los cambios genéticos que se producen durante la evolución clínica de la infección articular. Este análisis de variantes se realizó con *breseq* (versión 0.33.2) (173), que identifica y anota variantes genéticas entre cepas a partir de los FASTQ de las cepas a estudio y de una cepa de referencia. Los criterios de llamada de variantes se ajustaron de la siguiente forma (162,174): *minimum-mapping-quality* de 30, *consensus-minimum-variant-coverage* de 30x y *consensus-minimum-total-coverage* de 40x. El alineamiento de las lecturas al genoma de referencia fue visualizado mediante *IGV (Integrative Genomics Viewer)* (175). El *output* obtenido con *breseq* del comparativo de las variantes entre cepas respecto a una referencia fue filtrado hasta obtener las variantes que diferenciaban las cepas a comparar. Después se realizó un filtrado de variantes para obtener aquellos SNPs no sinónimos, SNPs sinónimos, sustituciones de múltiples bases, inserciones y deleciones que se encontraban en proteínas conocidas, descartando las que se encontraban en proteínas presuntivas e hipotéticas (*hypothetical proteins*) y en regiones intergénicas y en pseudogenes. También se excluyeron las variantes que se encontraban en regiones móviles del genoma (fagos), debido a su elevada variabilidad.

Los ficheros FASTA con las secuencias de nucleótidos fueron depositados en GenBank (NCBI) en el *Bioproject* PRJNA774351 (números de acceso JAJHKM000000000-JAJHNN000000000).

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las variables cualitativas se expresaron como frecuencias absolutas y relativas (porcentajes), y las variables cuantitativas preferiblemente con su mediana (y rango intercuartílico). El test del chi-cuadrado (χ^2) o el test exacto de Fisher (cuando alguna de las frecuencias esperadas era menor de 5) se utilizaron para comparar la distribución de

las variables categóricas, y el test *t* de Student o *U* de Mann-Whitney para las variables continuas. Para el análisis de supervivencia de las larvas de *G. mellonella* las curvas de supervivencia se realizaron usando el método de Kaplan-Meier (*test long-rank*). Un valor de $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo. La variable *outcome* o *endpoint* principal fue el fracaso microbiológico al tratamiento (en los bloques de estudio I, II y en el estudio de IPA persistente y recidivante del bloque III).

Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete informático *SPSS* para *Windows*, versión 20.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) y las figuras se realizaron con *GraphPad Prism* para *Windows*, versión 6 (GraphPad Software, San diego, California, EEUU).

En el análisis bioinformático, el estudio de asociación entre la presencia/ausencia de genes con las variables clínicas se realizó con *Scoary*, ajustando el nivel de significación (*p-value*) con el método de Benjamini-Hochberg para el control de la tasa de error tipo I por comparaciones múltiples (FDR, *false Discovery rate*) con los siguientes criterios: $p\text{-value} < 0.10$ y $FDR < 0.05$, $p\text{-value} < 0.05$ y $FDR < 0.10$ y, por último, $p\text{-value} < 0.05$ y $FDR < 0.05$.

RESULTADOS

BLOQUE I: ARTRITIS SÉPTICA
NATIVA PRODUCIDA POR
Staphylococcus aureus

Resultados

ESTUDIO RETROSPECTIVO DE ARTRITIS SÉPTICA NATIVA

1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS EPISODIOS DE ARTRITIS SÉPTICA NATIVA

1.1 DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA COHORTE

Se identificaron 29 pacientes con artritis séptica nativa causada por *S. aureus* entre los años 2005 y 2015. En la Tabla 9 se muestran las características clínicas de la cohorte. Diecinueve pacientes (19/29 [65.5%]) fueron varones y la edad media de los pacientes fue de 58.6 ± 18.2 años. Siete casos (7/29 [24.1%]) fueron causados por cepas de SARM y 22 (22/29 [75.9%]) por SASM. En total, 12 casos de artritis nativa (12/29 [41.4%]) se consideraron infecciones relacionadas con los cuidados sanitarios (HCR) (9/29 [31.0%]) y tres (3/29 [10.3%]) infecciones nosocomiales; mientras que el resto de los casos (17/29 [58.6%]) fueron de adquisición comunitaria. Cuatro pacientes (4/29 [13.8%]) tenían una enfermedad reumática (dos casos de gota, un caso de artritis reumatoide y un caso de esclerodermia) y cuatro pacientes (4/29 [13.8%]) habían tenido una bacteriemia estafilocócica previa al episodio de artritis nativa. Una de las artritis del estudio fue polimicrobiana, causada por *S. aureus* y *P. aeruginosa*. Más de la mitad de las artritis nativas afectaron a la rodilla (17/29 [58.6%]) y la mayoría de los casos presentaron signos inflamatorios (27/29 [93.1%]) y fiebre (20/28 [71.4%]). Seis pacientes (6/29 [20.7%]) tenían una infección por *S. aureus* en otra localización, concomitante a la artritis nativa: tres presentaban endocarditis infecciosa y tres una infección de piel y partes blandas (un absceso subcutáneo, una miositis y fascitis necrotizante y una bursitis en otra articulación). Estos seis pacientes presentaban bacteriemia en el momento del diagnóstico de artritis séptica y dos de ellos ya habían tenido previamente bacteriemia por *S. aureus*.

Resultados

La evolución clínica de la artritis séptica se pudo evaluar en 26/29 pacientes, por pérdida en el seguimiento de los otros casos. La mediana de seguimiento fue de 320 días, siendo de 18 meses en pacientes con evolución clínica favorable. Se observó fracaso del tratamiento en siete pacientes (7/26 [26.9%]): cuatro pacientes presentaron una artritis persistente (4/26 [15.4%]), y tres pacientes fallecieron; de estos tres, sólo en uno se pudo documentar recidiva de la infección. Al final del período de seguimiento, el 31.0% de los pacientes (9/29) presentó alguna secuela funcional: implante de una prótesis articular en dos pacientes (6 y 24 meses después del episodio de artritis séptica), dolor crónico en cinco pacientes y limitación de la movilidad articular en dos pacientes.

Tabla 9. Características clínicas de los pacientes con artritis séptica nativa causada por *S. aureus* y análisis comparativo según la sensibilidad a meticilina.

Características	Total casos (n=29), N° (%)	SARM (n=7), N° (%)	SASM (n=22), N° (%)	P
Características basales				
Sexo (varón)	19 (65.5)	5 (71.4)	14 (63.6)	1.000
Edad (años, media ± DE)	58.6 ± 18.2	67.0 ± 19.4	56.0 ± 17.5	0.169
Infección relacionada con el cuidado sanitario y nosocomial	12 (41.4)	5 (71.4)	7 (31.8)	0.092
Diabetes mellitus	8 (27.6)	3 (42.9)	5 (22.7)	0.357
Insuficiencia renal crónica	6 (20.7)	3 (42.9)	3 (13.6)	0.131
Cáncer	3 (10.3)	0 (0.0)	3 (13.6)	0.557
Cirrosis	6 (20.7)	3 (42.9)	3 (13.6)	0.131
Enfermedad reumática	4 (13.8)	2 (28.6)	2 (9.1)	0.238
Enfermedad pulmonar crónica	5 (17.2)	2 (28.6%)	3 (13.6)	0.569
Enfermedad cardíaca crónica	10 (34.5)	4 (57.1)	6 (27.3)	0.193
Terapia inmunosupresora	6 (20.7)	2 (28.6)	4 (18.2)	0.612

			Resultados	
Artritis relacionada con trauma	4 (13.8)	1 (14.3)	3 (13.6)	1.000
Cirugía previa en la articulación implicada	3 (10.3)	1 (14.3)	2 (9.1)	1.000
Presentación clínica				
≥2 articulaciones	2 (6.9)	0 (0.0)	2 (9.1)	1.000
Articulación implicada ^a				
Rodilla	17 (58.6)	3 (42.9)	14 (63.6)	
Cadera	4 (13.8)	2 (28.6)	2 (9.1)	0.408
Otra ^b	8 (27.6)	2 (28.6)	6 (27.3)	
Signos inflamatorios articulares	27 (93.1)	5 (71.4)	22 (100.0)	0.052
Fiebre >38°C	20/28 (71.4)	4/7 (57.1)	16/21 (76.2)	0.371
Leucocitos (x10 ⁹ /L, media ± DE)	11.8 ± 4.8	11.4 ± 6.0	11.9 ± 4.6	0.705
Proteína C reactiva (mg/L, media ± DE)	174.7 ± 152.9	206.7 ± 50.3	167.9 ± 167.6	0.591
Bacteriemia	18/28 (64.3)	4/7 (57.1)	14/21 (66.7)	0.674
Infección por <i>S. aureus</i> en otra localización concomitante a la artritis nativa	6 (20.7)	3 (42.9)	3 (13.6)	0.131
Datos de la artrocentesis diagnóstica				
Artrocentesis diagnóstica	24 (82.8)	6 (85.7)	18 (81.8)	1.000
Leucocitos (x10 ⁹ /L, media ± DE)	85.2 ± 46.0	84.4 ± 48.9	85.4 ± 47.7	1.000
Tinción de Gram positiva	9/18 (50.0)	3/5 (60.0)	6/13 (46.2)	1.000
Terapia quirúrgica y antibiótica				
Drenaje quirúrgico	18 (62.1)	7 (100.0)	11 (50.0)	0.026*
Artrotomía	3/13 (23.1)	2/5 (40.0)	1/8 (12.5)	0.510
Artroscopia	10/13 (76.9)	3/5 (60.0)	7/8 (87.5)	0.510
Necesidad de >1 cirugía	6/18 (33.3)	1/7 (14.3)	5/11 (45.5)	0.316

Resultados

Tiempo hasta la cirugía (días, mediana [RIQ])	8 (5-11)	7 (2-18)	8 (6-11)	0.791
Artrocentesis terapéutica	8/25 (32.0)	2/4 (50.0)	6/21 (28.6)	0.570
Terapia antibiótica (días, mediana [RIQ])	47 (28-68)	45 (19-74)	47 (28-62)	0.858
Fracaso microbiológico al tratamiento	7/26 (26.9)	4/7 (57.1)	3/19 (15.8)	0.057
Persistencia	4/26 (15.4)	1/7 (14.3)	3/19 (15.8)	1.000
Mortalidad	3/26 (11.5)	3/7 (42.9)	0/19 (0.0)	0.013*

Abreviaturas: DE, desviación estándar; SARM, *S. aureus* resistente a meticilina; SASM, *S. aureus* sensible a meticilina; RIQ, rango intercuartílico.

^a Cuando varias articulaciones estuvieron implicadas, el paciente se clasificó según la articulación más afectada (176).

^b Las otras articulaciones afectadas fueron tres tobillos, una muñeca, un codo, una articulación glenohumeral, una articulación acromioclavicular y una articulación esternoclavicular.

* Estos resultados son estadísticamente significativos.

1.2 COMPARACIÓN DE LOS EPISODIOS DE ARTRITIS SEGÚN LA SENSIBILIDAD A METICILINA DE LAS CEPAS DE *S. aureus*

En la Tabla 9 se muestra un análisis comparativo de las características clínicas de los episodios de artritis nativa causadas por SASM y SARM. Uno de los pacientes era adicto a drogas por vía parenteral (ADPV) y presentó una artritis nativa por SASM. Las artritis nativas causadas por SARM fueron de adquisición comunitaria en una menor proporción que las causadas por SASM (2/7 [28.6%] vs 15/22 [68.2%], $p=0.092$). Todas las artritis nativas causadas por SASM (22/22 [100.0%]) presentaron signos inflamatorios, siendo esta proporción menor entre las causadas por SARM [71.4% (5/7)] ($p=0.052$).

Todos los pacientes con infección causada por SARM requirieron drenaje quirúrgico, en contraste con sólo la mitad de los pacientes con infección por SASM (7/7 [100.0%] vs 11/22 [50.0%], $p=0.026$). Los pacientes fueron tratados con antibióticos durante una media de 49.6 días. El tratamiento habitual de los pacientes con SARM consistió en vancomicina durante una media de 21.7 días, y posteriormente cotrimoxazol durante

una media de 14.7 días. Los pacientes con artritis nativa por SARM fueron tratados principalmente con betalactámicos intravenosos durante una media de 23.5 días y fluoroquinolonas durante una media de 18.3 días. Tres pacientes fueron tratados con rifampicina durante una media de 17 días.

Se observó fracaso del tratamiento en siete pacientes (7/26 [26.9%]): 4/7 [57.1%] en el grupo de infección por SARM frente a 3/19 [15.8%] en el grupo de infección por SARM, $p=0.057$. El porcentaje de persistencia fue similar en las infecciones por SARM y SARM (1/7 [14.3%] vs 3/19 [15.8%], $p=1.0$). Sin embargo, la mortalidad fue significativamente mayor en los pacientes con infección por SARM (3/7 [42.9%] vs 0/19 [0.0%], $p=0.013$).

1.3 COMPARACIÓN DE LOS EPISODIOS DE ARTRITIS SEGÚN LA EVOLUCIÓN CLÍNICA DE LOS PACIENTES

El análisis univariante que se realizó para analizar la asociación entre las características clínicas de los pacientes con artritis séptica nativa causada por *S. aureus* y la evolución clínica no reveló características clínicas asociadas con el fracaso terapéutico (Tabla 10).

Tabla 10. Análisis comparativo de las características clínicas de los pacientes con artritis séptica nativa causada por *S. aureus* según su evolución clínica (se pudo evaluar en 26/29 pacientes).

Características	Fracaso terapéutico	Curación	P
	(n=7), N° (%)	(n=19), N° (%)	
Características basales			
Sexo (varón)	5 (71.4)	11 (57.9)	0.668
Edad (años, media \pm DE)	64.9 \pm 18.3	57.7 \pm 16.8	0.461
Infección relacionada con el cuidado sanitario y nosocomial	4 (57.1)	7 (36.8)	0.407
Diabetes mellitus	3 (42.9)	4 (21.1)	0.340
			149

Resultados

Insuficiencia renal crónica	2 (28.6)	2 (10.5)	0.287
Cáncer	0 (0.0)	3 (15.8)	0.540
Cirrosis	2 (28.6)	3 (15.8)	0.588
Enfermedad reumática	2 (28.6)	2 (10.5)	0.287
Enfermedad pulmonar crónica	2 (28.6)	2 (10.5)	0.287
Enfermedad cardíaca crónica	3 (42.9)	6 (31.6)	0.661
Terapia inmunosupresora	3 (42.9)	2 (10.5)	0.101
Artritis relacionada con trauma	1 (14.3)	2 (10.5)	1.000
Cirugía previa en la articulación implicada	0 (0.0)	3 (15.8)	0.540

Presentación clínica

Implicación de múltiples articulaciones	1 (14.3)	1 (5.3)	0.474
Articulación implicada ^a			
Rodilla	5 (71.4)	9 (47.4)	
Cadera	1 (14.3)	3 (15.8)	0.706
Otra	1 (14.3)	7 (36.8)	
Signos inflamatorios articulares	6 (85.7)	18 (94.7)	0.474
Fiebre >38°C	6/7 (85.7)	12/18 (66.7)	0.626
Leucocitos (x10 ⁹ /L, media ± DE)	14.2 ± 8.0	11.0 ± 3.3	0.387
Proteína C reactiva (mg/L, media ± DE)	17.3 ± 15.0	17.8 ± 16.2	0.840
Bacteriemia	6/7 (85.7)	11/18 (61.1)	0.362
Infección por <i>S. aureus</i> en otra localización concomitante a la artritis nativa	3 (42.9)	2 (10.5)	0.101

Datos de la artrocentesis diagnóstica

Artrocentesis diagnóstica	7 (100.0)	14 (73.7)	0.278
Leucocitos (x10 ⁹ /L, media ± DE)	67.4 ± 41.7	83.1 ± 39.1	0.268

Tinción de Gram positiva	3/6 (50.0)	5/10 (50.0)	1.000
Terapia quirúrgica y antibiótica			
Drenaje quirúrgico	7 (100.0)	10 (52.6)	0.058
Artrotomía	2/5 (40.0)	1/8 (12.5)	0.510
Artroscopia	3/5 (60.0)	7/8 (87.5)	0.510
Necesidad de >1 cirugía	3 (42.9)	2 (10.5)	0.101
Tiempo hasta la cirugía (días, mediana [RIQ])	7 (2-12)	8 (5-12)	0.813
Artrocentesis terapéutica	2/6 (33.3)	5/17 (29.4)	1.000
Terapia antibiótica (días, mediana [RIQ])	41 (19-74)	48 (42-65)	0.631

Abreviaturas: DE, desviación estándar; SARM, *S. aureus* resistente a meticilina; SASM, *S. aureus* sensible a meticilina; RIQ, rango intercuartílico.

^a Cuando varias articulaciones estuvieron implicadas, el paciente se clasificó según la articulación más afectada (176).

2. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DE LAS CEPAS CAUSANTES DE ARTRITIS

2.1 CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS Y GENOTÍPICAS

El patrón de sensibilidad a los antibióticos y las características fenotípicas y genotípicas de las cepas de *S. aureus* se detallan en la Tabla 11. Todas las cepas fueron sensibles a vancomicina (CMI \leq 1.0 mg/L), teicoplanina, daptomicina (CMI \leq 0.38 mg/L), linezolid, cotrimoxazol, clindamicina, rifampicina y ácido fusídico.

Las características fenotípicas y genotípicas se pudieron analizar en 21 de las 29 cepas de *S. aureus* disponibles (14/22 cepas de SASM y las 7/7 cepas de SARM). Seis cepas (6/21 [28.6%]) presentaron disfuncionalidad del sistema *agr*, 7 (7/21[33.3%]) una funcionalidad positiva débil y 8 cepas (8/21 [38.1%]) una funcionalidad positiva fuerte.

Resultados

Seis cepas (6/21 [28.6%]) mostraron una fuerte β -hemólisis, pero ninguna cepa presentó halo turbio de hemólisis rodeando a las colonias en agar sangre por expresión de la β -hemolisina (Hlb). Todas las cepas presentaron formación de *biofilm* y todas presentaron un fenotipo salvaje. Uno de los pacientes tuvo una artritis séptica causada por una cepa de SARM con dos fenotipos diferentes: uno de ellos presentaba una β -hemólisis débil en agar sangre y un *agr* funcional, mientras que el otro no presentaba β -hemólisis y presentaba disfuncionalidad de *agr* (Figura 38). Ambos tenían el mismo patrón en PFGE (Figura 39) y se consideró que pertenecían al mismo tipo clonal. Ambas cepas presentaron una misma sensibilidad fenotípica a antibióticos.

Tabla 11. Sensibilidad a antimicrobianos y características fenotípicas y genotípicas de las cepas de *S. aureus* y análisis comparativo según la sensibilidad a metilicina.

Características	Total casos (n=29), Nº (%)	SARM (n=7), Nº (%)	SASM (n=22), Nº (%)	P
Resistencia antimicrobiana				
Penicilina	26 (89.7)	7 (100.0)	19 (86.4)	0.557
Levofloxacino	7 (24.1)	6 (85.7)	1 (4.5)	<0.001*
Eritromicina	7 (24.1)	5 (71.4)	2 (9.1)	0.003*
Gentamicina	6 (20.7)	1 (14.3)	5 (22.7)	1.000
Mupirocina	1/23 (4.3)	1/7 (14.3)	0/16 (0.0)	0.304
CMI de daptomicina por Etest (mg/L)				
CMI ₅₀	0.19	0.13	0.19	-
CMI ₉₀	0.25	0.19	0.25	-
Media geométrica	0.16	0.13	0.18	0.061
CMI de vancomicina por Etest (mg/L)				
CMI ₅₀	0.75	0.75	0.75	-
CMI ₉₀	1.00	1.00	1.00	-
Media geométrica	0.80	0.85	0.78	0.532

Características fenotípicas

<i>agr</i> disfuncional	6/21 (28.6)	3/7 (42.9%)	3/14 (21.4)	0.354
β -hemólisis				
Negativo	2/21 (9.5)	0/7 (0.0)	2/14 (14.3)	
Débil	13/21 (61.9)	5/7 (71.4)	8/14 (57.1)	0.816
Fuerte	6/21 (28.6)	2/7 (28.6)	4/14 (28.)	
Formación <i>biofilm</i> (DO 595 nm, media \pm DE)	0.28 \pm 0.12	0.33 \pm 0.07	0.26 \pm 0.14	0.225

Genotipo de resistencia y virulencia

Complejo clonal (CC)

CC5	8/21 (38.1)	5/7 (71.4)	3/14 (21.4)	
CC8	2/21 (9.5)	1/7 (14.3)	1/14 (7.1)	
CC22	3/21 (14.3)	1/7 (14.3)	2/14 (14.3)	0.103
CC30	3/21 (14.3)	0/7 (0.0)	3/14 (21.4)	
Otros ^a	5/21 (23.8)	0/7 (0.0)	5/14 (35.7)	

Grupo de *agr*

<i>agr</i> I	8/21 (38.1)	2/7 (28.6)	6/14 (42.9)	
<i>agr</i> II	9/21 (42.9)	5/7 (71.4)	4/14 (28.6)	0.346
<i>agr</i> III	3/21 (14.3)	0/7 (0.0)	3/14 (21.4)	
<i>agr</i> IV	1/21 (4.8)	0/7 (0.0)	1/14 (7.1)	
<i>bla</i> Z (betalactamase)	18/21 (85.7)	7/7 (100.0)	11/14 (78.6)	0.521
<i>erm</i> (C) (erythromycin ribosome methylation protein C)	1/21 (4.8)	1/7 (14.3)	0/14 (0.0)	0.333
<i>aad</i> D (aminoglycoside adenytransferase)	4/21 (19.0)	4/7 (57.1)	0/14 (0.0)	0.006

Resultados

<i>qacC</i> (quaternary ammonium compound)	1/21 (4.8)	1/7 (14.3)	0/14 (0.0)	0.333
<i>tst1</i> (toxic shock syndrome toxin 1)	2/21 (9.5)	0/7 (0.0)	2/14 (14.3)	0.533
PVL (Panton Valentine leukocidin)	1/21 (4.8)	1/7 (14.3)	0/14(0.0)	0.333
<i>seg</i> (enterotoxin G)	17/21 (81.0)	6/7 (85.7)	11/14 (78.6)	1.000
<i>seo</i> (enterotoxin O)	16/21 (76.2)	5/7 (71.4)	11/14 (78.6)	1.000
<i>seu</i> (enterotoxin U)	17/21 (81.0)	6/7 (85.7)	11/14 (78.6)	1.000
β -hemolisina con inserción de fago	20/21 (95.2)	6/7 (85.7)	14/14 (100.0)	0.333
<i>sea</i> (enterotoxin A)	3/21 (14.3)	0/7 (0.0)	3/14 (21.4)	0.521
<i>sak</i> (staphylokinase)	19/21 (90.5)	6/7 (85.7)	13/14 (92.9)	1.000
<i>chp</i> (chemotaxis-inhibiting protein)	18/21 (85.7)	6/7 (85.7)	12/14 (85.7)	1.000
<i>scn</i> (staphylococcal complement inhibitor)	20/21 (95.2)	6/7 (85.7)	14/14 (100.0)	0.333
<i>spIA</i> (serine protease A)	14/21 (66.7)	6/7 (85.7)	8/14 (57.1)	0.337
<i>spIB</i> (serine protease B)	14/21 (66.7)	6/7 (85.7)	8/14 (57.1)	0.337
<i>cna</i> (collagen adhesin)	8/21 (38.1)	1/7 (14.3)	7/14 (50.0)	0.174
<i>fnbB</i> (fibronectin-binding protein B)	16/21 (76.2)	6/7 (85.7)	10/14 (71.4)	0.624

Abreviaturas: CC, complejo clonal; CMI, concentración mínima inhibitoria; DE, desviación estándar; DO; densidad óptica; SARM, *S. aureus* resistente a meticilina; SASM, *S. aureus* sensible a meticilina.

^a Incluye los siguientes CCs: CC6 (1), CC15 (1), CC25 (1), CC45 (1) y CC121 (1).

* Estos resultados son estadísticamente significativos.

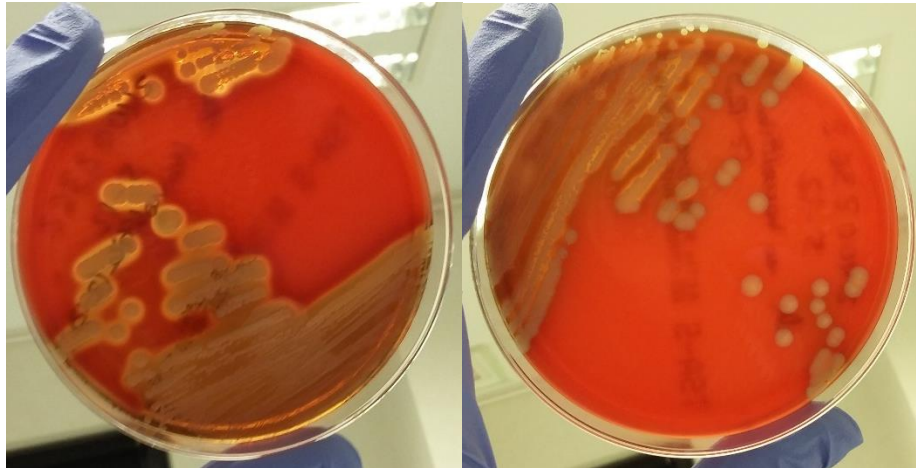


Figura 38. Fenotipo β -hemolítico (izquierda) y no β -hemolítico (derecha) en agar sangre de las cepas de *S. aureus* resistentes a metilina pertenecientes a un mismo paciente con artritis nativa.

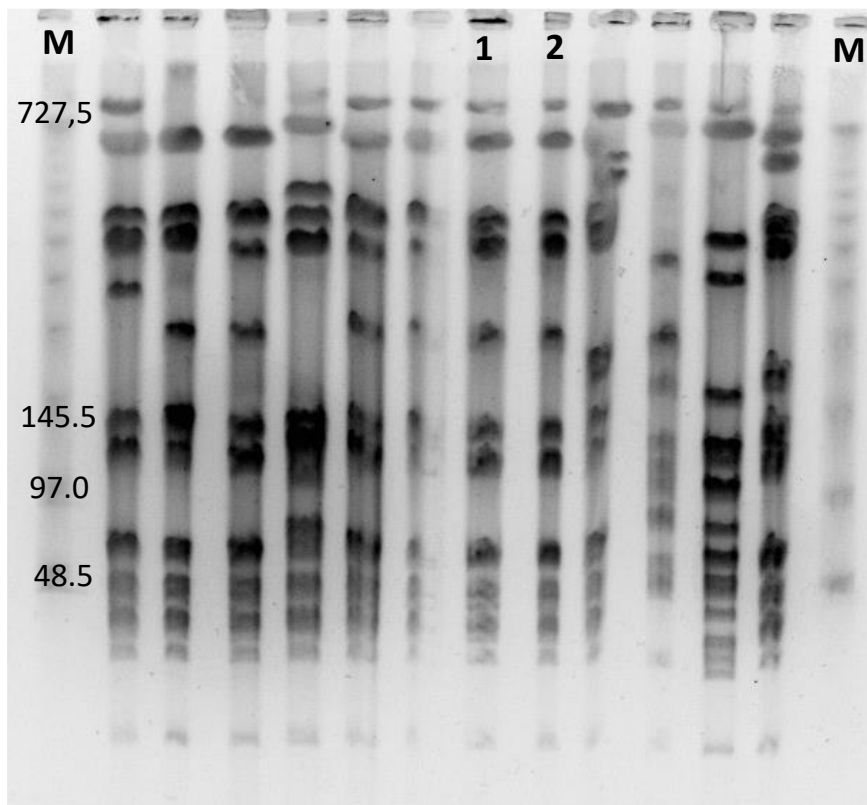


Figura 39. Electroforesis en gel en campo pulsante de las cepas de *S. aureus* causantes de artritis nativa. Las cepas 1 y 2 se corresponden con las cepas de SARM pertenecientes a un mismo paciente con dos fenotipos diferentes pero mismo patrón electroforético. La cepa 1 presentaba β -hemólisis débil en agar sangre y un *agr* funcional, mientras que la cepa 2 no presentaba β -hemólisis y mostraba disfuncionalidad de *agr*. M: marcador de peso molecular (kb).

Resultados

El análisis de PFGE mostró una alta variabilidad genética (Figura 40), siendo CC5 el complejo clonal mayoritario (8/21 [38.1%]). El *agr* tipo II (9/21 [42.9%]) y el *agr* tipo I (8/21 [38.1%]) fueron los tipos de *agr* principales. Catorce cepas (14/21 [66.7%]) presentaron la cápsula *cap5* y siete cepas (7/21 [33.3%]) la cápsula *cap8*. Todos los aislamientos portaron genes que codificaban para las proteínas de adhesión intercelular que participan en la formación de *biofilm* (*icaA*, *icaC*, *icaD*) y genes que codifican para MSCRAMMs. Todas las cepas (21/21 [100.0%]) presentaron el gen que codifica para la proteína de unión a fibronectina A (*fnbA*), mientras que el gen que codifica para la proteína de unión a fibronectina B (*fnbB*) estuvo presente en un 76.2% (16/21) de las cepas. Los genes que codifican para la toxina del síndrome del shock tóxico (*tst1*) y para la leucocidina de Pantón-Valentine (LPV) se detectaron en dos (2/21 [9.5%]) y una (1/21 [4.8%]) cepas, respectivamente. Estos casos evolucionaron favorablemente. Todas las cepas de *S. aureus* menos una (20/21 [95.2%]) portaban el gen de la β -hemolisina (*hlyB*) truncado por la inserción de fagos con el *cluster* de evasión del sistema inmune: *sak* (estafiloquinasa), *chp* (proteína inhibidora de la quimiotaxis) y *scn* (inhibidor del complemento estafilocócico).

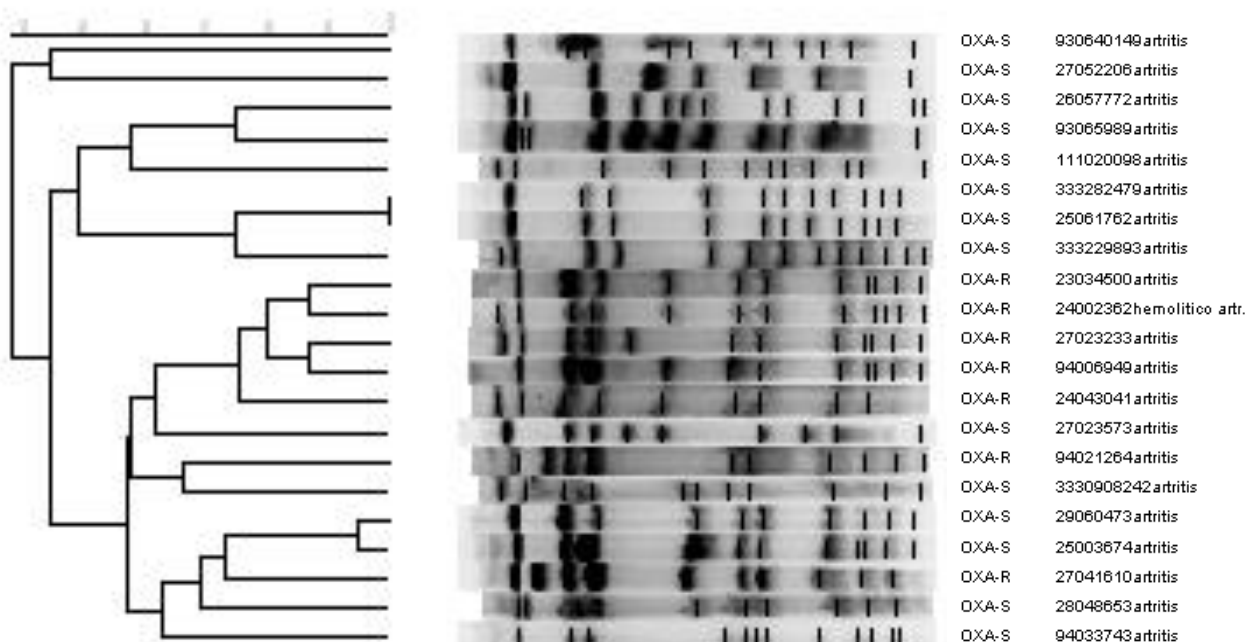


Figura 40. Electroforesis en gel en campo pulsante de todas las cepas de *S. aureus* causantes de artritis nativa junto con la sensibilidad a meticilina (S: sensible, R: resistente).

2.2 COMPARACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DE LAS CEPAS DE *S. aureus* SEGÚN LA SENSIBILIDAD A METICILINA

En la Tabla 11 se muestran las características microbiológicas de las cepas de *S. aureus* según su sensibilidad a meticilina. Todas las cepas de SARM fueron positivas para el gen *mecA*. Como era de esperar, los aislados de SARM presentaron con una mayor frecuencia resistencia a las fluoroquinolonas (6/7 [85.7%] vs 1/22 [4.5%], $p < 0.001$) y a eritromicina (5/7 [71.4%] vs 2/22 [9.1%], $p = 0.003$). Una de las cepas de SARM presentó resistencia de alto nivel a mupirocina (CMI ≥ 1024 mg/L), portando el gen *mupA*. Todas las cepas fueron sensibles a fosfomicina excepto una cepa de SARM que presentó una CMI > 64 mg/L.

La variabilidad genética fue mayor entre las cepas de SASM, en las que se identificaron nueve CCs diferentes, mientras que en las cepas de SARM sólo se identificaron tres CCs diferentes. CC5 (5/7 [71.4%]) fue el principal CC identificado entre las cepas de SARM y CC5 y CC30 fue identificado en la misma proporción entre las cepas de SASM (3/14 [21.4%]).

2.3 CORRELACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DE LAS CEPAS DE *S. aureus* CON EL PRONÓSTICO DE LOS PACIENTES

Se analizó si los factores bacterianos fenotípicos y genotípicos de las cepas de *S. aureus* podrían tener una influencia significativa en la evolución clínica de los pacientes con artritis séptica nativa (fracaso terapéutico o curación [Tabla 12]). No se observó ninguna diferencia en la disfuncionalidad de *agr* (2/7 [28.6%] en las cepas de los pacientes que experimentaron fracaso terapéutico vs 3/13 [23.1%] en las cepas de los pacientes que experimentaron curación con el tratamiento, $p = 1.000$). Tampoco se observaron diferencias en la β -hemólisis (en pacientes que experimentaron fracaso terapéutico: débil 6/7 [85.7%], fuerte 1/7 [14.3%] y negativo 0/7 [0.0%] vs en pacientes que

Resultados

experimentaron curación: débil 7 / 13 [53.8%], fuerte 5/13 [38.5%] y negativo 1/13 [7.7%], $p=0.428$). Sin embargo, observamos una menor formación de *biofilm* en las cepas de *S. aureus* de pacientes que experimentaron fracaso terapéutico (DO 595 nm, media \pm desviación estándar [DE]: 0.22 ± 0.08 vs. 0.33 ± 0.12 , $p=0.058$).

Tabla 12. Análisis comparativo de la sensibilidad a antimicrobianos y características fenotípicas y genotípicas de las cepas de *S. aureus* según la evolución clínica de la artritis nativa.

Características	Fracaso terapéutico	Curación	P
	(n=7), Nº (%)	(n=19), Nº (%)	
Resistencia antimicrobiana			
Penicilina	7 (100)	17 (89.5)	1.000
Levofloxacino	4 (57.1)	3 (15.8)	0.057
Eritromicina	3 (42.9)	4 (21.1)	0.340
Gentamicina	1 (14.3)	4 (21.1)	1.000
Mupirocina	1/7 (14.3)	0/15 (0.0)	0.318
CMI de daptomicina por Etest (mg/L)			
CMI ₅₀	0.19	0.13	-
CMI ₉₀	0.25	0.25	-
Media geométrica	0.18	0.15	0.501
CMI de vancomicina por Etest (mg/L)			
CMI ₅₀	1.00	0.75	-
CMI ₉₀	1.00	1.00	-
Media geométrica	0.88	0.75	0.145
Características fenotípicas			
<i>agr</i> disfuncional	2/7 (28.6)	3/13 (23.1)	1.000

β -hemólisis			
Negativo	0/7 (0.0)	1/13 (7.7)	
Débil	6/7 (85.7)	7/13 (53.8)	0.428
Fuerte	1/7 (14.3)	5/13 (38.5)	
Formación <i>biofilm</i> (DO 595 nm, media \pm DE)	0.22 \pm 0.08	0.33 \pm 0.12	0.058

Genotipo de resistencia y virulencia

Complejo clonal (CC)

CC5	3/7 (42.9)	5/13 (38.5)	
CC8	0/7 (0.0)	2/13 (15.4)	
CC22	1/7 (14.3)	2/13 (15.4)	0.837
CC30	2/7 (28.6)	1/13 (7.7)	
Otros	1/7 (14.3)	3/13 (23.1)	

Grupo de *agr*

<i>agrI</i>	2/7 (28.6)	5/13 (38.5)	
<i>agrII</i>	3/7 (42.9)	6/13 (46.2)	0.784
<i>agrIII</i>	2/7 (28.6)	1/13 (7.7)	
<i>agrIV</i>	0/7 (0.0)	1/13 (7.7)	
<i>blaZ</i> (betalactamase)	7/7 (100.0)	11/13 (84.6)	0.521
<i>erm(C)</i> (erythromycin ribosome methylation protein C)	1/7 (14.3)	0/13 (0.0)	0.350
<i>aadD</i> (aminoglycoside adenytransferase)	3/7 (42.9)	1/13 (7.7)	0.101
<i>qacC</i> (quaternary ammonium compound)	1/7 (14.3)	0/13 (0.0)	0.350
<i>tst1</i> (toxic shock syndrome toxin 1)	0/7 (0.0)	2/13 (15.4)	0.521

Resultados

PVL (Panton Valentine leukocidin)	0/7 (0.0)	1/13 (7.7)	1.000
<i>seg</i> (enterotoxin G)	6/7 (85.7)	10/13 (76.9)	1.000
<i>seo</i> (enterotoxin O)	6/7 (85.7)	9/13 (69.2)	0.613
<i>seu</i> (enterotoxin U)	6/7 (85.7)	10/13 (76.9)	1.000
β -hemolisina con inserción de fago	7/7 (100.0)	12/13 (92.3)	1.000
<i>sea</i> (enterotoxin A)	2/7 (28.6)	1/13 (7.7)	0.270
<i>sak</i> (staphylokinase)	7/7 (100.0)	11/13 (84.6)	0.521
<i>chp</i> (chemotaxis-inhibiting protein)	6/7 (85.7)	11/13 (84.6)	1.000
<i>scn</i> (staphylococcal complement inhibitor)	7/7 (100.0)	12/13 (92.3)	1.000
<i>splA</i> (serine protease A)	4/7 (57.1)	10/13 (76.9)	0.613
<i>splB</i> (serine protease B)	4/7 (57.1)	10/13 (76.9)	0.613
<i>cna</i> (collagen adhesin)	3/7 (42.9)	4/13 (30.8)	0.651
<i>fnbB</i> (fibronectin-binding protein B)	4/7 (57.1)	11/13 (84.6)	0.290

Abreviaturas: CC, complejo clonal; CMI, concentración mínima inhibitoria; DE, desviación estándar; DO; densidad óptica; SARM, *S. aureus* resistente a meticilina; SASM, *S. aureus* sensible a meticilina.

BLOQUE II: INFECCIÓN PROTÉSICA
ARTICULAR PRODUCIDA POR
Staphylococcus aureus

Resultados

ESTUDIO RETROSPECTIVO DE INFECCIÓN PROTÉSICA ARTICULAR PRODUCIDA POR *S. aureus* RESISTENTE A METICILINA

1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA COHORTE Y ANÁLISIS COMPARATIVO SEGÚN LA EVOLUCIÓN CLÍNICA DE LOS PACIENTES

De las 56 IPAs causadas por *S. aureus* que se identificaron en el Hospital Universitario 12 de Octubre desde el año 2005 hasta el año 2015, dieciocho (18/56 [32.1%]) fueron causadas por SARM. Las características clínicas de estos dieciocho casos de IPA se muestran en la Tabla 13. La mitad de los casos (9/18 [50.0%]) fueron varones, la edad media de todos los pacientes fue de 71.8 ± 12.3 años y la diabetes mellitus fue la comorbilidad más frecuentemente observada (6/18 [33.3%]). Se observaron 12 IPAs con presentación clínica aguda (12/18 [66.7%]) y 6 con presentación crónica (6/18 [33.3%]). En cuanto al tratamiento quirúrgico, 14 pacientes (14/18 [77.8%]) fueron sometidos a DAIR y 4 pacientes (4/18 [22.2%]) a explante protésico. La mediana de seguimiento de los pacientes fue de 688 días. Se observó fracaso terapéutico en diez pacientes (10/18 [55.6%]), los cuales mostraron una tendencia no significativa a tener insuficiencia renal crónica, a presentar una IPA crónica, niveles más altos de proteína C reactiva y un mayor retraso para someterse a desbridamiento quirúrgico (Tabla 13). Las razones del fracaso al tratamiento fueron: muerte relacionada con la infección (2/10), necesidad de más desbridamientos o de explante protésico en pacientes tratados inicialmente con DAIR (4/10), imposibilidad de sustitución del implante ortopédico en pacientes tratados con explante protésico (2/10), y signos persistentes de infección en el último seguimiento (2/10). Se documentó evidencia microbiológica de persistencia/recidiva de SARM en

Resultados

cuatro pacientes. La mediana de tiempo desde el desbridamiento hasta el fracaso terapéutico en los pacientes tratados por DAIR fue de 108 días. La comparación de las características clínicas entre los episodios de IPA que curaron y fracasaron terapéuticamente no mostró diferencias significativas (Tabla 13).

Tabla 13. Características clínicas de los pacientes con infección protésica articular causada por *S. aureus* resistente a meticilina.

Características	Total casos (n=18), N° (%)	Fracaso terapéutico (n=10), N° (%)	Curación (n=8), N° (%)	P
Características basales				
Sexo (varón)	9 (50.0)	5 (50.0)	4 (50.0)	1.000
Edad (años, media ± DE)	71.8 ± 12.3	74.0 ± 9.6	69.0 ± 15.3	0.407
Diabetes mellitus	6 (33.3)	4 (40.0)	2 (25.0)	0.638
Insuficiencia renal crónica	4 (22.2)	4 (40.0)	0 (0.0)	0.092
Artritis reumatoide	1 (5.6)	0 (0.0)	1 (12.5)	0.444
Cáncer	1 (5.6)	1 (10.0)	0 (0.0)	1.000
Cirrosis	3 (16.7)	2 (20.0)	1 (12.5)	1.000
Enfermedad pulmonar crónica	4 (22.2)	3 (30.0)	1 (12.5)	0.588
Enfermedad cardíaca crónica	3 (16.7)	1 (10.0)	2 (25.0)	0.559
Terapia inmunosupresora	3 (16.7)	1 (10.0)	2 (25.0)	0.559
Localización de la prótesis (rodilla) ^a	6 (33.3)	4 (40.0)	2 (25.0)	0.638
Prótesis de revisión	7 (38.9)	4 (40.0)	3 (37.5)	1.000
Presentación clínica				
Tipo de infección				

Resultados

Aguda	12 (66.7)	5 (50.0)	7 (87.5)	0.152
Crónica	6 (33.3)	5 (50.0)	1 (12.5)	
Infección polimicrobiana ^b	4 (22.2)	1 (10.0)	3 (37.5)	0.275
Bacteriemia	5 (27.8)	2 (20.0)	3 (37.5)	0.608
Fiebre >37°C	9/17 (52.9)	4/9 (44.4)	5/8 (62.5)	0.637
Dolor articular	13/16 (81.3)	7/9 (77.8)	6/7 (85.7)	1.000
Fístula	7 (38.9)	5 (50.0)	2 (25.0)	0.367
Supuración	11/17 (64.7)	6/9 (66.7)	5/8 (62.5)	1.000
Leucocitos (x10 ⁹ /L, media ± DE) ^c	11.8 ± 6.2	12.9 ± 6.9	10.6 ± 5.7	0.489
Proteína C reactiva (mg/L, media ± DE) ^c	143.3 ± 106.5	174.2 ± 108.7	66.0 ± 63.6	0.190

Tratamiento quirúrgico

DAIR	14 (77.8)	7 (70.0)	7 (87.5)	0.588
Tiempo hasta desbridamiento (días, mediana [RIQ])	15 (9-25)	15 (15-35)	12 (3-19)	0.165
Recambio del polietileno	1/14 (7.1)	1/7 (14.3)	0/7 (0.0)	1.000
Necesidad de ≥2 desbridamientos	0/14 (0.0)	0/7 (0.0)	0/7 (0.0)	-
Uso de rifampicina (días, media ± DE)	9.1 ± 24.5	2.4 ± 4.9	15.9 ± 34	0.620
Explante protésico	4 (22.2)	3 (30.0)	1 (12.5)	0.588
Uso de espaciador con antibiótico	1/4 (25.0)	0/3 (0.0)	1/1 (100.0)	0.250

Abreviaturas: DAIR, desbridamiento, antibioterapia y retención del implante; DE, desviación estándar; RIQ, rango intercuartílico.

^a Hubo 6 prótesis de rodilla y 12 de cadera (5 hemiartroplastias y 7 reemplazos totales de cadera).

^b Otros microorganismos: *Escherichia coli* (3 casos), *Pseudomonas aeruginosa* (1 caso), *Enterococcus faecalis* (1 caso) y *Morganella morganii* (1 caso).

^c Datos obtenidos en el diagnóstico, antes del tratamiento quirúrgico (desbridamiento o explante protésico).

2. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DE LAS CEPAS DE *S. aureus* Y ANÁLISIS COMPARATIVO SEGÚN LA EVOLUCIÓN CLÍNICA DE LOS PACIENTES

El patrón de sensibilidad a los antibióticos y las características fenotípicas y genotípicas de las cepas de SARM se muestran en la Tabla 14. Todas las cepas de SARM (18/18 [100.0%]) fueron sensibles a cotrimoxazol, vancomicina, teicoplanina, daptomicina, linezolid y dalbavancina. Todas las cepas fueron resistentes a fluoroquinolonas y una cepa presentó resistencia de alto nivel a mupirocina (CMI ≥ 1024 mg/L), portando el gen *mupA*. Se observó una cepa (1/18 [5.6%]) con CMI elevada a vancomicina (1.5 mg/L). Diez cepas de SARM (10/18 [55.6%]) mostraron un *agr* disfuncional, una cepa (1/18 [5.6%]) una funcionalidad débil y 7 cepas (7/18 [38.9%]) una funcionalidad fuerte. Trece cepas (13/18 [72.2%]) mostraron β -hemólisis en agar sangre, siendo β -hemólisis fuerte en 4 de ellas. Ninguna cepa presentó halo turbio de hemólisis rodeando a las colonias en agar sangre por expresión de la β -hemolisina (Hlb). Todas las cepas de *S. aureus* presentaron un fenotipo salvaje y todas fueron capaces de formar *biofilm* en condiciones estáticas.

Tabla 14. Sensibilidad a antimicrobianos y características fenotípicas y genotípicas de las cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina causantes de infección protésica articular.

Características	Total casos (n=18), N° (%)	Fracaso terapéutico (n= 10), N° (%)	Curación (n= 8), N° (%)	P
Resistencia antimicrobiana				
Fluoroquinolonas	18 (100.0)	10 (100.0)	8 (100.0)	-
Eritromicina	13 (72.2)	6 (60.0)	7 (87.5)	0.314
Clindamicina	5 (27.8)	2 (20.0)	3 (37.5)	0.608
Gentamicina	5 (27.8)	1 (10.0)	4 (50.0)	0.118
Fosfomicina	2 (11.1)	1 (10.0)	1(12.5)	1.000
Rifampicina	2 (11.1)	2 (20.0)	0 (0.0)	0.477
Mupirocina	1 (5.6)	0 (0.0)	1 (12.5)	0.183
Ácido fusídico	1 (5.6)	1 (10.0)	0 (0.0)	1.000
CMI de daptomicina (mg/L)				
CMI ₅₀	0.38	0.38	0.38	-
CMI ₉₀	0.75	0.75	0.75	-
Media geométrica	0.50	0.51	0.48	0.692
CMI de vancomicina (mg/L)				
CMI ₅₀	0.75	1.00	0.75	-
CMI ₉₀	1.00	1.00	1.00	-
Media geométrica	0.85	0.89	0.79	0.319
CMI de dalbavancina (mg/L)				

Resultados

CMI ₅₀	0.06	0.06	0.06	-
CMI ₉₀	0.09	0.09	0.09	-
Media geométrica	0.07	0.07	0.07	0.937
Características fenotípicas				
<i>agr</i> disfuncional	10 (55.6)	4 (40.0)	6 (75.0)	0.188
β-hemólisis				
Negativo	5 (27.8)	4 (40.0)	1 (12.5)	
Débil	9 (50.0)	5 (50.0)	4 (50.0)	0.319
Fuerte	4 (22.2)	1 (10.0)	3 (37.5)	
Formación <i>biofilm</i> (DO 595 nm, media±DE)	0.32 ± 0.16	0.35 ± 0.17	0.27 ± 0.15	0.203
Genotipo de resistencia y de virulencia				
<i>blaZ</i> (betalactamase)	14 (77.8)	7 (70.0)	7 (87.5)	0.588
<i>erm(C)</i> (rRNA methyltransferase)	4 (22.2)	2 (20.0)	2 (25.0)	1.000
<i>aadD</i> (aminoglycoside adenylytransferase)	15 (83.3)	9 (90.0)	6 (75.0)	0.559
<i>qacC</i> (quaternary ammonium compound)	4 (22.2)	2 (20.0)	2 (25.0)	1.000
β-hemolisina con inserción de fago	11 (61.1)	8 (80.0)	3 (37.5)	0.145
<i>sea</i> (enterotoxin A)	1 (5.6)	0 (0.0)	1 (12.5)	0.444
<i>sak</i> (staphylokinase)	11 (61.1)	8 (80.0)	3 (37.5)	0.145
<i>chp</i> (chemotaxis-inhibiting protein)	10 (55.6)	8 (80.0)	2 (25.0)	0.054
<i>scn</i> (staphylococcal complement inhibitor)	11 (61.1)	8 (80.0)	3 (37.5)	0.145
<i>fnbB</i> (fibronectin-binding protein B)	17 (94.4)	10 (100.0)	7 (87.5)	0.444

Abreviaturas: CMI, concentración mínima inhibitoria; DE, desviación estándar; DO; densidad óptica.

El análisis de PFGE (Figura 41) mostró dos patrones electroforéticos diferentes, correspondientes a dos MLSTs: ST125 (17 cepas) y ST228 (1 cepa). Ambos MLSTs (todas las cepas) pertenecieron al complejo clonal 5 (CC5). Todas las cepas mostraron *agr* tipo II y fueron positivas para el gen *mecA*. Ninguna cepa fue positiva para los genes que codificaban para la *tst1*, las toxinas exfoliativas (*etA*, *etB* y *etD*) y la LPV. Por el contrario, todas las cepas presentaron las proteasas de serina *splA* y *splB*, el *cluster egc* de genes de enterotoxinas (*seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo* y *seu*) y el gen de la α -hemolisina (*hla*). Once cepas (11/18 [61.1%]) portaban el gen de la β -hemolisina (*hly*) truncado debido a la inserción de un fago y todas fueron positivas para los genes de evasión del sistema inmune transmitidos por fagos (*sak*, *scn* y *chp*); con la excepción de una cepa que fue negativa para el gen *chp*. Los genes que participan en la formación de *biofilm* *icaA*, *icaC* e *icaD* se detectaron en todas las cepas, mientras que otro gen también implicado en la formación de *biofilm*, *bap*, siempre estuvo ausente. El gen de la cápsula tipo 5 (*cap5*) siempre estuvo presente. Todas las cepas fueron positivas para todos los genes MSCRAMMs (*bbp*, *clfA*, *clfB*, *ebh*, *ebpS*, *eno*, *fib*, *fnbA*, *map*, *sasG*, *sdrC*, *sdrD* y *vwbp*) con la excepción del gen que codifica para la proteína de unión a colágeno (*cna*) que estuvo ausente en todas las cepas. La comparación de las características microbiológicas, fenotípicas y genotípicas, de las cepas de SARM entre episodios que cursaron con fracaso terapéutico de la IPA respecto a las cepas de los pacientes que curaron no mostró diferencias significativas (Tabla 14). Sin embargo, se observó una tendencia hacia una mayor frecuencia de los genes transmitidos por fagos (*chp*, *sak* y *scn*) en las cepas causantes de IPAs que fracasaron terapéuticamente, sobre todo en el caso del gen que codifica para la proteína inhibidora de la quimiotaxis (*chp*) (8/10 [80.0%] vs 2/8 [25.0%], $p=0.054$). Todas las cepas con un *agr* funcional presentaron el fago, mientras que en las cepas con un *agr* disfuncional el fago estuvo poco presente (8/8 [100.0%] vs 3/10 [30.0%], $p=0.004$).

Resultados

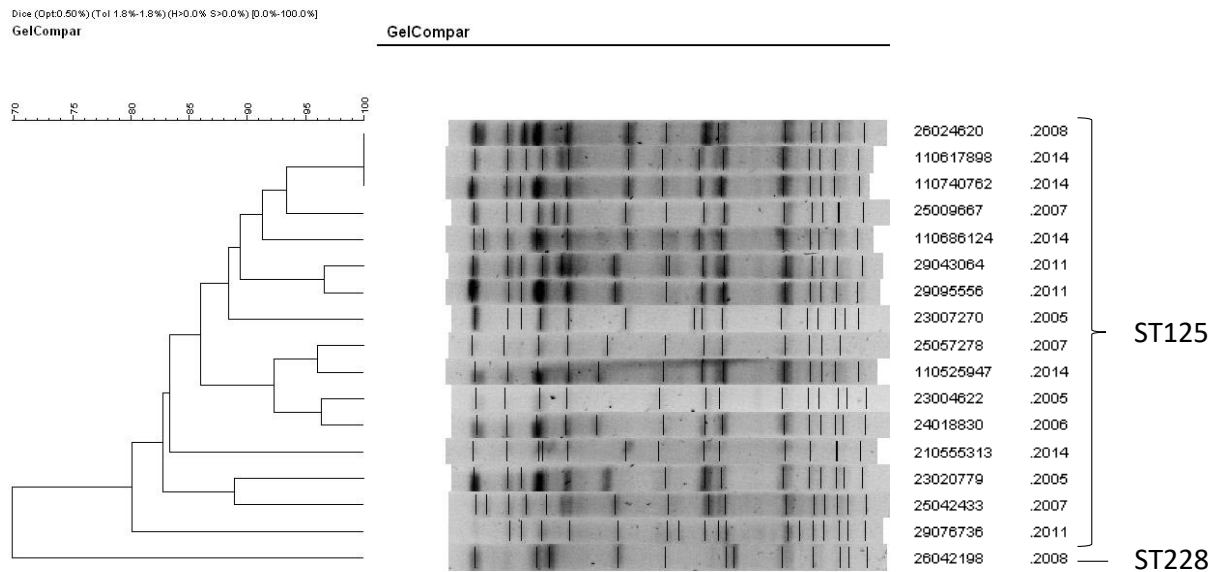


Figura 41. Electroforesis en gel en campo pulsante de 17 de las 18 cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina pertenecientes al complejo clonal 5 causantes de infección protésica articular junto con el año de aislamiento de cada cepa y el MLST al que pertenecen.

3. SENSIBILIDAD AL PÉPTIDO DE NEUTRÓFILO HUMANO 1 Y VIRULENCIA EN EL MODELO IN VIVO DE *Galleria mellonella*

Para profundizar en la tendencia observada de que existe una mayor frecuencia de los genes transmitidos por fagos (*chp*, *sak* y *scn*) en las cepas causantes de IPAs que fracasaron terapéuticamente, se seleccionaron 4 cepas del estudio con diferente evolución clínica y con presencia y ausencia del fago (Tabla 15). Todas las cepas correspondían a casos de IPAs postquirúrgicas precoces, de prótesis primaria, monomicrobianas y tratadas con DAIR. En estas cepas se estudió su sensibilidad a péptidos producidos por los neutrófilos (péptido de neutrófilo humano 1 [α -defensina-1]) y su virulencia en el modelo in vivo de *G. mellonella*.

Tabla 15. Características principales de las cepas seleccionadas de *S. aureus* causantes de IPA, resistentes a meticilina y pertenecientes al complejo clonal 5 (CC5); junto con la sensibilidad de las cepas al péptido de neutrófilo humano 1 (α -defensina-1) y el tiempo de supervivencia de las larvas de *G. mellonella* a las cepas de *S. aureus*.

Cepa <i>S. aureus</i>	β hemólisis	Funcionalidad de <i>agr</i>	MLST	β -hemolisina con inserción de fago ^a	Evolución clínica	Supervivencia a α -defensina-1 (% media ^b \pm DE)	Supervivencia de <i>Galleria mellonella</i> (horas media ^b \pm DE)
26024620	Fuerte	Negativa	ST125	Ausente	Fracaso	54.0 \pm 18.3	54.9 \pm 4.7
29095556	Débil	Positiva	ST125	Presente	Fracaso	61.3 \pm 9.3	53.3 \pm 5.0
21055531	Fuerte	Negativa	ST125	Ausente	Curación	77.7 \pm 0.6	45.3 \pm 4.7
26042198	Negativa	Negativa	ST228	Presente	Curación	63.5 \pm 12.0	102.4 \pm 4.8

Abreviatura: DE, desviación estándar.

^a Todas las cepas presentaron los genes transmitidos por fago *sak*, *chp* y *scn* excepto la cepa 26042198, que presentó los genes *scn*, *sak* y *sea* pero no el gen *chp*.

^b Media de los tres experimentos de sensibilidad a la α -defensina-1 y de virulencia en el modelo de *G. mellonella*, respectivamente.

La supervivencia de las cepas de *S. aureus* al péptido de neutrófilo humano 1 (α -defensina-1) fue parecida en todas las cepas (Tabla 15), independientemente de la presencia o ausencia del fago (62.4 \pm 1.6 vs 65.9 \pm 16.8, $p=1.000$) y de la evolución clínica de la IPA (curación vs fracaso: 70.6 \pm 10.0 vs 57.7 \pm 5.2, $p=0.333$). La supervivencia de las larvas de *G. mellonella* a las cepas de *S. aureus* (Tabla 15) también fue independiente de la presencia o ausencia del fago (77.9 \pm 34.7 vs 50.1 \pm 6.8, $p=0.667$) y de la evolución clínica de la IPA (curación vs fracaso: 73.9 \pm 40.4 vs 54.1 \pm 1.1, $p=1.000$). Con la única cepa de *S. aureus* perteneciente al ST228 (260421998) las larvas de *G. mellonella* mostraron un tiempo de supervivencia significativamente mayor que con las otras tres cepas pertenecientes al ST125 ($p<0.001$), entre las que no se observaron diferencias en el tiempo de supervivencia de las larvas (Figura 42).

Resultados

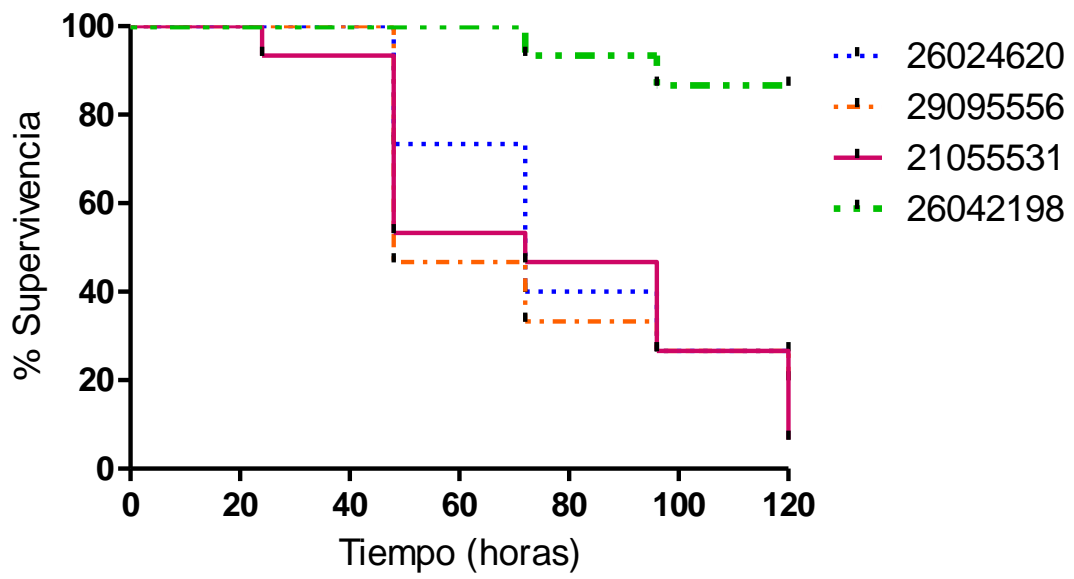


Figura 42. Curva de supervivencia de las larvas de *G. mellonella* a las cepas de *S. aureus*.

ESTUDIO PROSPECTIVO MULTICÉNTRICO DE INFECCIÓN PROTÉSICA ARTICULAR EN LA COMUNIDAD DE MADRID (ESTUDIO PISA)

1. DESCRIPCIÓN CLÍNICA Y MICROBIOLÓGICA DE LA COHORTE

El porcentaje de IPAs causadas por *S. aureus* en todos los hospitales participantes en el estudio fue de 24.3%. Inicialmente se recogieron 97 casos de IPA producida por *S. aureus* entre todos los hospitales, pero se excluyeron 9 casos por falta de información clínica. Por tanto, finalmente se incluyeron en el estudio a 88 pacientes. Cuarenta y cinco tenían IPP (45/88 [51.1%]), 21 eran IPCs (21/88 [23.9%]) y 19/88 IHs (21.6%); además, dos pacientes (2/88 [2.3%]) tuvieron una infección como resultado de la diseminación contigua de un foco supurativo y un paciente (1/88 [1.1%]) presentó una infección de tipo “cultivos intraoperatorios positivos”.

Las características clínicas y microbiológicas (fenotípicas y genotípicas) se muestran en detalle en la Tabla 16. Veinte cepas de *S. aureus* (20/88 [22.7%]) fueron resistentes a meticilina (SARM) y todas portaron el gen *mecA*. Todas las cepas de *S. aureus* fueron sensibles a cotrimoxazol, teicoplanina, linezolid, vancomicina (CMI \leq 2.0 mg/L) y daptomicina (CMI \leq 0.75 mg/L). Once cepas (11/88 [12.5%]) mostraron CMI \geq 1.5 mg/L a vancomicina, si bien ninguna presentó un fenotipo h-VISA. Sólo una cepa mostró resistencia a ácido fusídico (1/88 [1.1%]) y 6/88 (6.8%) a mupirocina, todas ellas con el gen *mupA*. Cincuenta y ocho cepas presentaron un *agr* funcional (58/88 [65.9%]). La mayoría de las cepas mostraron β -hemólisis (77/88 [87.5%]) (49 cepas una β -hemólisis débil y 28 fuerte) y formaron *biofilm* (84/88 [95.5%]). Dos cepas (2/88 [2.3%]) presentaron halos turbios de hemólisis rodeando a las colonias en agar sangre por

Resultados

expresión de la β -hemolisina (Hlb) y 7/88 cepas (8.0%) presentaron tanto β -hemólisis como halos turbios de hemólisis. En cuanto a la formación de *biofilm*, 58/88 cepas (65.9%) formaron *biofilm* débilmente, 18/88 (20.5%) moderadamente y 8/88 (9.1%) fuertemente. Cuatro cepas de *S. aureus* mostraron fenotipos poco comunes en agar sangre: tres eran SCV y una presentó un fenotipo mucoso.

El análisis de epidemiología molecular mostró que los aislados de *S. aureus* pertenecían a 16 complejos clonales (CC) diferentes, siendo CC5 el más frecuente (27/88 [30.7%]) (Tabla 16). Los genes pertenecientes al *cluster* de genes de enterotoxinas *egc* (*seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo* y *seu*) estuvieron ampliamente representados, siendo *sem* la mayoritaria (67/88 [76.1%]). Once cepas (11/88 [12.5%]) fueron positivas para la *tst1* y 75 cepas (75/88 [85.2%]) portaron un gen *hly* truncado debido a la inserción de un fago con genes pertenecientes al *cluster* de evasión inmune (*sak*, *chp* y *scn*). Las cepas con un *agr* funcional presentaron con mayor frecuencia este fago que las que tuvieron un *agr* disfuncional (56/58 [96.6%] vs 19/30 [63.3%], $p < 0,001$). Todas las cepas portaron los genes implicados en la formación de *biofilm* *icaA*, *icaC*, *icaD*; mientras que la proteína de superficie también implicada en la formación de biopelículas *bap* siempre estuvo ausente. Todos los aislamientos fueron positivos para genes que codifican para MSCRAMMs: *clfA*, *clfB*, *ebpS* (proteína de unión a la elastina de la superficie celular), *eno* (enolasa), *map* (proteína análoga al complejo mayor de histocompatibilidad de clase II), *sdrC* (proteína de unión a fibrinógeno) y *vwbp* (proteína de unión al factor de von Willebrand). El gen *cna* estuvo representada en la mitad de las cepas (44/88 [50.0%]). Una cepa (1/88 [1,1%]) fue positiva para *etA* (toxina exfoliativa de serotipo A) y ningún aislado fue positivo para el gen que codifica la LPV. De interés, 6/88 casos (6.8%) con infección por *S. aureus* pertenecieron al complejo clonal CC398. Todos ellos fueron sensibles a la meticilina excepto uno, que portó los genes de resistencia a la tetraciclina *tet (K)* y *tet (M)*, como otra cepa CC398 sensible a la meticilina. Todas las cepas del complejo clonal CC398 portaron el gen *hly* truncado debido a la inserción de fagos, excepto las dos que tenían los genes de resistencia a tetraciclina.

Tabla 16. Descripción clínica y microbiológica de la cohorte y análisis comparativo según la sensibilidad a metilina y la presentación clínica de la infección protésica articular.

	Total casos (n=88) Nº (%)	SARM (n=20) Nº (%)	SASM (n=68) Nº (%)	<i>P</i>	Hematógena (IH) (n=19) ^a Nº (%)	Postquirúrgica <90 días (IPP) (n=45) ^a Nº (%)	Postquirúrgica >90 días (IPC) (n=21) ^a Nº (%)	<i>P</i> (IH vs IPP)	<i>P</i> (IPP vs IPC)	<i>P</i> (IH vs IPC)
Características basales										
Sexo (varón)	35 (39.8)	8 (40.0)	27 (39.7)	0.981	8 (42.1)	15 (33.3)	11 (52.4)	0.504	0.140	0.516
Edad (años, media±DE)	74.7 ± 14.1	79.8 ± 8.8	73.2 ± 15.0	0.102	77.4 ± 13.9	74.2 ± 14.1	73.5 ± 15.3	0.293	0.962	0.307
Diabetes mellitus	16 (18.2)	5 (25.0)	11 (16.2)	0.509	4 (21.1)	8 (17.8)	3 (14.3)	0.739	1.000	0.689
Insuficiencia renal crónica	14 (15.9)	3 (15.0)	11 (16.2)	1.000	4 (21.1)	6 (13.3)	4 (19.0)	0.466	0.714	1.000
Artritis reumatoide	7 (8.0)	2 (10.0)	5 (7.4)	0.655	2 (10.5)	3 (6.)	1 (4.8)	0.629	1.000	0.596
Cáncer	7 (8.0)	2 (10.0)	5 (7.4)	0.655	2 (10.5)	1 (2.2)	3 (14.3)	0.208	0.091	1.000

Resultados

Cirrosis	2 (2.3)	0 (0.)	2 (2.9)	1.000	0 (0.0)	1 (2.2)	1 (4.8)	1.000	0.538	1.000
Enfermedad pulmonar crónica	11 (12.)	4 (20.0)	7 (10.3)	0.262	3 (15.8)	8 (17.8)	0 (0.0)	1.000	0.048*	0.098
Enfermedad cardíaca crónica	27 (30.7)	8 (40.0)	19 (27.9)	0.304	7 (36.8)	13 (28.9)	7 (33.3)	0.531	0.714	0.816
Terapia inmunosupresora	12 (13.6)	2 (10.0)	10 (14.7)	0.726	5 (26.3)	5 (11.1)	0 (0.0)	0.147	0.169	0.018*
Localización de la prótesis ^b										
Rodilla	40 (45.5)	8 (40.0)	32 (47.1)		16 (84.2)	18 (40.0)	4 (19.0)			
Cadera	46 (52.3)	12 (60.0)	34 (50.0)	0.769	3 (15.8)	26 (57.8)	16 (76.2)	0.003*	0.211	<0.001*
Otra	2 (2.3)	0 (0.0)	2 (2.9)		0 (0.0)	1 (2.2)	1 (4.8)			
Prótesis de revisión	22 (25.0)	4 (20.0)	18 (26.5)	0.770	5 (26.3)	9 (20.0)	7 (33.3)	0.742	0.355	0.736

Presentación clínica

Tipo de infección

Resultados

Hematógena	19 (21.6)	2 (10.0)	17 (25.0)		-	-	-			
Postquirúrgica <90 días	45 (51.1)	9 (45.0)	36 (52.9)		-	-	-			
Postquirúrgica >90 días	21 (23.9)	7 (35.0)	14 (20.6)	0.097	-	-	-	-	-	-
Cultivo intraoperatorio positivo	1 (1.1)	1 (5.0)	0 (0.0)		-	-	-			
Foco contiguo	2 (2.3)	1 (5.0)	1 (1.5)		-	-	-			
Infección polimicrobiana	14 (15.9)	3 (15.0)	11 (16.2)	1.000	0 (0.0)	8 (17.8)	6 (28.6)	0.093	0.346	0.021*
Bacteriemia	18 (20.5)	3 (15.0)	15 (22.1)	0.753	9 (47.4)	6 (13.3)	2 (9.5)	0.008*	1.000	0.007*
Fiebre>37°C	31 (35.2)	6 (30.0)	25 (36.8)	0.578	11 (57.9)	16 (35.6)	3 (14.3)	0.098	0.075	0.004*
Dolor articular	73 (83.0)	18 (90.0)	55 (80.9)	0.504	18 (94.7)	36 (80.0)	16 (76.2)	0.258	0.753	0.186
Fístula	24 (27.3)	8 (40.0)	16 (23.5)	0.146	0 (0.0)	7 (15.6)	16 (76.2)	0.094	<0.001*	<0.001*
Supuración	35 (39.8)	7 (35.0)	28 (41.2)	0.620	0 (0.0)	29 (64.4)	6 (28.6)	<0.001*	0.007*	0.021*

Resultados

Leucocitos (x10 ⁹ /L, (media±DE) ^c	10.3 ± 6.3	7.6 ± 6.8	11.1 ± 5.9	0.010*	11.4 ± 7.6	10.4 ± 5.4	9.0 ± 6.5	0.397	0.247	0.124
---	------------	-----------	------------	--------	------------	------------	-----------	-------	-------	-------

Proteína C reactiva (mg/L, media±DE) ^c	140.4 ± 128.9	121.4 ± 127.1	145.8 ± 129.9	0.367	244.8 ± 130.1	128.5 ± 122.3	75.0 ± 89.4	0.002*	0.096	<0.001*
--	------------------	------------------	------------------	-------	---------------	---------------	-------------	--------	-------	---------

Tratamiento quirúrgico

DAIR	58 (65.9)	9 (45.0)	49 (72.1)	0.025*	16 (84.2)	33 (73.3)	8 (38.1)	0.521	0.006*	0.003*
------	-----------	----------	-----------	--------	-----------	-----------	----------	-------	--------	--------

Resistencia antimicrobiana

Penicilina	78 (88.6)	20 (100)	58 (85.3)	0.108	13 (68.4)	43 (95.6)	19 (90.5)	0.007*	0.587	0.120
------------	-----------	----------	-----------	-------	-----------	-----------	-----------	--------	-------	-------

Meticilina	20 (22.7)	-	-	-	2 (10.5)	9 (20.0)	7 (33.3)	0.483	0.239	0.133
------------	-----------	---	---	---	----------	----------	----------	-------	-------	-------

Levofloxacino	21 (23.9)	17 (85.0)	4 (5.9)	<0.001*	3 (15.8)	9 (20.0)	8 (38.1)	1.000	0.117	0.115
---------------	-----------	-----------	---------	---------	----------	----------	----------	-------	-------	-------

Eritromicina	33 (37.5)	15 (75.0)	18 (26.5)	<0.001*	5 (26.3)	20 (44.4)	6 (28.6)	0.174	0.219	0.873
--------------	-----------	-----------	-----------	---------	----------	-----------	----------	-------	-------	-------

Clindamicina	18 (20.5)	5 (25.0)	13 (19.1)	0.544	4 (21.1)	10 (22.2)	3 (14.3)	1.000	0.526	0.689
--------------	-----------	----------	-----------	-------	----------	-----------	----------	-------	-------	-------

Gentamicina	12 (13.6)	4 (20.0)	8 (11.8)	0.457	1 (5.3)	8 (17.8)	3 (14.3)	0.260	1.000	0.607
-------------	-----------	----------	----------	-------	---------	----------	----------	-------	-------	-------

Resultados

Fosfomicina	3 (3.4)	3 (15.0)	0 (0.0)	0.010*	1 (5.3)	1 (2.2)	1 (4.8)	0.509	0.538	1.000
Rifampina	3 (3.4)	1 (5.0)	2 (2.9)	0.543	0 (0.0)	1 (2.2)	2 (9.5)	1.000	0.236	0.488
Mupirocina	6 (6.8)	5 (25.0)	1 (1.5)	0.002*	1 (5.3)	1 (2.2)	3 (14.3)	0.509	0.091	0.607
CMI de daptomicina por										
Etest (mg/L)										
CMI ₅₀	0.19	0.19	0.13	-	0.13	0.13	0.19	-	-	-
CMI ₉₀	0.38	0.38	0.38	-	0.38	0.25	0.38	-	-	-
Media geométrica	0.16	0.19	0.16	0.266	0.16	0.15	0.18	0.597	0.285	0.545
CMI de vancomicina por										
Etest (mg/L)										
CMI ₅₀	1.00	1.00	1.00	-	1.00	1.00	1.00	-	-	-
CMI ₉₀	1.50	1.50	1.00	-	1.50	1.00	1.50	-	-	-
Media geométrica	0.90	1.09	0.85	0.002*	0.87	0.87	1.01	0.682	0.051*	0.152

Resultados

Vancomicina CMI \geq 1.5

mg/L

11 (12.5) 6 (30.0) 5 (7.4) 0.015* 2 (10.5) 1 (2.2) 7 (33.3) 0.208 0.001* 0.133

Características fenotípicas

Funcionalidad de *agr*

Negativo

30 (34.1) 6 (30.0) 24 (35.3) | 6 (31.6) 13 (28.9) 9 (42.9)

Débil

24 (27.3) 4 (20.0) 20 (29.4) | 0.474 10 (52.6) 7 (15.6) 6 (28.6) | 0.003* 0.117 0.335

Fuerte

34 (38.6) 10 (50.0) 24 (35.3) | 3 (15.8) 25 (55.6) 6 (28.6)

β -hemólisis

77 (87.5) 20 (100.0) 57 (83.8) | 0.063 15 (78.9) 42 (93.3) 17 (81.0) | 0.182 0.196 1.000

Formación de *biofilm* (DO

595 nm, media \pm DE)

0.12 \pm 0.11 0.18 \pm 0.17 0.11 \pm 0.07 | 0.001* 0.09 \pm 0.04 0.13 \pm 0.14 0.13 \pm 0.07 | 0.150 0.117 0.008*

Epidemiología molecular

Complejo clonal (CC)

CC5

27 (30.7) 17 (85.0) 10 (14.7) | 2 (10.5) 15 (33.3) 8 (38.1)

Resultados

CC15	7 (8.0)	0 (0.0)	7 (10.3)		1 (5.3)	4 (8.9)	2 (9.5)			
CC30	13 (14.8)	0 (0.0)	13 (19.1)		3 (15.8)	5 (11.1)	5 (23.8)			
CC45	12 (13.6)	1 (5.0)	11 (16.2)		2 (10.5)	8 (17.8)	2 (9.5)			
Otro ^d	29 (33.0)	2 (10.0)	27 (39.7)	<0.001*	11 (57.9)	13 (28.9)	4 (19.0)	0.162	0.605	0.088
Grupo de <i>agr</i>										
<i>agr I</i>	26 (29.5)	2 (10.0)	24 (35.3)		8 (42.1)	13 (28.9)	4 (19.0)			
<i>agr II</i>	35 (39.8)	17 (85.0)	18 (26.5)	<0.001*	5 (26.3)	18 (40.0)	10 (47.6)	0.495	0.685	0.225
<i>agr III</i>	27 (30.7)	1 (5.0)	26 (38.2)		6 (31.6)	14 (31.1)	7 (33.3)			
Genotipo de resistencia										
<i>mecA</i> (penicillin binding protein 2a)	20 (22.7)	20 (100.0)	0 (0.0)	<0.001*	2 (10.5)	9 (20.0)	7 (33.3)	0.483	0.239	0.133
<i>blaZ</i> (betalactamase)	74 (84.1)	16 (80.0)	58 (85.3)	0.728	14 (73.7)	42 (93.3)	15 (71.4)	0.044*	0.024*	0.873
<i>erm(C)</i> (rRNA methyltransferase)	5 (5.7)	4 (20.0)	1 (1.5)	0.009*	0 (0.0)	2 (4.4)	2 (9.5)	1.000	0.587	0.488

Resultados

<i>aadD</i> (aminoglycoside adenyltransferase)	12 (13.6)	11 (55.0)	1 (1.5)	<0.001*	0 (0.0)	5 (11.1)	6 (28.6)	0.310	0.090	0.021*
<i>dfrS1</i> (dihydrofolate reductase mediating trimethoprim resistance)	3 (3.4)	3 (15.0)	0 (0.0)	0.010*	0 (0.0)	1 (2.2)	2 (9.5)	1.000	0.236	0.488
<i>mupA</i> (isoleucyl-tRNA synthetase)	6 (6.8)	5 (25.0)	1 (1.5)	0.002*	1 (5.3)	1 (2.2)	3 (14.3)	0.509	0.091	0.607
<i>tetK</i> (tetracycline efflux protein)	4 (4.5)	2 (10.0)	2 (2.9)	0.221	1 (5.3)	1 (2.2)	1 (4.8)	0.059	0.538	1.000
<i>tetM</i> (ribosomal protection protein associated with tetracycline resistance)	2 (2.3)	1 (5.0)	1 (1.5)	0.405	1 (5.3)	1 (2.2)	0 (0.0)	0.509	1.000	0.475
<i>fosB</i> (fosfomicin resistance protein B)	41 (46.6)	15 (75.0)	26 (38.2)	0.004*	7 (36.8)	18 (40.0)	14 (66.7)	0.813	0.043*	0.059*
Genotipo de virulencia										
<i>tst1</i> (toxic shock syndrome toxin-1)	11 (12.5)	1 (5.0)	10 (14.7)	0.444	3 (15.8)	4 (8.9)	2 (9.5)	0.415	1.000	0.654

Resultados

<i>seg</i> (enterotoxin G)	62 (70.5)	19 (95.0)	43 (63.2)	0.006*	11 (57.9)	30 (66.7)	18 (85.7)	0.504	.106	0.049*
<i>seo</i> (enterotoxin O)	64 (72.7)	19 (95.0)	45 (66.2)	0.011*	11 (57.9)	32 (71.1)	18 (85.7)	0.304	.197	0.049*
<i>seu</i> (enterotoxin U)	63 (71.6)	19 (95.0)	44 (64.7)	0.008*	11 (57.9)	31 (68.9)	18 (85.7)	0.398	.145	0.049*
β -hemolisina con inserción de fago	75 (85.2)	14 (70.0)	61 (89.7)	0.066	18 (94.7)	38 (84.4)	17 (81.0)	0.418	.733	0.345
<i>sea</i> (enterotoxin A)	13 (14.8)	2 (10.0)	11 (16.2)	0.724	4 (21.1)	4 (8.9)	5 (23.8)	0.223	.130	1.000
<i>sak</i> (staphylokinase)	63 (71.6)	14 (70.0)	49 (72.1)	0.858	15 (78.9)	31 (68.9)	15 (71.4)	0.414	.834	0.721
<i>chp</i> (chemotaxis-inhibiting protein)	64 (72.7)	10 (50.0)	54 (79.4)	0.009*	14 (73.7)	33 (73.3)	15 (71.4)	0.977	.871	0.873
<i>scn</i> (staphylococcal complement inhibitor)	75 (85.2)	14 (70.0)	61 (89.7)	0.066	18 (94.7)	38 (84.4)	17 (81.0)	0.418	.733	0.345
<i>spIA</i> (serinprotease A)	48 (54.5)	17 (85.0)	31 (45.6)	0.002*	10 (52.6)	24 (53.3)	12 (57.1)	0.959	.772	0.775
<i>spIB</i> (serinprotease B)	46 (52.3)	17 (85.0)	29 (42.6)	0.001*	8 (42.1)	24 (53.3)	12 (57.1)	0.412	.772	0.342

Resultados

<i>cap 5</i> (capsular polysaccharide 5)	46 (52.3)	19 (95.0)	27 (39.7)	<0.001*	12 (63.2)	21 (46.7)	10 (47.6)	0.228	.942	0.324
<i>cap 8</i> (capsule polysaccharide 8)	42 (47.7)	1 (5.0)	41 (60.3)	<0.001*	7 (36.8)	24 (53.3)	11 (52.4)	0.228	.942	0.324
<i>cna</i> (collagen adhesin)	44 (50.0)	3 (15.0)	41 (60.3)	<0.001*	10 (52.6)	24 (53.3)	9 (42.9)	0.959	.428	0.536
<i>fnbA</i> (fibronectin-binding protein A)	87 (98.9)	20 (100)	67 (98.5)	1.000	18 (94.7)	45 (100)	21 (100)	0.297	-	0.475
<i>fnbB</i> (fibronectin-binding protein B)	67 (76.1)	19 (95.0)	48 (70.6)	0.034*	12 (63.2)	38 (84.4)	15 (71.4)	0.096	.319	0.577

Abreviaturas: CMI, concentración mínima inhibitoria; DAIR, desbridamiento, antibioterapia y retención del implante; DE, desviación estándar; DO, densidad óptica; IH, infección hematógena; IPC, infección postquirúrgica crónica; IPP, infección postquirúrgica precoz; SARM, *S. aureus* resistente a metilina; SASM, *S. aureus* sensible a metilina.

^a Tres casos (2 infecciones causadas por un foco contiguo supurativo y un cultivo intraoperatorio positivo) fueron excluidas de esta comparación.

^b Hubo 40 prótesis de rodillas y 46 prótesis de cadera (14 hemiartroplastias y 32 reemplazamientos totales de cadera).

^c Datos obtenidos al diagnóstico, antes del tratamiento quirúrgico (sea desbridamiento o explante protésico).

^d Otros CCs (porcentaje respecto a todos los casos: n=88): 1 (1.1%) CC1, 2 (2.3%) CC6, 4 (4.5%) CC8, 2 (2.3%) CC9, 1 (1.1%) CC10, 5 (5.7%) CC22, 2 (2.3%) CC25, 1 (1.1%) CC188, 6 (6.8%) CC398, 3 (3.4%) CC509, 1 (1.1%) CC707 and 1 (1.1%) CC1021.

* Estos resultados son estadísticamente significativos.

2. ANÁLISIS COMPARATIVO SEGÚN LA SENSIBILIDAD A METICILINA

Las características clínicas de los casos de SARM y de SASM fueron similares (Tabla 16) excepto por el tipo de infección: las IPAs producidas por SARM se presentaron con mayor frecuencia como una IPA crónica. En consecuencia, las IPAs causadas por SASM fueron con mayor frecuencia agudas y tratadas con DAIR que las causadas por SARM (49/68 [72.1%] vs 9/20 [45.0%], $p=0.025$). Las infecciones por SARM mostraron menos leucocitosis que las infecciones por SASM ($7.6 \pm 6.8 \times 10^9/L$ vs $11.1 \pm 5.9 \times 10^9/L$, $p=0.010$).

Desde una perspectiva microbiológica, las cepas de SARM se distribuyeron en 4 CCs, siendo CC5 el más frecuente (17/20 [85.0%]), mientras que las cepas de SASM se distribuyeron en 16 CCs, siendo el CC30 el más frecuente (13/68 [19.1%]). Las cepas de SARM formaron más *biofilm* que las cepas de SASM (DO 595 nm 0.18 ± 0.17 vs 0.11 ± 0.07 , $p=0.001$).

Con respecto a los genes de virulencia, aquellos con una representación significativamente mayor en las cepas de SARM que en las de SASM fueron: el *cluster egc*; las leucocidinas *lukD*, *lukE* y *lukY*; las serinproteasas *splA* y *splB*; las proteínas de tipo exotoxina estafilocócica *setB2* y *setB3*; la cápsula tipo 5 (*cap5*); los MSCRAMMs *fib*, *fnbB* y *sasG* y el antígeno estafilocócico inmunodominante de superficie B (*isaB*). Por el contrario, el gen de serinproteasa *splE*, *cna* (adhesina de unión a colágeno) y *chp* (proteína inhibidora de quimiotaxis) fueron significativamente más frecuentes entre las cepas de SASM.

3. ANÁLISIS COMPARATIVO SEGÚN LA PRESENTACIÓN CLÍNICA

La IH se presentó con mayor frecuencia en pacientes inmunodeprimidos y con prótesis de rodilla, y cursó con más fiebre, bacteriemia y unos valores de proteína C reactiva más altos que las otras infecciones (Tabla 16). La diversidad clonal también fue mayor en la

Resultados

IH (19 cepas pertenecieron a 13 CCs diferentes) que en la IPP (12 CCs para 45 cepas) o en la IPC (8 CCs diferentes para 21 cepas). El complejo clonal CC5 fue menos frecuente en IH que en IPP e IPC (2/19 [10.5%], 15/45 [33.3%] y 8/21 [38.1%], respectivamente). Curiosamente, las cepas de *S. aureus* causantes de IH fueron menos resistentes a la penicilina que las cepas causantes de IPP (13/19 [68.4%] vs 43/45 [95.6%], $p=0.007$) y portaron con menor frecuencia el gen *blaZ* (14/19 [73.7%] vs 42/45 [93.3%], $p=0.044$). Hubo menos cepas causantes de IH con una fuerte funcionalidad de *agr* que entre las cepas causantes de IPP (3/19 [15.8%] vs 25/45 [55.6%], $p=0.005$).

En el subconjunto de la IH, los hemocultivos fueron negativos o positivos en 10/19 (52.6%) y 9/19 casos (47.4%), respectivamente. En general, los casos bacteriémicos y no bacteriémicos fueron similares desde una perspectiva clínica y microbiológica (Tabla 17), aunque el tiempo transcurrido desde la colocación de la prótesis hasta la infección fue menor entre los casos no bacteriémicos (1.26 [RIQ (rango intercuartílico) 0.66-7.65] años vs 7.05 [RIQ 2.91- 21.4] años, $p=0.043$), y el número de prótesis de revisión fue mayor (4/10 [40.0%] vs 1/9 [11.1%], $p>0.05$). No se observaron diferencias significativas en la funcionalidad de *agr*, aunque se observó que la formación de *biofilm* fue ligeramente mayor entre los casos no bacteriémicos (DO 595 nm 0.10 ± 0.04 vs 0.07 ± 0.01 , $p=0.133$).

En el subconjunto de pacientes con IPP, comparamos las características de los pacientes con inicio de síntomas en el primer mes después del implante protésico y aquellos con aparición de síntomas de IPA entre los 30 y 90 días tras el implante. Como se muestra en la Tabla 17, no se observaron diferencias clínicas ni microbiológicas entre los dos grupos.

En comparación con las infecciones agudas (IPP e IH), los casos de IPC ocurrieron con mayor frecuencia en prótesis de cadera, fueron menos inflamatorios y presentaron fístula con mayor frecuencia. Las cepas de *S. aureus* causantes de IPC presentaron una CMI a vancomicina más alta que las cepas causantes de IPP (media geométrica: 1.01 vs 0.87 mg/L, $p=0.051$) y portaron con menor frecuencia el gen *blaZ* (15/21 [71.4%] vs 42/45 [93.3%], $p=0.024$). Sin embargo, las cepas causantes de IPC fueron positivas con mayor frecuencia al gen *fosB* que las causantes de IPP (14/21 [66.7%] vs 18/45 [40.0%],

p=0.043) y, también las causantes de IPC portaron con mayor frecuencia el gen *aadD* que las causantes de IH (6/21 [28.6%] vs 0/19 [0.0%], p=0.021). Hubo menos cepas causantes de IPC con una fuerte funcionalidad de *agr* que entre las cepas causantes de IPP (6/21 [28.6%] vs 25/45 [55.6%], p=0.041). En las infecciones postquirúrgicas, la formación de *biofilm* fue similar, pero mayor que en las cepas que causantes de IH.

Tabla 17. Análisis comparativo de las características clínicas y microbiológicas (fenotípicas y genotípicas) entre las infecciones protésicas articulares con inicio de síntomas en los primeros 30 días tras el implante, y las infecciones protésicas articulares con inicio de síntomas entre los 30-90 días tras la cirugía; y entre la infección hematológica con hemocultivo positivo y negativo.

	Postquirúrgica <30 días (n=30), N° (%)	Postquirúrgica 30-90 días (n=15), N° (%)	<i>p</i>	Infección hematológica con hemocultivo positivo (n=9), N° (%)	Infección hematológica con hemocultivo negativo (n=10), N° (%)	<i>p</i>
Características basales						
Sexo (varón)	10 (33.3)	5 (33.3)	1.000	3 (33.3)	5 (50.0)	0.650
Edad (años, media±DE)	76.1 ± 12.8	70.4 ± 16.2	0.201	77.7 ± 17.5	77.1 ± 10.7	0.604
Diabetes mellitus	4 (13.3)	4 (26.7)	0.410	2 (22.2)	2 (20.0)	1.000
Insuficiencia renal crónica	5 (16.7)	1 (6.7)	0.647	3 (33.3)	1 (10.0)	0.303
Artritis reumatoide	2 (6.7)	1 (6.7)	1.000	1 (11.1)	1 (10.0)	1.000
Cáncer	0 (0.0)	1 (6.7)	0.333	0 (0.0)	2 (20.0)	0.474
Cirrosis	1 (3.3)	0 (0.0)	1.000	0 (0.0)	0 (0.0)	-

Resultados

Enfermedad pulmonar crónica	6 (20.0)	2 (13.3)	0.699	1 (11.1)	2 (20.0)	1.000
Enfermedad cardíaca crónica	8 (26.7)	5 (33.3)	0.732	3 (33.3)	4 (40.0)	1.000
Terapia inmunosupresora	4 (13.3)	1 (6.7)	0.651	2 (22.2)	3 (30.0)	1.000
Localización de prótesis (rodilla)	10 (33.3)	8 (53.3)	0.197	7 (77.8)	9 (90.0)	0.582
Prótesis de revisión	6 (20.0)	3 (20.0)	1.000	1 (11.1)	4 (40.0)	0.303
Presentación clínica						
Infección polimicrobiana	5 (16.7)	3 (20.0)	1.000	0 (0.0)	0 (0.0)	-
Bacteriemia	4 (13.3)	2 (13.3)	1.000	9 (100)	-	-
Tiempo desde el implante protésico hasta la infección (años)	-	-	-	7.05 (2.91-21.4)	1.26 (0.66-7.65)	0.043
Fiebre >37°C	11 (36.7)	5 (33.3)	0.826	4 (44.4)	7 (70.0)	0.370
Dolor articular	23 (76.7)	13 (86.7)	0.695	8 (88.9)	10 (100.0)	0.474
Fístula	4 (13.3)	3 (20.0)	0.670	0 (0.0)	0 (0.0)	-
Supuración	22 (73.3)	7 (46.7)	0.078	0 (0.0)	0 (0.0)	-
Leucocitos (x10 ⁹ /L, media±DE) ^a	10.2 ± 5.4	10.7 ± 5.5	0.779	12.5 ± 10.1	10.4 ± 4.6	0.780
Proteína C reactiva (mg/L, media±DE) ^a	121.7 ± 120.4	140.5 ± 128.9	0.864	240.1 ± 133.7	249.0 ± 133.8	0.887
Tratamiento quirúrgico						
DAIR	21 (70.0)	12 (80.0)	0.722	7 (77.8)	9 (90.0)	0.582

Resultados

Explantе protésico	9 (30.0)	3 (20.0)	0.722	2 (22.2)	1 (10.0)	0.582
--------------------	----------	----------	-------	----------	----------	-------

Resistencia antimicrobiana

Penicilina	29 (96.7)	14 (93.3)	1.000	6 (66.7)	7 (70.0)	1.000
Meticilina	5 (16.7)	4 (26.7)	0.454	0 (0.0)	2 (20.0)	0.474
Levofloxacino	5 (16.7)	4 (26.7)	0.454	1 (11.1)	2 (20.0)	1.000
Eritromicina	14 (46.7)	6 (40.0)	0.671	1 (11.1)	4 (40.0)	0.303
Clindamicina	7 (23.3)	3 (20.0)	1.000	2 (22.2)	2 (20.0)	1.000
Gentamicina	4 (13.3)	4 (26.7)	0.410	1 (11.1)	0 (0.0)	0.474
Fosfomicina	0 (0.0)	1 (6.7)	0.333	0 (0.0)	1 (10.0)	1.000
Rifampicina	1 (3.3)	0 (0.0)	1.000	0 (0.0)	0 (0.0)	-
Mupirocina	1 (3.3)	0 (0.0)	1.000	0 (0.0)	1 (10.0)	1.000

CMI de daptomicina por Etest

(mg/L)

CMI ₅₀	0.13	0.19	-	0.19	0.13	-
CMI ₉₀	0.25	0.38	-	0.50	0.19	-
Media geométrica	0.15	0.18	0.164	0.19	0.14	0.210

CMI de vancomicina por Etest

(mg/L)

CMI ₅₀	1.00	1.00	-	1.00	0.75	-
CMI ₉₀	1.00	1.00	-	1.50	1.00	-

Resultados

Media geométrica	0.85	0.90	0.621	1.03	0.75	0.051
Vancomicina CMI \geq 1.5 mg/L	1 (3.3)	0 (0.0)	1.000	2 (22.2)	0 (0.0)	0.211
Características fenotípicas						
Funcionalidad de <i>agr</i>						
Negativo	9 (30.0)	4 (26.7)	1.000	4 (44.4)	2 (20.0)	0.269
Débil	5 (16.7)	2 (13.3)		5 (55.6)	5 (50.0)	
Fuerte	16 (53.3)	9 (60.0)		0 (0.0)	3 (30.0)	
β -hemólisis	27 (90.0)	15 (100.0)	0.540	7 (77.8)	8 (80.0)	1.000
Formación de <i>biofilm</i> (DO 595 nm, media \pm DE ^a)	0.13 \pm 0.15	0.13 \pm 0.09	0.682	0.07 \pm 0.01	0.10 \pm 0.04	0.133
Epidemiología molecular						
Complejo clonal (CC)						
CC5	9 (30.0)	6 (40.0)	0.462	1 (11.1)	1 (10.0)	0.777
CC15	2 (6.7)	2 (13.3)		1 (11.1)	0 (0.0)	
CC30	5 (16.7)	0 (0.0)		2 (22.2)	1 (10.0)	
CC45	6 (20.0)	2 (13.3)		0 (0.0)	2 (20.0)	
Otros	8 (26.7)	5 (33.3)		5 (55.6)	6 (60.0)	
Grupo de <i>agr</i>						
<i>agr I</i>	9 (30.0)	4 (26.7)	0.381	4 (44.4)	4 (40.0)	1.000
<i>agr II</i>	10 (33.3)	8 (53.3)		2 (22.2)	3 (30.0)	
<i>agr III</i>	11 (36.7)	3 (20.0)		3 (33.3)	3 (30.0)	

Genotipo de resistencia						
<i>mecA</i> (penicillin binding protein 2a)	5 (16.7)	4 (26.7)	0.454	0 (0.0)	2 (20.0)	0.474
<i>blaZ</i> (beta-lactamase)	28 (93.3)	14 (93.3)	1.000	7 (77.8)	7 (70.0)	1.000
<i>erm(C)</i> (rRNA methyltransferase)	2 (6.7)	0 (0.0)	0.545	0 (0.0)	0 (0.0)	-
<i>aadD</i> (aminoglycoside adenytransferase)	2 (6.7)	3 (20.0)	0.315	0 (0.0)	0 (0.0)	-
<i>dfrS1</i> (dihydrofolate reductase mediating trimethoprim resistance)	1 (3.3)	0 (0.0)	1.000	0 (0.0)	0 (0.0)	-
<i>mupA</i> (isoleucyl-tRNA synthetase)	1 (3.3)	0 (0.0)	1.000	0 (0.0)	1 (10.0)	1.000
<i>tetK</i> (tetracycline efflux protein)	1 (3.3)	0 (0.0)	1.000	1 (11.1)	0 (0.0)	0.474
<i>tetM</i> (ribosomal protection protein associated with tetracycline resistance)	1 (3.3)	0 (0.0)	1.000	1 (11.1)	0 (0.0)	0.474
<i>fosB</i> (fosfomicin resistance protein B)	10 (33.3)	8 (53.3)	0.197	4 (44.4)	3 (30.0)	0.650
Genotipo de virulencia						
<i>tst1</i> (toxic shock syndrome toxin-1)	4 (13.3)	0 (0.0)	0.285	3 (33.3)	0 (0.0)	0.087
<i>seg</i> (enterotoxin G)	20 (66.7)	10 (66.7)	1.000	4 (44.4)	7 (70.0)	0.370
<i>seo</i> (enterotoxin O)	22 (73.3)	10 (66.7)	0.732	4 (44.4)	7 (70.0)	0.370
<i>seu</i> (enterotoxin U)	21 (70.0)	10 (66.7)	1.000	4 (44.4)	7 (70.0)	0.370

Resultados

β -hemolisina con inserción de fago	25 (83.3)	13 (86.7)	1.000	8 (88.9)	10 (100.0)	0.474
<i>sea</i> (enterotoxin A)	4 (13.3)	0 (0.0)	0.285	2 (22.2)	2 (20.0)	1.000
<i>sak</i> (staphylokinase)	21 (70.0)	10 (66.7)	1.000	6 (66.7)	9 (90.0)	0.303
<i>chp</i> (chemotaxis-inhibiting protein)	22 (73.3)	11 (73.3)	1.000	7 (77.8)	7 (70.0)	1.000
<i>scn</i> (staphylococcal complement inhibitor)	25 (83.3)	13 (86.7)	1.000	8 (88.9)	10 (100.0)	0.474
<i>spIA</i> (serinprotease A)	15 (50.0)	9 (60.0)	0.526	5 (55.6)	5 (50.0)	1.000
<i>spIB</i> (serinprotease B)	15 (50.0)	9 (60.0)	0.526	4 (44.4)	4 (40.0)	1.000
<i>cap 5</i> (capsular polysaccharide type 5)	12 (40.0)	9 (60.0)	0.205	6 (66.7)	6 (60.0)	1.000
<i>cap 8</i> (capsular polysaccharide type 8)	18 (60.0)	6 (40.0)	0.205	3 (33.3)	4 (40.0)	1.000
<i>cna</i> (collagen adhesin)	17 (56.7)	7 (46.7)	0.526	4 (44.4)	6 (60.0)	0.656
<i>fnbA</i> (fibronectin-binding protein A)	30 (100.0)	15 (100.0)	-	8 (88.9)	10 (100.0)	0.474
<i>fnbB</i> (fibronectin-binding protein B)	24 (80.0)	14 (93.3)	0.395	6 (66.7)	6 (60.0)	1.000

Abreviaturas: CMI, concentración mínima inhibitoria; DAIR, desbridamiento, antibioterapia y retención del implante; DE, desviación estándar; DO; densidad óptica.

^a Datos obtenidos al diagnóstico, antes del tratamiento quirúrgico (sea desbridamiento o explante protésico).

4. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y MICROBIOLÓGICAS SEGÚN LA EVOLUCIÓN CLÍNICA DE LA INFECCIÓN

Se observó fracaso terapéutico en 31 pacientes (36.5%) de los 85 pacientes (85/88 [96.6%]) cuya evolución clínica pudimos evaluar (Tabla 18). El seguimiento de los pacientes fue de 1.26 ± 0.6 años. La mayoría de los casos con una evolución clínica desfavorable fueron tratados con DAIR, en comparación con aquellos con una evolución clínica favorable (26/31 [83.9%] vs 29/54 [53.7%], $p=0.005$). Entre los primeros, el fracaso fue más frecuente en los pacientes con IPC y con un mayor retraso en el desbridamiento. El uso de rifampicina y el recambio de componentes móviles se asociaron con un buen pronóstico en pacientes tratados con DAIR. Una comparación exhaustiva de las características microbiológicas, fenotípicas y genotípicas, no mostró factores asociados con el fracaso terapéutico, con la única excepción de la CMI a vancomicina ≥ 1.5 mg/L, que fue más frecuente en los casos de pacientes tratados con DAIR con una evolución clínica desfavorable (6/26 [23.1%] vs 1/29 [3.4%], $p=0.044$). También hubo una tendencia hacia una mayor presencia de *S. aureus* perteneciente al complejo clonal CC5 (8/26 [30.8%] vs 4/29 [13.8%], $p=0.192$) y con *agr* tipo II (12/26 [46.2%] vs 7/29 [24.1%], $p=0.099$) entre las IPAs que cursaron con fracaso terapéutico.

Resultados

Tabla 18. Análisis comparativo de las características clínicas y microbiológicas (fenotípicas y genotípicas) según la evolución clínica de la infección protésica articular

	Total casos (n=85)			Tratados con DAIR ^a (n=55)			Tratados con explante protésico (n=30)		
	Fracaso terapéutico (n=31), N° (%)	Curación (n=54), N° (%)	<i>P</i>	Fracaso terapéutico (n=26), N° (%)	Curación (n=29), N° (%)	<i>P</i>	Fracaso terapéutico (n=5), N° (%)	Curación (n=25), N° (%)	<i>p</i>
Características basales									
Sexo (varón)	15 (48.4)	19 (35.2)	0.232	10 (38.5)	10 (34.5)	0.759	5 (100.0)	9 (36.0)	0.014*
Age (años, media±DE)	76.3 ± 13.1	73.4 ± 14.9	0.298	75.6 ± 13.8	73.5 ± 14.3	.320	80.2 ± 8.8	73.4 ± 15.9	0.627
Diabetes mellitus	5 (16.1)	10 (18.5)	0.781	5 (19.2)	6 (20.7)	0.893	0 (0.0)	4 (16.0)	1.000
Insuficiencia renal crónica	5 (16.1)	8 (14.8)	1.000	3 (11.5)	4 (13.8)	1.000	2 (40.0)	4 (16.0)	0.254
Artritis reumatoide	2 (6.5)	5 (9.3)	1.000	1 (3.8)	1 (3.4)	1.000	1 (20.0)	4 (16.0)	1.000

Resultados

Cáncer	4 (12.9)	3 (5.6)	0.252	4 (15.4)	2 (6.9)	0.406	0 (0.0)	1 (4.0)	1.000
Cirrosis	0 (0.0)	2 (3.7)	0.531	0 (0.0)	1 (3.4)	1.000	0 (0.0)	1 (4.0)	1.000
Enfermedad pulmonar crónica	5 (16.1)	6 (11.1)	0.520	3 (11.5)	3 (10.3)	1.000	2 (40.0)	3 (12.0)	0.183
Enfermedad cardíaca crónica	11 (35.5)	15 (27.8)	0.458	9 (34.6)	6 (20.7)	0.247	2 (40.0)	9 (36.0)	1.000
Terapia inmunosupresora	3 (9.7)	9 (16.7)	0.522	3 (11.5)	6 (20.7)	0.475	0 (0.0)	3 (12.0)	1.000
Localización de prótesis (rodilla)	14 (45.2)	24 (44.4)	0.949	13 (50.0)	18 (62.1)	0.368	1 (20.0)	6 (24.0)	1.000
Localización de prótesis (hemiartroplastia de cadera)	5 (16.1)	9 (16.7)	0.949	3 (11.5)	2 (6.9)	0.659	2 (40.0)	7 (28.0)	0.622
Prótesis de revisión	4 (12.9)	18 (33.3)	0.043*	4 (15.4)	8 (27.6)	0.339	0 (0.0)	10 (40.0)	0.140
Presentación clínica									
Infección postquirúrgica > 90 días	9 (29.0)	12 (22.2)	0.483	7 (26.9)	1 (3.4)	0.020*	2 (40.0)	11 (44.0)	1.000
Infección hematógena	9 (29.0)	9 (16.7)	0.179	8 (30.8)	7 (24.1)	0.581	1 (20.0)	2 (8.0)	0.433

Resultados

Infección polimicrobiana	3 (9.7)	10 (18.5)	0.358	2 (7.7)	6 (20.7)	0.257	1 (20.0)	4 (16.0)	1.000
Bacteriemia	8 (25.8)	9 (16.7)	0.311	7 (26.9)	4 (13.8)	0.224	1 (20.0)	5 (20.0)	1.000
Fiebre>37°C	13 (41.9)	18 (33.3)	0.428	12 (46.2)	13 (44.8)	0.921	1 (20.0)	5 (20.0)	1.000
Dolor articular	27 (87.1)	44 (81.5)	0.502	23 (88.5)	22 (75.9)	0.303	4 (80.0)	22 (88.0)	0.538
Fístula	9 (29.0)	15 (27.8)	0.902	6 (23.1)	5 (17.2)	0.589	3 (60.0)	10 (40.0%)	0.628
Supuración	12 (38.7)	22 (40.7)	0.854	10 (38.5)	14 (48.3)	0.464	2 (40.0)	8 (32.0)	1.000
Leucocitos (x10 ⁹ /L, media±DE) ^a	10.4 ± 5.0	12.3 ± 5.6	0.106	10.8 ± 5.3	12.0 ± 5.0	0.348	8.8 ± 2.7	12.8 ± 6.2	0.162
Proteína C reactiva (mg/L, media±DE) ^a	160.6 ± 139.1	122.2 ± 122.2	0.219	151.7 ± 132.3	167.5 ± 147.7	0.957	206.6 ± 180.9	71.2 ± 51.7	0.245
Tratamiento quirúrgico									
DAIR	26 (83.9)	29 (53.7)	0.005*	-	-	-	-	-	-
Tiempo hasta el desbridamiento [días, mediana (RIQ)]	-	-	-	10 (6-24)	5 (2-10)	0.001*	-	-	-

Resultados

Recambio de polietileno	-	-	-	15 (57.7)	22 (75.9)	0.152	-	-	-
Necesidad de ≥ 2 desbridamientos	-	-	-	2 (7.7)	6 (20.7)	0.257	-	-	-
Rifampicina ≥ 14 días†	-	-	-	12 (57.0)	25 (86.0)	0.021*	-	-	-
Explante protésico	5 (16.1)	25 (46.3)	0.005*	-	-	-	-	-	-
Uso de espaciador cargado de antibiótico¶	-	-	-	-	-	-	1/3 (33.3)	11/14 (78.6)	0.191
Resistencia antimicrobiana									
Penicilina	26 (83.9)	49 (90.7)	0.486	21 (80.8)	26 (89.7)	0.455	5 (100.0)	23 (92.0)	1.000
Meticilina	7 (22.6)	12 (22.2)	0.970	4 (15.4)	4 (13.8)	1.000	3 (60.0)	8 (32.0)	0.327
Levofloxacino	9 (29.0)	11 (20.4)	0.365	5 (19.2)	3 (10.3)	0.455	4 (80.0)	8 (32.0)	0.128
Eritromicina	10 (32.3)	22 (40.7)	0.437	7 (26.9)	12 (41.4)	0.260	3 (60.0)	10 (40.0)	0.628
Clindamicina	4 (12.9)	14 (25.9)	0.157	3 (11.5)	8 (27.6)	0.137	1 (20.0)	6 (24.0)	1.000
Gentamicina	5 (16.1)	6 (11.1)	0.520	4 (15.4)	4 (13.8)	1.000	1 (20.0)	2 (8.0)	0.433

Resultados

Fosfomicina	1 (3.2)	1 (1.9)	1.000	0 (0.0)	0 (0.0)	-	1 (20.0)	1 (4.0)	0.310
Rifampicina	1 (3.2)	2 (3.7)	1.000	1 (3.8)	0 (0.0)	0.473	0 (0.0)	2 (8.0)	1.000
Mupirocina	2 (6.5)	4 (7.4)	1.000	1 (3.8)	2 (6.9)	1.000	1 (20.0)	2 (8.0)	0.433
CMI de daptomicina por Etest (mg/L)									
CMI ₅₀	0.19	0.19	-	0.19	0.13	-	0.19	0.19	-
CMI ₉₀	0.38	0.38	-	0.38	0.38	-	0.38	0.25	-
Media geométrica	0.17	0.16	0.596	0.16	0.16	0.807	0.20	0.16	0.491
MIC de vancomicina por Etest (mg/L)									
CMI ₅₀	1.00	1.00	-	1.00	1.00	-	1.00	1.00	-
CMI ₉₀	1.50	1.00	-	1.50	1.00	-	1.50	1.50	-
Media geométrica	0.94	0.87	0.222	0.94	0.83	0.145	0.94	0.93	0.800
Vancomicina CMI \geq 1.5 mg/L	7 (22.6)	4 (7.4)	0.089	6 (23.1)	1 (3.4)	0.044*	1 (20.0)	3 (12.0)	0.538
Características fenotípicas									

Resultados

Funcionalidad de <i>agr</i>									
Negativo	9 (29.0)	20 (37.0)		8 (30.8)	11 (37.9)		1 (20.0)	9 (36.0)	
Débil	8 (25.8)	16 (29.6)	0.548	7 (26.9)	6 (20.7)	0.806	1 (20.0)	10 (40.0)	0.392
Fuerte	14 (45.2)	18 (33.3)		11 (42.3)	12 (41.4)		3 (60.0)	6 (24.0)	
β -hemólisis	28 (90.3)	47 (87.0)	0.740	23 (88.5)	25 (86.2)	1.000	5 (100.0)	22 (88.0)	1.000
Formación de <i>biofilm</i> (DO 595 nm, media \pm DE)	0.12 \pm 0.07	0.12 \pm 0.12	0.373	0.13 \pm 0.07	0.13 \pm 0.16	0.231	0.10 \pm .03	0.12 \pm 0.07	0.957
Epidemiología molecular									
Complejo clonal (CC)									
CC5	10 (32.3)	16 (29.6)		8 (30.8)	4 (13.8)		2 (40.0)	12 (48.0)	
CC15	4 (12.9)	3 (5.6)		3 (11.5)	2 (6.9)		1 (20.0)	1 (4.0)	
CC30	4 (12.9)	8 (14.8)		4 (15.4)	5 (17.2)		0 (0.0)	3 (12.0)	
CC45	2 (6.5)	9 (16.7)		1 (3.8)	6 (20.7)		1 (20.0)	3 (12.0)	

Resultados

Otros	11 (35.5)	18 (33.3)	0.574	10 (38.5)	12 (41.4)	0.276	1 (20.0)	6 (24.0)	0.625
Grupo de agr									
<i>agr I</i>	7 (22.6)	18 (33.3)		5 (19.2)	10 (34.5)		2 (40.0)	8 (32.0)	
<i>agr II</i>	15 (48.4)	19 (35.2)	0.434	12 (46.2)	7 (24.1)	0.196	3 (60.0)	12 (48.0)	0.675
<i>agr III</i>	9 (29.0)	17 (31.5)		9 (34.6)	12 (41.4)		0 (0.0)	5 (20.0)	
Genotipo de resistencia									
<i>mecA</i> (penicillin binding protein 2a)	7 (22.6)	12 (22.2)	0.970	4 (15.4)	4 (13.8)	1.000	3 (60.0)	8 (32.0)	0.327
<i>blaZ</i> (betalactamase)	25 (80.6)	46 (85.2)	0.587	20 (76.9)	26 (89.7)	0.281	5 (100.0)	20 (80.0)	0.556
<i>ermC</i> (rRNA methyltransferase)	2 (6.5)	3 (5.6)	1.000	1 (3.8)	0 (0.0)	0.473	1 (20.0)	3 (12.0)	0.538
<i>aadD</i> (aminoglycoside adenyltransferase)	4 (12.9)	8 (14.8)	1.000	4 (15.4)	2 (6.9)	0.406	0 (0.0)	6 (24.0)	0.553
<i>dfrS1</i> (dihydrofolate reductase mediating trimethoprim resistance)	1 (3.2%)	2 (3.7)	1.000	0 (0.0)	1 (3.4)	1.000	1 (20.0)	1 (4.0)	0.310
<i>mupA</i> (isoleucyl-tRNA synthetase)	2 (6.5)	4 (7.4)	1.000	1 (3.8)	2 (6.9)	1.000	1 (20.0)	2 (8.0)	0.433

Resultados

<i>tetK</i> (tetracycline efflux protein)	1 (3.2)	3 (5.6)	1.000	1 (3.8)	1 (3.4)	1.000	0 (0.0)	2 (8.0)	1.000
<i>tetM</i> (ribosomal protection protein associated with tetracycline resistance)	1 (3.2)	1 (1.9)	1.000	1 (3.8)	1 (3.4)	1.000	0 (0.0)	0 (0.0)	-
<i>fosB</i> (fosfomicin resistance protein B)	13 (41.9)	27 (50.0)	0.473	11 (42.3)	11 (37.9)	0.741	2 (40.0)	16 (64.0)	0.364
Genotipo de virulencia									
<i>tst1</i> (toxic shock syndrome toxin-1)	4 (12.9)	6 (11.1)	1.000	4 (15.4)	4 (13.8)	1.000	0 (0.0)	2 (8.0)	1.000
<i>seg</i> (enterotoxin G)	20 (64.5)	39 (72.2)	0.458	16 (61.5)	19 (65.5)	0.759	4 (80.0)	20 (80.0)	1.000
<i>seo</i> (enterotoxin O)	21 (67.7)	41 (75.9)	0.414	17 (65.4)	21 (72.4)	0.573	4 (80.0)	20 (80.0)	1.000
<i>seu</i> (enterotoxin U)	20 (64.5)	40 (74.1)	0.352	16 (61.5)	19 (65.5)	0.759	4 (80.0)	21 (84.0)	1.000
β-hemolisina con inserción de fago	27 (87.1)	45 (83.3)	0.761	22 (84.6)	25 (86.2)	1.000	5 (100.0)	20 (80.0)	0.556
<i>sea</i> (enterotoxin A)	5 (16.1)	8 (14.8)	1.000	4 (15.4)	6 (20.7)	0.733	1 (20.0)	2 (8.0)	0.433
<i>sak</i> (staphylokinase)	22 (71.0)	38 (70.4)	0.954	18 (69.2)	20 (69.0)	0.983	4 (80.0)	18 (72.0)	1.000

Resultados

<i>chp</i> (chemotaxis-inhibiting protein)	23 (74.2)	38 (70.4)	0.706	20 (76.9)	21 (72.4)	0.702	3 (60.0)	17 (68.0)	1.000
<i>scn</i> (staphylococcal complement inhibitor)	27 (87.1)	45 (83.3)	0.761	22 (84.6)	25 (86.2)	1.000	5 (100.0)	20 (80.0)	0.556
<i>spA</i> (serinprotease A)	18 (58.1)	29 (53.7)	0.697	15 (57.7)	12 (41.4)	0.227	3 (60.0)	17 (68.0)	1.000
<i>spB</i> (serinprotease B)	17 (54.8)	28 (51.9)	0.791	14 (53.8)	11 (37.9)	0.237	3 (60.0)	17 (68.0)	1.000
<i>cap 5</i> (capsular polysaccharide 5)	18 (58.1)	27 (50.0)	0.473	15 (57.7)	11 (37.9)	0.143	3 (60.0)	16 (64.0)	1.000
<i>cap 8</i> (capsular polysaccharide 8)	13 (41.9)	27 (50.0)	0.473	11 (42.3)	18 (62.1)	0.143	2 (40.0)	9 (36.0)	1.000
<i>cna</i> (collagen adhesin)	15 (48.4)	28 (51.9)	0.758	13 (50.0)	19 (65.5)	0.244	2 (40.0)	9 (36.0)	1.000
<i>fnbA</i> (fibronectin-binding protein A)	30 (96.8)	54 (100.0)	0.365	25 (96.2)	29 (100.0)	0.473	5 (100.0)	25 (100.0)	-
<i>fnbB</i> (fibronectin-binding protein B)	23 (74.2)	42 (77.8)	0.708	20 (76.9)	22 (75.9)	0.926	3 (60.0)	20 (80.0)	0.565

Abreviaturas: CMI, concentración mínima inhibitoria; DAIR, desbridamiento, antibioterapia y retención del implante; DE, desviación estándar; DO; densidad óptica; RIQ, rango intercuartílico.

Tres pacientes con evolución clínica desconocida.

^a Datos obtenidos al diagnóstico, antes del tratamiento quirúrgico (sea desbridamiento o explante protésico).

‡Calculado para pacientes sin fracaso terapéutico en los primeros 30 días de tratamiento.

¶Calculado para pacientes tratados con procedimiento de recambio en dos tiempos (n=17).

* Estos resultados son estadísticamente significativos.

5. SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS EN EL *BIOFILM* (*Calgary biofilm device*)

La sensibilidad del *biofilm* a los antimicrobianos se evaluó en los antibióticos administrados durante un período de tiempo significativo (≥ 14 días en los primeros 30 días o ≥ 21 días durante todo el tratamiento) en los casos tratados con DAIR. Todas las cepas fueron sensibles a daptomicina, oxacilina, levofloxacino y rifampicina según los criterios de CMI. La distribución de la CMEB para estos antibióticos se encuentra representada en la Tabla 19 y en la Figura 43. Los valores de $CMEB_{50/90}$ para todos los antibióticos en monoterapia fueron >256.0 mg/L, excepto para oxacilina ($CMEB_{50} = 256.0$ mg/L) y rifampina ($CMEB_{50/90} = 128.0$ y 256.0 mg/L, respectivamente). La adición de una concentración fija de levofloxacino mostró una reducción no significativa en la CMEB de rifampicina (Figura 43F y Figura 44). Por el contrario, la adición de una concentración fija de rifampicina condujo a un aumento no significativo de la CMEB de levofloxacino (Figura 43D). La CMIB y la CMBB (para la bacteria dispersada del *biofilm*) para todos los antibióticos fue baja (Tabla 19). En conjunto, no encontramos asociación entre los valores de CMEB y la evolución clínica de la IPA (Tabla 20).

Resultados

Tabla 19. Concentraciones mínimas de erradicación, inhibitoria y bactericida del *biofilm* (CMEB, CMIB y CMBB) 50 y 90 para oxacilina, daptomicina, levofloxacino (en monoterapia y en combinación con una concentración fija de 5 mg/L de rifampicina) y rifampicina (en monoterapia y en combinación con una concentración fija de 3 mg/L de rifampicina).

Antibiótico	CMEB₅₀ (mg/L)	CMEB₉₀ (mg/L)	CMIB₅₀ (mg/L)	CMIB₉₀ (mg/L)	CMBB₅₀ (mg/L)	CMBB₉₀ (mg/L)
Oxacilina (n=18)	256.0	>256.0	≤0.5	≤0.5	≤0.5	1.0
Daptomicina (n=9)	>256.0	>256.0	≤0.5	1.0	≤0.5	2.0
Levofloxacino (n=18)	>256.0	>256.0	≤0.5	≤0.5	≤0.5	1.0
Levofloxacino + 5 mg/L Rifampicina (n=18)	>256.0	>256.0	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5
Rifampicina (n=29)	128.0	256.0	≤0.5	≤0.5	≤0.5	1.0
Rifampicina + 3 mg/L Levofloxacino (n=18)	32.0	128.0	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5

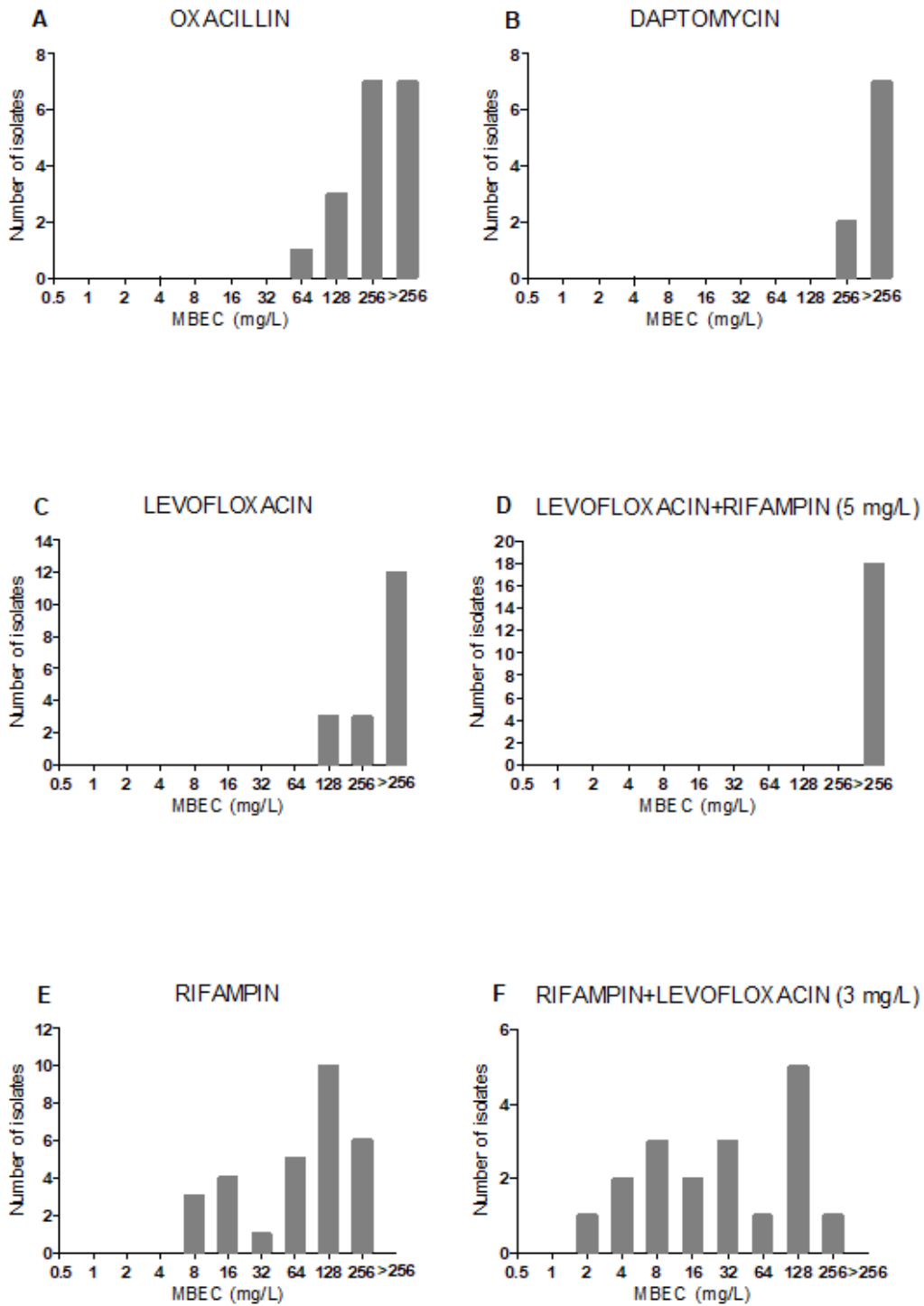


Figura 43. Distribución de la concentración mínima de erradicación de *biofilm* (CMEB, MBEC en inglés) para oxacilina (A), daptomicina (B), levofloxacino en monoterapia (C), levofloxacino en combinación con una concentración fija de 5 mg/L de rifampicina (D), rifampicina en monoterapia (E), y rifampicina en combinación con una concentración fija de 3 mg/L de levofloxacino (F).

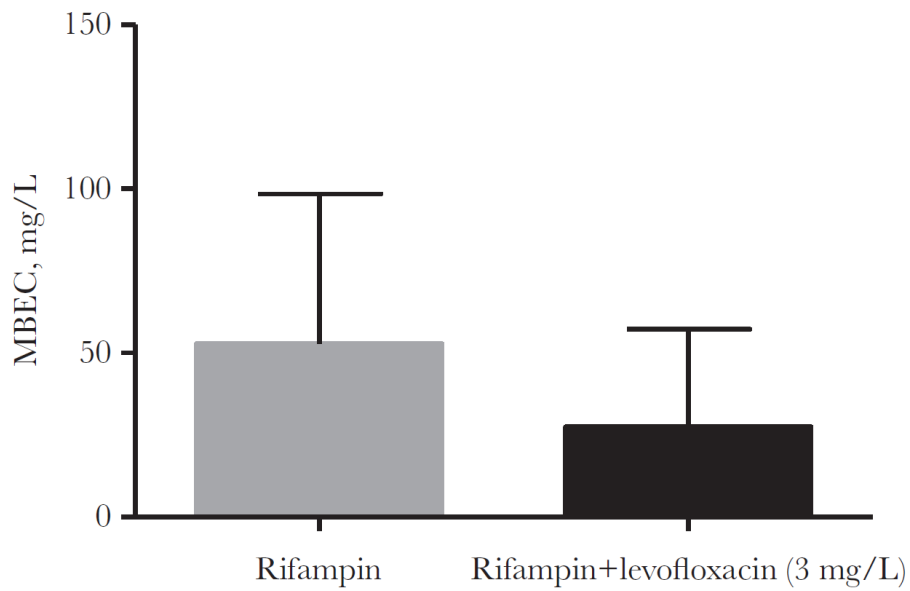


Figura 44. Media geométrica (95% intervalo de confianza) en todos los casos de la concentración mínima de erradicación de *biofilm* (CMEB, MBEC en inglés) de rifampicina para la rifampicina en monoterapia y en combinación con una concentración fija de 3 mg/L de levofloxacino.

Tabla 20. Concentración mínima de erradicación de *biofilm* (CMEB) para rifampicina en monoterapia y combinada con levofloxacino según la evolución clínica de la infección.

RIFAMPICINA CMEB (mg/L)	Total casos (n=18)	Curación (n=15, 83.3%)	Fracaso terapéutico (n=3, 16.7%)	<i>P</i>
Monoterapia				
Rango	8 - 256	8 - 256	64 - 128	
CMEB ₅₀ / CMEB ₉₀	64 / 256	64 / 256	128 / 128	
Media geométrica (95% IC)	52.8 (28.3 - 98.5)	46.3 (22.1 - 96.9)	101.6 (37.6 - 274.6)	0.805
Con levofloxacino (3mg/L)				
Rango	2 - 256	2 - 256	32 - 128	
CMEB ₅₀ / CMEB ₉₀	32 / 128	16 / 128	128 / 128	
Media geométrica (95% IC)	27.4 (13.2 - 57.2)	22.1 (9.6 - 50.8)	80.6 (11.0 - 588.9)	0.384

Abreviaturas: IC, intervalo de confianza.

Resultados

BLOQUE III: SECUENCIACIÓN DE
GENOMA COMPLETO DE
Staphylococcus aureus CAUSANTE
DE INFECCIÓN
ARTICULAR

Resultados

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *S. aureus* CAUSANTE DE INFECCIÓN PROTÉSICA ARTICULAR

En este estudio se incluyeron 49 cepas de *S. aureus* causantes de IPA en 45 pacientes (hubo 4 pacientes con IPA en los que se aislaron dos cepas en cada caso). De los 45 pacientes, 17 (37.8%) fueron varones con una mediana de edad de 81.0 años (RIQ 70.0-86.0 años). Veintiún pacientes (21/45 [46.7%]) tenían prótesis de rodilla y 24/45 (53.3%) de cadera. En cuanto al tipo de infección: 23/45 (51.1%) fueron precoces, 11/45 (24.4%) tardías (>90 días tras cirugía), 9/45 (20.0%) hematógenas, 1/45 (2.2%) con diagnóstico por CIOP y 1/45 (2.2%) por contigüidad. Treinta pacientes (30/45 [66.7%]) recibieron tratamiento quirúrgico mediante DAIR y 15/45 (33.3%) explante. Dieciocho casos (18/45 [40.0%]) fueron causados por SARM. En cuanto a la evolución clínica, 25 pacientes (25/45 [55.6%]) curaron, 18/45 (40.0%) cursaron con fracaso terapéutico y 2/45 casos (4.4%) no pudieron ser evaluados.

Se incluyeron las siguientes parejas de cepas pertenecientes a un mismo paciente:

- Cepas 110.1 y 110.2: IPA recidivante tratada con explante protésico, con un tiempo de recidiva de 56 días y una duración de tratamiento antibiótico de 236 días.
- Cepas 214.1 y 214.1_SCV: el diagnóstico inicial de la IPA de este paciente fue con una cepa de *S. aureus* de fenotipo salvaje y no hemolítica, pero al darle pases se desdobló en una cepa no hemolítica y SCV (214.1_SCV) y en una cepa hemolítica de fenotipo salvaje (224.1). La evolución de este paciente fue desfavorable.
- Cepas 407.1 y 407.2: cepas con fenotipos diferentes (407-1 salvaje y 407.2 SCV) que aparecieron a la vez en el cultivo de diagnóstico de IPA del mismo paciente. Este paciente evolucionó favorablemente.
- Cepas 507.1 y 507.2: el paciente debutó con IPA de prótesis de rodilla izquierda (cepa 507.1) y a los 4 días presentó bacteriemia por *S. aureus*, provocando una

Resultados

nueva IPA de prótesis de rodilla derecha (cepa 507.2). El paciente evolucionó favorablemente

Los resultados de las cepas de *S. aureus* se expresaron sobre un denominador total de 46 cepas, que incluye a la primera cepa aislada de cada caso, excepto en el caso 407, en el que se incluyeron dos cepas diferentes de *S. aureus* porque ambas crecieron a la vez en el cultivo de diagnóstico de la IPA de ese paciente.

1. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DE LAS CEPAS DE *S. aureus*

Un 67.4% (31/46) de las cepas causantes de IPA presentaron funcionalidad de gen regulador accesorio *agr* y la mayoría de ellas presentaron β -hemólisis en agar sangre (42/46 [91.3%]). Sólo dos cepas del estudio tuvieron un fenotipo SCV (cepas 2014.1_SCV y 407.2). Las dos cepas de los casos 110 y 507 presentaron funcionalidad de *agr* y un fenotipo β -hemolítico. Sin embargo, en el caso 407 la cepa con fenotipo salvaje (407.1) presentó funcionalidad de *agr* y un fenotipo β -hemolítico, mientras que la cepa de fenotipo SCV (407.2) no presentó ni funcionalidad de *agr* ni β -hemólisis. En cuanto al caso 214, ambas cepas presentaron funcionalidad de *agr*, pero la de fenotipo salvaje (214.1) mostró β -hemólisis mientras que la de fenotipo SCV (214.1_SCV) no.

2. RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS Y FACTORES DE VIRULENCIA

En la Tabla 21 se muestra la resistencia antimicrobiana fenotípica y genotípica de las 45 cepas de las que se pudo obtener la resistencia antimicrobiana fenotípica. Hubo una cepa (407.2) de la que no se pudo obtener el antibiograma definitivo debido a que no crecía adecuadamente, al ser de fenotipo SCV. Las 45 cepas fueron sensibles a vancomicina, daptomicina, teicoplanina, linezolid, cotrimoxazol y ácido fusídico. La correlación entre el genotipo y fenotipo de resistencia a antibióticos fue muy elevada. Todas las parejas de cepas de un mismo paciente con IPA presentaron el mismo fenotipo de resistencia antibiótica.

Tabla 21. Resistencia antimicrobiana fenotípica y genotípica de las cepas de *S. aureus* causantes de infección protésica articular.

Tipo de antibiótico	Fenotipo de resistencia		Genotipo de resistencia	
	Nº (%), n=45		Nº (%), n=45	
Betalactámicos	Penicilina	42 (93.3)	<i>blaZ</i>	36 (80.0)
	Meticilina	18 (40.0)	<i>mecA</i>	18 (40.0)
Aminoglucósidos	Gentamicina	7 (15.6)	<i>aac(6')-aph(2'')</i>	5 (11.1)
			<i>aphA</i>	7 (15.6)
			<i>ant</i>	3 (6.7)
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacino	20 (44.4)	<i>norA</i>	45 (100.0)
			Mutación <i>gyrA</i>	18 (40.0)
			(16 S84L, 1 S85P, 1 E88K)	
			Mutación <i>grlA</i>	20 (44.4)
	Levofloxacino	18 (40.0)	(20 S80F, 1 S80Y)	
Macrólidos	Eritromicina	21 (46.7)	<i>erm(A)</i>	3 (6.7)
	Clindamicina	11 (24.4)	<i>erm(C)</i>	5 (11.1)
Macrólidos, lincosamidas, estreptogramina B			<i>msr(A)</i>	14 (31.1)
Trimetoprim	Cotrimoxazol	0 (0.0)	<i>dfrA</i>	3 (6.7)
			Mutación <i>dfrB</i>	7 (15.6)
			(6 H31N, 1 F99I, 1 F99Y)	

Resultados

			<i>dfrC</i>	3 (6.7)
Fosfomicina	Fosfomicina	2 (4.4)	<i>fosB</i>	31 (68.9)
Mupirocina	Mupirocina	4 (8.9)	<i>mupA</i>	4 (8.9)
Ácido fusídico	Ácido fusídico	0 (0.0)	Mutación <i>fusA</i>	0 (0.0)
Rifampicina	Rifampicina	1 (2.2)	Mutación <i>rpoB</i> (Q468L y Q468R)	1 (2.2)

Los genes de virulencia de las 46 cepas causantes de los 45 casos de IPA se encuentran en las Tablas 22, 23 y 24 agrupados según su función biológica. Todas las cepas presentaron genes que codifican para adhesinas y genes implicados en la formación de *biofilm*.

Tabla 22. Genes de virulencia en las cepas de *S. aureus* causantes de infección protésica articular.

Virulencia	Gen	Nº (%), n=46
Proteasas	<i>splA</i>	28 (60.9)
	<i>splB</i>	28 (60.9)
	<i>aur</i>	46 (100.0)
Enterotoxinas	<i>seg</i>	20 (43.5)
	<i>sea</i>	10 (21.7)
Toxina shock tóxico	<i>tst1</i>	6 (13.0)
Leucocidinas	<i>lukE</i>	31 (67.4)
	<i>lukD</i>	31 (67.4)
Hemolisinas	<i>hlg</i>	46 (100.0)
	<i>hla</i>	46 (100.0)
Fagos-HIb	<i>scn</i>	38 (82.6)
	<i>sak</i>	34 (73.9)
	<i>chp</i>	30 (65.2)

Tabla 23. Genes codificantes para adhesinas en las cepas de *S. aureus* causantes de infección protésica articular.

Adhesinas	Gen	Nº (%), (n=46)
	<i>clfA</i>	41 (89.1)
	<i>clfB</i>	35 (76.1)
MSCRAMMs	<i>cna</i>	18 (39.1)
(componentes microbianos de superficie que reconocen moléculas adhesivas de la matriz)	<i>fnbA</i>	44 (95.7)
	<i>fnbB</i>	37 (80.4)
	<i>ebpS</i>	46 (100.0)
	<i>spa</i>	46 (100.0)
	<i>sdrC</i>	41 (89.1)
	<i>sdrD</i>	39 (84.8)
Proteínas extracelulares	<i>coA</i>	46 (100.0)
	<i>efb</i>	46 (100.0)
Formación <i>biofilm</i>	<i>atl</i>	46 (100.0)
Antiadhesina	<i>pls</i>	4 (8.7)
Motivo LPXTG	<i>sasG</i>	30 (65.2)

Tabla 24. Genes implicados en la formación de *biofilm* en las cepas de *S. aureus* causantes de infección protésica articular.

Formación de <i>biofilm</i>	Gen	Nº (%), (n=46)
Biosíntesis de adhesina intracelular polisacárida (PIA)	<i>icaB</i>	46 (100.0)
	<i>icaC</i>	46 (100.0)
	<i>icaD</i>	46 (100.0)
Biosíntesis de PIA y regulación formación <i>biofilm</i>	<i>icaR</i>	46 (100.0)
Regulación formación <i>biofilm</i>	<i>rbf</i>	46 (100.0)
	<i>tcaR</i>	46 (100.0)
	<i>sigB</i>	46 (100.0)

3. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR

En la Tabla 25 se encuentran los resultados de epidemiología molecular de todas las cepas de *S. aureus* del estudio: CC, MLST (ST) y *spa type*. Los CCs se asignaron a partir de los ST. Dentro de los 45 pacientes, las cepas de *S. aureus* se distribuyeron en los siguientes complejos clonales: 22/45 (48.9%) CC5, 6/45 (13.3%) CC30, 4/45 (8.9%) CC45, 3/45 (6.7%) CC398, 2/45 (4.4%) CC15 y hubo 1/45 cepa (2.2%) (todas ellas fueron cepas de SASM) de cada uno de los siguientes CCs: CC1, CC6, CC8, CC9, CC10, CC188, CC509 y CC1021. El resto de las cepas de SASM se distribuyeron entre los siguientes CCs: 5/27 (18.5%) CC5, 6/27 (22.2%) CC30, 4/27 (14.8%) CC45, 2/27 (7.4%) CC398 y 2/27 (7.4%) CC15. La distribución de las cepas de SARM entre los distintos CCs fue: 17/18 (94.4%) CC5 y 1/18 (5.6%) CC398. En cuanto al MLST, la distribución de las cepas de *S. aureus* de los 45 pacientes fue: 16/45 (35.6%) ST125, 5/45 (11.1%) ST30, 4/45 (8.9%) ST5, 4/45 (8.9%) ST45, 3/45 (6.7) ST398 y hubo 1/45 cepa (2.2%) de cada uno de los siguientes STs: ST6, ST8, ST10, ST15, ST109, ST188, ST228, ST509, ST852, ST1021, ST1160, ST1776,

Resultados

ST1842. La distribución de las cepas de SASM entre los distintos STs fue: 5/27 (18.5%) ST30, 4/27 (14.8%) ST45, 2/27 (7.4%) ST5, 2/27 (7.4%) ST125, 2/27 (7.4%) ST398 y hubo 1/27 (3.7%) de cada uno de los siguientes STs: ST6, ST8, ST10, ST15, ST109, ST188, ST509, ST852, ST1021, ST1160, ST1776, ST1842. La distribución de las cepas de SARM entre los distintos STs fue: 14/18 (77.8%) ST125, 2/18 (11.1%) ST5, 1/18 (5.6%) ST228 y 1/18 (5.6%) ST398.

Dentro del principal CC, el CC5, el ST mayoritario fue el ST125 con 16/22 cepas (72.7%), después el ST5 con 4/22 cepas (18.2%) y después el ST228 y el ST1776 con una cepa cada uno (1/22 [4.5%]). El *spa type* mayoritario fue el t067 en el CC5 ST125. Las cepas pertenecientes a un mismo paciente presentaron el mismo CC, ST y *spa type*. Todas las cepas resistentes a meticilina tuvieron el SCCmec IVc.

Tabla 25. Epidemiología molecular de las cepas de *S. aureus* causantes de infección protésica articular y, según ésta, las referencias usadas para cada cepa y análisis bioinformático.

Cepa (código)	CC	ST	<i>spa type</i>	Referencia ^a (anotación)	Referencia (variantes)
104-1	15	15	-	MSSA476	-
107-1	398	398	-	SO385	-
108-1	5	5	-	N315	-
110-1	5	125	t067	N315	N315
110-2	5	125	t067	N315	N315
111-1	30	30	-	MRSA252	-
112-1	6	6	-	N315	-
113-1	30	30	-	MRSA252	-
114-1	5	125	t1954	N315	-
115-1	5	228	t062	N315	-
116-1	5	5	-	N315	-
117-1	1021	1021	-	N315	-
118-1	5	125	t067	N315	-
205-1	5	125	t067	N315	-
206-1	5	125	t067	N315	-
208-1	509	509	-	N315	-
214-1	30	30	-	MRSA252	MRSA252
214-1_SCV	30	30	-	MRSA252	MRSA252
218-1	5	125	-	N315	-
219-1	398	398	-	SO385	-
220-1	5	1776	-	N315	-
223-1	30	30	-	MRSA252	-

304-1	5	125	t067	N315	-
305-1	5	125	t067	N315	-
306-1	5	125	t1954	N315	-
307-1	5	125	-	N315	-
401-1	45	45	t026	CA-347	-
402-1	5	5	-	N315	-
404-1	15	1160	-	MSSA476	-
405-1	5	125	t067	N315	-
407-1	5	125	t067	N315	N315
407-2	5	125	t067	N315	N315
408-1	5	125	t067	N315	-
409-1	188	188	-	MSSA476	-
414-1	30	30	-	MRSA252	-
505-1	5	125	t067	N315	-
507-1	8	8	-	NCTC 8325	NCTC 8325
507-2	8	8	-	NCTC 8325	NCTC 8325
605-1	5	125	t067	N315	-
701-1	5	5	t002	N315	-
802-1	30	1842	-	MRSA252	-
804-1	10	10	-	N315	-
806-1	45	45	-	CA-347	-
807-1	45	45	-	CA-347	-
808-1	1	852	-	MSSA476	-
809-1	45	45	t026	CA-347	-
901-1	5	125	t067	N315	-
1001-1	398	398	-	SO385	-
1101-1	9	109	t209	N315	-

^aLos CCs y STs de las cepas de referencia son los siguientes: MSSA476 (CC1, ST1, BX571857.1), SO385 (CC398, ST398, AM990992.1), N315 (CC5, ST5, BA000018.3), MRSA252 (CC30, ST30, BX571856.1), CA-347 (CC45, ST45, CP006044.1), NCTC 8325 (CC8, ST8, NC_007795.1).

4. ASOCIACIÓN DE GENES CON VARIABLES CLÍNICAS

Se analizó la asociación de genes de virulencia y de resistencia a los antibióticos con las siguientes variables clínicas de interés:

- Hospital.
- Tipo de infección: hematogena vs precoz, precoz vs crónica y hematogena vs crónica.

Resultados

- Hemocultivo positivo vs hemocultivo negativo dentro de las infecciones hematógenas.
- Resistencia a metilina.
- Evolución clínica (fracaso terapéutico vs curación) de todos los casos y según el tratamiento quirúrgico (DAIR o explante protésico).

De todas las variables clínicas estudiadas, no se encontró asociación con la presencia de ningún gen, con la excepción de algunos genes de resistencia a antibióticos y de virulencia con la resistencia a metilina (con todos los ajustes de *p-value* y FDR realizados), y con uno de los hospitales (el hospital 8) (sólo con el criterio de *p-value*<0.05 y FDR<0.1). En el anexo VI se muestran los genes asociados a la resistencia de metilina y al hospital 8 con el criterio de *p-value*<0.05 y FDR<0.1, descartando las proteínas presuntivas e hipotéticas (*hypothetical proteins*).

5. ANÁLISIS FILOGENÉTICO

El dendrograma filogenético con las 46 cepas causantes de los 45 casos de IPA por *S. aureus* y los principales genes de resistencia a antibióticos y de virulencia están representados en la Figura 45. Las cepas se agruparon en el dendrograma filogenético por similitud de CCs y STs, formando dos *clusters* claramente diferenciados.

De las parejas de cepas de un mismo paciente, no se diferenciaron en la presencia/ausencia de genes los casos 110 (caso recidivante de IPA tratado con explante), 214 (cepa con fenotipo salvaje y SCV) ni 507 (paciente con IPA de ambas rodillas) y sí el caso 407. La cepa 407.2 (SCV) se diferenció con la otra cepa de diagnóstico de la IPA de este paciente, 407.1 (de fenotipo salvaje), en los siguientes genes: los de resistencia *aac(6')-aph(2'')*, *blaZ*, *erm(C)*, *msr(A)*, *mupA*, *dfrA*, *dfrC* y la antiadhesina *pls* que los perdió y adquirió la mutación H31N en el gen de resistencia *dfrB*.

6. ESTUDIO DE VARIANTES ENTRE CEPAS

Se analizaron las variantes entre las cepas de *S. aureus* aisladas de un mismo caso de IPA que mostró algún aspecto clínico o microbiológico de interés (casos 110, 214, 407 y 507). En la Tabla 26 se describe el número de variantes de cada cepa con la referencia utilizada y el número de variantes totales entre cada pareja de cepas y tras el filtrado de variantes realizado (SNPs no sinónimos, SNPs sinónimos, sustituciones de múltiples bases, inserciones y deleciones que no se encontraban en proteínas presuntivas e hipotéticas, ni en regiones intergénicas ni en pseudogenes).

Tabla 26. Número de variantes de cada cepa con la referencia y de variantes totales de diferencia entre las parejas de cepas de un mismo paciente con infección protésica articular y entre esas parejas de cepas tras el filtrado de variantes por tipo de variante.

Cepa	Referencia	% Alineamiento	Nº variantes totales con referencia	Nº variantes de diferencia entre pareja de cepas con la referencia: totales y tipos tras el filtrado de variantes					
				Total	SNPs no sinónimos	SNPs sinónimos	Sustituciones de múltiples bases	Inserciones	Deleciones
110.1	N315	87.5	1025	50	3	2	1	0	0
110.2 ^a		86.5	1009						
214.1	MRSA252	94.5	644	20	5	0	0	0	1
214.1_SCV		94.7	644						
407.1	N315	87.2	729	68	4	2	0	0	3
407.2		89.9	734						
507.1	NCTC 8325	93.3	1444	40	0	0	0	2	0
507.2		93.2	1450						

^a En las cepas del caso 110 se produjo además una variante que da lugar a un codón de terminación.

En la Tabla 27 se detallan las variantes entre cada pareja de cepas de un mismo paciente, tras el filtrado realizado. Se observaron variantes en una diversidad de genes de virulencia y en algún gen de resistencia a antibióticos.

Tabla 27. Variantes entre parejas de cepas de *S. aureus* de un mismo paciente con infección protésica articular.

Cepas	Posición de nucleótidos	Cepa inicial	Segunda cepa	Anotación	Tipo de mutación	Descripción (gen)
110	1267745	G	A	V435I	NSYN	polyribonucleotide nucleotidyltransferase (<i>pnpA</i>)
	1782694	T	A	L142* (TTA→TAA)	STOP ^a	acetoin dehydrogenase homolog (<i>acuA</i>)
	2008110	G	C	V68L	NSYN	truncated amidase [<i>truncated(lytA)</i>]
	2008114	G	A	S66S	SYN	truncated amidase [<i>truncated(lytA)</i>]
	2008120	A	C	K64N	NSYN	truncated amidase [<i>truncated(lytA)</i>]
	2008131	2 bp→TA		180-181/207 nt	MBS	truncated amidase [<i>truncated(lytA)</i>]
	2719126	G	A	D601D	SYN	clumping factor B (<i>clfB</i>)
214 ^b	152575	G	A	E142G	NSYN	purine nucleoside phosphorylase (<i>deoD</i>)
	300370	T	C	L316F	NSYN	autolysin sensor kinase protein (<i>lyts</i>)
	456061	C	A	Q58K	NSYN	exotoxin
	582831	G	A	H156R	NSYN	cysteinyI-tRNA synthetase (<i>cysS</i>)
	1395855	Δ1 bp		2/150 nt	DEL	50S ribosomal protein L33 type 2 (<i>rpmG2</i>)
	1913285	C	T	V146I	NSYN	beta-lactamase regulatory protein (<i>blaR1</i>)
407 ^b	122992	C	T	G337D	NSYN	Immunoglobulin G binding protein A precursor (<i>spa</i>)
	123300	G	A	N234N	SYN	Immunoglobulin G binding protein A precursor (<i>spa</i>)
	130382	A	G	T212A	NSYN	ornithine cyclodeaminase (<i>sbnB</i>)
	153784		Δ14 bp	22-35/1179 nt	DEL	Phosphopentomutase (<i>drm</i>)

Resultados

	616194	C	T	D1067D	SYN	Ser-Asp rich fibrinogen-binding, bone sialoprotein-binding protein (<i>sdrE</i>)
	1387278	A	G	V136A	NSYN	oligopeptide transporter membrane permease domain (<i>opp-2B</i>)
	1432562		$\Delta 502$ bp		DEL	thymidylate synthase (<i>thyA</i>)
	1563277	G	A	A185V	NSYN	geranyltranstransferase homolog (<i>ispA</i>)
	2082198		(A)7→6	712/717 nt	DEL	accessory gene regulator A (<i>agrA</i>)
507	619894	(TTTTAACA)1→2		324/483 nt	INS	monovalent cation/H ⁺ antiporter subunit E (<i>mnhE2</i>)
	1159234	(GGCGGT)1→2		1302/1368 nt	INS	signal recognition particle protein

Abreviaturas: bp, pares de bases; DEL, delección; INS, inserción; MBS, sustitución de múltiples bases; NSYN, SNP no sinónimo; nt, nucleótido; SYN, SNP sinónimo.

^a *STOP codon*: codón de terminación.

^b En los casos 214 y 407 la cepa inicial es de fenotipo salvaje y la segunda cepa de fenotipo SCV.

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *S. aureus* CAUSANTE DE INFECCIÓN PROTÉSICA ARTICULAR PERSISTENTE Y RECIDIVANTE

En este estudio se incluyeron 14 pacientes con IPA causada por *S. aureus* y tratados con DAIR, 6 presentaron fracaso terapéutico con persistencia o recidiva de la IPA y 8 evolucionaron favorablemente. Las características principales de los pacientes se encuentran descritas en la Tabla 28.

Tabla 28. Características principales de los pacientes tratados con DAIR con persistencia o recidiva de la infección y con curación.

Cepa (código)	Sexo y edad (años)	Localización prótesis	Tipo infección	Duración tratamiento antibiótico ^a (días)	Evolución
104	M, 63	Rodilla	Precoz	60	Recidiva ^b
107	M, 86	Rodilla	Hematógena	66	Recidiva ^b
409	M, 87	Cadera	Precoz	37	Recidiva ^b
401	M, 65	Rodilla	Precoz	144	Persistencia
402	V, 81	Rodilla	Hematógena	78	Persistencia
118	M, 78	Cadera	Precoz	25	Persistencia
111	V, 69	Rodilla	Precoz	82	Curación
112	M, 83	Rodilla	Hematógena	90	Curación
116	M, 62	Rodilla	Precoz	79	Curación
208	V, 53	Cadera	Precoz	93	Curación
804	M, 84	Rodilla	Hematógena	89	Curación
806	V, 37	Rodilla	Precoz	81	Curación
807	M, 63	Rodilla	Precoz	57	Curación
808	M, 72	Rodilla	Precoz	100	Curación

Abreviatura: M, mujer; V, varón.

Resultados

^a La duración del tratamiento antibiótico se consideró desde el desbridamiento hasta la retirada del antibiótico o hasta el tratamiento quirúrgico de rescate en los casos con persistencia de la infección.

^b Para los casos recidivantes el tiempo a la recidiva fue de 217 días para el caso 104, 55 para el 107 y 20 para el caso 409.

1. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DE LAS CEPAS DE *S. aureus*

Las principales características microbiológicas de las cepas de *S. aureus* se encuentran en la Tabla 29. Todas las cepas fueron sensibles a daptomicina, vancomicina, teicoplanina, linezolid, fosfomicina, cotrimoxazol, rifampicina, mupirocina y ácido fusídico. En cuanto a la meticilina, todas las cepas de *S. aureus* fueron sensibles, excepto las cepas del caso de IPA persistente 118. Ninguna cepa presentó un fenotipo h-VISA. Todas las parejas de cepas de los casos de IPAs persistentes o recidivantes presentaron el mismo fenotipo de resistencia antibiótica, excepto el caso recidivante 401, en el que la cepa 401.1 fue resistente a gentamicina y la cepa 401.2 sensible. Curiosamente, las dos cepas del caso recidivante 107 presentaron sensibilidad fenotípica a eritromicina y resistencia fenotípica a clindamicina (al contrario que como suele ser cuando hay diferencia en la sensibilidad fenotípica a ambos macrólidos) y las cepas del caso recidivante 409 presentaron resistencia fenotípica a ciprofloxacino, pero sensibilidad fenotípica a levofloxacino. No se pudo obtener un fenotipo definitivo de resistencia a antibióticos de la segunda cepa del caso recidivante 104 (cepa 104.2), al ser de fenotipo SCV. Esta cepa fue la única del estudio en el que se observó dicho fenotipo, mientras que el resto de las cepas del estudio tuvieron un fenotipo salvaje.

Tabla 29. Características microbiológicas de las cepas de *S. aureus* causantes de infección protésica articular tratada con desbridamiento, antibioterapia y retención del implante (DAIR).

Cepa^a	Resistencia antibióticos	Funcionalidad de agr	Formación de biofilm
FailRel104.1	PEN	Fuerte	Débil
FailRel104.2	†	Fuerte	Débil
FailRel107.1	PEN, CL, GEN, CIP, LEV	Negativo	Débil
FailRel107.2	PEN, CL, GEN CIP, LEV	Negativo	Débil
FailRel409.1	PEN, CIP	Débil	Débil
FailRel409.2	PEN, CIP	Débil	Moderado
FailPer401.1	PEN, GEN	Fuerte	Débil
FailPer401.2	PEN	Fuerte	Débil
FailPer402.1	PEN	Débil	Débil
FailPer402.2	PEN	Débil	Débil
FailPer118.1	PEN, MET, ER, CIP, LEV	Fuerte	Moderado
FailPer118.2	PEN, MET, ER, CIP, LEV	Fuerte	Moderado
Cure111	PEN	Fuerte	Débil
Cure112	PEN	Negativo	Débil
Cure116	PEN	Débil	Débil
Cure208	PEN, ER, CL	Negativo	Fuerte
Cure804	‡	Débil	Débil
Cure806	PEN, GEN	Fuerte	Débil
Cure807	PEN	Fuerte	Débil
Cure808	PEN	Fuerte	Débil

Abreviaturas: CIP, ciprofloxacino; CL, clindamicina; ER, eritromicina; GEN, gentamicina; LEV, levofloxacino; MET, metilina; PEN, penicilina.

Resultados

^a El nombre de las cepas causantes de recidiva de la infección lleva en su nombre “Rel” de *relapse* y las causantes de persistencia de la infección llevan “Per” de *persistence*. Estas cepas recidivantes/persistentes de cada paciente tienen el mismo número, pero la primera acabada en “.1” y la segunda en “.2”. Las cepas que tuvieron una evolución favorable llevan en su nombre la palabra “Cure”.

[†] No se pudo obtener un fenotipo definitivo de resistencia a antibióticos de la cepa FailRel104.2, al ser de fenotipo SCV.

[‡] La cepa Cure804 fue sensible a todos los antibióticos estudiados.

Todas las cepas causantes de IPA presentaron un *agr* funcional (Tabla 29), excepto las cepas causantes del caso recidivante 107 y de los casos 112 y 208, que evolucionaron favorablemente. Las cepas de un mismo paciente con IPA persistente o recidivante presentaron la misma funcionalidad de *agr*. Todas las cepas del estudio presentaron β -hemólisis en agar sangre excepto la única cepa de fenotipo SCV (104.2) que no presentó β -hemólisis. Las cepas del caso recidivante 107, además de β -hemólisis, presentaron halos turbios de hemólisis rodeando a las colonias de *S. aureus* en agar sangre por expresión de la β -hemolisina (Figura 46). Todas las cepas formaron *biofilm* (Tabla 29). Doce IPAs (12/14 [85.7%]) estuvieron causadas por cepas débilmente productoras de *biofilm*, un caso de IPA persistente (1/14 [7.1%]) por una cepa productora moderada de *biofilm* (caso 118) y sólo una IPA, que tuvo una evolución clínica favorable, fue causada por una cepa fuertemente productora de *biofilm* (caso 208). Las cepas pertenecientes a un mismo paciente con IPA persistente o recidivante tuvieron la misma formación de *biofilm*, excepto el caso de IPA persistente 409, en el que la primera cepa (409.1) fue productora débil de *biofilm* y la segunda cepa (409.2) fue productora moderada de *biofilm*.



Figura 46. Colonias de *S. aureus* del caso recidivante 107 mostrando β -hemólisis en agar sangre y halos turbios de hemólisis por expresión de la β -hemolisina.

2. FACTORES DE VIRULENCIA Y DE RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS

El perfil de resistencia antimicrobiana fenotípico y genotípico se correlacionó en la mayoría de los casos. Las cepas del caso recidivante 409, que presentaron resistencia fenotípica a ciprofloxacino, pero sensibilidad fenotípica a levofloxacino, presentaron el gen *norA* y un gen *griA* mutado, pero no el gen *gyrA* mutado, el cual también estuvo presente en las cepas con resistencia fenotípica a levofloxacino (las cepas del caso recidivante 107 y las del caso persistente 118).

En la Tabla 30 se encuentran los principales genes de virulencia presentes en todas las cepas causantes de los 14 casos de IPA y según la evolución clínica de la IPA.

Tabla 30. Genes de virulencia de todas las cepas* causantes de los 14 casos de infección protésica articular incluidos en el estudio.

Virulencia	Gen	Total casos	Persistencia/recidiva	Curación
		Nº (%), (n=14)	Nº (%), (n=6)	Nº (%), (n=8)
Proteasas	<i>splA*</i>	6 (42.9)	3 (50.0)	3 (37.5)
	<i>splB*</i>	6 (42.9)	3 (50.0)	3 (37.5)
	<i>aur</i>	14 (100.0)	6 (100.0)	8 (100.0)
Enterotoxinas	<i>seg</i>	8 (57.1)	3 (50.0)	5 (62.5)
	<i>sea</i>	4 (28.6)	1 (16.7)	3 (37.5)
Toxina shock tóxico	<i>tst1</i>	1 (7.1)	0 (0.0)	1 (12.5)
Leucocidinas	<i>lukE</i>	8 (57.1)	4 (66.7)	4 (50.0)
	<i>lukD</i>	8 (57.1)	4 (66.7)	4 (50.0)
Hemolisinas	<i>hlg</i>	14 (100.0)	6 (100.0)	8 (100.0)
	<i>hla</i>	14 (100.0)	6 (100.0)	8 (100.0)
Fagos-Hlb	<i>scn</i>	13 (92.9)	5 (83.3)	8 (100.0)
	<i>sak</i>	11 (78.6)	4 (66.7)	7 (87.5)
	<i>chp</i>	10 (71.4)	4 (66.7)	6 (75.0)
MSCRAMMs (componentes microbianos de superficie que reconocen moléculas adhesivas de la matriz)	<i>clfA</i>	11 (78.6)	5 (83.3)	6 (75.0)
	<i>clfB*</i>	10 (71.4)	3 (50.0)	7 (87.5)
	<i>cna*</i>	9 (64.3)	3 (50.0)	6 (75.0)
	<i>fnbA</i>	14 (100.0)	6 (100.0)	8 (100.0)
	<i>fnbB</i>	12 (85.7)	6 (100.0)	6 (75.0)
	<i>ebpS</i>	14 (100.0)	6 (100.0)	8 (100.0)
	<i>spa</i>	14 (100.0)	6 (100.0)	8 (100.0)
	<i>sdrC</i>	14 (100.0)	6 (100.0)	8 (100.0)
Proteínas extracelulares	<i>sdrD</i>	11 (78.6)	6 (100.0)	5 (62.5)
	<i>coA</i>	14 (100.0)	6 (100.0)	8 (100.0)
	<i>efb</i>	14 (100.0)	6 (100.0)	8 (100.0)
Formación de <i>biofilm</i>	<i>atl</i>	14 (100.0)	6 (100.0)	8 (100.0)
Motivo LPXTG	<i>sasG</i>	7 (50.0)	3 (50.0)	4 (50.0)
Biosíntesis de adhesina	<i>icaB</i>	14 (100.0)	6 (100.0)	8 (100.0)
intracelular polisacárida	<i>icaC</i>	14 (100.0)	6 (100.0)	8 (100.0)
(PIA)	<i>icaD</i>	14 (100.0)	6 (100.0)	8 (100.0)

*En los casos persistentes/recidivantes sólo se ha incluido la primera cepa para este análisis.

La β -hemolisina con inserción del fago portador de genes de evasión del sistema inmune se detectó en todas las cepas excepto en las cepas del caso de IPA recidivante 107, que además de β -hemólisis, presentaron halos turbios de hemólisis en agar sangre.

3. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR

En la Tabla 31 se encuentran los resultados de epidemiología molecular de todas las cepas de *S. aureus* del estudio: CC, MLST (ST) y *spa type*. El CC se asignó a partir del MLST. Las cepas pertenecientes a los mismos pacientes con IPAs persistentes o recidivantes pertenecieron al mismo CC, MLST y *spa type*. Las únicas cepas resistentes a metilina (las del caso de IPA persistente 118) tuvieron el SCCmec IVc.

Resultados

Tabla 31. Epidemiología molecular de las cepas de *S. aureus* causantes de infección protésica articular persistente o recidivante y con curación y, según ésta, las referencias usadas para cada cepa y análisis bioinformático.

Cepa ^a	CC	ST	<i>spa type</i>	Referencia ^b (anotación)	Referencia (variantes) ^c
FailRel104.1	15	15	-	MSSA476	MSSA476
FailRel104.2	15	15	-	MSSA476	MSSA476
FailRel107.1	398	398	-	SO385	SO385
FailRel107.2	398	398	-	SO385	SO385
FailRel409.1	188	188	-	MSSA476	MSSA476
FailRel409.2	188	188	-	MSSA476	MSSA476
FailPer401.1	45	45	t026	CA-347	CA-347
FailPer401.2	45	45	t026	CA-347	CA-347
FailPer402.1	5	5	-	N315	N315
FailPer402.2	5	5	-	N315	N315
FailPer118.1	5	125	t067	N315	N315
FailPer118.2	5	125	t067	N315	N315
Cure111.1	30	30	-	MRSA252	N315
Cure112.1	6	6	-	N315	N315
Cure116.1	5	5	-	N315	N315
Cure208.1	509	509	-	N315	N315
Cure804.1	10	10	-	N315	N315
Cure806.1	45	45	-	CA-347	N315
Cure807.1	45	45	-	CA-347	N315
Cure808.1	1	852	-	MSSA476	N315

^a El nombre de las cepas causantes de recidiva de la infección lleva en su nombre "Rel" de *relapse* y las causantes de persistencia de la infección llevan "Per" de *persistence*. Estas cepas recidivantes/persistentes de cada paciente tienen el mismo número, pero la primera acabada en ".1" y la segunda en ".2". Las cepas que tuvieron una evolución favorable llevan en su nombre la palabra "Cure".

^b Los CCs y STs de las cepas de referencia son los siguientes: MSSA476 (CC1, ST1, BX571857.1), SO385 (CC398, ST398, AM990992.1), N315 (CC5, ST5, BA000018.3), MRSA252 (CC30, ST30, BX571856.1), CA-347 (CC45, ST45, CP006044.1).

^c El estudio de variantes se realizó con la cepa de referencia N315 (CC5), ya que fue el CC mayoritario, excepto en el análisis de variantes entre las parejas de cepas aisladas inicial y posteriormente en los casos de IPAs persistentes o recidivantes, para las que se eligió la cepa de referencia más adecuada al CC de cada pareja de cepas.

4. ASOCIACIÓN DE GENES CON VARIABLES CLÍNICAS

Se realizó el análisis de asociación de genes de virulencia y de resistencia a los antibióticos con las siguientes variables clínicas de interés:

- La evolución clínica persistente o recidivante de la IPA:
 - Comparando la cepa inicial respecto a la cepa aislada posteriormente en los 6 casos con persistencia (3 casos) o recidiva (3 casos) de la IPA.
 - Comparando la cepa inicial respecto a la cepa aislada posteriormente en los 3 casos con persistencia de la IPA.
 - Comparando la cepa inicial respecto a la cepa aislada posteriormente en los 3 casos con recidiva de la IPA.
- La persistencia o recidiva de la IPA respecto a su curación:
 - Comparando las 6 cepas inicialmente aisladas en los casos de IPA persistentes o recidivante respecto a las 8 cepas de los casos que evolucionaron favorablemente.
 - Comparando las 6 segundas cepas aisladas en los casos de IPA persistente o recidivante respecto a las 8 cepas de los casos que evolucionaron favorablemente.

De todas las variables clínicas estudiadas, no se encontró asociación con la presencia de ningún gen con ninguno de los criterios usados, ni comparando las cepas causantes de IPA que evolucionaron favorablemente con las que fracasaron terapéuticamente, ni en la comparación de las cepas de los casos persistentes y recidivantes.

5. ANÁLISIS FILOGENÉTICO

El dendrograma filogenético de las 12 cepas de los 6 casos con recidiva o persistencia de la infección tratados con DAIR y de las 8 cepas causantes de IPA tratadas con DAIR que curaron, junto con los principales genes de resistencia a antibióticos y de virulencia, están representados en la Figura 47. Las cepas causantes de recidiva/persistencia de la

Resultados

infección de un mismo paciente se agruparon, además de en CCs y STs, por parejas entre ellas por su similitud genética.

Algunas parejas de cepas persistentes o recidivantes de un mismo paciente no se diferenciaron en la presencia/ausencia de genes (casos 107, 118 y 409) y el resto de las cepas de un mismo paciente se diferenciaron en genes de resistencia a antibióticos:

- La cepa 401.1, a diferencia de la cepa persistente 401.2, presentó el gen de resistencia a aminoglucósidos *aac(6')-aph(2'')*, lo que implicó que la cepa 401.1 resultara resistente a gentamicina y la cepa 401.2 sensible.
- La cepa 402.1, a diferencia de la cepa persistente 402.2, presentó la mutación H31N en el gen *dfrB*, que confiere resistencia a trimetoprim.
- La cepa 104.1, a diferencia de la cepa recidivante 104.2, presentó el gen *blaZ* (beta-lactamasa).

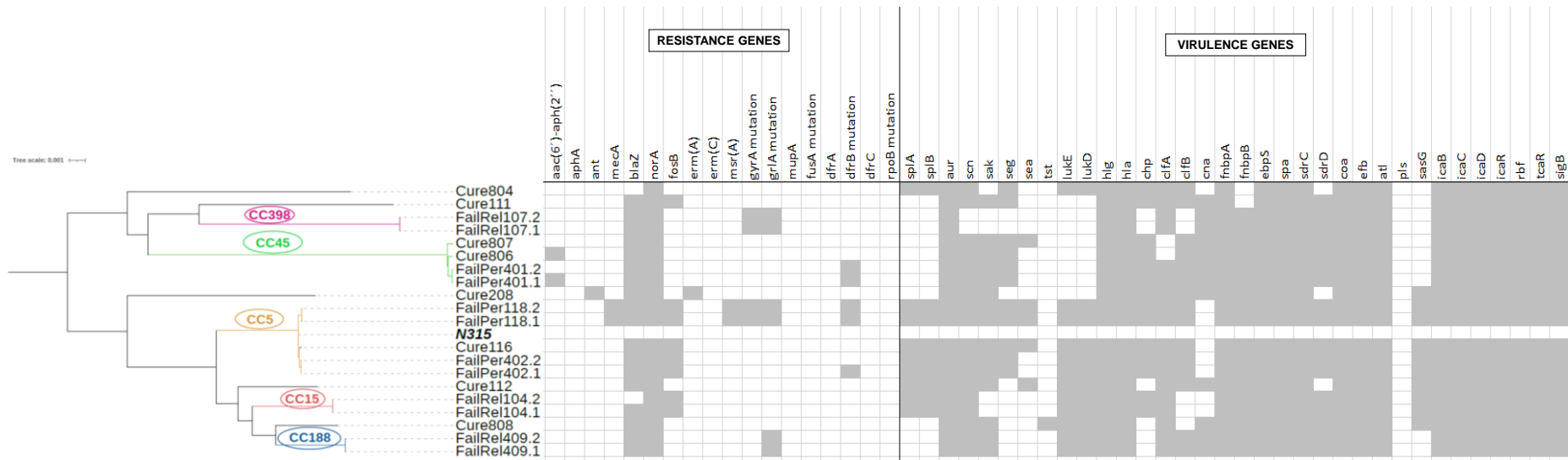


Figura 47. Dendrograma filogenético de las de las 12 cepas de los 6 casos con recidiva o persistencia de la infección tratados con DAIR y de las 8 cepas causantes de infección protésica articular tratada con DAIR que curaron, junto con los principales genes de resistencia a antibióticos y de virulencia.

Notas: Las casillas de color gris indican presencia de ese gen y las blancas ausencia del gen.
 Las cepas que tuvieron una evolución favorable llevan en su nombre la palabra "Cure".
 El nombre de las cepas causantes de recidiva de la infección lleva en su nombre "Rel" de *relapse* y las causantes de persistencia de la infección llevan "Per" de *persistence*. Estas cepas recidivantes/persistentes de cada paciente tienen el mismo número, pero la primera acabada en ".1" y la segunda en ".2".

6. ESTUDIO DE VARIANTES ENTRE CEPAS

En el análisis de variantes se compararon las mismas cepas que en el análisis de asociación, y, además, también se analizaron las variantes entre las parejas de cepas inicial y su segundo aislamiento en cada uno de los 6 casos de IPA persistente o recidivante.

En el análisis de variantes que se realizó entre las cepas de *S. aureus* causantes de IPA persistente o recidivante y las cepas causantes de IPA con evolución clínica favorable no se encontró ninguna variante presente en todas las cepas primeras que recidivaron/persistieron y que no estuviera en las que curaron, y viceversa. Del mismo modo, no se encontró ninguna variante presente en todas las cepas segundas de los casos de IPA que recidivaron/persistieron y que no estuviera en las que curaron, y viceversa.

En cuanto al análisis de variantes que se realizó entre las cepas causantes de IPA persistente o recidivante en la Tabla 32 se describe el número de variantes de cada cepa causante de IPA recidivante o persistente con la referencia utilizada y el número de variantes totales entre cada pareja de cepas de un mismo paciente y tras el filtrado de variantes realizado (SNPs no sinónimos, SNPs sinónimos, sustituciones de múltiples bases, inserciones y deleciones que no se encontraban en proteínas presuntivas e hipotéticas, ni en regiones intergénicas ni en pseudogenes).

Tabla 32. Número de variantes de cada cepa causante de infección protésica articular recidivante o persistente con la referencia y número de variantes totales de diferencia entre las parejas de cepas de un mismo paciente y entre esas parejas tras el filtrado de variantes por tipo de variante.

Cepa ^a	Referencia	% Alineamiento	Nº variantes totales con referencia	Nº variantes de diferencia entre parejas de cepas con la referencia: totales y tipos tras el filtrado de variantes					
				Total	SNPs no sinónimos	SNPs sinónimos	Sustituciones de múltiples bases		
							Inserciones	Delecciones	
FailRel104.1	MSSA476	87.9	16439	407	34	45	23	1	8
FailRel104.2		93.0	16285						
FailRel107.1	SO385	93.2	345	21	1	2	0	0	0
FailRel107.2		92.8	352						
FailRel409.1	MSSA476	89.0	18554	237	16	27	12	2	1
FailRel409.2		87.1	18578						
FailPer401.1	CA-347	91.5	1536	18	3	0	0	2	3
FailPer401.2		94.4	1550						
FailPer402.1	N315	90.8	1281	21	0	0	0	0	0
FailPer402.2		91.3	1271						
FailPer118.1	N315	91.1	891	19	0	0	0	0	1
FailPer118.2		90.9	892						

^a El nombre de las cepas causantes de recidiva de la infección lleva en su nombre “Rel” de *relapse* y las causantes de persistencia de la infección llevan “Per” de *persistence*. Estas cepas recidivantes/persistentes de cada paciente tienen el mismo número, pero la primera acabada en “.1” y la segunda en “.2”.

En la Tabla 33 se detallan las variantes entre cada pareja de cepas de un mismo paciente con IPA persistente o recidivante, tras el filtrado de variantes. Las variantes se produjeron en una gran diversidad de genes virulencia. En los casos recidivantes 104 y 409 encontramos el mismo SNP no sinónimo en el gen *fnbA* entre cada cepa inicial y la recidivante: Q819H (referencia MSSA476 [BX571857.1]).

Resultados

Tabla 33. Variantes entre parejas de cepas de *S. aureus* de un mismo paciente con infección protésica articular persistente o recidivante.

Cepas ^a	Posiciones de nucleótidos	Cepa inicial	Cepa recidivante/ persistente	Anotación	Tipo de mutaciones	Descripción (gen)	
FailRel104 ^b	82110	A	C	G57G	SYN	lipoprotein	
	126756		Δ8 bp	83-90/741 nt	DEL	GntR family regulatory protein	
	241537-243250				4 MBS, 3 NSYN, 5 SYN	staphylocoagulase precursor	
	428158-431375				6 MBS, 11 NSYN, 4 SYN	exotoxin	
	437491-437497				3 NSYN	exotoxin5	
	442703, 442706				SYN, NSYN	exotoxin	
	446421-448928				5 NSYN, 6 SYN, 1 MBS	lipoprotein	
	479985, 479991				2 SYN	glutamate synthase, small subunit	
	560689		Δ3 bp	343-345/1401 nt	DEL	cysteinyI-tRNA synthetase	
	598737	T	A	A364A	SYN	serine-aspartate repeat-containing protein D (<i>sdrD</i>)	
	604977	C	T	D947D	SYN	bone sialoprotein-binding protein	
	842802, 842812				MBS, SYN	clumping factor A (<i>clfA</i>)	
	946908-947417				3 SYN, 1 DEL, 1 MBS	transport system extracellular binding lipoprotein	
	1059255			+TGTTGGTTTCG ACGGTGT	1279/3753 nt	INS	bifunctional autolysin precursor
	1388164, 1388182					MBS, SYN	topoisomerase IV subunit A
	1883013	C	T	A234T		NSYN	serine protease
2088541-2088547					3SYN	autoinducer sensor protein	

Resultados

	2275393-2275829				2 DEL, 4 NSYN, 1 SYN, 1 MBS	hyaluronate lyase precursor 2
	2464027		Δ4 bp	126-129/780 nt	DEL	extracellular solute-binding lipoprotein
	2538425-2538596				6 SYN, 1 NSYN, 4MBS	lipoprotein
	2557255-2558646				2 SYN, 2MBS	fibronectin-binding protein B precursor (<i>fnbB</i>)
	2560605-2562933				5 NSYN, 7 SYN, 2 MBS, 2 DEL	fibronectin-binding protein A precursor (<i>fnbA</i>)
FailRel107	915183	A	G	G139D	NSYN	lpxtg-motif cell wall anchor domain
	1642042	T	C	Y18Y	SYN	integrase
	1699959	A	C	T582T	SYN	penicillin-binding Protein dimerisation domain family
	81598-83027				6 NSYN, 6 SYN, 3 MBS	lipoprotein
	98820	G	A	G298G	SYN	immunoglobulin G binding protein A precursor
	243016	C	T	N532N	SYN	staphylocoagulase precursor
	431559, 431562				2 NSYN	exotoxin
	598737	A	T	A364A	SYN	serine-aspartate repeat-containing protein D (<i>sdrD</i>)
	843649	G	T	V867V	SYN	clumping factor A (<i>clfA</i>)
FailRel409	1059255	+TGTTGGTTTCG ACGGTGT		1279/3753 nt	INS	bifunctional autolysin precursor
	1148233		+68 bp	931/939 nt	INS	ribonuclease HIII
	1622493, 1622511				DEL, NSYN	DNA primase
	2088515		3 bp→CTC	610-612/1293 nt	MBS	autoinducer sensor protein
	2496948-2497602				7 SYN, 1 NSYN, 7MBS	protein flp
	2538455, 2539355				SYN, MBS, NSYN	exported protein (lipoprotein)

Resultados

	2560599-2562279				5 SYN, 3 NSYN	fibronectin-binding protein A precursor (<i>fnbA</i>)
	2567893-2567901				2 SYN, 2 NSYN	MerR family regulatory protein
	2700008, 2700011				2 SYN	fibrinogen and keratin-10 binding surface anchored protein
FailPer401	19218		+G	874/1968 nt	INS	DHHA1 domain protein
	103426	T	A	I503F	NSYN	N-acetyl-ornithine/N-acetyl-lysine deacetylase family protein
	199157		Δ 131 bp	730-860/960 nt	DEL	cation diffusion facilitator transporter family protein
	1197044	A	C	K309Q	NSYN	methionyl-tRNA formyltransferase (<i>fmt</i>)
	1598596		Δ 8 bp	695-702/1020 nt	DEL	maltose operon transcriptional repressor-like protein
	2042765		Δ 107 bp	1167-1273/1539 nt	DEL	sodium/proline symporter (<i>putP</i>)
	2215085	A	T	N169I	NSYN	ATP synthase F1, gamma subunit (<i>atpG</i>)
	2397306		+T	193/348 nt	INS	transcriptional regulator family protein
FailPer402	No se observaron variantes en las cepas del caso de IPA 402					
FailPer118	1696986	(AATG)3→4		11/561 nt	DEL	DNA-3-methyladenine glycosidase

Abreviaturas: bp, pares de bases; DEL, delección; INS, inserción; MBS, sustitución de múltiples bases; NSYN, SNP no sinónimo; nt, nucleótido; SYN, SNP sinónimo.

Se agruparon las variantes de una misma proteína y, por tanto, no se mostró la anotación de esas variantes.

^a El nombre de las cepas causantes de recidiva de la infección lleva en su nombre “Rel” de *relapse* y las causantes de persistencia de la infección llevan “Per” de *persistence*.

^b La cepa inicial del caso 104 es de fenotipo salvaje y la cepa recidivante es de fenotipo SCV.

No se encontró ninguna variante presente en todas las cepas inicialmente aisladas que recidivaron/persistieron y que no estuviera en sus aislamientos posteriores (ni viceversa) en los 6 casos de IPAs persistentes y recidivantes, del mismo modo que en los 3 casos de IPA persistente y en los 3 casos de IPA recidivante.

Resultados

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL COMPLEJO CLONAL CC5 DE *S. aureus* RESISTENTE A METICILINA CAUSANTE DE INFECCIÓN ARTICULAR

Se incluyeron un total de 38 cepas de SARM pertenecientes al complejo clonal CC5 causantes de infección articular en 8 hospitales de la Comunidad de Madrid. En cuanto al tipo de infección articular, 5 casos (5/38 [13.2%]) fueron artritis nativa del H. Universitario 12 de Octubre desde 2005 hasta 2015 y 33 casos (33/38 [86.8%]) fueron IPA de diferentes hospitales de la Comunidad de Madrid desde 2005 hasta mayo de 2017. La distribución de los 38 casos por año fue: 4 (10.5%) de 2005, 3 (7.9%) de 2006, 4 (10.5%) de 2007, 2 (5.3%) de 2008, 1 (2.6%) de 2009, 3 (7.9%) de 2011, 1 (2.6%) de 2013, 5 (13.2%) de 2014, 9 (23.7%) de 2016 y 6 (15.8%) de 2017. La distribución de los 38 casos por hospitales fue: 27 (71.7%) del hospital 1, 2 (5.3%) del hospital 2, 1 (2.6%) del hospital 3, 3 (7.9%) del hospital 4, 2 (5.3%) del hospital 5 y 1 (2.6%) del hospital 6, 7 y 8.

La mayoría de las cepas presentaron β -hemólisis en agar sangre (33/38 [86.8%]) y la mitad de ellas (22/38 [57.9%]) un *agr* funcional. En la Tabla 34 se observan las características generales de las 38 cepas incluidas en el estudio y los datos de epidemiología molecular. El ST mayoritario fue el 125 (33/38 [86.8%]). También hubo 3 cepas (3/38 [7.9%]) con ST5 y 2 cepas (2/38 [5.3%]) pertenecientes al ST228. En cuanto al tipado de *spa*, la mayoría de las cepas pertenecieron al t067 (29/38 [76.3%]). Dos cepas (2/38 [5.3%]) pertenecieron al t002 y otras dos al t1954 y después hubo una cepa (1/38 [2.6%]) perteneciente a cada uno de los siguientes tipos de *spa*: t2173, t837, t062, t1399 y t285. Todas las cepas excepto una (37/38 [97.4%]) presentaron el SCCmec tipo IVc.

Resultados

Tabla 34. Características generales de las 38 cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina del complejo clonal CC5 causantes de infección articular y su epidemiología molecular.

Cepa ^a	Tipo de infección	Fecha	Hospital	ST	<i>spa</i>	<i>SCCmec</i>
SAi01_09H1	Artritis nativa	20-04-09	1	125	t067	IVc
SAi02_13H1	Artritis nativa	01-02-13	1	5	t002	IVc
SAi03_05H1	Artritis nativa	23-07-05	1	125	t067	IVc
SAi04_06H1	Artritis nativa	13-01-06	1	125	t067	IVc
SAi06_06H1	Artritis nativa	11-08-06	1	125	t067	IVc
SAi07_08H1	IPA	25-04-08	1	125	t1399	IVc
SAi08_08H1	IPA	16-07-08	1	228	t2851	I
SAi09_05H1	IPA	30-04-05	1	125	t067	IVc
SAi10_07H1	IPA	06-07-07	1	125	t067	IVc
SAi11_07H1	IPA	01-09-07	1	125	t067	IVc
SAi12_07H1	IPA	02-03-07	1	125	t067	IVc
SAi13_14H1	IPA	11-02-14	1	125	t067	IVc
SAi14_14H1	IPA	30-01-14	1	125	t067	IVc
SAi15_11H1	IPA	08-04-11	1	125	t067	IVc
SAi16_11H1	IPA	28-07-11	1	125	t837	IVc
SAi17_14H1	IPA	05-05-14	1	125	t1954	IVc
SAi18_05H1	IPA	14-02-05	1	125	t067	IVc
SAi19_07H1	IPA	12-02-07	1	125	t067	IVc
SAi20_11H1	IPA	21-09-11	1	125	t067	IVc
SAi21_05H1	IPA	29-01-05	1	125	t067	IVc
SAi22_06H1	IPA	06-04-06	1	125	t067	IVc
SAi23_14H1	IPA	27-11-14	1	125	t067	IVc
SAi24_14H1	IPA	22-09-14	1	125	t067	IVc
SAi25_16H3	IPA	11-06-16	3	125	t067	IVc
SAi26_16H5	IPA	16-06-16	5	125	t067	IVc
SAi28_16H5	IPA	25-07-16	5	125	t067	IVc

SAi29_16H2	IPA	07-07-16	2	125	t067	IVc
SAi30_16H2	IPA	05-08-16	2	125	t067	IVc
SAi31_16H1	IPA	22-09-16	1	5	t2173	IVc
SAi32_16H4	IPA	27-05-16	4	125	t067	IVc
SAi34_16H6	IPA	27-09-16	6	125	t067	IVc
SAi35_16H1	IPA	03-11-16	1	125	t067	IVc
SAi37_17H4	IPA	16-01-17	4	125	t067	IVc
SAi38_17H7	IPA	13-03-17	7	5	t002	IVc
SAi39_17H4	IPA	16-03-17	4	125	t067	IVc
SAi40_17H8	IPA	10-03-17	8	125	t067	IVc
SAi41_17H1	IPA	17-04-17	1	125	t1954	IVc
SAi42_17H1	IPA	16-05-17	1	228	t062	IVc

Abreviaturas: IPA, infección protésica articular.

^a Las cepas fueron nombradas con las iniciales SA (de *Staphylococcus aureus*), seguido de la letra i y de un número para su rápida identificación; después de una barra baja aparecen dos números que se corresponden con el año de la cepa (por ejemplo 09 se corresponde con el año 2009), y, por último, aparece una H de hospital y un número que se corresponde con el identificador del hospital.

El perfil fenotípico y genotípico de resistencia a antibióticos se recoge en la Tabla 35. Todas las cepas fueron sensibles a vancomicina, teicoplanina, daptomicina, linezolid y cotrimoxazol. El perfil de resistencia fenotípica a antimicrobianos se relacionó con los genes de resistencia detectados por SGC en la mayoría de los casos.

Resultados

Tabla 35. Resistencia antimicrobiana fenotípica y genotípica de las cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina del complejo clonal CC5 causantes de infección articular.

Tipo de antibiótico	Fenotipo de resistencia (n=38), Nº (%)		Genotipo de resistencia (n=38), Nº (%)	
Betalactámicos	Penicilina	38 (100.0)	<i>blaZ</i>	30 (78.9)
	Meticilina	38 (100.0)	<i>mecA</i>	38 (100.0)
Aminoglucósidos	Gentamicina	9 (23.7)	<i>aadD</i>	28 (73.7)
			<i>aac(6')-aph(2'')</i>	4 (10.5)
			<i>aph(3')-III</i>	18 (47.4)
			<i>ant(6)-Ia</i>	18 (47.4)
			<i>spc</i>	1 (2.6)
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacino	35 (92.1)	<i>norA</i>	38 (100.0)
	Levofloxacino	36 (94.7)	Mutación <i>gyrA</i> (33 S84L, 4 S85P)	36 (94.7)
			Mutación <i>grlA</i> (S80F)	36 (94.7)
Macrólidos	Eritromicina	30 (78.9)	<i>erm(A)</i>	1 (2.6)
	Clindamicina	11 (28.9)	<i>erm(C)</i>	8 (21.1)
Macrólidos, lincosamidas, estreptogramina B			<i>mph(C)</i>	26 (68.4)
			<i>msr(A)</i>	26 (68.4)
Trimetoprim	Cotrimoxazol	0 (0.0)	<i>dfrA</i>	3 (7.9)
			Mutación <i>dfrB</i> H31N	3 (7.9)
			<i>dfrC</i>	3 (7.9)
Fosfomicina	Fosfomicina	4 (10.5)	<i>fosB</i>	3 (7.9)
Mupirocina ^a	Mupirocina	7 (18.4)	<i>mupA</i>	6 (15.8)
Ácido fusídico	Ácido fusídico	1 (2.6)	Mutación <i>fusA</i> (V90I)	1 (2.6)
Rifampicina	Rifampicina	2 (5.3)	Mutación <i>rpoB</i> (1 H481Y, 1 S486L)	2 (5.3)

^a La única cepa con resistencia a mupirocina que no portó el gen *mupA* presentó una resistencia intermedia a mupirocina (CMI = 6 mg/L)

Los genes de virulencia presentes en las 38 cepas de *S. aureus* causantes de infección articular están descritos en la Tabla 36. Éstos mostraron una distribución homogénea entre las cepas estudiadas, estando altamente representados los genes asociados a la adhesión celular y a la formación de *biofilm*.

Tabla 36. Genes de virulencia de las cepas de *S. aureus* causantes de infección articular.

Virulencia	Gen	Nº (%), (n=38)
Proteasas	<i>splA</i>	29 (76.3)
	<i>splB</i>	31 (81.6)
	<i>aur</i>	38 (100.0)
Enterotoxinas	<i>seg</i>	1 (2.6)
	<i>sem</i>	1 (2.6)
	<i>sei</i>	1 (2.6)
	<i>seo</i>	1 (2.6)
	<i>sen</i>	1 (2.6)
	<i>sed</i>	1 (2.6)
	<i>sej</i>	1 (2.6)
	<i>ser</i>	1 (2.6)
	<i>sea/sep</i>	21 (55.3)
Toxina shock tóxico	<i>tst1</i>	1 (2.6)
Hlg y leucocidinas	<i>lukE</i>	6 (15.8)
	<i>lukD</i>	5 (13.2)
	<i>hlgA</i>	38 (100.0)
	<i>hlgB</i>	38 (100.0)
	<i>hlgC</i>	38 (100.0)
Hemolisinas	<i>hla</i>	38 (100.0)
	<i>hlb</i>	38 (100.0)
Hlb-fagos	<i>scn</i>	25 (65.8)

Resultados

	<i>sak</i>	24 (63.2)
	<i>chp</i>	22 (57.9)
	<i>clfA</i>	24 (63.2)
	<i>clfB</i>	19 (50.0)
	<i>cna</i>	0 (0.0)
MSCRAMMs (componentes microbianos de superficie que reconocen moléculas adhesivas de la matriz)	<i>fnbA</i>	36 (94.7)
	<i>fnbB</i>	35 (92.1)
	<i>ebpS</i>	38 (100.0)
	<i>spa</i>	38 (100.0)
	<i>sdrC</i>	32 (84.2)
	<i>sdrD</i>	38 (100.0)
	<i>sdrE</i>	30 (78.9)
	<i>coa</i>	38 (100.0)
	<i>eap</i>	38 (100.0)
	<i>emp</i>	38 (100.0)
Proteínas extracelulares	<i>efb</i>	38 (100.0)
	<i>hyp1</i>	38 (100.0)
	<i>vWbp</i>	38 (100.0)
	<i>hyp2</i>	38 (100.0)
Formación <i>biofilm</i>	<i>atl</i>	38 (100.0)
	<i>aap</i>	38 (100.0)
Antiadhesina	<i>pls</i>	6 (15.8)
Motivo LPXTG	<i>sasG</i>	38 (100.0)
	<i>sasH</i>	38 (100.0)
Proteínas hipotéticas de superficie	<i>hyp surface proteins (otros sas)</i>	38 (100.0)
	<i>icaA</i>	38 (100.0)
Biosíntesis de adhesina intracelular polisacárida (PIA)	<i>icaB</i>	38 (100.0)
	<i>icaC</i>	38 (100.0)
	<i>icaD</i>	29 (76.3)
Regulación formación <i>biofilm</i> , biosíntesis PIA	<i>icaR</i>	38 (100.0)
	<i>rbf</i>	38 (100.0)

Regulación de formación de <i>biofilm</i>	<i>tcaR</i>	38 (100.0)
	<i>sarA</i>	38 (100.0)
	<i>sigB</i>	38 (100.0)

Se analizó la asociación de las características fenotípicas y genotípicas de las cepas de *S. aureus* con el tipo de infección articular (artritis nativa vs IPA), con el hospital de procedencia y con el período de tiempo (desde 2005 hasta 2010 y desde 2011 hasta 2017). No se observaron diferencias significativas de genes de resistencia y de virulencia respecto al tipo de infección articular. En cuanto a los distintos hospitales, las cepas del hospital 2 mostraron una mayor sensibilidad fenotípica a fluoroquinolonas que las del resto de hospitales (2/2 [100.0%] vs 1/36 [2.8%], $p=0.004$) y las del hospital 5 mostraron una mayor prevalencia de los genes *lukD* y *lukE* que las del resto de hospitales (2/2 [100.0%] vs 3/36 [8.3%], $p=0.014$ y 2/2 [100.0%] vs 4/36 [11.1%], $p=0.021$; respectivamente). Respecto a la evolución temporal del complejo clonal CC5 se observó una mayor presencia del gen de resistencia a aminoglucósidos *aph(3')-III* en las cepas aisladas durante el período de 2005 a 2010 con respecto a las aisladas en el período de 2011 a 2017 (10/14 [71.4%] vs 8/24 [33.3%], $p=0.023$). Del mismo modo ocurrió con el gen *ant(6)-Ia* (10/14 [71.4%] vs 8/24 [33.3%], $p=0.023$). Sin embargo, se observó una menor presencia del gen *fnbB* en el período de 2005 a 2010 respecto al período de 2011 a 2017 (11/14 [78.6%] vs 24/24 [100.0%], $p=0.043$).

En la Figura 48 se observa el dendrograma filogenético de las 38 cepas de *S. aureus* causantes de infección articular, junto con el descriptivo de genes de resistencia y de virulencia de cada una de las cepas. En el árbol filogenético se observaron dos *clusters* claramente diferenciados: uno formado por el ST228 (2 cepas) y otro formado por el ST5 (3 cepas) y por el ST125 (33 cepas). El *cluster* que agrupó a las cepas ST125 incluyó 4 *spa types* diferentes, y no se asoció con el hospital de origen, ni con el año de aislamiento. Los SNPs de diferencia entre cepas varió desde 18 (entre SAi03_05H1 y SAi24_14H1) a 478 (entre SAi38_17H7 y SAi42_17H1) (Figura 49).

Resultados

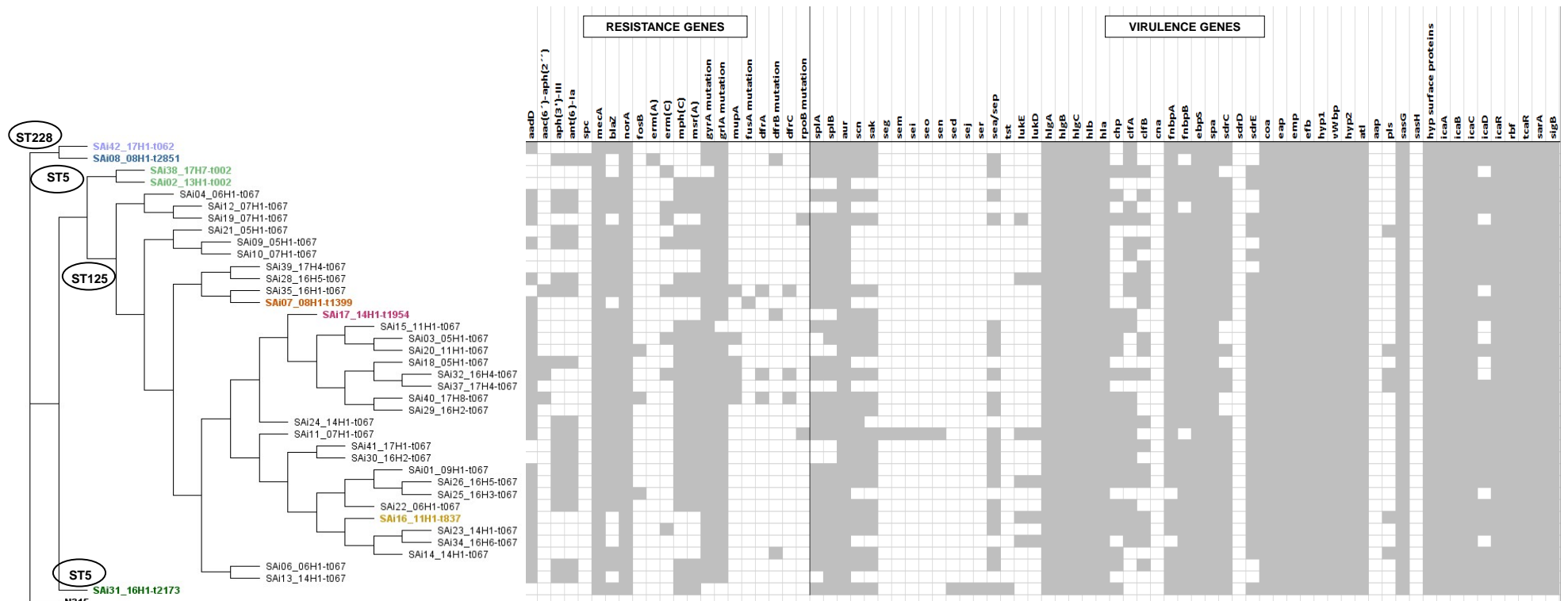


Figura 48. Dendrograma filogenético de las 38 cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina pertenecientes al complejo clonal CC5 causantes de infección articular, junto con los principales genes de resistencia y de virulencia.

Notas: Las casillas de color gris indican presencia de ese gen y las blancas ausencia del gen. Las cepas fueron nombradas con las iniciales SA (de *Staphylococcus aureus*), seguido de la letra i y de un número para su rápida identificación; después de una barra baja aparecen dos números que se corresponden con el año de la cepa (por ejemplo 09 se corresponde con el año 2009), y, por último, aparece una H de hospital y un número que se corresponde con el identificador del hospital. A continuación, aparece el *spa* type. Las cepas de un mismo color pertenecen a un mismo *spa* type.

N315	SAI0_0...	SAI1_0...	SAI2_0...	SAI3_1...	SAI4_1...	SAI5_1...	SAI6_1...	SAI7_1...	SAI8_0...	SAI9_0...	SAI0_0...	SAI20_1...	SAI21_0...	SAI22_0...	SAI23_1...	SAI24_1...	SAI25_1...	SAI26_1...	SAI28_1...	SAI29_1...	SAI02_1...	SAI30_1...	SAI31_1...	SAI32_1...	SAI34_1...	SAI35_1...	SAI37_1...	SAI38_1...	SAI39_1...	SAI03_0...	SAI40_1...	SAI41_1...	SAI42_1...	SAI04_0...	SAI06_0...	SAI07_0...	SAI08_0...	SAI09_0...	
N315	330	321	321	358	350	344	343	335	341	315	336	328	340	321	352	298	370	354	361	346	361	366	324	362	357	374	357	380	340	316	350	376	358	325	323	335	350	319	
SAI0_0H1-067	330	77	77	114	106	100	99	91	97	71	92	84	96	77	108	54	126	110	117	102	337	122	392	118	113	130	113	358	96	72	106	132	424	81	79	93	416	73	
SAI1_0H1-067	321	77	68	68	67	71	69	66	60	66	62	59	53	87	44	75	23	91	77	106	71	328	89	383	87	80	119	82	349	85	41	75	99	415	72	52	82	407	66
SAI2_0H1-067	321	77	68	105	97	91	90	82	88	34	83	75	87	68	99	45	117	101	108	93	328	113	383	109	104	121	104	349	87	63	97	123	415	44	70	84	407	66	
SAI3_1H1-067	358	114	97	105	116	110	109	101	107	99	102	94	124	87	118	64	136	130	143	112	365	130	420	138	133	154	133	396	122	82	115	142	452	109	89	119	444	103	
SAI4_1H1-067	350	108	71	97	116	98	63	89	95	91	76	82	116	81	46	52	108	94	135	100	357	118	412	116	51	146	111	378	114	70	104	138	444	101	81	111	436	93	
SAI5_1H1-067	344	100	69	91	110	98	91	83	75	85	84	54	110	69	100	46	118	102	129	80	351	114	406	96	105	142	91	372	108	42	84	124	438	95	75	105	430	89	
SAI6_1H1-1837	343	99	66	90	109	63	91	82	88	84	69	75	109	54	65	45	103	87	128	93	350	111	405	109	70	141	104	371	107	63	97	121	437	94	74	104	429	86	
SAI7_1H1-11954	335	91	60	82	101	89	83	82	80	76	75	67	101	60	91	37	109	93	120	85	342	105	397	101	96	133	96	363	99	55	89	115	429	86	66	96	421	80	
SAI8_0H1-067	341	97	66	88	107	95	75	88	80	82	81	59	107	66	97	43	115	99	126	77	348	111	403	87	102	139	82	369	105	47	81	121	435	92	72	102	427	86	
SAI9_0H1-067	315	71	62	34	99	91	85	84	76	82	77	69	81	62	93	39	111	95	102	87	322	107	377	103	98	115	98	343	81	57	91	117	409	38	64	78	401	60	
SAI0_0H1-067	326	92	59	93	102	76	94	69	75	81	77	68	102	37	78	38	70	54	121	86	343	104	398	102	83	134	97	364	100	56	90	114	430	87	67	97	422	79	
SAI0_1H1-067	328	84	53	75	94	82	54	75	67	59	68	94	83	84	30	102	86	113	64	295	98	290	80	89	126	75	256	92	35	68	108	422	79	59	89	414	73		
SAI21_0H1-067	340	96	87	87	124	116	110	109	101	107	81	102	94	87	118	64	136	120	127	112	347	132	402	128	123	140	123	368	106	82	116	142	434	91	89	103	426	85	
SAI22_0H1-067	321	77	44	48	97	61	69	54	60	66	62	37	53	87	63	23	71	55	106	71	328	89	383	87	66	119	82	349	85	41	75	99	415	72	52	82	407	64	
SAI23_1H1-067	352	108	75	99	118	46	100	65	91	97	93	78	84	118	63	54	112	96	137	102	359	120	414	118	45	150	113	380	116	72	104	130	446	103	83	113	438	95	
SAI24_1H1-067	298	54	23	45	64	52	46	45	37	43	39	38	30	64	23	54	72	56	83	48	305	68	360	64	59	96	59	326	62	18	52	78	392	49	29	59	384	43	
SAI25_1H3-067	370	126	91	117	136	108	118	103	109	115	111	70	102	136	71	112	72	40	155	120	377	138	432	136	117	168	131	398	134	90	124	148	464	121	101	131	456	113	
SAI26_1H5-067	354	110	77	101	120	94	102	67	93	99	95	54	86	120	55	96	56	40	139	104	361	122	416	120	101	152	115	382	118	74	108	132	448	105	85	115	440	97	
SAI28_1H5-067	351	117	106	108	143	135	129	138	130	126	102	131	113	127	106	137	83	155	139	131	348	151	423	147	142	145	142	399	97	101	135	161	455	112	108	108	447	106	
SAI29_1H2-067	346	102	71	93	112	100	80	93	85	77	87	86	64	112	71	102	48	120	104	131	353	116	408	98	107	144	93	374	110	52	78	126	440	97	77	107	432	91	
SAI02_1H1-0002	361	337	328	328	365	357	351	350	342	348	322	343	335	347	328	359	305	377	361	368	353	373	423	369	394	381	384	317	347	323	357	383	456	332	330	342	447	326	
SAI30_1H2-067	366	122	89	113	130	118	114	111	105	111	107	104	98	132	89	120	68	138	122	151	116	373	428	132	125	162	127	394	130	86	120	132	460	117	97	127	452	111	
SAI31_1H1-12173	324	392	383	383	420	412	406	405	397	403	377	398	390	402	383	414	360	432	416	423	408	423	428	424	419	436	419	442	402	378	412	438	424	387	385	397	414	381	
SAI32_1H4-067	362	118	67	109	128	116	96	109	101	87	67	103	102	80	128	87	118	64	136	120	147	98	369	132	424	123	160	95	390	126	68	102	142	456	113	93	123	448	107
SAI33_1H4-067	357	113	80	104	123	51	105	70	96	102	98	83	89	123	68	45	59	117	101	142	107	364	125	419	123	155	118	385	121	77	111	135	451	108	88	118	443	100	
SAI35_1H1-067	374	130	119	121	184	142	141	133	139	115	134	140	119	150	96	168	152	145	144	381	162	436	160	155	115	402	134	114	148	174	488	125	121	119	460	119			
SAI37_1H4-067	357	113	82	104	123	111	91	104	96	82	98	87	75	123	82	113	59	131	115	142	93	384	127	419	95	118	155	395	121	63	97	137	451	108	86	118	443	102	
SAI38_1H7-0002	380	358	349	349	386	378	372	371	383	369	343	364	356	368	349	380	326	398	382	389	374	317	394	442	390	385	402	385	368	344	378	404	478	353	351	363	468	347	
SAI39_1H4-067	340	96	85	87	122	114	108	107	99	105	81	100	92	106	85	116	62	134	118	97	110	347	130	402	126	121	124	121	368	80	114	140	434	91	87	87	426	85	
SAI03_0H1-067	316	72	41	63	82	70	42	63	55	47	57	56	26	82	41	72	18	90	74	101	52	323	86	378	68	77	114	63	344	80	56	96	410	67	47	77	402	61	
SAI40_1H8-067	350	106	75	97	116	104	84	97	89	81	91	90	68	116	75	104	52	124	108	135	78	357	120	412	102	111	148	97	378	114	56	130	444	101	81	111	436	95	
SAI41_1H1-067	376	132	99	123	142	128	124	121	115	121	117	114	108	142	99	130	78	148	132	161	126	383	132	438	142	135	174	137	404	140	96	130	470	127	107	137	462	121	
SAI42_1H1-062	358	424	415	415	452	444	438	437	429	425	409	420	422	424	415	446	372	484	448	455	440	456	460	424	456														

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

El tratamiento de la infección articular producida por *S. aureus*, tanto de la artritis nativa como de la IPA, es muy complejo y supone un gran desafío. Son infecciones con una tasa de fracaso terapéutico elevada y producen una gran morbilidad en los pacientes. Los parámetros clínicos que predicen el fracaso en la infección articular han sido estudiados previamente, sin embargo, la influencia del conjunto de las características fenotípicas y genotípicas del patógeno resulta actualmente muy poco conocida. El estudio de la influencia de los aspectos microbiológicos sobre la evolución clínica de los pacientes con infección articular se ha limitado clásicamente a las especies bacterianas y al patrón de sensibilidad a los antibióticos.

En la presente tesis doctoral, se ha investigado exhaustivamente la relación entre las características clínicas y microbiológicas (fenotípicas y genotípicas) de la infección articular estafilocócica, proporcionando una valiosa información sobre la patogenia y el pronóstico de la infección articular causada por *S. aureus*. Se ha analizado un grupo extenso de casos de artritis nativa y de IPA. En conjunto, la infección articular producida por *S. aureus* tiene una presencia de SARM en nuestro medio del 23%, siendo el complejo clonal CC5 el más representado, sobre todo entre las cepas de SARM. En las cepas de SASM el CC más frecuente fue CC30.

1. ARTRITIS SÉPTICA NATIVA PRODUCIDA POR *S. aureus*

Entre las características microbiológicas y moleculares de *S. aureus* que pueden influir en la evolución clínica de la artritis nativa, la resistencia a la meticilina es la única que ha sido estudiada en profundidad. La incidencia de infección ósea y articular causada por SARM depende en gran medida de la epidemiología local, pero en general parece que está aumentando (98,177). La frecuencia de infección por SARM en nuestro estudio (24,1%) fue semejante a la de otros (98–101,178). El porcentaje de varones fue más elevado que el esperado en la población general, del mismo modo que en otros estudios de artritis séptica nativa (98,101,179). Como en estudios anteriores, observamos una asociación entre la infección por SARM y la edad, las comorbilidades y las infecciones relacionadas con los cuidados sanitarios y adquiridas en el hospital (9,98,99,101,180,181). Por otro lado, las cepas de SASM estuvieron más frecuentemente asociadas al ámbito comunitario y causaron una artritis nativa más inflamatoria. En la Tabla 37 se muestra una revisión de la literatura de los estudios sobre artritis nativa producida por *S. aureus* publicados en la literatura desde 2005 hasta 2020.

Tabla 37. Series de casos de artritis nativa producida por *S. aureus* publicados en la literatura (2005-2020).

Referencia	Diseño	Tamaño muestral	Bacteriemia	Otras infecciones	Cirugía	Duración de la terapia	Mortalidad
Ross y Davidson, 2005 ^a (99)	Retrospectivo 2 centros	59 (15 SARM)	9/15 (60%)	5/15 (33%)	9/15 (60%)	ND	3/15 (20%)
Al-Nammari et al, 2007 (98)	Retrospectivo 1 centro	58 (15 SARM/43 SASM)	ND	SARM 80% SASM 55%	SARM 80% SASM 83%	SARM 43 días SASM 42 días	SARM 26% SASM 7%
Frazeo et al, 2009 ^{a,b} (182)	Retrospectivo 2 centros	12 (6 SARM/4 SASM)	SARM 2/6 (33%) SASM 1/2 (50%)	ND	ND	ND	ND
Fangtham y Baer, 2012 (180)	Revisión de literatura	56 (todos SARM)	ND	ND	ND	ND	16%
Helito et al, 2015 (178)	Retrospectivo 1 centro	35 (13 SARM/22 SASM)	ND	ND	ND	ND	ND
Lin et al, 2015 ^b (101)	Retrospectivo 2 centros	93 (38 SARM/55 SASM)	28 (30%)	ND	78 (84%)	ND	5%
Mínguez et al, 2015 (100)	Retrospectivo 1 centro	24 (7 SARM/17 SASM)	SARM 71% SASM 59%	ND	SARM 42% SASM 41%	SARM: 30 días SASM: 45 días	SARM 57% SASM 18%
McBride et al, 2019 ^{a,b} (179)	Retrospectivo 1 centro	543 (436 con cultivo +) (30 SARM/200 SASM)	ND	ND	449/543 (83%)	34 días	26/543 (5%) a los 90 días

Discusión

Nuestro estudio	Retrospectivo	29	SARM 4/7 (57%)	SARM 3/7 (43%)	SARM 7/7 (100%)	SARM: 45 días	SARM 3/7 (43%)
	1 centro	(7 SARM/22 SASM)	SASM 14/21 (67%)	SASM 3/22 (14%)	SASM 11/22 (50%)	SASM: 47 días	SASM 0/19 (0%)

Abreviaturas: ND, no disponible; SARM, *S. aureus* resistente a meticilina; SASM, *S. aureus* sensible a meticilina.

^a Todos los estudios incluyeron pacientes con artritis nativa estafilocócica excepto: Ross et al, 15 casos de artritis estafilocócica y 44 causadas por otras etiologías; Frazee et al, 10 casos de artritis estafilocócica y dos causadas por otras etiologías; McBride et al, 254/436 casos de artritis estafilocócica (230/254 casos de artritis causadas por *S. aureus*) y 182/436 causadas por otras etiologías,

^b Todos los estudios incluyeron pacientes con artritis nativa estafilocócica excepto los siguientes, que incluyeron casos distintos a la artritis nativa: Frazee et al, infecciones postquirúrgicas; Lin et al, infecciones postquirúrgicas y protésicas articulares; McBride et al, infecciones de materiales médicos intraarticulares, excluyendo el reemplazo de la superficie articular, pero incluyendo clavos.

La tasa de fracaso del tratamiento fue elevada, siendo mayor en los pacientes infectados por SARM que en los pacientes infectados por SASM, como describen Ross et al y Al-Nammari et al (98,99). En el caso de la infección por SARM convergen una mayor fragilidad del paciente (edad, comorbilidad) con un arsenal terapéutico menos eficaz (betalactámicos y fluoroquinolonas para SASM vs vancomicina y cotrimoxazol para SARM) (3,12). Resulta incierto si la evolución clínica de los pacientes podría haber sido más favorable con un tratamiento de antimicrobianos combinados o con terapias más recientes como la daptomicina. Las artritis nativas causadas por SARM se presentaron con mayor frecuencia con otras infecciones concomitantes por *S. aureus* y siempre requirieron drenaje quirúrgico (en comparación con las artritis por SASM). Creemos que el desbridamiento quirúrgico se presenta aquí como un marcador indirecto de gravedad. La peor evolución clínica observada en los pacientes infectados con cepas de SARM se debió, de hecho, a una mayor mortalidad en lugar de a una mayor tasa de persistencia de la infección. Este estudio refuerza la importancia del SARM como agente causante de la artritis nativa, con peor pronóstico que la artritis nativa producida por SASM.

Más allá de las características clínicas y de la sensibilidad a la meticilina, realizamos en este estudio un análisis de resultados centrado en la influencia de otras características microbiológicas (fenotípicas y genotípicas) de las cepas de *S. aureus*. Evaluamos si la actividad hemolítica de los aislados de *S. aureus* podría ser un marcador indirecto de patogenicidad en la evolución clínica de la artritis, pero no observamos ninguna correlación. También analizamos la influencia de la formación de *biofilm* en el fracaso del tratamiento y observamos una menor formación de *biofilm* en los casos con fracaso terapéutico. Esto es consecuente con la observación de una mayor tasa de fracaso del tratamiento entre los pacientes que presentaron una infección estafilocócica sistémica; estos pacientes también se asociaron con un desenlace fatal y probablemente las infecciones fueron causadas por cepas virulentas con un *agr* funcional y, por lo tanto, con una menor capacidad para desarrollar *biofilm* (33). A diferencia de otras infecciones óseas y articulares sobre prótesis, la formación de *biofilm* bacteriano no parece tan importante en la patogénesis de la artritis séptica nativa hematógena, al menos durante las primeras etapas de la enfermedad. El único paciente de nuestro estudio con artritis

Discusión

causada por *S. aureus* positivo para LPV tuvo una evolución clínica favorable, a diferencia de otros casos notificados previamente (183). Existen estudios anteriores que mostraron el importante papel de la adhesina de unión al colágeno (*cna*) en la patogénesis de la artritis séptica producida por *S. aureus* (184), pero en nuestro estudio sólo identificamos este gen en el 38.1% de las cepas. El complejo clonal más frecuentemente identificado fue el complejo clonal CC5 con *agrII*, que es actualmente el principal clon de SARM en España (47,48). Las cepas de *S. aureus* presentaron una elevada heterogeneidad genética, principalmente entre las cepas de SASM. La menor diversidad observada en las cepas de SARM podría estar relacionada con una mayor adquisición nosocomial de estas cepas. A pesar de la diversidad de CCs observada, el CC predominante fue el CC5. También estudios previos coinciden en que este CC es frecuente en las IPAs (50,107).

Una de las limitaciones del estudio de artritis nativas es su diseño retrospectivo. El número de pacientes incluidos impide extraer conclusiones más sólidas, aunque el tamaño muestral es comparable a series de casos anteriores. Como realizamos el estudio en un solo centro, los resultados podrían quedar limitados por la epidemiología local. Sin embargo, nuestra población de estudio constituye una cohorte homogénea y representativa de la artritis nativa producida por *S. aureus* durante un largo período de tiempo. Aunque no observamos ninguna asociación entre los factores moleculares de las cepas de *S. aureus* y la evolución clínica de los pacientes, éste es, según nuestro conocimiento, el primer análisis de diversas características genotípicas de *S. aureus* en una cohorte de casos de artritis séptica nativa. Otra limitación del estudio fue que no hubo disponibilidad de las cepas persistentes. Por tanto, no pudimos estudiar las diferencias fenotípicas entre las cepas iniciales y las persistentes. Un estudio reciente mostró la evolución fenotípica de las cepas de *S. aureus* durante la progresión de aguda a crónica de una infección osteoarticular (78).

En resumen, este estudio muestra que la tasa de fracaso terapéutico en pacientes con artritis nativa causada por cepas de SARM fue más alta que en pacientes con artritis causada por SASM. También observamos una considerable variabilidad genética de las cepas, con el complejo clonal CC5 como principal complejo clonal. Se requieren más

estudios para comprender la influencia de los factores de virulencia de *S. aureus* en la evolución clínica de los pacientes con artritis nativa.

2. INFECCIÓN PROTÉSICA ARTICULAR PRODUCIDA POR *S. aureus*

2.1 INFECCIÓN PROTÉSICA ARTICULAR PRODUCIDA POR *S. aureus* RESISTENTE A METICILINA

La frecuencia de infección por SARM y de fracaso terapéutico observadas en este estudio son similares a los estudios anteriores, y la asociación del fracaso terapéutico con la insuficiencia renal crónica, los altos niveles de proteína C reactiva y el retraso en el desbridamiento fue la esperada (96). Además, la mayor frecuencia de IPAs agudas (es decir, postquirúrgicas precoces o hematógenas) es característica de la naturaleza de la virulencia de *S. aureus* (17).

Se ha descrito que *S. aureus* tiene un peor pronóstico en comparación con otras etiologías de IPAs (185,186). Además, las cepas de SARM podría tener un peor pronóstico que las cepas de SASM (187), aunque un estudio observacional que incluyó un gran número de casos cuestionó esta idea, siempre que se pudiera administrar rifampicina en el tratamiento de la IPA (96).

En el estudio retrospectivo de IPA producida por SARM, no encontramos diferencias significativas en las características fenotípicas de las cepas de SARM causantes de casos de IPA con una evolución favorable respecto a las de las cepas causantes de casos con un fracaso terapéutico, incluida la formación de *biofilm* y la disfuncionalidad de *agr*. El hecho de que la mayoría de nuestros casos fueran agudos podría justificar la menor influencia de estos factores, aunque otros autores han demostrado la importancia de la disfuncionalidad de *agr* en la evolución clínica de las infecciones producidas por *S. aureus* (PainterTrensMicrobiol2014) (33). Sin embargo, la ausencia de correlación entre la formación de *biofilm* y la evolución clínica de las infecciones ya se ha descrito previamente en *S. aureus* (188,189).

Discusión

Más allá de estas características microbiológicas fundamentales, existe interés en saber si algún factor de virulencia podría estar asociado a un peor pronóstico de la IPA. Las cepas de estafilococos de este estudio recogidas durante un período de 10 años pertenecían al mismo complejo clonal (CC5) que se ha encontrado en otros estudios sobre IPA producida por *S. aureus* (50,107), compartiendo así la mayor parte del contenido genético. Todas las cepas presentaron el *cluster egc* de genes de enterotoxinas, que son los superantígenos más prevalentes en las cepas de *S. aureus* y han demostrado su papel en la endocarditis causada por esta bacteria (190).

A pesar de la homogeneidad genética de las cepas de *S. aureus*, encontramos que los genes pertenecientes al *cluster* de evasión del sistema inmune, como los genes *sak*, *scn* y *chp*, tendían a ser más prevalentes entre los pacientes con fracaso terapéutico. Estos genes, integrados en fagos (ϕ Sa3), codifican para proteínas inmunomoduladoras que contrarrestan la inmunidad innata humana (GoerkecMolecularMicrobiology2006) (95). Algunos estudios han asociado el gen *sak* con infecciones asociadas a implantes (103,105). La estafiloquinasa (SAK) activa el plasminógeno a plasmina, que degrada los coágulos de fibrina, facilitando la penetración bacteriana en los tejidos. La proteína de inhibición de la quimiotaxis de *S. aureus* (CHIPS) es un potente inhibidor de la quimiotaxis de neutrófilos y monocitos. Se une a los receptores del péptido del complemento C5a y de péptidos formilados como fMLP y, por lo tanto, disminuye sustancialmente la fagocitosis y la posterior muerte de las bacterias (191). En los estudios de sensibilidad de las cepas de *S. aureus* al péptido de neutrófilo humano 1 y de supervivencia de las larvas de *G. mellonella* a *S. aureus* no encontramos asociación con la presencia del fago. Sin embargo, la cepa con la que las larvas sobrevivieron más tiempo presentó el fago y, además, fue la única cepa perteneciente al ST228 y, por tanto, presentaba un contenido genético diferente al resto de cepas.

Resulta de interés que la presencia de estos genes integrados en fagos se ha asociado con infecciones estafilocócicas menos graves en las que estos genes podrían contribuir a un mecanismo de adaptación de *S. aureus* al hospedador (95,192). Esto podría sugerir que la IPA causada por estos estafilococos no produciría necesariamente un cuadro clínico grave, pero el fracaso terapéutico sería más subagudo y tardío. De hecho, en el estudio observacional previamente referido, el momento del fracaso terapéutico fue

distinto según la presentación clínica: los casos con un patrón muy inflamatorio (bacteriemia, niveles altos de PCR) típicamente presentaron fracaso terapéutico dentro de los primeros 30 días después del desbridamiento, mientras que el fracaso terapéutico posterior se observó en pacientes con fístula, aflojamiento protésico o retraso en el desbridamiento (96). Cabe resaltar que la mayoría de nuestros pacientes con una evolución clínica desfavorable presentaron un fracaso tardío (> 30 días después del desbridamiento).

2.2 MICROBIOLOGÍA DE *S. aureus* PRODUCTOR DE INFECCIÓN PROTÉSICA ARTICULAR

En el estudio prospectivo multicéntrico de IPA observamos una alta diversidad clínica, microbiológica y genética en las cepas de *S. aureus* causantes de IPA. En nuestra cohorte se observaron 16 CCs estafilocócicos diferentes, siendo también en este estudio el complejo clonal CC5 el más frecuente (47,50,51). La frecuencia de SARM en nuestro estudio fue similar a la de otros estudios (97,186,193). Estas cepas de SARM mostraron una mayor capacidad de producción de *biofilm* que las cepas de SASM, en concordancia a otros estudios (194). Es conocido que el *background* genético de SASM y SARM es diferente (195), como se refleja en la distribución de genes. Sin embargo, encontramos pocas diferencias clínicas entre las IPAs producidas por SARM y SASM, excepto por una menor frecuencia de adquisición hematógena entre las primeras (96). De hecho, la IPA producida por SARM es fundamentalmente un fenómeno postquirúrgico, como lo ilustra su mayor homogeneidad de CCs (85% CC5), lo que es consistente con la fuente de adquisición relacionada con el hospital (50,107) y con los hallazgos obtenidos en el estudio de artritis nativa de la presente tesis doctoral. Resulta de interés que cinco pacientes presentaron una IPA causada por SASM perteneciente a CC398 (las cepas de SARM perteneciente al CC398 está asociado al ganado), que ha sido descrita recientemente en diferentes estudios como una cepa emergente causante de infecciones (196–198). Un 90% de las cepas clínicas de *S. aureus* obtenidas del ser humano portan el gen *hly* truncado por la inserción de un fago con genes del *cluster* de evasión del sistema inmune (93), pero en el presente estudio el porcentaje fue algo

menor (85.2%). Hay un estudio que postula que en el *biofilm* es frecuente la liberación del fago (199). Todas las cepas de *S. aureus* que presentaron halos turbios de hemólisis en agar sangre no presentaron el fago portador de genes de evasión del sistema inmune, permitiendo la expresión de la β -hemolisina (95,127). Las cepas con un *agr* funcional presentaron con mayor frecuencia este fago y, además, la expresión de genes del fago, como *sak*, está regulada positivamente por el sistema *agr* (192).

2.3 PRESENTACIÓN CLÍNICA DE LA INFECCIÓN PROTÉSICA ARTICULAR

Como era de esperar, la presentación clínica de IPA estafilocócica mostró un predominio de inicio agudo (IPP y IH) (22,29). La variedad en la presentación clínica de la IPA estafilocócica podría ser explicada parcialmente por la heterogeneidad fenotípica y genotípica observada. La IPP y la IH mostraron un cuadro clínico más inflamatorio que la IPC, mientras que, en conjunto, las cepas productoras de IPC mostraron mayor resistencia fenotípica y genotípica a los antibióticos (con la excepción de una mayor resistencia a penicilina en la IPP) y formaron más *biofilm*. Aunque no pudimos obtener conclusiones definitivas, los diferentes tipos de infección podrían ser parcialmente explicados por la diferente funcionalidad de *agr*, que es menos funcional en los casos de IPC (IPC>IH>IPP). En las IPA con presentación clínica aguda, el *agr* generalmente aumenta la patogénesis al incrementar la expresión de factores de virulencia agresivos. Por el contrario, el *agr* disfuncional tiene un papel más complejo en las infecciones crónicas, promoviendo la formación de *biofilm* (52). También existe una compensación de la virulencia a favor de la resistencia a los antibióticos, que fue más frecuente en nuestros casos de IPC (33).

Una comparación de la IH bacteriémica y no bacteriémica podría arrojar algo de luz sobre la patogénesis de este tipo de IPA. Entre los casos no bacteriémicos, observamos una mayor proporción de prótesis de revisión, lo que conlleva un mayor riesgo de infección postquirúrgica (200), un menor tiempo en desarrollar la infección desde la colocación de la prótesis y una mayor capacidad de formar *biofilm* de las cepas causantes. Aunque la ausencia de bacteriemia no descarta la vía de infección hematogena, podría sugerir que algunas de ellas son en realidad el resultado de la

reactivación de un inóculo latente de estafilococos que habrían contaminado la prótesis en el momento de su implantación. La reactivación estafilocócica en el tejido óseo es de hecho un fenómeno bien descrito en la osteomielitis (201). En este sentido, algunos autores han propuesto el término de “infección tardía aguda” (*late-acute infection* en inglés) para incluir cualquier tipo de IPA que se presente de forma abrupta en algún momento posterior a la implantación de la prótesis (185), y que englobaría las infecciones realmente hematógenas y aquéllas que se producen como resultado de la reactivación de un foco latente de infección adquirido en el postoperatorio inmediato.

Con respecto a la patogenia, no observamos diferencias significativas en el grupo de IPP entre los casos con inicio de síntomas en los primeros 30 días después de la cirugía y aquellos con inicio de síntomas entre los días 30 a 90. Esto es destacable porque los límites de tiempo que definen la IPP y la IPC son a veces arbitrarios y han cambiado a lo largo del tiempo (22,26,29,202). Además, etiquetar a los pacientes con un tipo de IPA u otro tiene implicaciones directas para el manejo quirúrgico y la posibilidad de realizar DAIR (12,22,26,29). Nuestros resultados son consistentes con el pronóstico similar en los casos manejados por DAIR de otros estudios (96,203).

2.4 EVOLUCIÓN CLÍNICA DE LA INFECCIÓN PROTÉSICA ARTICULAR

La tasa de fracaso terapéutico observada fue importante (37% en general, 47% en los casos manejados con DAIR), pero comparable a estudios previos (96,97,204). A pesar de un análisis exhaustivo de múltiples genes y características microbiológicas fenotípicas, no encontramos ningún factor que pudiera relacionarse con la evolución clínica del paciente. Aunque algunos estudios han asociado la infección por SARM con un mayor riesgo de fracaso terapéutico (51,187,204,205), esto ha sido rebatido por otros (96), y, de hecho nosotros no observamos un peor pronóstico en las infecciones por SARM. En general, la IPA es una infección muy compleja, en la que la importancia de algunas características microbiológicas específicas podrían quedar diluidas en la compleja interacción de otros factores relacionados con el huésped, con la prótesis, con el manejo quirúrgico y con el tratamiento antibiótico (18). Sin embargo, observamos una CMI de vancomicina ligeramente superior en los casos con evolución clínica desfavorable. Si

bien la realización del Etest de vancomicina puede tener una importante variabilidad (206), una CMI de vancomicina más alta ha sido asociada a una disfunción de *agr* y a complicaciones asociadas al *biofilm* (49). Aunque la formación de *biofilm* desarrolla un papel fundamental en la IPA, no observamos ninguna asociación entre la formación de *biofilm* y la evolución clínica de la IPA, de forma similar a otros estudios (207,208). Nuestros resultados concuerdan con un estudio reciente de Wildeman et al (106), quienes observaron una asociación entre un fenotipo de resistencia a los antibióticos, el uso de un tratamiento antimicrobiano sin actividad en el *biofilm* y el fracaso terapéutico, pero no encontraron ninguna asociación entre las características genéticas y la evolución clínica de los pacientes con IPA causada por *S. aureus*. A pesar de los avances en la investigación y la creciente literatura relacionada con la IPA, un estudio reciente ha reportado que no han detectado ninguna mejora sustancial en las tasas de éxito del tratamiento en la IPA a lo largo del tiempo (209). A pesar de determinadas mejoras en el tratamiento de la IPA, como es el uso de rifampicina, resultan necesarios nuevos tratamientos para conseguir optimizar el manejo de la IPA y mejorar la calidad de vida de los pacientes.

2.5 SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS DE *S. aureus* FORMADOR DE *BIOFILM* EN LA INFECCIÓN PROTÉSICA ARTICULAR

Como se mencionó previamente, los parámetros estándar de sensibilidad a los antibióticos, como la CMI, muestran una pobre correlación con la evolución clínica de la infección (29,210). Es necesario estandarizar los métodos de sensibilidad a antimicrobianos para las infecciones asociadas con *biofilm* (76,82,211). El CBD se ha utilizado previamente en el contexto de IPA (117), aunque, hasta donde sabemos, este es el primer estudio que aborda la posible correlación entre la CMEB de un antibiótico específico y la evolución clínica de la infección. En general, las CMEBs de oxacilina, daptomicina y levofloxacino fueron más altas que las concentraciones clínicamente alcanzables y no mostraron una correlación con la evolución clínica del paciente. Como era de esperar, la rifampicina mostró las CMEBs más bajas y, por tanto, la actividad más alta en el *biofilm* (74), lo que es consistente con los resultados clínicos positivos reportados en la literatura (96,97,202). Aun así, los valores específicos de CMEB de

rifampicina fueron muy altos y no mostraron una correlación con la evolución clínica de los pacientes. También analizamos la CMEB de combinaciones añadiendo concentraciones fijas clínicamente relevantes de levofloxacino a rifampicina, y viceversa, aunque los resultados no fueron mejores que las monoterapias. Entre las posibles razones de la falta de correlación entre la CMEB y la evolución clínica de la IPA, puede haber factores farmacocinéticos y farmacodinámicos (PK/PD) que influyan en la actividad antimicrobiana ósea y en el *biofilm*, como el efecto postantibiótico o la acumulación de antibióticos intracelularmente y en el *biofilm* (73,76). La eficacia de la combinación de rifampicina con levofloxacino en la infección osteoarticular es evidente, pero las dosis óptimas aún no han sido determinadas (84,212,213). Del mismo modo, se necesita más investigación para estandarizar la actividad de los antibióticos en el *biofilm* en este escenario clínico (214). La CMIB y la CMBB para todos los antibióticos fue baja, sin embargo, un estudio reciente ha destacado el importante papel que podrían desempeñar las bacterias dispersadas del *biofilm*, ya que pueden ser fenotípicamente heterogéneas y con una supervivencia incrementada, siendo capaz de formar nuevas comunidades de *biofilm*, siendo más adherentes y virulentas y con una sensibilidad a antimicrobianos alterada (215).

El estudio de IPA producida por SARM presenta las limitaciones de todos los estudios retrospectivos de un solo centro, además del pequeño tamaño muestral. Sin embargo, los pacientes incluidos componen una cohorte homogénea y representativa de la IPA causada por SARM para el estudio de la variabilidad de aspectos microbiológicos, fenotípicos y moleculares en los casos en los que el tratamiento tuvo éxito o fracasó. En el estudio prospectivo multicéntrico de IPA, aunque el número de casos no es pequeño en comparación con otras series, el tamaño muestral y las comparaciones realizadas no permitieron obtener conclusiones definitivas. Tampoco podemos descartar que algunas de las asociaciones observadas fueran causadas por el azar, ya que el número de comparaciones fue elevado. En segundo lugar, aunque nuestro estudio incluyó una amplia gama de marcadores moleculares de *S. aureus*, la presencia de un gen determinado no implica necesariamente un producto proteico específico o una función celular.

En general, en el estudio retrospectivo piloto de IPA producida por SARM hemos descrito nuestra experiencia durante un período de 10 años, observando que todos los estafilococos pertenecían al mismo CC (CC5), que ha sido también el CC mayoritario en el estudio prospectivo multicéntrico de IPA y en el estudio de artritis nativas. En el estudio retrospectivo hemos encontrado que los genes pertenecientes al *cluster* de evasión del sistema inmune tienden a correlacionarse con la probabilidad de fracaso terapéutico de la IPA producida por SARM. Sin embargo, esta asociación no se ha observado en el estudio prospectivo de IPA causada por *S. aureus*, tanto SARM como SASM. En este último estudio, a pesar de la heterogeneidad microbiológica observada en *S. aureus*, la funcionalidad del sistema regulador de virulencia *agr* fue mayor en la IPP. Además, en este grupo de IPAs no se encontraron diferencias entre los casos con inicio de síntomas en los primeros 30 días después de la cirugía y aquellos con inicio de síntomas entre los días 30 a 90, clarificando así la clasificación de la IPA. A pesar de la minuciosidad del estudio, no hemos encontrado parámetros fenotípicos o genotípicos significativos que puedan explicar el pronóstico de la infección, incluida la CMEB. No obstante, nuestros hallazgos podrían generar estudios posteriores, tanto fenotípicos como genotípicos y de transcriptómica para lograr una mejor comprensión de la influencia de los factores de virulencia de *S. aureus* en la evolución clínica de IPA.

3. SECUENCIACIÓN DE GENOMA COMPLETO DE *S. aureus* CAUSANTE DE INFECCIÓN ARTICULAR

3.1 GENOMA DE *S. aureus* CAUSANTE DE INFECCIÓN PROTÉSICA ARTICULAR

En cuanto a la epidemiología molecular, la mayoría de las cepas pertenecían al complejo clonal 5, ST125, *spa type* t067 y todas las cepas resistentes a meticilina excepto una tenían el SCC*mec* IVc. La prevalencia de este clon en nuestro estudio se corresponde con el clon predominante en España (48). Además, la mayor presencia del complejo clonal CC5 coincide con los datos de otros estudios de *S. aureus* causantes de infección osteoarticular (50,51) y con los estudios previos de la presente tesis doctoral, realizados con *microarrays* de ADN. Del mismo modo, las cepas de SASM mostraron mayor

diversidad genética que las cepas de SARM, al distribuirse entre más CCs y STs, mientras que el 94% de las cepas de SARM pertenecieron al complejo clonal CC5 y el 78% al ST125. Las cepas se agruparon filogenéticamente por CCs y STs parecidos, debido a su *background* genético similar (36); del mismo modo que las cepas procedentes de un mismo paciente, mostrando por tanto entre ellas un contenido genético muy similar.

Todas las cepas presentaron genes que codifican para adhesinas y genes implicados en la formación de *biofilm*, debido a la importancia que tienen estos factores de virulencia en la patogénesis de la infección articular (10). Las cepas del clon CC5 de SARM mostraron un patrón similar de presencia/ausencia de genes de virulencia, debido a la similitud del contenido genético que existe dentro de un mismo CC (36). La β -hemolisina con inserción del fago portador de genes de evasión del sistema inmune se suele encontrar en la mayoría de cepas de *S. aureus* causantes de infecciones en el ser humano (en un 90-95% de ellas) (95), incluida la infección articular (103,105). Sin embargo, en nuestro estudio encontramos el gen *scn* en un 83% de las cepas causantes de IPA, pero sólo en el 66% de las cepas de SARM del clon CC5 causantes de infección articular. La baja prevalencia de este fago ya la observamos en el estudio anterior multicéntrico prospectivo de IPA, realizado con *microarrays* de ADN.

El perfil de resistencia antimicrobiana fenotípico y genotípico se correlacionó en la mayoría de los casos, al igual que en otros estudios (216). Los casos no relacionados podrían explicarse por la falta de expresión de los genes de resistencia encontrados y por la presencia de otros genes diferentes a los analizados que expliquen la resistencia fenotípica.

Debido a su gran interés, por las posibles implicaciones terapéuticas que podría tener, se investigó la asociación entre la presencia de genes de resistencia a antibióticos y de virulencia y la presentación y evolución clínica de los pacientes con IPA. Sin embargo, no se encontraron genes asociados a las variables clínicas estudiadas, como el tipo de infección y el fracaso terapéutico, del mismo modo que en otros estudios de IPA causada por *S. aureus* (106,217) y que en los otros estudios de infección articular de la presente tesis doctoral. Este hecho podría deberse, probablemente, a que la IPA es una

Discusión

infección muy compleja y multifactorial en la que intervienen múltiples aspectos del paciente, del microorganismo causante de la infección, de la prótesis y del manejo terapéutico y quirúrgico de la IPA, que resultan decisivos (16,18). Por el contrario, hay un estudio de infecciones relacionadas con dispositivos ortopédicos causados por *S. epidermidis* en el que sí se encontró asociación entre ciertos genes de la bacteria y el fracaso terapéutico (218). La asociación de la presencia de ciertos genes a la resistencia a meticilina se debe, en gran medida, a la predominancia del complejo clonal CC5 en esas cepas resistentes a meticilina, compartiendo así muchas características genéticas respecto a las cepas sensibles a meticilina, entre las que hay mucha más diversidad genética y, por tanto, de CCs. La asociación de determinados genes con uno de los hospitales del estudio se debe a que la mitad de las cepas de ese hospital pertenecían al complejo clonal CC45, un CC que sólo estuvo representado en otra cepa de otro hospital.

En el caso con infección de las prótesis de ambas rodillas y bacteriemia (caso 507) se detectaron pocas variantes entre las cepas de las dos prótesis, probablemente porque tenían un mismo foco bacteriémico, o bien, porque la infección de la primera prótesis desencadenó la bacteriemia, aunque de acuerdo con un estudio reciente este fenómeno es infrecuente (219). Entre esta pareja de cepas se produjo una deleción en un gen codificante para un antiportador de cationes (*mnhE2*) que permite mantener el pH citoplasmático de la bacteria permitiendo su supervivencia en condiciones ambientales de estrés (220). En el caso 407 se observó una pérdida de genes de resistencia a antibióticos y de la antiadhesina *pIs* en la cepa con fenotipo SCV respecto a la de fenotipo salvaje. Además, entre ambas cepas encontramos variantes en el gen *spa*, que codifica para la proteína A, y en el gen *sdrE*. Ambos genes están relacionados con el sistema inmune: la proteína A de *S. aureus* es necesaria para unirse al dominio Fab de los anticuerpos para resistir a la fagocitosis (221) y la proteína SdrE es una MSCRAMM cuya expresión conduce a una menor producción de los factores del complemento y a una menor muerte por las células PMNs (222).

3.2 GENOMA DE *S. aureus* CAUSANTE DE INFECCIÓN PROTÉSICA ARTICULAR PERSISTENTE Y RECIDIVANTE

Un contacto prolongado de *S. aureus* en el entorno del hospedador humano puede inducir en la bacteria una adaptación y disminución de la virulencia (78). No se encontró ningún CC (ni ST) que se asociara a la persistencia o recidiva de la IPA. Tampoco se encontraron genes de resistencia a antibióticos ni de virulencia asociados a la persistencia ni a la recidiva de la IPA, del mismo modo que en nuestros estudios anteriores no se encontró asociación de determinados genes con la evolución clínica de la infección articular. Curiosamente, las dos cepas del caso recidivante 107 presentaron un patrón de sensibilidad a antibióticos poco frecuente, con sensibilidad fenotípica a eritromicina y resistencia fenotípica a clindamicina, que podría ser causado por el gen *lnu*, que parece estar relacionado con linajes clonales animales de *S. aureus*, como el complejo clonal CC398 (223), al que pertenecieron las cepas del caso 107.

El estudio de SGC de las cepas de los casos recidivantes y persistentes confirmó la misma identidad clonal entre las parejas de cepas inicial y la recidivante o persistente. Sin embargo, la comparación genética entre estas parejas de cepas puso de manifiesto la aparición de modificaciones genéticas entre la cepa inicial y la recidivante o persistente, perdiendo genes de resistencia a antibióticos y aumentando la sensibilidad a antibióticos en uno de los casos. Estos resultados contrastan con un reciente estudio que mostró un aumento de la resistencia a antibióticos en *S. aureus* causante de bacteriemia persistente (224). A diferencia de estudios previos (78), en todos los casos, excepto en uno (el caso persistente 402), se produjeron variantes significativas entre la cepa inicial y la segunda. Esas variantes se produjeron principalmente en adhesinas, del mismo modo que en un estudio de reciente publicación (225). Sin embargo, no se encontraron variantes comunes en las cepas causantes de todos o de la mayoría de los casos de IPA persistente y/o recidivante. Entre las cepas de los casos recidivantes 104 y 409 se identificaron un gran número de variantes entre ellas, probablemente debido a que la cepa de referencia usada para el análisis (MSSA476) no era del mismo CC. En esos dos casos encontramos variantes en distintas MSCRAMMs: *bbp*, *sdrD*, *clfA*, *fnbA* y *fnbB*.

Discusión

Las proteínas ClfA y FnBPs (proteína de unión a fibronectina) se pueden unir al fibrinógeno por el mismo mecanismo, pero también a otros ligandos: ClfA al factor I, que promueve la evasión de la muerte de neutrófilos, y FnBPs a elastina y plasminógeno y también promueve la formación de *biofilm* (226). En ambas cepas encontramos el mismo SNP no sinónimo en el gen *fnbA* entre cada cepa inicial y la recidivante (Q819H). Alteraciones de aminoácidos en FnBPA se han asociado con infecciones de dispositivos cardiovasculares y válvulas cardíacas nativas causadas por *S. aureus* (227–229), a pesar de que en el caso de la IPA producida por *S. aureus* un estudio no encontró asociación entre polimorfismos en FnBP e IPA (230). Además, las bacterias recidivantes/persistentes aumentan la expresión de las FnBPs, desarrollando un fenotipo altamente invasivo (231). La variación antigénica de FnBPA podría contribuir a la evasión de la respuesta inmune del hospedador por parte de *S. aureus* (232). En el caso persistente 401 se observó un SNP no sinónimo en el gen *fmt*, que ha sido asociado a la disminución en la producción de factores de virulencia extracelulares y una disminución en la patogenia, lo que puede permitir a la bacteria aumentar la supervivencia y persistir (233). En el caso persistente 118 se observó una deleción en la *DNA-3-methyladenine glycosidase* que cataliza la eliminación del daño químico en las bases del ADN (234). Esta variante podría desempeñar un papel importante en la adaptación de la bacteria a un entorno estresante. Curiosamente, en las cepas persistentes y recidivantes no encontramos ninguna variante en los principales reguladores de virulencia de *S. aureus* como, por ejemplo, el *agr*.

El fenotipo SCV ha sido claramente asociado a la persistencia o recidiva de la infección, en parte por su capacidad de persistir intracelularmente (91,235). Se ha demostrado que, en el transcurso de la osteomielitis crónica, tras la invasión celular del hospedador, las cepas de *S. aureus* desarrollan mecanismos de adaptación disminuyendo su citotoxicidad y aumentando el porcentaje de formación de SCVs para poder persistir en los osteoblastos (236). En el caso recidivante 104 (cepa inicial de fenotipo salvaje y la segunda SCV) y en el caso 214 (también caso con ambos fenotipos, pero con pocas variantes, ya que ambas cepas surgieron de una única cepa) se observaron variantes en exotoxinas. Se ha descrito que el fenotipo SCV en *S. aureus* es favorecido por la interrupción de la cadena de transporte de electrones y la consecuente reducción en la

producción de ATP, inhibiendo así el crecimiento y la funcionalidad de *agr*. En estas condiciones se produce una reducción en la producción de hemolisina y un aumento la expresión de la FnBP (el caso recidivante 104 también presentó variantes en *fnbA* y *fnbB*), proporcionando a los mutantes SCVs una elevada capacidad invasiva hacia nuevas células del hospedador (231,237). En los casos 104 y 214 las cepas de fenotipo salvaje, presentaron un *agr* funcional y β -hemólisis en agar sangre, mientras que las cepas de fenotipo SCV no presentaron β -hemólisis, aunque siguieron presentando un *agr* funcional. En el otro caso de IPA con una cepa de fenotipo SCV y otra de fenotipo salvaje (caso 407) la cepa SCV presentó una delección en el *agr* y una pérdida de su funcionalidad y de la β -hemólisis.

3.3 GENOMA DEL COMPLEJO CLONAL CC5 DE *S. aureus* RESISTENTE A METICILINA CAUSANTE DE INFECCIÓN ARTICULAR (Artritis nativa y protésica)

En cuanto a los análisis de asociación, un estudio previo de nuestro grupo encontró asociación entre marcadores patogénicos moleculares y la fuente de la bacteriemia, mostrando mayor prevalencia de los genes *msrA* y *hla* en las bacteriemias con una fuente de infección osteoarticular (47). Sin embargo, en este estudio no hemos encontrado diferencias entre las cepas de SARM del clon CC5 productoras de infecciones articulares distintas (artritis nativa e IPA), sugiriendo que una cepa de *S. aureus* podría producir una infección articular con independencia de la presencia o no de material protésico. Las características fenotípicas y genotípicas del clon CC5 de SARM causante de infección articular en los distintos hospitales se mantuvo prácticamente sin cambios a lo largo de los 12 años de estudio. El papel de los MGEs de *S. aureus*, que portan tanto genes de virulencia como de resistencia, ha sido esencial en la adaptación de esta bacteria a la presión ambiental (238) y es en genes codificados por plásmidos donde encontramos los principales cambios bacterianos durante el tiempo que duró el estudio: en los genes asociados a la resistencia a aminoglucósidos *aph(3')-III* y *ant(6)-Ia*, cuya presencia disminuyó a lo largo del tiempo. Entre las cepas de *S. aureus* sí que se encontró

Discusión

una gran cantidad de SNPs de diferencia entre ellas, menos entre las cepas con un mismo MLST, las cuales se agruparon filogenéticamente.

Aun teniendo en cuenta que las series de casos microbiológicos de infección articular suelen ser escasas y bastante reducidas, el tamaño muestral de estos estudios de SGC probablemente redujo las opciones de encontrar factores de virulencia asociados al tipo de infección, a la evolución clonal en el tiempo y a la evolución clínica de la IPA. Además, al analizar las diferencias entre cepas, se encontraron muchas variantes en regiones intergénicas, en proteínas hipotéticas y en SNPS sinónimos cuya implicación en estas infecciones nos es desconocida. Futuros estudios fenotípicos y de transcriptómica, podrían aportar más información sobre los factores de *S. aureus* implicados en la evolución clínica de la infección articular. Sin embargo, según nuestro conocimiento, este es el primer estudio de SGC de una colección de cepas de *S. aureus* causantes de infección articular en España, proporcionando una detallada y valiosa información sobre la epidemiología y las características moleculares de la infección articular producida por *S. aureus* a lo largo del tiempo. También estudiamos la adaptación molecular de esta bacteria en la IPA, con un análisis exhaustivo de todas las cepas aisladas en una misma IPA. Otros autores se limitan a un pequeño número de casos seleccionados y, por lo tanto, ofrecen sólo una comprensión limitada del patrón general de evolución de *S. aureus* durante la IPA (78).

En resumen, las características genéticas de *S. aureus* causante de infección articular son diversas, siendo el clon predominante el complejo clonal CC5 ST125 *spa type* t067, sobre todo entre las cepas de SARM, que mostraron menor diversidad genética que las cepas de SASM. El clon CC5 ST125 *spa type* t067 en las cepas de SARM causantes de infección articular se ha mantenido estable, no mostrando diferencias genómicas importantes entre las cepas en cuanto a perfil de resistencia y virulencia que indiquen una evolución temporal de este clon en los últimos 12 años. Se observó una elevada prevalencia de genes de virulencia de gran relevancia en la patogénesis de la infección articular, como adhesinas y genes implicados la formación de *biofilm*. En cuanto a la resistencia a antimicrobianos, el perfil de resistencia fenotípico y genotípico se correlacionó en la mayoría de los casos. Probablemente, debido a la complejidad y al carácter multifactorial de la IPA, no se encontró ningún gen asociado a la presentación y

evolución clínica de la IPA, del mismo modo que en los estudios anteriores de esta presente tesis doctoral. Sin embargo, nuestros resultados muestran que *S. aureus* es capaz de modificar su genotipo durante la evolución clínica de la IPA, adaptándose para recidivar o persistir. Sobre todo, perdiendo genes de resistencia a antibióticos y, también, mediante la adquisición de variantes, principalmente en genes que codifican para adhesinas. No obstante, parece que las vías de adaptación genética en la IPA podrían ser episodio específicas. Ésto junto con otros aspectos claves de la infección como la inmunidad del hospedador podrían hacer que la infección progrese hacia la curación o hacia la cronificación.

Como conclusión, la presente tesis doctoral pone de manifiesto la compleja interacción que se establece en la infección articular entre el hospedador, el microorganismo y el tratamiento médico-quirúrgico recibido. Además, en la IPA interviene de forma significativa la presencia de un cuerpo extraño y la consiguiente participación del *biofilm* bacteriano. Todos estos factores influyen en la evolución clínica del paciente con infección articular. Como hallazgos concretos relevantes, cabe destacar que en la artritis nativa la tasa de fracaso terapéutico es mayor en los pacientes con infección producida por SARM que en los casos producidos por SASM. En la IPA se observó una mayor funcionalidad de *agr* en los casos de IPP y no se encontraron diferencias entre la IPP con inicio de síntomas en los primeros 30 días después de la cirugía y aquella con inicio de síntomas entre los días 30 a 90. Una comparación exhaustiva de las características clínicas, microbiológicas, fenotípicas y genotípicas, no mostró factores significativos asociados con el fracaso terapéutico de la IPA producida por *S. aureus*, con la única excepción de una CMI a vancomicina ligeramente superior en las cepas de casos con evolución clínica desfavorable. No obstante, *S. aureus* es capaz de modificar su genotipo durante la evolución clínica de la IPA, adaptándose para recidivar o persistir. El clon CC5 ST125 *spa type* t067 es el predominante en el *S. aureus* productor de infección articular (sobre todo en el SARM) y, en nuestro medio, se ha mantenido prácticamente estable en la última década.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La infección articular producida por *S. aureus* tiene una presencia de SARM en nuestro medio del 23%, siendo el complejo clonal CC5 el más representado, sobre todo entre las cepas de SARM. En las cepas de SASM el CC más frecuente fue CC30.

En relación a las características clínicas y microbiológicas de la artritis séptica nativa causada por *S. aureus*

2. Se detectó un 24% de resistencia a meticilina entre las cepas de *S. aureus* causantes de artritis nativa.
3. La tasa de fracaso terapéutico de la artritis nativa causada por *S. aureus* fue de un 27%. Este fracaso fue mayor entre los casos producidos por cepas de SARM que por cepas de SASM. No se observaron factores genotípicos asociados a una peor evolución clínica de la artritis nativa producida por *S. aureus*, a pesar de la gran variabilidad genética observada.

En relación a las características clínicas y microbiológicas de la artritis protésica causada por *S. aureus*

4. En el estudio multicéntrico de Madrid se detectó un 23% de resistencia a meticilina entre las cepas de *S. aureus* causantes de IPA. En esta serie prospectiva la resistencia a meticilina no determinó el pronóstico de la IPA.
5. El estudio prospectivo multicéntrico puso de manifiesto la elevada tasa de fracaso terapéutico en la IPA producida por *S. aureus*, un 37%, alcanzando el 47% en los casos manejados con DAIR.
6. Los diferentes tipos de presentación clínica de la IPA podrían ser parcialmente explicados por la diferente funcionalidad de *agr*, que es menor en los casos de

Conclusiones

infección postquirúrgica crónica y mayor en los casos de infección postquirúrgica precoz.

7. En el grupo de IPAs postquirúrgicas precoces no se encontraron diferencias entre los casos con inicio de síntomas en los primeros 30 días después de la cirugía y aquellos con inicio de síntomas entre los días 30 a 90, clarificando así la clasificación de la IPA y el manejo quirúrgico de estas infecciones con DAIR.
8. Los resultados de los estudios de actividad antibiótica realizados en un modelo de *biofilm* no mostraron correlación con la evolución clínica de los pacientes. Aunque todos los antibióticos analizados mostraron una elevada CMEB, la rifampicina mostró la actividad más alta en el *biofilm*. Es importante resaltar que las combinaciones de levofloxacino y rifampicina, con concentraciones similares a las hipotéticamente alcanzadas en hueso tras el tratamiento, no mostraron mejores resultados de CMEB que las monoterapias.
9. Una comparación exhaustiva de las características clínicas, microbiológicas, fenotípicas y genotípicas, no mostró factores asociados con el fracaso terapéutico de la IPA producida por *S. aureus*. Como excepción a lo anterior, la CMI a vancomicina fue ligeramente superior en las cepas causantes de casos con evolución clínica desfavorable. Aunque hemos encontrado cierta asociación entre la presencia de genes pertenecientes al *cluster* de evasión del sistema inmune y una mayor probabilidad de fracaso terapéutico en las IPAs causadas por SARM, ésta no pudo ser confirmada de forma clara en estudios clínicos más amplios o de forma experimental.

En relación a la secuenciación de genoma completo de cepas de *S. aureus* causantes de infección articular

10. En las cepas de *S. aureus* causantes de infección articular se observó una elevada prevalencia de genes que codifican para adhesinas y genes implicados en la formación de *biofilm*. Sin embargo, la β -hemolisina con inserción del fago portador de genes de evasión del sistema inmune, que suele encontrarse en la mayoría de

- cepas de *S. aureus* que infectan al ser humano, estuvo poco representada en las cepas causantes de IPA.
11. Las características genéticas de *S. aureus* causante de infección articular son diversas, siendo el clon predominante el complejo clonal CC5 ST125 *spa type* t067, sobre todo entre las cepas de SARM, que mostraron menor diversidad genética que las cepas de SASM. Todas las cepas de SARM portaron el gen *mecA* y el SCC*mec* IVc, excepto una.
 12. *S. aureus* es capaz de modificar su genotipo durante la evolución clínica de la IPA, adaptándose para recaer o persistir. Sobre todo, perdiendo genes de resistencia a antibióticos y, también, mediante la adquisición de variantes, principalmente en genes que codifican para adhesinas. No obstante, las vías de adaptación genética en la IPA parecen ser específicas de cada episodio.
 13. El clon CC5 ST125 *spa type* t067 en las cepas de SARM causantes de infección articular se ha mantenido estable, no mostrando diferencias genómicas importantes entre las cepas que indiquen una evolución temporal de este clon en los últimos 12 años. Tampoco se observaron diferencias genómicas significativas entre cepas causantes de artritis nativa y de IPA.
 14. De forma general, la presente tesis doctoral subraya la complejidad de la infección articular, en la que las características microbiológicas específicas podrían diluirse en las sofisticadas interrelaciones que se establecen entre los múltiples factores del huésped, del tratamiento antimicrobiano y quirúrgico, y en el caso de la IPA también de la prótesis. Los hallazgos de la presente tesis doctoral suscitan ideas e hipótesis para investigaciones futuras, que deberían explorar sobre todo el transcriptoma de los microorganismos, con el fin de comprender mejor los mecanismos patogénicos de *S. aureus* en la infección articular y así poder optimizar el tratamiento y mejorar la calidad de vida de los pacientes con esta infección.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Marín M, Esteban J, Meseguer MA, Sánchez-Somolinos M. Diagnóstico microbiológico de las infecciones osteoarticulares. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010;28(8):534–40.
2. Ross JJ. Septic Arthritis of Native Joints. *Infect Dis Clin North Am*. 2017;31(2):203–18.
3. Mathews CJ, Weston VC, Jones A, Field M, Coakley G. Bacterial septic arthritis in adults. *Lancet*. 2010;375(9717):846–55.
4. Sharff KA, Richards EP, Townes JM. Clinical Management of Septic Arthritis. *Curr*. 2013;15:1–9.
5. Maneiro JR, Souto A, Cervantes EC, Mera A, Carmona L, Gomez-Reino JJ. Predictors of treatment failure and mortality in native septic arthritis. *Clin Rheumatol*. 2014;34(11):1961–7.
6. Sharff KA, Richards EP, Townes JM. Clinical Management of Septic Arthritis. *Curr*. 2013;15:1–9.
7. Newman JH. Review of septic arthritis throughout the antibiotic era. *Ann Rheum Dis*. 1976;35:198–205.
8. Hassan AS, Rao A, Manadan AM, Block JA. Peripheral Bacterial Septic Arthritis: Review of Diagnosis and Management. *J Clin Rheumatol*. 2017;23(8):435–42.
9. Nolla JM, Lora-Tamayo J, Gómez Vaquero C, Narváez J, Murillo O, Pedrero S, et al. Pyogenic arthritis of native joints in non-intravenous drug users: A detailed analysis of 268 cases attended in a tertiary hospital over a 22-year period. *Semin Arthritis Rheum*. 2015;45(1):94–102.
10. Montanaro L, Spexiale P, Campoccia D, Ravaioli S, Cangini I, Pietrocola G. Scenery of Staphylococcus implant infections in orthopedics. *Rev Lit Arts Am*. 2011;6:1329–49.
11. Kapadia BH, Berg RA, Daley JA, Fritz J, Bhavé A, Mont MA. Periprosthetic joint infection. *Lancet*. 2016;387(10016):386–94.
12. Ariza J, Cobo J, Baraia-Etxaburu J, Benito N, Bori G, Cabo J, et al. Executive summary of management of prosthetic joint infections. Clinical practice guidelines by the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (SEIMC). *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2017;35(3):189–95.
13. Pozo JL Del, Ph D, Patel R. Infection Associated with Prosthetic Joints. *N Engl J Med*. 2009;361(8):787–94.
14. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R. Procedimiento Microbiología Clínica SEIMC. Diagnóstico microbiológico infecciones relacionadas con biopelículas. 2017.
15. Cobo J, Del Pozo JL. Prosthetic joint infection: Diagnosis and management. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2011;9(9):787–802.
16. Tande AJ, Gomez-Urena EO, Barbari EF, Osmon DR. Management of Prosthetic Joint Infection. *Infect Dis Clin North Am*. 2017;31(2):237–52.

17. Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE. Prosthetic-Joint Infections. *N Engl J Med*. 2004;351(16):1645–54.
18. Trampuz A, Zimmerli W. Prosthetic joint infections: Update in diagnosis and treatment. *Swiss Med Wkly*. 2005;135(17–18):243–51.
19. Gbejuade HO, Lovering AM, Webb JC. The role of microbial biofilms in prosthetic joint infections: A review. *Acta Orthop*. 2015;86(2):147–58.
20. Zimmerli W. Clinical presentation and treatment of orthopaedic implant-associated infection. *J Intern Med*. 2014;276(2):111–9.
21. Zimmerli W, Moser C. Pathogenesis and treatment concepts of orthopaedic biofilm infections. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2012;65(2):158–68.
22. Tsukayama DT, Estrada R, Gustilo RB. Infection after total hip arthroplasty. A study of the treatment of one hundred and six infections. *J Bone Joint Surg Am*. 1996;78(4):512–23.
23. Benito N, Franco M, Ribera A, Soriano A, Rodriguez-Pardo D, Sorlí L, et al. Time trends in the aetiology of prosthetic joint infections: a multicentre cohort study. *Clin Microbiol Infect*. 2016;22(8):732.e1-732.e8.
24. Parvizi J, Gehrke T, Chen AF. Proceedings of the international consensus on periprosthetic joint infection. *Bone Jt J*. 2013;95 B(11):1450–2.
25. Atkins BL, Athanasou N, Deeks J, Crook DWM, Simpson H, Peto T, et al. Prospective evaluation of criteria for microbiological diagnosis of prosthetic-joint infection at revision arthroplasty. *J Clin Microbiol*. 1998;36(10):2932–9.
26. Osmon DR, Berbari EF, Berendt AR, Lew D, Zimmerli W, Steckelberg JM, et al. Diagnosis and management of prosthetic joint infection: Clinical practice guidelines by the infectious diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2013;56(1):1–25.
27. Peel TN, Sedarski JA, Dylla BL, Shannon SK, Amirahmadi F, Hughes JG, et al. Laboratory Workflow Analysis of Culture of Periprosthetic Tissues in Blood Culture Bottles. *J Clin Microbiol*. 2017;55(9).
28. Portillo ME, Salvadó M, Trampuz A, Siverio A, Alier A, Sorli L, et al. Improved diagnosis of orthopedic implant-associated infection by inoculation of sonication fluid into blood culture bottles. *J Clin Microbiol*. 2015;53(5):1622–7.
29. Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE. Prosthetic-Joint Infections. 2004;1645–54.
30. Guo Y, Song G, Sun M, Wang J, Wang Y. Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10(March):1–11.
31. Lee AS, De Lencastre H, Garau J, Kluytmans J, Malhotra-Kumar S, Peschel A, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Dis Prim*. 2018;4(May):1–23.
32. Lakhundi S, Zhang K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clin Microbiol Rev*. 2018;31(4):1–103.
33. Painter KL, Krishna A, Wigneshweraraj S, Edwards AM. What role does the quorum-sensing accessory gene regulator system play during *Staphylococcus aureus* bacteremia ? *Trends Microbiol*. 2014;22(12):676–85.
34. Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, Baba T, Yuzawa H, Kobayashi I, et al. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*. 2001;357(357):1225–40.
35. Otto M. *Staphylococcus aureus* toxins. *Curr Opin microbiol*. 2014;0:32–7.

36. Planet PJ, Narechania A, Chen L, Mathema B, Boundy S, Archer G, et al. Architecture of a Species: Phylogenomics of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 2017;25(2):153–66.
37. Turner NA, Sharma-Kuinkel BK, Maskarinec SA, Eichenberger EM, Shah PP, Carugati M, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. *Nat Rev Microbiol.* 2019;17(4):203–18.
38. Diep BA, Gill SR, Chang RF, Phan TH Van, Chen JH, Davidson MG, et al. Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet.* 2006;367(9512):731–9.
39. Campoccia D, Montanaro L, Arciola CR. Current methods for molecular epidemiology studies of implant infections. *Int J Artif Organs.* 2009;32(9):642–54.
40. Coll P, Coque MT, Domínguez MA, Vázquez J, Vila J. Procedimientos en Microbiología Clínica SEIMC, Métodos moleculares de tipificación epidemiológica en bacteriología. *Procedimientos en Microbiología Clínica SEIMC.* 2005. p. 1–68.
41. Bartels MD, Petersen A, Worning P, Nielsen JB, Larner-Svensson H, Johansen HK, et al. Comparing whole-genome sequencing with sanger sequencing for spa typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 2014;52(12):4305–8.
42. Giulieri SG, Holmes NE, Stinear TP, Howden BP. Use of bacterial whole-genome sequencing to understand and improve the management of invasive *Staphylococcus aureus* infections. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2016;14(11):1023–36.
43. Fernández Cuenca F, López Cerero L, Pascual Hernández Á. Técnicas de tipificación molecular para la vigilancia y control de la infección. *Enferm Infecc Microbiol Cli.* 2013;31(SUPPL.1):20–5. 44. Harmsen D, Claus H, Witte W, Claus H, Turnwald D, Vogel U. 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.* 2003;41(12):5442–8.
45. Grundmann H, Aanensen DM, Wijngaard CC Van Den, Spratt BG, Harmsen D. Geographic Distribution of *Staphylococcus aureus* Causing Invasive Infections in Europe : A Molecular-Epidemiological Analysis. *PLoS Med.* 2010;7(1):1–15.
46. Asadollahi P, Farahani NN, Mirzaii M, Khoramrooz SS. Distribution of the Most Prevalent Spa Types among Clinical Isolates of Methicillin-Resistant and -Susceptible *Staphylococcus aureus* around the World : A Review. *Front Microbiol.* 2018;9(February):1–16.
47. Pérez-Montarelo D, Viedma E, Larrosa N, Gómez-González C, De Gopegui ER, Muñoz-Gallego I, et al. Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* bacteremia: Association of molecular factors with the source of infection. *Front Microbiol.* 2018;9(SEP):1–11.
48. Vindel A, Cuevas O, Cercenado E, Marcos C, Bautista V, Castellares C, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Spain: Molecular epidemiology and utility of different typing methods. *J Clin Microbiol.* 2009;47(6):1620–7.
49. Viedma E, Sanz F, Orellana MA, Juan RS, Aguado JM, Otero R, et al. Relationship between agr dysfunction and reduced vancomycin susceptibility in methicillin-

- susceptible *Staphylococcus aureus* causing bacteraemia. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69:51–8.
50. Post V, Wahl P, Uçkay I, Ochsner P, Zimmerli W, Corvec S, et al. Phenotypic and genotypic characterisation of *Staphylococcus aureus* causing musculoskeletal infections. *Int J Med Microbiol.* 2014;304(5–6):565–76.
 51. Ferry T, Uçkay I, Vaudaux P, François P, Schrenzel J, Harbarth S, et al. Risk factors for treatment failure in orthopedic device-related methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2010;29(2):171–80.
 52. Le KY, Otto M. Quorum-sensing regulation in staphylococci — an overview. *Front Microbiol.* 2015;6(October):1–8.
 53. Singh R, Ray P. Quorum sensing-mediated regulation of staphylococcal virulence and antibiotic resistance. *Future Microbiol.* 2014;9(5):669–81.
 54. Otto M. Staphylococcal biofilm. *Microbiol Spectr.* 2018;176(1):139–48.
 55. Archer NK. *Staphylococcus aureus* biofilms. Properties , regulation and roles in human disease. *Virulence.* 2011;8(1):329–40.
 56. Jenul C, Horswill AR. Regulation of *Staphylococcus aureus* virulence. *Microbiol Spectr.* 2019;7(2):669–86.
 57. Hao H, Dai M, Wang Y, Huang L, Yuan Z. Key genetic elements and regulation systems in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiol.* 2012;7(11):1315–29.
 58. Butrico CE, Cassat JE. Quorum sensing and toxin production in *Staphylococcus aureus* osteomyelitis: Pathogenesis and paradox. *Toxins (Basel).* 2020;12(8):1–22.
 59. Tam K, Torres VJ. *Staphylococcus aureus* secreted toxins and extracellular enzymes. *Microbiol Spectr.* 2019;7(2):640–68.
 60. Gordon RJ, Lowy FD. Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. *Clin Infect Dis.* 2008;46(S5):S350–9.
 61. Kwiecinski JM, Horswill AR. *Staphylococcus aureus* bloodstream infections: pathogenesis and regulatory mechanisms. *Curr Opin Microbiol.* 2020;53:51–60.
 62. Wang J, Wang L. Novel therapeutic interventions towards improved management of septic arthritis. *BMC Musculoskelet Disord.* 2021;22(1):1–18.
 63. Gimza BD, Cassat JE. Mechanisms of Antibiotic Failure During *Staphylococcus aureus* Osteomyelitis. *Front Immunology.* 2021;12:1–8.
 64. Josse J, Valour F, Maali Y, Diot A, Batailler C, Ferry T, et al. Interaction Between Staphylococcal Biofilm and Bone : How Does the Presence of Biofilm Promote Prosthesis Loosening? *Front Microbiol.* 2019;10.
 65. Foster TJ. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. *FEMS Microbiol Rev.* 2017;41(3):430–49.
 66. Ahmad S. Characterization of Novel Antibiotic Resistance Genes in Staphylococcal *aureus*. *J Bacteriol Mycol Open Access.* 2018;6(1):10–2.
 67. Lozano C, Torres C. Actualización en la resistencia antibiótica en Gram positivos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2017;35(1):2–8.
 68. Painter KL, Krishna A, Wigneshweraraj S, Edwards AM. What role does the quorum-sensing accessory gene regulator system play during *Staphylococcus aureus* bacteremia? *Trends Microbiol.* 2014;22(12):676–85.
 69. Lowy FD. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest.* 2003;111(9):1265–73.

70. Geisinger E, Isberg RR. Interplay between antibiotic resistance and virulence during Disease promoted by multidrug-resistant bacteria. *J Infect Dis.* 2017;215(Suppl 1):S9–17.
71. Lade H, Kim JS. Bacterial targets of antibiotics in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics.* 2021;10(4):1–29.
72. Watkins RR, Holubar M, David MZ. Antimicrobial Resistance in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* to Newer Antimicrobial Agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019;63(12):1–14.
73. Coiffier G, Albert J, Arvieux C, Guggenbuhl P. Optimizing combination rifampin therapy for staphylococcal osteoarticular infections. *Jt Bone Spine.* 2020;80(2013):11–7.
74. Zimmerli W, Sendi P, Vitro I, Models A. Role of Rifampin against Staphylococcal Biofilm Infections In Vitro, in Animal Models, and in Orthopedic-Device-Related Infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019;63(2):1–10.
75. Ardanuy C, Cercenado E, Morosini MI, Torres C. Procedimiento Microbiología Clínica SEIMC. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en grampositivos. *Procedimientos en Microbiología Clínica SEIMC.* 2011. p. 1–41.
76. Sendi P, Zimmerli W. The use of rifampin in staphylococcal orthopaedic-device-related infections. *Clin Microbiol Infect.* 2017;23(6):349–50.
77. Lee YC, Chen PY, Wang JT, Chang SC. Prevalence of fosfomycin resistance and gene mutations in clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2020;9(1):1–7.
78. Trouillet-Assant S, Lelièvre L, Martins-Simões P, Gonzaga L, Tasse J, Valour F, et al. Adaptive processes of *Staphylococcus aureus* isolates during the progression from acute to chronic bone and joint infections in patients. *Cell Microbiol.* 2016;18(10):1405–14.
79. Lamret F, Colin M, Mongaret C, Gangloff SC, Reffuveille F. Antibiotic tolerance of *staphylococcus aureus* biofilm in periprosthetic joint infections and antibiofilm strategies. *Antibiotics.* 2020;9(9):1–18.
80. Schilcher K, Horswill AR. Staphylococcal Biofilm Development: Structure, Regulation, and Treatment Strategies. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2020;84(3):1–36.
81. Kranjec C, Angeles DM, Mårli MT, Fernández L, García P, Kjos M, et al. Staphylococcal biofilms: Challenges and novel therapeutic perspectives. *Antibiotics.* 2021;10(2):1–30.
82. Macià MD, Rojo-Molinero E, Oliver A. Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(10):981–90.
83. Valour F, Trouillet-assant S, Riffard N, Tasse J, Flammier S, Rasigade J, et al. Antimicrobial Activity against Intraosteoblastic *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(4):2029–36.
84. Muller-serieys C, Mghir AS, Massias L, Fantin B. Bactericidal activity of the combination of levofloxacin with rifampin in experimental prosthetic knee infection in rabbits due to methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(5):2145–8.
85. Ferreira M, Rzhepishevskaja O, Grenho L, Malheiros D, Gonçalves L, Almeida AJ, et al. Levofloxacin-loaded bone cement delivery system : Highly effective against

- intracellular bacteria and *Staphylococcus aureus* biofilms. *Int J Pharmaceutics*. 2017;532(August):241–8.
86. Meléndez-carmona MÁ, Muñoz-Gallego I, Viedma E, Lora-tamayo J, Chaves F. Intraosteoblastic activity of levofloxacin and rifampin alone and in combination against clinical isolates of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* causing prosthetic joint infection. *Int J Antimicrob Agents*. 2019;54:356–60.
 87. Knafl D, Tobudic S, Cheng SC, Bellamy DR, Thalhammer F. Dalbavancin reduces biofilms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* (MRSE). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017;36:677–80.
 88. Meeker DG, Beenken KE, Mills WB, Loughran AJ, Spencer HJ, Lynn WB, et al. Evaluation of Antibiotics Active against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Based on Activity in an Established Biofilm. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(10):5688–94.
 89. Arciola CR, Campoccia D. Implant infections: adhesion, biofilm formation and immune evasion. *Nat Rev Microbiol*. 2018;16(July):397–409.
 90. Lin YT, Tsai JC, Yamamoto T, Chen HJ, Hung WC, Hsueh PR, et al. Emergence of a small colony variant of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a patient with septic arthritis during long-term treatment with daptomycin. *J Antimicrob Chemother*. 2016;71(7):1807–14.
 91. Kahl BC, Becker K. Clinical Significance and Pathogenesis of Staphylococcal Small Colony. *Am Soc Microbiol*. 2016;29(2):401–27.
 92. Sendi P, Proctor RA. *Staphylococcus aureus* as an intracellular pathogen: the role of small colony variants. *Trends Microbiol*. 2009;17(2):54–8.
 93. Verkaik NJ, Benard M, Boelens HA, De Vogel CP, Nouwen JL, Verbrugh HA, et al. Immune evasion cluster-positive bacteriophages are highly prevalent among human *Staphylococcus aureus* strains, but they are not essential in the first stages of nasal colonization. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17(3):343–8.
 94. Van Wamel WJB, Rooijackers SHM, Ruyken M, van Kessel KPM, van Strijp JAG. The Innate Immune Modulators Staphylococcal Complement Inhibitor and Chemotaxis Inhibitory Protein of *Staphylococcus aureus* Are Located on β The Innate Immune Modulators Staphylococcal Complement Inhibitor and Chemotaxis Inhibitory Protein of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 2006;188(4):1310–5.
 95. Goerke C, Wirtz C, Flückiger U, Wolz C. Extensive phage dynamics in *Staphylococcus aureus* contributes to adaptation to the human host during infection. *Mol Microbiol*. 2006;61(6):1673–85.
 96. Lora-Tamayo J, Murillo O, Iribarren JA, Soriano A, Sánchez-Somolinos M, Baraia-Etxaburu JM, et al. A large multicenter study of methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* prosthetic joint infections managed with implant retention. *Clin Infect Dis*. 2013;56(2):182–94.
 97. Senneville E, Joulie D, Legout L, Valette M, Dezègue H, Beltrand E, et al. Outcome and predictors of treatment failure in total hip/knee prosthetic joint infections due to *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis*. 2011;53(4):334–40.
 98. Al-Nammari SS, Bobak P, Venkatesh R. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* versus methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* adult haematogenous septic arthritis. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2007;127(7):537–42.
 99. Ross JJ, Davidson L. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* septic arthritis:

- An emerging clinical syndrome. *Rheumatology*. 2005;44(9):1197–8.
100. Mínguez S, Molinos S, Mateo L, Gimenez M, Mateu L, Cabello J, et al. Artritis séptica por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina en adultos. *Reumatol Clin*. 2015;11(6):381–6.
 101. Lin WT, Wu C Da, Cheng SC, Chiu CC, Tseng CC, Chan HT, et al. High prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among patients with septic arthritis caused by *Staphylococcus aureus*. *PLoS One*. 2015;10(5):8–15.
 102. Brandt CM, Duffy MCT, Berbari EF, Hanssen AD, Steckelberg JM, Osmon DR. *Staphylococcus aureus* prosthetic joint infection treated with Debridement and Prosthesis Retention. *Mayo Clin Proc*. 1997;74(6):553–8.
 103. Luedicke C, Slickers P, Ehricht R, Monecke S. Molecular fingerprinting of *Staphylococcus aureus* from bone and joint infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010;29(4):457–63.
 104. Choo, KK, Karau MJ. Greenwood-Quaintance, KE, Tilahun, AY, Chella, SD, Jayawant, NM, Patel, R, Rajagopalan G, Kim CK, Karau MJ, Greenwood-Quaintance KE, Tilahun AY, David CS, et al. Superantigens in *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic joint infection Choon. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2015 Mar 1;81(3):201–7.
 105. Aubin GG, Lavigne JP, Guyomarch B, Dina C, Gouin F, Lepelletier D, et al. Staphylokinase and ABO group phenotype: New players in *Staphylococcus aureus* implant-associated infections development. *Future Microbiol*. 2015;10(12):1929–38.
 106. Wildeman P, Tevell S, Eriksson C, Lagos AC, Söderquist B, Stenmark B. Genomic characterization and outcome of prosthetic joint infections caused by *Staphylococcus aureus*. *Sci Rep*. 2020;10(1):1–14.
 107. Ferry T, Uçkay I, Vaudaux P, François P, Schrenzel J, Harbarth S, et al. Risk factors for treatment failure in orthopedic device-related methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010;29(2):171–80.
 108. Newman JH. Review of septic arthritis throughout the antibiotic era. 1976;198–205.
 109. Uçkay I, Al-Mayahi M, Suvà D, Lew D, Vaudaux P. Native Joint Arthritis. *Bone and Joint Infections: From Microbiology to Diagnostics and Treatment*. 2015. 77–91 p.
 110. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, Mcshane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The american rheumatism association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*. 1988;31:315–24.
 111. Friedman ND, Kaye KS, Stout JE, McGarry SA, Trivette SL, Briggs JP, et al. Health care-associated bloodstream infections in adults: A reason to change the accepted definition of community-acquired infections. *Ann Intern Med*. 2002;137(10):791–7.
 112. Morin CA, Hadler JL. Population-Based Incidence and Characteristics of Community-Onset *Staphylococcus aureus* Infections with Bacteremia in 4 Metropolitan Connecticut Areas, 1998. *J Infect Dis*. 2001;184:1029–34.
 113. Wouthuyzen-Bakker M, Lora-Tamayo J, Senneville E, Scarborough M, Ferry T, Uçkay I, et al. Erysipelas or cellulitis with a prosthetic joint in situ. *J Bone Jt Infect*.

- 2018;3(4):222–5.
114. Mansilla EC, Moreno RCM de CL, León JL del P, Luna FFÁ de, Arriaza MM. Procedimiento microbiología clínica SEIMC. Diagnóstico microbiológico de las infecciones asociadas a dispositivos biomédicos. *Procedimientos Microbiología Clínica SEIMC*. 2015:1–46.
 115. Walsh TR, Bolmström A, Qwörnström A, Ho P, Wootton M, Howe RA, et al. Evaluation of Current Methods for Detection of Staphylococci with Reduced Susceptibility to Glycopeptides. *J Clin Epidemiol*. 2001;39(7):2439–44.
 116. Innovotech. MBEC Assay For High-Throughput Antimicrobial Susceptibility Testing of Biofilms. Procedure manual. Innovotech, Inc. 2015:1–21.
 117. Molina-Manso D, Ortiz-Pérez A, Manrubia-Cobo M, Gómez-Barrena E, Cordero-Ampuero J, Esteban J. In vitro susceptibility to antibiotics of staphylococci in biofilms isolated from orthopaedic infections. *Int J Antimicrob Agents*. 2013;41(6):521–3.
 118. Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D. The Calgary Biofilm Device : New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilms. *J Clin Microbiol*. 1999;37(6):1771–6.
 119. Abbanat D, Shang W, Amsler K, Santoro C, Baum E, Crespo-Carbone S, et al. Evaluation of the in vitro activities of ceftobiprole and comparators in staphylococcal colony or microtitre plate biofilm assays. *Int J Antimicrob Agents*. 2014;43(1):32–9.
 120. Innovotech. The MBEC TM Physiology & Genetics (P&G) Assay. p. 1–16.
 121. Cluzel RA, Lopitiaux R, Sirot J, Rampon S. Rifampicin in the treatment of osteoarticular infections due to staphylococci. *J Antimicrob Chemother*. 1984 Jun;13 Suppl C:23–9.
 122. Landersdorfer CB, Bulitta JB, Kinzig M, Holzgrabe U, Sörgel F. Penetration of antibacterials into bone: Pharmacokinetic, pharmacodynamic and bioanalytical considerations. Vol. 48, *Clinical Pharmacokinetics*. 2009:89–124.
 123. Van Bambeke F, Barcia-Macay M, Lemaire S, Tulkens PM. Cellular pharmacodynamics and pharmacokinetics of antibiotics: Current views and perspectives. *Curr Opin Drug Discov Dev*. 2006;9(2):218–30.
 124. Barcia-Macay M, Seral C, Mingeot-Leclercq M-P, Tulkens PM, Van Bambeke F. Pharmacodynamic Evaluation of the Intracellular Activities of Antibiotics against *Staphylococcus aureus* in a Model of THP-1 macrophages. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(3):841–51.
 125. Rimmelé T, Boselli E, Djabarouti S, Bel JC, Guyot R, Saux MC, et al. Diffusion of levofloxacin into bone and synovial tissues. *J Antimicrob Chemother*. 2004;53(3):533–5.
 126. Stulik L, Malafa S, Hudcova J, Rouha H, Henics BZ, Craven DE, et al. α -Hemolysin Activity of Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Predicts Ventilator-associated Pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;190(10):1139–48.
 127. Salgado-Pabón W, Herrera A, Vu BG, Stach CS, Merriman JA, Spaulding AR, et al. *Staphylococcus aureus* β -toxin production is common in strains with the β -toxin gene inactivated by bacteriophage. *J Infect Dis*. 2014;210(5):784–92.
 128. Traber, Katrina E, Novick RP. agr function in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Microbiology*. 2008AD;154(Pt 8):2265–74.
 129. Lázaro-Díez M, Remuzgo-Martínez S, Rodríguez-Mirones C, Acosta F, Icardo JM,

- Martínez-Martínez L, et al. Effects of Subinhibitory Concentrations of Ceftaroline on Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Biofilms. *PLoS One*. 2016;1–15.
130. Stepanovic S , Vukovic D, Hola V, Bonaventura GD, Djukic S, Circovic I, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates : overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*. 2007;115:891–9.
 131. Pérez-Montarelo D, Viedma E, Murcia M, Muñoz-Gallego I, Larrosa N, Brañas P, et al. Pathogenic Characteristics of *Staphylococcus aureus* Endovascular Infection Isolates from Different Clonal Complexes. *Front Microbiol*. 2017;8(MAY):1–13.
 132. Peleg AY, Monga D, Pillai S, Mylonakis E, Moellering Jr RC, Eliopoulos GM. Reduced Susceptibility to Vancomycin Influences Pathogenicity in *Staphylococcus aureus* Infection. *J Infect Dis*. 2009;199(4):532–6.
 133. Ramarao N, Nielsen-Ieroux C, Lereclus D. The Insect *Galleria mellonella* as a Powerful Infection Model to Investigate Bacterial Pathogenesis. *J Vis Exp*. 2012;70(December):1–7.
 134. Chaves F, García-Martínez J, de Miguel S, Sanz F, Otero JR. Epidemiology and Clonality of Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Causing Bacteremia in a Tertiary-Care Hospital in Spain. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2005;26(May):150–6.
 135. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed- field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*. 1995;33(9):2233–9.
 136. CDC. The Pulsed-Field Gel Electrophoresis Process [Internet]. Available from: <https://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/pfge.html> Bacterial
 137. Larsen AR, Stegger M, Sørnum M, Ryan CM, De Miguel N, Johnson PJ. spa typing directly from a mecA, spa and pvl multiplex PCR assay—a cost-effective improvement for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* surveillance. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14(1):611–4.
 138. Kahl BC, Mellmann A, Deiwick S, Peters G, Harmsen D. Variation of the Polymorphic Region X of the Protein A Gene during Persistent Airway Infection of Cystic Fibrosis Patients Reflects Two Independent Mechanisms of Genetic Change in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 2005;43(1):502–5.
 139. Oliveira DC, Lencastre H De. Multiplex PCR Strategy for Rapid Identification of Structural Types and Variants of the mec Element in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(7):2155–61.
 140. Islam Z, Espinosa-gongora C, Damborg P, Larsen J, Guardabassi L. Horses in Denmark Are a Reservoir of Diverse Clones of Methicillin-Resistant and - Susceptible *Staphylococcus aureus*. *Front Microbiol*. 2017;8(April):1–10.
 141. Deurenberg RH, Vink C, Driessen C, Bes M, London N, Etienne J, et al. Rapid detection of Pantón–Valentine leukocidin from clinical isolates of *Staphylococcus aureus* strains by real-time PCR. *FEMS Microbiol Lett*. 2004;240:225–8.
 142. Stegger M, Lindsay JA, Moodley A, Skov R, Broens EM, Guardabassi L. Rapid PCR Detection of *Staphylococcus aureus* Clonal Complex 398 by Targeting the

- Restriction-Modification System Carrying *sau1-hsdS1*. *J Clin Microbiol.* 2011;49(2):732–4.
143. Enright MC, Day NPJ, Davies CE, Peacock SJ. Multilocus Sequence Typing for Characterization of Methicillin- Resistant and Methicillin-Susceptible Clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 2000;38(3):1008–15.
 144. Monecke S, Berger-Bächli B, Coombs G, Holmes A, Kay I, Kearns A, et al. Comparative genomics and DNA array-based genotyping of pandemic *Staphylococcus aureus* strains encoding Panton-Valentine leukocidin. *Clin Microbiol Infect.* 2007;13(3):236–49.
 145. Monecke S, Slickers P, Ehricht R. Assignment of *Staphylococcus aureus* isolates to clonal complexes based on microarray analysis and pattern recognition. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2008;53(2):237–51.
 146. Alere. Manual *S. aureus* genotyping kit 2.0. p. 1–58.
 147. Illumina. An Introduction to Next-Generation Sequencing Technology. 2016. p. 1–16.
 148. Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data [Internet]. 2020. Available from: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
 149. Larsen M V., Cosentino S, Rasmussen S, Friis C, Hasman H, Marvig RL, et al. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *J Clin Microbiol.* 2012;50(4):1355–61.
 150. Carriço JA, Rossi M, Moran-Gilad J, Van Domselaar G, Ramirez M. A primer on microbial bioinformatics for nonbioinformaticians. *Clin Microbiol Infect.* 2018;24(4):342–9.
 151. Monecke S, Coombs G, Shore AC, Coleman DC, Akpaka P, Borg M, et al. A field guide to pandemic, epidemic and sporadic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS One.* 2011;6(4).
 152. Nurk S, Bankevich A, Antipov D, Gurevich AA, Korobeynikov A, Lapidus A, et al. Assembling single-cell genomes and mini-metagenomes from chimeric MDA products. *J Comput Biol.* 2013;20(10):714–37.
 153. Mikheenko A, Prjibelski A, Saveliev V, Antipov D, Gurevich A. Versatile genome assembly evaluation with QUAST-LG. *Bioinformatics.* 2018;34(13):i142–50.
 154. Seemann T. Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics.* 2014;30(14):2068–9.
 155. Aziz RK, Bartels D, Best AA, Dejongh M, Disz T, Edwards RA, et al. The RAST Server : Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics.* 2008;15:1–15.
 156. Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67:2640–4.
 157. Joensen KG, Scheutz F, Lund O, Hasman H, Kaas RS, Nielsen EM, et al. Real-Time Whole-Genome Sequencing for Routine Typing, Surveillance, and Outbreak Detection of Verotoxigenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* 2014;52:1501–10.
 158. Bradley P, Gordon NC, Walker TM, Dunn L, Heys S, Huang B, et al. Rapid antibiotic-resistance predictions from genome sequence data for *Staphylococcus aureus* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Commun.* 2015;6:1–14.
 159. Page AJ, Cummins CA, Hunt M, Wong VK, Reuter S, Holden MTG, et al. Roary: Rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics.*

- 2015;31(22):3691–3.
160. Brynildsrud O, Bohlin J, Scheffer L, Eldholm V. Rapid scoring of genes in microbial pan-genome-wide association studies with Scoary. *Genome Biol.* 2016;17(1):1–9.
 161. Finder SCC, Tool W, Kaya H, Hasman H, Larsen J, Stegger M, et al. SCCmecFinder, a Web-Based Tool for Typing of Staphylococcal Cassette Chromosome mec in *Staphylococcus aureus* Using Whole-Genome Sequence Data. *mSphere.* 2018;3(1):1–9.
 162. GitHub - tseemann/snippy: Rapid haploid variant calling and core genome alignment [Internet]. 2020. Available from: <https://github.com/tseemann/snippy>
 163. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics.* 2009;25(16):2078–9.
 164. Okonechnikov K, Conesa A, García-Alcalde F. Qualimap 2: Advanced multi-sample quality control for high-throughput sequencing data. *Bioinformatics.* 2016;32(2):292–4.
 165. Croucher NJ, Page AJ, Connor TR, Delaney AJ, Keane JA, Bentley SD, et al. Rapid phylogenetic analysis of large samples of recombinant bacterial whole genome sequences using Gubbins. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(3):e15.
 166. Nguyen LT, Schmidt HA, Von Haeseler A, Minh BQ. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol Biol Evol.* 2015;32(1):268–74.
 167. Kalyaanamoorthy S, Minh BQ, Wong TKF, Von Haeseler A, Jermini LS. ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nat Methods.* 2017;14(6):587–9.
 168. Letunic, Ivica, Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Bioinforma Adv Access Publ.* 2006;1–2.
 169. Letunic I, Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(W1):W256–9.
 170. Sahl JW, Lemmer D, Travis J, Schupp JM, Gillece JD, Aziz M, et al. NASP: an accurate, rapid method for the identification of SNPs in WGS datasets that supports flexible input and output formats. *Microb genomics.* 2016;2(8):e000074.
 171. Stamatakis A. RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics.* 2014;30(9):1312–3.
 172. Geneious. Geneious [Internet]. 2020. Available from: <https://www.geneious.com/>
 173. Deatherage DE, Barrick JE. Identification of mutations in laboratory evolved microbes from next-generation sequencing data using breseq. *Methods Mol Biol.* 2014;1151:1–8.
 174. Petkau A, Mabon P, Sieffert C, Knox NC, Cabral J, Iskander M, et al. SNVPhyl: a single nucleotide variant phylogenomics pipeline for microbial genomic epidemiology. *Microb genomics.* 2017;3(6):e000116.
 175. Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, et al. Integrative Genome Viewer. *Nat Biotechnol.* 2011;29(1):24–6.
 176. Ferrand J, El Samad Y, Brunschweiler B, Grados F, Dehamchia-Rehailia N, Séjourne A, et al. Morbimortality in adult patients with septic arthritis: A three-year hospital-based study. *BMC Infect Dis.* 2016;16(1):1–10.

177. Murillo O, Grau I, Lora-Tamayo J, Gomez-Junyent J, Ribera A, Tubau F, et al. The changing epidemiology of bacteraemic osteoarticular infections in the early 21st century. *Clin Microbiol Infect.* 2015;21(3):254.e1-254.e8.
178. Helito CP, Zanon BB, Miyahara H de S, Pecora JR, Munhoz Lima AL, de Oliveira PR, et al. Clinical and epidemiological differences between septic arthritis of the knee and hip caused by oxacillin-sensitive and -resistant *S. aureus*. *Clinics.* 2015;70(1):30–3.
179. McBride S, Mowbray J, Caughey W, Wong E, Luey C, Siddiqui A, et al. Epidemiology, management, and outcomes of large and small native joint septic arthritis in adults. *Clin Infect Dis.* 2020;70(2):271–9.
180. Fangtham M, Baer AN. Methicillin-resistant staphylococcus aureus arthritis in adults: Case report and review of the literature. *Semin Arthritis Rheum.* 2012;41(4):604–10.
181. Murillo O, Gomez-Junyent J, Grau I, Ribera A, Cabrera C, Pedrero S, et al. Clinical findings of bacteremic septic arthritis according to the site of acquisition: The overlap between health care-related and community- and nosocomial-acquired cases. *Eur J Intern Med.* 2016;28:38–42.
182. Frazee BW, Fee C, Lambert L. How Common is MRSA in Adult Septic Arthritis? *Ann Emerg Med.* 2009;54(5):695–700.
183. Rafai M, Abouelalaa K, Skhsoukh Y, Balkhi H, Belyamani L, Dimou M. Evolution of a fatal septic arthritis caused by a Panton-Valentine leukocidin (PVL)-producing *Staphylococcus aureus* strain. *Jt Bone Spine.* 2013:525-7
184. Patti JM, Bremell T, Krajewska-Pietrasik D, Abdelnour A, Tarkowski A, Ryden C, et al. The *Staphylococcus aureus* collagen adhesin is a virulence determinant in experimental septic arthritis. *Infect Immun.* 1994;62(1):152–61.
185. Wouthuyzen-bakker M, Sebillotte M, Lomas J, Taylor A, Benavent E, Murillo O, et al. Clinical outcome and risk factors for failure in late acute prosthetic joint infections treated with debridement and implant retention R. *J Infect.* 2020;78(1):40–7.
186. Byren I, Bejon P, Atkins BL, Angus B, Masters S, Gundle R, et al. One hundred and twelve infected arthroplasties treated with ‘DAIR’ (debridement, antibiotics and implant retention): antibiotic duration and outcome. 2009;(March):1264–71.
187. Salgado CD, Dash S, Cantey JR. Higher Risk of Failure of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Prosthetic Joint Infections. *Clin Orthop Relat Res.* 2007;461:48–53.
188. Fernández-Hidalgo N, Basas J, Viedma E, Ribera A, Larrosa N, Pérez-Montarelo D, et al. Association between biomass formation and the prognosis of infective endocarditis due to *Staphylococcus aureus*. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2020;38(6):263–6.
189. Kwiecinski JM, Jacobsson G, Horswill AR, Josefsson E, Jin T. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* clinical isolates correlates with the infection type. *Infect Dis (Auckl).* 2019;51(6):446–51.
190. Stach CS, Vu BG, Merriman JA, Herrera A, Cahill MP, Schlievert PM, et al. Novel tissue level effects of the *Staphylococcus aureus* enterotoxin gene cluster are essential for infective endocarditis. *PLoS One.* 2016;11(4):1–20.
191. Blomfeldt A, Aamot H V., Eskesen AN, Monecke S, White RA, Leegaard TM, et al. DNA microarray analysis of *staphylococcus aureus* causing bloodstream infection:

- Bacterial genes associated with mortality? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2016;35(8):1285–95.
192. Jin T, Bokarewa M, McIntyre L, Tarkowski A, Corey GR, Reller LB, et al. Fatal outcome of bacteraemic patients caused by infection with staphylokinase-deficient *Staphylococcus aureus* strains. *J Med Microbiol.* 2003;52(10):919–23.
 193. Lora-tamayo J, Murillo O, Iribarren JA, Soriano A, Sánchez-Somolinos M, Baraia-Etxaburu JM, et al. A Large Multicenter Study of Methicillin – Susceptible and Methicillin – Resistant *Staphylococcus aureus* Prosthetic Joint Infections Managed With Implant Retention. *Clin Infect Dis.* 2013;56(2):182–94.
 194. Piechota M, Kot B, Frankowska-Maciejewska A, Gruzewska A, Woźniak-Kosek A. Biofilm Formation by Methicillin-Resistant and Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus* Strains from Hospitalized Patients in Poland. *Biomed Res Int.* 2018;1–7.
 195. Branger C, Gardye C, Galdbart J, Deschamps C, Lambert N. Genetic Relationship between Methicillin-Sensitive and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains from France and from International Sources : Delineation of Genomic Groups. *J Clin Microbiol.* 2003;41(7):2946–51.
 196. Aubin GG, Lepelletier D, Reynaud A, Lavigne JP, Corvec S. Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* CC398: First description in prosthetic joint infection and genetic background comparison with nasal carriage isolates. *J Infect Chemother.* 2014;20(6):394–6.
 197. Bouiller K, Hocquet D, Sauget M, Bertrand X, Chirouze C. Epidemiology and risk factors of *Staphylococcus aureus* CC398 bone and joint infections. *BMC Infect Dis.* 2020;20(1):1–7.
 198. Mistourath Mamaa O, Aspiroz C, Ruiz-Ripaa L, Torres C. Relevance of clonal complex CC398 in bacteremia caused by *Staphylococcus aureus* in a secondary hospital of Aragon, Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2020;38(8):394–5.
 199. Resch A, Fehrenbacher B, Eisele K, Schaller M, Götz F. Phage release from biofilm and planktonic *Staphylococcus aureus* cells. *FEMS Microbiol Lett.* 2005;252(1):89–96.
 200. Berbari EF, Hanssen AD, Duffy MC, Steckelberg JM, Ilstrup DM, Harmsen WS, et al. Risk Factors for Prosthetic Joint Infection: Case-Control Study. *Clin Infect Dis.* 1998;27(5):1247–54.
 201. Libraty DH, Patkar C, Torres B. *Staphylococcus aureus* Reactivation Osteomyelitis after 75 Years. *N Engl J Med.* 2012 Feb 2;366(5):1–2.
 202. Zimmerli W, Widmer AF, Blatter M, Frei R, Ochsner PE. Role of rifampin for treatment of orthopedic implant-related staphylococcal infections: A randomized controlled trial. *J Am Med Assoc.* 1998;279(19):1537–41.
 203. Löwik CAM, Parvizi J, Jutte PC, Zijlstra WP, Knobben BAS, Xu C, et al. Debridement, antibiotics, and implant retention is a viable treatment option for early periprosthetic joint infection presenting more than 4 weeks after index arthroplasty. *Clin Infect Dis.* 2020;71(3):630–6.
 204. Morgenstern M, Erichsen C, Militz M, Xie Z, Peng J, Stannard J, et al. The AO trauma CPP bone infection registry: Epidemiology and outcomes of *Staphylococcus aureus* bone infection. *J Orthop Res.* 2021;39(1):136–46.

205. Bradbury T, Fehring TK, Taunton M, Hanssen A, Azzam K, Parvizi J, et al. The Fate of Acute Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Periprosthetic Knee Infections Treated by Open Debridement and Retention of Components. *J Arthroplasty*. 2009;24(6 SUPPL.):101–4.
206. Falcón R, Madrid S, Tormo N, Casañ C, Albert E, Gimeno C, et al. Intra- and Interinstitutional Evaluation of an Etest for Vancomycin Minimum Inhibitory Concentration Measurement in *Staphylococcus aureus* Blood Isolates. *Clin Infect Dis*. 2015;61(9):1490–2.
207. Guembe M, Alonso B, Lucio J, Pérez-granda MJ, Cruces R, Sánchez-carrillo C, et al. Biofilm production is not associated with poor clinical outcome in 485 patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Microbiol Infect*. 2017;24:659.e1-659.e3.
208. Barsoumian AE, Mende K, Jr CJS, Beckius ML, Wenke JC, Murray CK, et al. Clinical infectious outcomes associated with biofilm-related bacterial infections: a retrospective chart review. *BMC Infect Dis*. 2015;15:1–7.
209. Xu C, Goswami K, Li WT, Tan TL, Yayac M, Wang SH, et al. Is Treatment of Periprosthetic Joint Infection Improving Over Time? *J Arthroplasty*. 2020;35(6):1696-1702.e1.
210. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science (80-)*. 1999;284(5418):1318–22.
211. Coenye T, Goeres D, Bambeke F Van, Bjarnsholt T. Should standardized susceptibility testing for microbial biofilms be introduced in clinical practice? *Clin Microbiol Infect*. 2018;24(6):570–2.
212. Murillo O, Doménech A, Garcia A, Tubau F, Cabellos C, Gudíol F, et al. Efficacy of high doses of levofloxacin in experimental foreign-body infection by methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(12):4011–7.
213. Nguyen S, Robineau O, Titecat M, Blondiaux N, Valette M, Loiez C, et al. Influence of daily dosage and frequency of administration of rifampicin–levofloxacin therapy on tolerance and effectiveness in 154 patients treated for prosthetic joint infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015;34(8):1675–82.
214. Magana, M; Sereti, C; Ioannidis, A; Mitchell, CA; Ball, AR; Magiorkinis, E; Chatzipanagiotou, S; Hamblin, MR; Hadjifrangiskou, M; Tegos G. Options and Limitations in Clinical Investigation of Bacterial Biofilms. *Clin Microbiol Rev*. 2018;31(3):1–49.
215. Rumbaugh KP, Sauer K. Biofilm dispersion. *Nat Rev Microbiol*. 2020;18(10):571–86.
216. Mason A, Foster D, Bradley P, Golubchik T, Doumith M, Gordon NC, et al. Accuracy of different bioinformatics methods in detecting antibiotic resistance and virulence factors from *staphylococcus aureus* whole-genome sequences. *J Clin Microbiol*. 2018;56(9):1–12.
217. Noone JC, Stegger M, Lilje B, Stavem K, Hølmersén K, Skråmm I, et al. Molecular characteristics of *Staphylococcus aureus* associated prosthetic joint infections after hip fractures treated with hemiarthroplasty: a retrospective genome-wide association study. *Sci Rep*. 2020;10(1):1–8.
218. Post V, Harris LG, Morgenstern M, Mageiros L, Hitchings MD, Méric G, et al. Comparative genomics study of *Staphylococcus epidermidis* isolates from

- orthopedic-device-related infections correlated with patient outcome. *J Clin Microbiol.* 2017;55(10):3089–103.
219. Wouthuyzen-Bakker M, Sebillotte M, Arvieux C, Fernandez-Sampedro M, Senneville E, Barbero JM, et al. How to Handle Concomitant Asymptomatic Prosthetic Joints During an Episode of Hematogenous Periprosthetic Joint Infection, a Multicenter Analysis. *Clin Infect Dis.* 2021;1–5.
 220. Antiporters M, Vaish M, Price-whelan A, Reyes-robles T, Liu J, Jereen A, et al. Roles of *Staphylococcus aureus* Mnh1 and Mnh2 Antiporters in Salt Tolerance, Alkali Tolerance, and Pathogenesis. *J Bacteriol.* 2018;7:e00611-17.
 221. Falugi F, Kim HK, Missiakas DM, Schneewind O. Role of protein a in the evasion of host adaptive immune responses by *Staphylococcus aureus*. *MBio.* 2013;4(5):1–9.
 222. Sharp JA, Echague CG, Hair PS, Ward MD, Nyalwidhe JO, Geoghegan JA, et al. *Staphylococcus aureus* surface protein SdrE binds complement regulator factor H as an immune evasion tactic. *PLoS One.* 2012;7(5).
 223. Lozano C, Aspiroz C, Sa Y, Go E, Ruiz-larrea F, Zarazaga M, et al. Genetic environment and location of the *Inu* (A) and *Inu* (B) genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other staphylococci of animal and human origin. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(August):2804–8.
 224. Giulieri SG, Baines SL, Guerillot R, Seemann T, Gonçalves da Silva A, Schultz M, et al. Genomic exploration of sequential clinical isolates reveals a distinctive molecular signature of persistent *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *Genome Med.* 2018;10(1):1–17.
 225. Ma D, Brothers KM, Maher PL, Phillips NJ, Simonetti D, William Pasculle A, et al. *Staphylococcus aureus* genotype variation among and within periprosthetic joint infections. *J Orthop Res.* 2021;(January):1–9.
 226. Foster TJ. The remarkably multifunctional fibronectin binding proteins of *Staphylococcus aureus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2016;35(12):1923–31.
 227. Hos NJ, Rieg S, Kern W V, Jonas D, Fowler VG, Higgins PG, et al. Amino acid alterations in fibronectin binding protein A (FnBPA) and bacterial genotype are associated with cardiac device related infection in *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *J Infect.* 2015;70(2):153–9.
 228. Lower SK, Lamlertthon S, Casillas-Ituarte NN, Lins RD, Yongsunthon R, Taylor ES, et al. Polymorphisms in fibronectin binding protein A of *Staphylococcus aureus* are associated with infection of cardiovascular devices. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(45):18372–7.
 229. Kim CJ, Song KH, Choe PG, Park WB, Kim ES, Park KU, et al. The microbiological characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from patients with native valve infective endocarditis. *Virulence.* 2019;10(1):948–56.
 230. Eichenberger EM, Thaden JT, Sharma-Kuinkel B, Park LP, Rude TH, Ruffin F, et al. Polymorphisms in fibronectin binding proteins A and B among *Staphylococcus aureus* bloodstream isolates are not associated with arthroplasty infection. *PLoS One.* 2015;10(11):1–17.
 231. Löffler B, Tuchscher L, Niemann S, Peters G. *Staphylococcus aureus* persistence in non-professional phagocytes. *Int J Med Microbiol.* 2014;304(2):170–6.

232. Loughman A, Sweeney T, Keane FM, Pietrocola G, Speziale P, Foster TJ. Sequence diversity in the A domain of *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein A. *BMC Microbiol.* 2008;8:1–14.
233. Lewandowski T, Huang J, Fan F, Rogers S, Gentry D, Holland R, et al. *Staphylococcus aureus* formyl-methionyl transferase mutants demonstrate reduced virulence factor production and pathogenicity. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(7):2929–36.
234. Zhu X, Yan X, Carter LG, Liu H, Graham S, Coote PJ, et al. A model for 3-methyladenine recognition by 3-methyladenine DNA glycosylase i (TAG) from *Staphylococcus aureus*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 2012;68(6):610–5.
235. Tande AJ, Osmon DR, Greenwood-Quaintance KE, Mabry TM, Hanssen AD, Patel R. Clinical characteristics and outcomes of prosthetic joint infection caused by small colony variant staphylococci. *MBio.* 2014;5(5):1–9.
236. Kalinka J, Hachmeister M, Geraci J, Sordelli D, Hansen U, Niemann S, et al. *Staphylococcus aureus* isolates from chronic osteomyelitis are characterized by high host cell invasion and intracellular adaptation, but still induce inflammation. *Int J Med Microbiol.* 2014;304:1–12.
237. Pader V, James EH, Painter KL, Wigneshweraraj S, Edwards AM. The agr quorum-sensing system regulates fibronectin binding but not hemolysis in the absence of a functional electron transport chain. *Infect Immun.* 2014;82(10):4337–47.
238. Jamrozy D, Coll F, Mather AE, Harris SR, Harrison EM, MacGowan A, et al. Evolution of mobile genetic element composition in an epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Temporal changes correlated with frequent loss and gain events. *BMC Genomics.* 2017;18(1):1–12.

ANEXOS

ANEXOS

1. ANEXO I. Centros participantes en el estudio prospectivo multicéntrico de infección protésica articular causada por *S. aureus* en la Comunidad de Madrid (estudio PISA) y numeración de los episodios y cepas.

1. Hospital Universitario 12 de Octubre (episodios del 100 al 199)
2. Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz (episodios del 200 al 299)
3. Hospital General Universitario Gregorio Marañón (episodios del 300 al 399)
4. Hospital Universitario La Paz (episodios del 400 al 499)
5. Hospital Universitario Clínico San Carlos (episodios del 500 al 599)
6. Hospital Universitario Príncipe de Asturias (episodios del 600 al 699)
7. Hospital Universitario de Getafe (episodios del 700 al 799)
8. Hospital Universitario Ramón y Cajal (episodios del 800 al 899)
9. Hospital Universitario de La Princesa (episodios del 900 al 999)
10. Hospital Universitario Rey Juan Carlos (episodios del 1000 al 1099)
11. Hospital Universitario Puerta de Hierro (episodios del 1100 al 1199)

A cada centro se le asignó ese rango de números de episodios que se especifica entre paréntesis. Ese número de episodio coincide con el número de cepa estafilocócica remitida. Por ejemplo, el primer caso del Hospital Universitario La Paz fue el caso 401 y la cepa aislada de ese caso se nombró como la 401.1. Si en la evolución del caso 401 se aislara una segunda cepa por persistencia o recidiva de la infección, a esa cepa se le asignaría el código 401.2.

2. ANEXO II. Informe del Comité Ético de Investigación Clínica.



Nº CEI: 16/188

DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN

Dña. **MARÍA UGALDE DÍEZ**, Secretaria del Comité de Ética de la Investigación del HOSPITAL UNIVERSITARIO DOCE DE OCTUBRE.

CERTIFICA:

Que este Comité, en la reunión celebrada el día **28/06/2016**, ha evaluado los aspectos éticos del Proyecto de Investigación **TP16/0092** titulado:

IMPACTO DE LAS CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS Y GENOTÍPICAS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS EN LAS INFECCIONES DE PRÓTESIS ARTICULARES

Del cual es el Investigador Principal el Dr. **CHAVES SANCHEZ, Fernando** del Servicio de **MICROBIOLOGIA**

Entendiendo que dicho estudio se ajusta a las normas éticas esenciales y criterios deontológicos que rigen en este Centro, cumpliendo los requisitos metodológicos necesarios, este Comité **INFORMA FAVORABLEMENTE** a la realización de dicho proyecto en este Centro.

Lo que firmo en Madrid, a 29 de junio de 2016

Firmado: *Dra. María Ugalde Díez*
Secretaria del CEI Hospital Universitario 12 de Octubre.

ANEXO I: COMPOSICIÓN DEL CEI

Nº CEIC: 16/188

TÍTULO: *IMPACTO DE LAS CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS Y GENOTÍPICAS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS EN LAS INFECCIONES DE PRÓTESIS ARTICULARES*

Investigador Principal: CHAVES SANCHEZ, Fernando

Dª MARIA UGALDE DIEZ, SECRETARIA DEL COMITÉ ETICO DE LA INVESTIGACION DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO 12 DE OCTUBRE DE MADRID

Hace constar que:

1. En la reunión ordinaria celebrada el día **28/06/2016**, se decidió emitir el informe correspondiente al proyecto de Investigación de referencia.
2. El CEIC del Hospital Universitario 12 de Octubre, tanto en su composición como en sus PNTs, cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95)
3. La composición del Ceic del Hospital Universitario 12 de Octubre que evaluó el proyecto fue la siguiente:

PRESIDENTE	Dra. Mª del Puy Goyache Goñi	Farmacéutico Adjunto de Farmacia Hospitalaria
VICEPRESIDENTA	Dra. Carmen Jiménez López-Guarch	Medico Cardiología
SECRETARIA	Dra. María Ugalde Diez	Dra. en Ciencias Biológicas
VOCALES:	Dª Mª Luisa Albelda de la Haza	Licenciada Derecho
	Dra. Mª de las Mercedes Catalán Gómez	Medico Medicina Intensiva
	Dr. Rafael Delgado Vázquez	Jefe de Sección de Microbiología Molecular
	Dr. Eduardo Gutiérrez Martínez	Medico Nefrología
	Sra. Mª Pilar Hernández Suarez	Diplomado Universitario en Enfermería
	Dr. Luis Manuel Manso Sanchez	Medico Oncología
	Dra. María del Pilar Martínez Sanchez	Medico Hematología
	Sr. Francisco Javier Mazuecos Gómez	Auxiliar Administrativo Endoscopia
	Dr. Cesar Minué Lorenzo	Médico de Familia de Atención Primaria
	Dra. Gloria Orejón de Luna	Pediatra de Atención Primaria
	Dª. Montserrat Pilas Pérez	Diplomado Universitario en Enfermería
	Dr. Santiago Ponce Aix	Medico Oncología
	Dra. Teresa Yolanda Revilla Ostolaza	Medico Radiología
	Dra. María del Carmen Riesco Martínez	Medico Oncología
	Dra. Yolanda Rodríguez Gil	Médico Anatomía Patológica
	Dr. Roberto Rodríguez Jiménez	Médico Psiquiatría
	Dra. Belén Ruiz Antoran	Farmacóloga clínica (Hospital Universitario Puerta de Hierro)
	Dra. Raquel Siguín Gómez	Farmacéutica Atención Primaria
	Dª Rosa Mª Vega Viaña	Plataforma de Ensayos Clínicos SCReN
	Dr. Alberto Villarejo Galende	Medico Neurología

Que en el caso de que se evaluara algún proyecto del que un miembro sea investigador/colaborador, este se ausentara de la reunión durante la discusión del proyecto.

Para que conste donde proceda, y a petición del promotor,

3. ANEXO III. Formulario de datos de cepas de *S. aureus* enviadas por cada hospital para el estudio prospectivo multicéntrico de infección protésica articular estafilocócica (estudio PISA).

Hoja de recogida de datos (datos microbiológicos)

SE DEBE RECOGER LOS DATOS DE CADA UNA DE LAS CEPAS GUARDADAS

Código de la cepa (ID) _____

Nº muestra (asignado por el centro) _____ Fecha de la muestra
 __/__/____

Origen de la muestra (líquido articular, biopsia articular, material protésico, hemocultivo, ...) _____

Técnica utilizada para determinar la sensibilidad:

Disco-difusión (sí/no) ___ Etest (sí/no) ___ Marca comercial:

Microdilución (sí/no) _____ Marca comercial: ___

Pruebas de sensibilidad (Sólo rellenar los datos disponibles según las pruebas de rutina realizadas en el centro de origen):

	Categoría (S, I, R)	CMI (mg/L)
Penicilina*		
Oxacilina		
Vancomicina		
Teicoplanina		
Daptomicina		
Linezolid		
Eritromicina		
Clindamicina		
Gentamicina		
Rifampicina		
Cotrimoxazol		
Ciprofloxacina		
Levofloxacina		

Fosfomicina		
Mupirocina		
Ácido fusídico		

Observaciones:

4. ANEXO IV. Base de datos diseñada para la recogida de datos clínicos de los casos de artritis séptica nativa estafilocócica.

Episodio

Siglas

Sexo

Fecha nac

**ARTRITIS SÉPTICA
NATIVA POR MRSA**

Fecha inicio

Poliarticular?

Artic. 1

Artic. 2

Artic. 3

Fiebre > 38°C

Signos infl.

HipoTA < 90 mmHg

Leucocitos (/uL)

PCR (mg/dL)

VSG (mm/h)

Bacteriemia

Polimicrobiana?

Artrocentesis

Aspecto

Leucos (/uL)

PMN (%)

Gluc (mg/dL)

Cristales

Gram

Cultivo

	Fecha	Outcome	Secuela
6 m	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
12 m	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
24 m	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

Fecha de último control

Diabetes <input type="text"/>	VIH <input type="text"/>
Insuf. Renal Crónica <input type="text"/>	ADVP <input type="text"/>
Diálisis <input type="text"/>	Reumatismo <input type="text"/>
Tto inmunosupr. <input type="text"/>	Artr. crist. <input type="text"/>
Cancer <input type="text"/>	Trauma <input type="text"/>
Cirrosis <input type="text"/>	IQ previa <input type="text"/>
Cardiopatía <input type="text"/>	Fecha <input type="text"/>
Neumopatía <input type="text"/>	Institucionalizado <input type="text"/>
Demencia <input type="text"/>	Ingreso antes artr <input type="text"/>
Hemiplejía <input type="text"/>	Fecha* <input type="text"/>
Dermopatía <input type="text"/>	Health-Care** <input type="text"/>
Bacteriemia previa <input type="text"/>	- institucionalizado
Fecha <input type="text"/>	- HdDía / QT iv / HD <= 30 día
	- HaD (iv) <= 30 días
	- ingreso > 48h en <= 90 día

Notas

	ATB-1	ATB-2	ATB-3	Fecinicio	Fecha fin
Combo1	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Combo2	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Combo3	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Combo4	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

Fecha tratamiento oral definitiva

Tto IQ-1 Fecha

Tto IQ-2 Fecha

Artrocentesis terapéuticas - nº

* Fecha ingreso actual si nosocomial, fecha alta de último ingreso previo

5. ANEXO V. Base de datos diseñada para la recogida de datos clínicos de los casos de infección protésica articular estafilocócica.

FEpisodio

Número episodio

Iniciales (3 letras)

Sexo

Fecha nacimiento

Infección: datos clínicos

Fecha inicio síntomas

Tipo de infección

Fiebre - T^o >37°C

Dolor local

Signos inflamatorios

Trayecto fistuloso

Supuración herida IQ

Leucocitos sangre (cels/mm3)

PCR (mg/L)

Radiografía

TRATAMIENTO QUIRÚRGICO Y ANTIBIÓTICO

Comorbilidad y datos de la prótesis

Diabetes mellitus

Insuf. Renal Crónica

Artritis Reumatoide

Trat. Inmunosupresor

Neoplasia activa

Cirrosis hepática

Neumopatía crónica

Cardiopatía

Localización prótesis

Núm. prótesis

Fecha colocación

Infección: datos microbiológicos

Sensibilidad Oxacilina

¿Bacteriemia?

¿Infección inicial polimicrobiana?

Microorg. 1

Sensibilidad Quinolonas

Microorg. 2

Sensibilidad Quinolonas

Microorg. 3

Sensibilidad Quinolonas

Follow-up

Último control

Fecha último control

Evolución infección

¿Necesita antibióticos supresivos?

PCR (mg/L)

Clase Funcional

Radiografía prótesis

Fecha inicio ATB supr.

ATB Supr. 1

ATBSupr2:

Exitus

¿Relacionado con la infección?

Fecha de exitus

¿Duración de la infección estafilocócica?

Durante el episodio, ¿superinfección por otros microorganismos?

Microorganismo (1)

Microorganismo (2)

Finalmente, ¿hubo que retirar la prótesis?

Motivo de retirada de la prótesis

Resumen evolución

Nota

Tratamiento quirúrgico y antibiótico

Núm Episodio	<input type="text"/>	Abrir bloque de tratamiento por cada cirugía realizada Escribir tratamientos antibióticos hasta la siguiente cirugía El primer bloque puede comprender antibioterapia sin cirugía			
Núm bloque tratamiento	<input type="text"/>				
Tipo de Cirugía	<input type="text"/>	Fecha cirugía	<input type="text"/>	Notas	<input type="text"/>
Recambio polietileno	<input type="text"/>				
Colocación de espaciador	<input type="text"/>	Antibiótico espaciador	<input type="text"/>		
	Antibiótico (1)	Antibiótico (2)	¿Rifampicina?	Fecha inicio combinación	Fecha fin combinación
Combinación 1	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Combinación 2	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Combinación 3	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Combinación 4	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

6. ANEXO VI. Asociación de genes con variables clínicas de interés en la infección protésica articular (Bloque III de secuenciación de genoma completo).

Genes asociados a la resistencia a oxacilina (*p-value*<0.05 y *FDR*<0.1)

Gen	Anotación
<i>mecA</i>	penicillin binding protein 2 prime
<i>mecR1</i>	methicillin resistance protein
<i>ccrA</i>	cassette chromosome recombinase A
<i>ccrB</i>	cassette chromosome recombinase B
	IS1182 family transposase ISSep1
<i>set9</i>	exotoxin 9
<i>set6</i>	exotoxin 6
<i>set11</i>	exotoxin 11
<i>ear</i>	Ampiciline resistance protein
<i>secB</i>	Protein-export protein SecB
<i>fhuD2</i>	hydroxamate siderophore binding lipoprotein
	truncated transposase
	truncated transposase
<i>hsdS</i>	Type I restriction modification system specificity subunit
	Alpha-Hemolysin precursor
<i>dut</i>	Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase
<i>aroB</i>	3-dehydroquinate synthase
<i>aroB</i>	3-dehydroquinate synthase
	truncated replication protein for plasmid
<i>pre</i>	plasmid recombination enzyme
	truncated replication protein for pUB110 plasmid
<i>bleO</i>	bleomycin resistance protein
<i>aadD</i>	kanamycin nucleotidyltransferase
<i>capD</i>	capsular polysaccharide synthesis enzyme
	Alpha-Hemolysin precursor
<i>coa</i>	staphylocoagulase precursor
	tRNA-Ala(tgc)

	single-strand DNA-binding protein
<i>cap8I</i>	capsular polysaccharide synthesis enzyme
<i>cap8K</i>	capsular polysaccharide synthesis enzyme
<i>cap8J</i>	capsular polysaccharide synthesis enzyme
<i>capH</i>	capsular polysaccharide synthesis enzyme O-acetyl transferase
	Cap5H
<i>capI</i>	capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap5I
<i>capJ</i>	capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap5J
<i>capK</i>	capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap5K
<i>capD</i>	capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap5D
<i>tnp</i>	transposase
<i>agrD</i>	AgrD protein
<i>agrB</i>	accessory gene regulator B
<i>set14</i>	exotoxin 14
	LysR family regulatory protein
	deoxyribose-phosphate aldolase
<i>int_2</i>	integrase
<i>yent2</i>	enterotoxin YENT2
<i>sem</i>	enterotoxin SEM
<i>set13</i>	exotoxin 13
<i>fIr</i>	FPRL1 inhibitory protein
<i>seo</i>	enterotoxin SeO
<i>cna</i>	collagen adhesin
<i>msr(A)</i>	ABC-F type ribosomal protection protein Msr(A)
<i>sbi</i>	IgG-binding protein
<i>spE</i>	serine protease
<i>pre</i>	plasmid recombination enzyme
<i>spC</i>	serine protease SpC
<i>sbi</i>	IgG-binding protein SBI
	ABC transporter ATP-binding protein
<i>TRAP</i>	signal transduction protein TRAP
<i>set10</i>	exotoxin 10
<i>cap8H</i>	capsular polysaccharide synthesis enzyme
<i>truncated(mapW)</i>	truncated map-w protein
<i>truncated-SA_1</i>	truncated hypothetical protein
	acetyltransferase (GNAT) family protein
<i>trap</i>	signal transduction protein
	ABC transporter ATP-binding protein

<i>sasG</i>	Surface protein response regulator
	ISNCY family transposase ISBli29
	sensor kinase protein
	tRNA-Ala(tgc)
<i>hsdM</i>	type I site-specific deoxyribonuclease LldI chain hsdM
	transposase for IS-like element
<i>truncated-SA_2</i>	truncated transposase
<i>sigS</i>	RNA polymerase sigma factor SigS
<i>splA</i>	serine protease SplA
<i>vraG</i>	ABC transporter permease
<i>isaB</i>	immunodominant antigen B
<i>fmt</i>	autolysis and methicillin resistant-related protein phage integrase family protein
<i>vraF</i>	ABC transporter protein
<i>isaB</i>	immunodominant antigen B
<i>ssp</i>	extracellular ECM and plasma binding protein
<i>lukD</i>	leukotoxin, LukD
<i>lukE</i>	leukotoxin LukE
<i>arg</i>	arginase
<i>vraF</i>	ABC transporter ATP-binding protein
<i>vraG</i>	ABC transporter permease
<i>set7</i>	exotoxin 7
<i>fmtA</i>	FmtA, autolysis and methicillin resistant-related protein
<i>set12</i>	exotoxin 12
<i>truncated(mapW)</i>	truncated map-w protein
<i>ptbA</i>	PTS transport system protein
<i>hlgC</i>	leukocidin S subunit
	inositol monophosphatase family protein
<i>fadB</i>	fatty oxidation complex protein
	ABC transporter ATP_binding protein
<i>lukF</i>	leukocidin F subunit
<i>appA</i>	Oligopeptide-binding protein AppA
<i>ybhR</i>	membrane protein
<i>bin3</i>	transposon Tn552 DNA-invertase bin3 tRNA-Lys(ttt)

<i>set8</i>	exotoxin 8
<i>set15</i>	exotoxin 15
<i>aur</i>	zinc metalloproteinase aureolysin
<i>fosB</i>	fosfomycin resistance protein fofB
<i>esxB</i>	ESAT-6 secretion system extracellular protein B
<i>esxC</i>	ESAT-6 secretion system extracellular protein C
<i>esxD</i>	ESAT-6 secretion system extracellular protein D
<i>aur</i>	zinc metalloproteinase aureolysin precursor
	transposase
<i>set5</i>	exotoxin 5
<i>s/11</i>	exotoxin
	N-acetyltransferase family protein
<i>leuA</i>	2-isopropylmalate synthase
<i>tagE</i>	glycosyl transferase
<i>s/11</i>	exotoxin
<i>truncated-SA</i>	IS1182 family transposase ISSau3
<i>sep</i>	enterotoxin P
<i>hysA</i>	hyaluronate lyase precursor
<i>spID</i>	serine protease SpID
<i>truncated(tnp)</i>	truncated transposase
<i>agrB</i>	autoinducer processing protein
<i>agrD</i>	autoinducer peptide precursor
<i>ebh</i>	Extracellular matrix-binding protein ebh
<i>deoC2</i>	deoxyribose-phosphate aldolase
<i>sem_2</i>	enterotoxin
<i>map_2</i>	MHC class II analog
	tandem lipos family protein
<i>spIF</i>	serine protease SpIF
<i>set3</i>	exotoxin 3
<i>rocF</i>	arginase
<i>s/11</i>	exotoxin
	acetyltransferase (GNAT) family protein
<i>gltR</i>	bacterial regulatory helix-turn-helix, lysR family protein
<i>menG</i>	2-phytyl-1,4-naphtoquinone methyltransferase
<i>seg</i>	extracellular enterotoxin type G precursor
<i>sen</i>	enterotoxin SeN
	transport system extracellular binding lipoprotein
	transposase for IS-like element

<i>murF</i>	UDP-N-acetylmuramoyl-tripeptide--D-alanyl-D-alanine ligase tRNA-Val(tac)
<i>rlp</i>	RGD-containing lipoprotein
<i>cysL</i>	LysR family regulatory protein
<i>oatA</i>	O-acetyltransferase OatA tandem lipos family protein
<i>pre</i>	plasmid recombination enzyme family protein
<i>wecD</i>	dTDP-fucosamine acetyltransferase
<i>aphA</i>	Aminoglycoside 3'-phosphotransferase
<i>sdrC</i>	Ser-Asp rich fibrinogen-binding, bone sialoprotein-binding protein
<i>hsdM</i>	type I restriction enzyme modification protein
<i>sei</i>	extracellular enterotoxin type I precursor

Genes asociados al hospital 8 (p -value<0.05 y FDR<0.1)

Gen	Anotación
<i>gltR</i>	bacterial regulatory helix-turn-helix, lysR family protein toxin, beta-grasp domain protein fecCD transport family protein ABC transporter family protein transposase family protein toxin, beta-grasp domain protein ABC transporter family protein
<i>seh</i>	Enterotoxin type H
<i>flr</i>	FPRL1 inhibitory protein
<i>fdh</i>	NAD-dependent formate dehydrogenase
<i>fnbA</i>	fibronectin-binding protein A
<i>truncated(tnp)</i>	truncated transposase rnat-Ala(tgc)
<i>menG</i>	2-phytyl-1,4-naphtoquinone methyltransferase
<i>tnp</i>	transposase LysR family regulatory protein CHAP domain protein type I restriction modification DNA specificity domain protein tandem lipos family protein tandem lipos family protein
	polysaccharide lyase family 8, super-sandwich domain protein
<i>sl11</i>	superantigen-like protein 11 flavin reductase like domain protein peptide methionine sulfoxide reductase family protein
<i>emp</i>	extracellular matrix -binding protein emp helix-turn-helix family protein
<i>icaC</i>	intercellular adhesion protein C transketolase, pyrimidine binding domain protein
<i>opp-2B</i>	oligopeptide transporter membrane permease domain protein
<i>opp-2C</i>	oligopeptide transporter membrane permease domain protein

<i>opp-2D</i>	oligopeptide transport ATPase
<i>opp-2F</i>	oligopeptide transporterATPase domain protein
<i>folP</i>	dihydropteroate synthase chain A synthetase
	H ⁺ antiporter-2 family protein
	bacterial regulatory s, tetR family protein
	HAD hydrolase, IA, variant 1 family protein
	thermophilic metalloprotease family protein
	NETI family protein
<i>yezG</i>	antitoxin YezG
	degT/DnrJ/EryC1/StrS aminotransferase family protein
	phosphoenolpyruvate-dependent sugar phosphotransferase system, EIIA 2 family protein
	sir2 silent information regulator family NAD-dependent deacetylase
	N-acetyl-ornithine/N-acetyl-lysine deacetylase family protein
	bacterial regulatory s, luxR family protein
	type I restriction modification DNA specificity domain protein
<i>argC</i>	N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase
<i>paiB</i>	protease synthase and sporulation protein PAI 2
<i>fib</i>	fibrinogen-binding protein
	carbamoyl-phosphate synthase L chain, ATP binding domain protein
	IS30 family transposase IS1252
	Blt-like protein
	tandem lipos family protein
	IS1182 family transposase ISSau3
	ABC-2 transporter family protein
<i>lrpC</i>	HTH-type transcriptional regulator LrpC
	ABC-2 type transporter family protein
	HAD hydrolase, IIB family protein
	bacterial regulatory s, tetR family protein
	saccharopine dehydrogenase family protein
	tandem lipos family protein
	ABC transporter family protein
<i>folP</i>	dihydropteroate synthase
<i>norB</i>	quinolone resistance protein norB
<i>ecfA2</i>	energy-coupling factor transporter ATP-binding protein EcfA2
	coagulase family protein
<i>fIr</i>	FPRL1 inhibitory protein
	host cell surface-exposed lipofamily protein
	toxin, beta-grasp domain protein
	PAP2 superfamily protein
	viral (Super1) RNA helicase family protein
	N-6 DNA Methylase family protein
<i>lysA</i>	diaminopimelate decarboxylase
<i>ampS</i>	aminopeptidase ampS
	ABC transporter family protein
	ABC transporter family protein
	binding--dependent transport system inner membrane component family protein
	ABC transporter family protein
	ABC transporter family protein
	SWIM zinc finger family protein
<i>yhal</i>	Inner membrane protein Yhal
<i>lysA</i>	diaminopimelate decarboxylase
	binding--dependent transport system inner membrane component family protein

<i>oatA</i>	O-acetyltransferase OatA tandem lipos family protein
<i>hsdM</i>	type I site-specific deoxyribonuclease LldI chain hsdM

7. ANEXO VII. Publicaciones en revistas internacionales relacionadas con la tesis doctoral

- Influence of molecular characteristics in the prognosis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* prosthetic joint infections: beyond the species and the antibiogram. Muñoz-Gallego I, Lora-Tamayo J, Pérez-Montarelo D, Brañas P, Viedma E, Chaves F. Infection 2017;45(4):533-7.
- *Staphylococcus aureus* native arthritis over 10 years. Muñoz-Gallego I, Mancheño M, Pérez-Montarelo D, Viedma E, Chaves F, Lora-Tamayo J. Médecine et Maladies Infectieuses 2020;50(3):257-62.
- Genotypic and phenotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* prosthetic joint infections: insight on the pathogenesis and prognosis of a multicenter prospective cohort. Muñoz-Gallego I, Viedma E, Esteban J, Mancheño-Losa M, García-Cañete J, Blanco-García A, Rico A, García-Perea A, Ruiz Garbajosa P, Escudero-Sánchez R, Sánchez Somolinos M, Marín Arriaza M, Romanyk J, Barbero JM, Arribi Vilela A, González Romo F, Pérez-Jorge C, M. Arana D, Monereo A, Domingo D, Cordero J, Sánchez Romero MI, García Viejo MA, Lora-Tamayo J, Chaves F. Grupo de Infección Osteoarticular de la Comunidad de Madrid. Open Forum Infectious Diseases 2020;7(9):ofaa344.

Influence of molecular characteristics in the prognosis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* prosthetic joint infections: beyond the species and the antibiogram

Irene Muñoz-Gallego¹ · Jaime Lora-Tamayo² · Dafne Pérez-Montarelo¹ · Patricia Brañas¹ · Esther Viedma¹ · Fernando Chaves¹

Received: 19 December 2016 / Accepted: 20 March 2017 / Published online: 7 April 2017
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2017

Abstract We have explored the relationship of phenotypic (antibiogram, β -haemolysis, *agr* functionality, biofilm formation) and genotypic characteristics on the prognosis of 18 cases of methicillin-resistant *S. aureus* prosthetic joint infection (2005–2015). All isolates belonged to CC5, and had *agr* type II. This pilot study suggests that phage-borne genes belonging to the immune evasion cluster (*chp*, *sak* and *scn*) were more frequent among episodes with treatment failure (80.0 vs. 37.5%).

Keywords Biofilms · Bone infections · Joint infections · DAIR · MRSA

Introduction

Prosthetic joint infection (PJI) is a dreadful complication after an arthroplasty, it requiring complex surgical and medical management [1]. *Staphylococcus aureus* is a common aetiology of PJI mainly due to its ability to adhere and invade host tissues, evade immune defences, and produce biofilm [2]. In addition, antibiotic resistance associated to methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) increases the difficulties of management [1, 3].

Previous studies have focused on the search of clinical predictors of outcome in staphylococcal PJI [4], but very few have studied the influence of virulence determinants, such as the accessory gene regulator (*agr*) [2, 5–8]. The aim of this study was to describe the clinical and microbiological characteristics of MRSA PJIs and to investigate whether specific phenotypic or genotypic factors could be related to the outcome.

Patients and methods

Setting and patients

A retrospective study was conducted at the Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, including all MRSA PJIs between 2005 and 2015. The study was approved by the ethics committee of the hospital. PJI by MRSA was defined by ≥ 2 surgical, joint-aspirated or blood cultures yielding MRSA, along with a compatible clinical presentation (i.e. presence of sinus tract, purulence surrounding the prosthesis, and/or local inflammatory signs) [9]. Clinical records were reviewed to collect clinical and treatment information. PJI was considered acute if it was early postoperative (i.e. infection beginning within the first 30 days after prosthesis placement), haematogenous (acute onset after a clinically suspected or documented bacteraemia) or as the result of spread from a contiguous infected focus. Cases with post-operative infections beginning beyond the first 30 days after the index surgery were considered chronic.

Surgical management of these patients was decided by the treating medical team on an individualized basis, usually following current recommendations [1, 9]. Briefly, patients with an acute infection, a stable prosthesis and good condition of periprosthetic soft tissues were

✉ Jaime Lora-Tamayo
jaime@lora-tamayo.es

¹ Servicio de Microbiología, Instituto de Investigación Biomédica Hospital 12 de Octubre, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain

² Unidad de Enfermedades Infecciosas, Instituto de Investigación Biomédica Hospital 12 de Octubre, Hospital Universitario 12 de Octubre, Avenida de Córdoba sn, Madrid 28041, Spain



Disponible en ligne sur

ScienceDirect
 www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

EM|consulte
 www.em-consulte.com


Original article

Staphylococcus aureus native arthritis over 10 years

Une décennie d'arthrites à Staphylococcus aureus sur articulations natives

 I. Muñoz-Gallego^{a,b,*}, M. Mancheño^{b,c}, D. Pérez-Montarelo^{a,b}, E. Viedma^{a,b}, F. Chaves^{a,b},
 J. Lora-Tamayo^{b,c}
^a Servicio de Microbiología, Hospital Universitario 12 de Octubre, Universidad Complutense, Madrid, Spain^b Instituto de Investigación Biomédica, Hospital Universitario 12 de Octubre, Universidad Complutense, Madrid, Spain^c Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitario 12 de Octubre, Universidad Complutense, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 June 2018

Received in revised form

25 September 2018

Accepted 28 January 2020

Available online 11 February 2020

Keywords:

Joint infections

Molecular epidemiology

MRSA

Native septic arthritis

Staphylococcus aureus

Mots clés :

Arthrite septique native

Épidémiologie moléculaire

Infections des articulations

SARM

Staphylococcus aureus

ABSTRACT

Objectives. – Septic arthritis is associated with significant case fatality and morbidity. *Staphylococcus aureus* is the most common cause of arthritis. We aimed to analyze the microbiological features of *S. aureus* causing native arthritis and to investigate their influence on the clinical outcome of the infection.

Patients and methods. – We conducted a retrospective study including all episodes of *S. aureus* native arthritis between 2005–2015. Phenotypic (antimicrobial susceptibility, β -hemolysis, *agr* functionality, biofilm formation) and genotypic characteristics (pulsed-field gel electrophoresis, DNA microarrays) were investigated. The primary endpoint was microbiological failure of treatment, including infection relapse, persistence, or attributable death.

Results. – Twenty-nine patients were included (65.5% of men, mean age: 59): seven (24.1%) patients presenting with methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) native arthritis and 19 with methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) native arthritis. Treatment failure occurred in seven (26.9%) patients (4/7 patients [57.1%] among MRSA infections vs. 3/19 [15.8%] among MSSA infections). The persistence rate was similar in MRSA and MSSA infections (1/7 vs. 3/19). However, the case fatality was significantly higher in patients with MRSA infection (3/7 vs. 0/19). The most frequent clonal complex (CC) was CC5 (38.1%). MSSA showed higher genetic variability (nine CCs) versus MRSA (3 CCs).

Conclusions. – Beyond methicillin resistance, we did not find phenotypic or genotypic factors associated with the poor outcome of *S. aureus* native arthritis. CC5 was the major CC, showing the higher genetic variability of MSSA versus MRSA.

© 2020 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

R É S U M É

Objectifs. – L'arthrite septique (AS) est associée à une importante morbi-mortalité. *Staphylococcus aureus* est la cause la plus courante d'AS. L'objectif était d'analyser les caractéristiques microbiologiques des AS natives causées par *S. aureus* et leur influence sur le résultat clinique.

Patients et méthodes. – Étude rétrospective ayant inclus tous les épisodes d'AS à *S. aureus* de 2005 à 2015. Les caractéristiques phénotypiques (sensibilité aux antimicrobiens, β -hémolyse, fonctionnalité du *agr*, formation de biofilms) et génotypiques (PFGE, ADN-microarrays) ont été examinées. Le critère d'évaluation principal était l'échec microbiologique du traitement (rechute, persistance ou mort attribuable).

Résultats. – Vingt-neuf patients ont été inclus (65,5 % d'hommes, âge moyen 59 ans) : sept (24,1 %) patients atteints d'AS causée par *S. aureus* résistant à la métilcilline (SARM) et 19 par *S. aureus* sensible à la métilcilline (SASM). Un échec thérapeutique a été observé chez sept patients (26,9 %) : 4/7 patients (57,1 %) pour SARM contre 3/19 (15,8 %) pour SASM ($p = 0,057$). Le taux de persistance était semblable

* Corresponding author at: Servicio de Microbiología, Hospital Universitario 12 de Octubre, Instituto de Investigación Biomédica Hospital 12 de Octubre, Avenida de Córdoba s/n, Madrid 28041, Spain.

E-mail address: iremunoz@gmail.com (I. Muñoz-Gallego).

<https://doi.org/10.1016/j.medmal.2020.01.012>

0399-077X/© 2020 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Genotypic and Phenotypic Characteristics of *Staphylococcus aureus* Prosthetic Joint Infections: Insight on the Pathogenesis and Prognosis of a Multicenter Prospective Cohort

Irene Muñoz-Gallego,^{1,2} Esther Viedma,^{1,2,3} Jaime Esteban,^{4,5} Mikel Manchuelo-Losa,^{2,5} Joaquín García-Cañete,⁶ Antonio Blanco-García,⁶ Alicia Rico,⁷ Adelaida García-Perea,⁸ Patricia Ruiz Garbajosa,^{3,9} Rosa Escudero-Sánchez,^{3,10} Mar Sánchez Somolinos,¹¹ Mercedes Marín Arriaza,^{11,12} Juan Romanyk,¹³ José María Barbero,¹⁴ Ana Arribi Vilela,¹⁵ Fernando González Romo,¹⁵ Conchita Pérez-Jorge,¹⁶ David M. Arana,¹⁷ Alfonso Monereo,¹⁸ Diego Domingo,¹⁹ José Cordero,²⁰ M^a Isabel Sánchez Romero,²¹ Miguel Ángel García Viejo,²² Jaime Lora-Tamayo,^{2,23} and Fernando Chaves^{1,2,23}, on behalf of Grupo de Infección Osteoarticular de la Comunidad de Madrid

¹Servicio de Microbiología, Hospital Universitario 12 de Octubre, Universidad Complutense, Madrid, Spain, ²Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre (imas12), Madrid, Spain, ³Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI), Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación, Sevilla, Spain, ⁴Servicio de Microbiología, IIS-Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain, ⁵Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitario 12 de Octubre, Universidad Complutense, Madrid, Spain, ⁶Servicio de Medicina Interna-Urgencias, Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain, ⁷Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain, ⁸Servicio de Microbiología, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain, ⁹Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain, ¹⁰Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain, ¹¹Servicio de Microbiología y Enfermedades Infecciosas, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain, ¹²CIBER de Enfermedades Respiratorias (CIBERES CB06/06/D058), Madrid, Spain, ¹³Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Príncipe de Asturias, Alcalá de Henares, Madrid, Spain, ¹⁴Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitario Príncipe de Asturias, Alcalá de Henares, Madrid, Spain, ¹⁵Servicio de Microbiología, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain, ¹⁶Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Rey Juan Carlos, Móstoles, Madrid, Spain, ¹⁷Servicio de Microbiología, Hospital Universitario de Getafo, Getafo, Madrid, Spain, ¹⁸Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitario de Getafo, Getafo, Madrid, Spain, ¹⁹Servicio de Microbiología, Hospital Universitario de La Princesa, Madrid, Spain, ²⁰Servicio de Traumatología, Hospital Universitario de La Princesa, Madrid, Spain, ²¹Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Majadahonda, Madrid, Spain, and ²²Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Majadahonda, Madrid, Spain

Background. *Staphylococcus aureus* is the leading cause of prosthetic joint infection (PJI). Beyond the antibiogram, little attention has been paid to the influence of deep microbiological characteristics on patient prognosis. Our aim was to investigate whether microbiological genotypic and phenotypic features have a significant influence on infection pathogenesis and patient outcome.

Methods. A prospective multicenter study was performed, including all *S. aureus* PJIs (2016–2017). Clinical data and phenotypic (*agr* functionality, β -hemolysis, biofilm formation) and genotypic characteristics of the strains were collected. Biofilm susceptibility to antimicrobials was investigated (minimal biofilm eradication concentration [MBEC] assay).

Results. Eighty-eight patients (39.8% men, age 74.7 \pm 14.1 years) were included. Forty-five had early postoperative infections (EPIs), 21 had chronic infections (CPIs), and 19 had hematogenous infections (HIs). Twenty (22.7%) were caused by methicillin-resistant *S. aureus*. High genotypic diversity was observed, including 16 clonal complexes (CCs), with CC5 being the most frequent (30.7%). *agr* activity was greater in EPI than CPI (55.6% vs 28.6%; $P = .041$). Strains causing EPI were phenotypically and genotypically similar, regardless of symptom duration. Treatment failure (36.5%) occurred less frequently among cases treated with implant removal. In cases treated with debridement and implant retention, there were fewer failures among those who received combination therapy with rifampin. No genotypic or phenotypic characteristics predicted failure, except vancomycin minimal inhibitory concentration ≥ 1.5 mg/L (23.1% failure vs 3.4%; $P = .044$). MBEC₅₀ was >1.28 mg/L for all antibiotics tested and showed no association with prognosis.

Conclusions. *S. aureus* with different genotypic backgrounds is capable of causing PJI, showing slight differences in clinical presentation and pathogenesis. No major microbiological characteristics were observed to influence the outcome, including MBEC.

Keywords. biofilm; bone infections; pathogenesis; prosthetic joint infections; *Staphylococcus aureus*.

Received 5 April 2020; editorial decision 31 July 2020; accepted 8 August 2020.

Correspondence: Jaime Lora-Tamayo, MD, PhD, Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitario 12 de Octubre, Instituto de Investigación Biomédica Hospital 12 de Octubre, Avenida de Córdoba sn, Madrid 28041, Spain (jaimo@lora-tamayo.es).

Open Forum Infectious Diseases®

© The Author(s) 2020. Published by Oxford University Press on behalf of Infectious Diseases Society of America. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits non-commercial reproduction and distribution of the work, in any medium, provided the original work is not altered or transformed in any way, and that the work is properly cited. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oup.com
DOI: 10.1093/ofid/ofaa344

Prosthetic joint infection (PJI) is a serious complication of arthroplasty, resulting in significant morbidity and costs. Although the outcome of PJI is largely dependent on specialized surgery and appropriate antimicrobial treatment, the etiology is also very important for defining the pathogenesis and prognosis.

The ability of bacteria to cause PJI depends on virulence factors that enable attachment, biofilm development, tissue damage, and intracellular invasion, among other complications. The specific bacteria responsible for the infection have

8. ANEXO VIII. Comunicaciones presentadas en congresos relacionadas con la tesis doctoral

Congresos internacionales

- In vitro *biofilm* susceptibility of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* to rifampin and levofloxacin and their combination in prosthetic joint infections. Muñoz-Gallego I, Viedma E, Mancheño M, Esteban J, Ruiz Garbajosa P, Rico A, Lora-Tamayo J, Chaves F. Grupo de Infección Osteoarticular de la Comunidad de Madrid. 29th ECCMID, the European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Ámsterdam, Holanda. 13-16 de Abril de 2019.
- Persisting and relapsing *Staphylococcus aureus* prosthetic joint infection managed with Debridement, Antibiotics and Implant Retention (DAIR): microbiological and molecular adaptation. Muñoz-Gallego I, Meléndez-Carmona MA, Garrido Allepuz C, Viedma E, Lora-Tamayo J, Sebastián V, Chaves F. 31st ECCMID, the European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Online congress. 9-12 de Julio de 2021.

Congresos nacionales

- Artritis nativas por *Staphylococcus aureus* durante un período de 10 años: características clínicas y microbiológicas. Muñoz-Gallego I, Mancheño M, Pérez-Montarelo D, Viedma E, Lora-Tamayo J, Chaves F. XXI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Málaga, España. 11-13 de Mayo de 2017.
- Caracterización microbiológica, fenotípica y genotípica, de la infección protésica articular por *Staphylococcus aureus*: estudio multicéntrico en la Comunidad de Madrid. Muñoz-Gallego I, Viedma E, Mancheño M, Pérez-Montarelo D, Esteban J, Rico A, Ruiz Garbajosa P, Marín M, Arribi A, Romanyk J, Pérez Jorge C, Molina Arana D, Domingo D, Sánchez Romero I, Lora-Tamayo J, Chaves F. Grupo de Infección Osteoarticular de la Comunidad de Madrid. XXII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Bilbao, España. 24-26 de Mayo de 2018.

- Epidemiología molecular de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina CC5 causante de infección osteoarticular a través de secuenciación de genoma completo en la Comunidad de Madrid. Muñoz-Gallego I, Larsen J, Islam Z, Lora-Tamayo J, Larsen AR, Chaves F, Viedma E. Grupo de Infección Osteoarticular de la Comunidad de Madrid. XXII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Bilbao, España. 24-26 de Mayo de 2018.
- Influencia de las características microbiológicas en la presentación clínica de una cohorte prospectiva multicéntrica de infección de prótesis articular por *Staphylococcus aureus*: estudio PISA. Muñoz-Gallego I, Viedma E, Mancheño M, García Cañete J, Esteban J, Rico A, Cobo J, Ruiz Garbajosa P, Sánchez Somolinos M, Marín M, Barbero JM, Romanyk J, Arribi A, Pérez Jorge C, Pérez Caballero G, Domingo D, García viejo MA, Chaves F, Lora-Tamayo J. Grupo de Infección Osteoarticular de la Comunidad de Madrid. XXIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Madrid, España. 23-25 de Mayo de 2019.
- Caracterización molecular de *Staphylococcus aureus* causantes de infección protésica articular en Madrid. Muñoz-Gallego I, Garrido-Allepuz C, Lora-Tamayo J, Chaves F, Sebastián V, Viedma E. Grupo de Infección Osteoarticular de la Comunidad de Madrid. Congreso Nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Congreso virtual (libro de abstract virtual SEIMC 2020, ISBN-978-84-09-22864-5). 25 de Agosto de 2020.