

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA I



STAPHYLOCOCCUS AUREUS EN POBLACIÓN PEDIÁTRICA:
EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR Y FACTORES DE VIRULENCIA

TESIS DOCTORAL DE:

CARMEN GÓMEZ GONZÁLEZ

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

FERNANDO CHAVES

Madrid, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Medicina

Departamento de Microbiología I



***STAPHYLOCOCCUS AUREUS* EN POBLACIÓN
PEDIÁTRICA: EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR Y
FACTORES DE VIRULENCIA**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Carmen Gómez González

Bajo la dirección del doctor

Fernando Chaves

2012

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Medicina

Departamento de Microbiología I



***STAPHYLOCOCCUS AUREUS* EN POBLACIÓN
PEDIÁTRICA: EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR
Y FACTORES DE VIRULENCIA**

Tesis doctoral

Carmen Gómez González

Madrid 2012

A Borja y a Claudia

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que han contribuido en la realización de este trabajo:

Al Dr. Fernando Chaves bajo cuya dirección se ha llevado a cabo este estudio, le quiero agradecer su paciencia y su dedicación a la hora de elaborar esta tesis. El haberme dado la oportunidad de trabajar con su equipo, el haber sido un estímulo y un ejemplo de constancia y trabajo y la calidad humana que ha demostrado conmigo a lo largo de todos estos años.

A Mercedes Murcia, ya que sin su colaboración en las labores técnicas este trabajo no habría sido posible, gracias también por ser una excelente compañera con la que he podido contar en todo momento.

A Mar Aguilera y Antonia Martín por enseñarme las técnicas moleculares imprescindibles para la realización de este trabajo, por su paciencia infinita y por ser un ejemplo como profesionales y como personas.

A los Drs. Pablo Rojo, Marta Barrios y Alba Palacios, pediatras del Hospital 12 de Octubre, a los Drs. Nieves Larrosa, Guillermo Prats y Fernando Moraga, microbiólogos y pediatra del Hospital Vall d'Hebron, a los Drs. Enrique Ruiz de Gopegui, Jose Luis Pérez y Joaquín Dueñas, microbiólogos y pediatra del Hospital Son Dureta (actualmente Hospital Son Espases) y a los Drs. Ana Fernandez, Germán Bou y Ana Belén Alas Barbeito, microbiólogos y pediatra del CHUAC. Su colaboración, su dedicación y su eficiencia, han sido imprescindibles para que este estudio multicéntrico se haya llevado a cabo.

A las residentes del servicio de microbiología del Hospital 12 Octubre en especial a Amparo, Adela, Lula, Esther, Joshi, Jenifer, Almu y Laura por haber sido tan buenas compañeras en este viaje que ha sido para mi la formación como especialista y el periodo como investigadora, por los buenos momentos dentro y fuera del laboratorio y por su apoyo en los momentos difíciles, por ser tan buenas amigas.

A todo el servicio de microbiología del Hospital 12 de Octubre por haber hecho posible mi formación como especialista y en especial a Ana Pérez que siempre estuvo dispuesta a ayudarme tanto en el ámbito profesional como personal.

Esta tesis ha sido en parte financiada con el Proyecto FISS
PI08/81520 y la Red Española de Investigación en Patología Infecciosa
(REIPI) (RD 08/0011)

ÍNDICE

1. LISTADO DE FIGURAS.....	8
2. LISTADO DE TABLAS.....	11
3. LISTADO DE ABREVIATURAS.....	13
I- INTRODUCCIÓN.....	15
1. Características microbiológicas de <i>S.aureus</i>.....	17
2. El genoma de <i>S.aureus</i>: estructura y elementos que lo conforman.....	19
3. Estructura bacteriana de <i>S.aureus</i> y factores de virulencia.....	22
3.1. Componentes de la superficie bacteriana.....	23
3.1.1. La pared celular.....	23
3.1.2. Proteínas de superficie implicadas en la adhesión.....	25
3.1.3. El polisacárido capsular.....	29
3.1.4. El biofilm.....	29
3.2. Factores extracelulares producidos por <i>S.aureus</i>	30
3.2.1. Enzimas extracelulares.....	30
3.2.2. Proteínas extracelulares.....	31
3.2.2.a. Las hemolisinas.....	33
3.2.2.b. La Leucocidina de Panton Valentine.....	34
3.2.2.c. Toxinas con actividad superantigénica.....	35
3.2.2.d. Las toxinas EDIN.....	38
3.2.2.e. Proteínas implicadas en la evasión del sistema inmune.....	39
4. Sistemas de regulación de la expresión de factores de virulencia.....	40
5. Colonización por <i>S.aureus</i>.....	44
6. Síndromes clínicos causados por <i>S.aureus</i>.....	44
6.1. Infecciones toxigénicas.....	45
6.2. Infecciones de piel y tejidos blandos.....	47
6.3. Bacteriemia.....	48
6.4. Endocarditis.....	49
6.5. Pericarditis.....	49
6.6. Meningitis.....	49
6.7. Infecciones de las vías respiratorias.....	50
6.8. Infecciones musculoesqueléticas.....	50

6.9. Infecciones protésicas.....	51
6.10. Infecciones de las vías urinarias.....	52
7. Resistencias a los antimicrobianos.....	52
7.1. Resistencia a los β -lactámicos.....	52
7.2. Resistencia a los antibióticos de los grupos macrólidos, lincosamidas y estreptograminas.....	60
7.3. Resistencia a las quinolonas.....	63
7.4. Resistencia a los glucopéptidos.....	63
7.5. Resistencia a la mupirocina.....	66
7.6. Resistencia al linezolid.....	67
7.7. Resistencia a la daptomicina.....	68
8. Epidemiología de <i>S.aureus</i>.....	68
8.1. Evolución de <i>S.aureus</i> a través de la historia.....	68
8.2. Métodos de tipificación molecular.....	70
8.2.1. Fundamentos y aplicaciones de los métodos de tipificación molecular.....	70
8.2.2. Electroforesis en campos pulsados.....	71
8.2.3. <i>Multilocus sequence typing</i>	71
8.3. Evolución y epidemiología de SARM asociado al hospital.....	72
8.4. Principales clones epidémicos de SARM-AH.....	75
8.5. Epidemiología de las infecciones causadas por SARM asociado a la comunidad.....	76
8.5.1. Infecciones por SARM asociado a la comunidad, definiciones y características.....	76
8.5.2. Patogenia y factores de virulencia asociados a SARM-AC.....	78
8.5.3. Principales clones epidémicos de SARM-AC.....	80
8.5.4. Infecciones por SARM-AC en población pediátrica.....	82
II- JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO Y OBJETIVOS.....	85
1. Objetivo general.....	90
2. Objetivos específicos.....	90
III- MATERIAL Y MÉTODOS.....	92

1. Diseño del estudio	94
1.1. Tipo de estudio.....	94
1.2. Ámbito del estudio.....	94
1.3. Criterios de inclusión y periodo del estudio.....	95
1.4. Definiciones.....	95
1.5. Protocolo de recogida de los datos clínicos y microbiológicos.....	97
2. Estudios microbiológicos	98
2.1 Identificación fenotípica de los aislados.....	98
2.2 Estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos.....	99
3. Confirmación de la resistencia a meticilina mediante la detección del gen <i>mecA</i>	101
4. Detección de la Leucocidina de Panton Valentine	108
5. Caracterización genotípica	110
5.1. Electroforesis en campo pulsante.....	110
5.2. <i>Multilocus sequence typing</i> (MLST).....	114
5.3. Caracterización del <i>cassette</i> cromosómico <i>SCCmec</i>	118
5.4. Determinación del tipo de <i>agr</i>	121
6. Estudio del contenido genético de los aislamientos de <i>S.aureus</i> mediante microarrays	123
7. Análisis estadístico de los resultados	126
 IV-RESULTADOS	 130
 1. Resultados generales	 132
1.1. Características demográficas de la población estudiada.....	132
1.2. Estudio de los casos en función de la adquisición.....	133
2. Características de los aislamientos de <i>S.aureus</i>. Resistencia a los antimicrobianos	134
2.1. Resistencia a meticilina.....	134
2.2. Estudio de la sensibilidad a los antibióticos no β -lactámicos en función de la resistencia a meticilina.....	137
3. Incidencia y distribución de la Leucocidina de Panton Valentine	138

4. Comparación de las características clínicas, demográficas y microbiológicas de las infecciones causadas por <i>S.aureus</i> en niños.....	141
4.1. Comparación de las infecciones por <i>S.aureus</i> asociadas a la comunidad y al sistema sanitario.....	144
4.2. Comparación de las infecciones causadas por SARM y SASM.....	147
4.3. Comparación de las infecciones asociadas a la comunidad y al sistema sanitario en función de la resistencia a meticilina.....	150
4.3.1. Características de las infecciones causadas por SARM en función de la adquisición.....	151
4.3.2. Características de las infecciones causadas por SASM en función de la adquisición.....	153
4.3.3. Características de las infecciones asociadas a la comunidad en función de la resistencia a meticilina.....	156
4.3.4. Características de las infecciones asociadas al sistema sanitario en función de la resistencia a meticilina.....	159
4.4. Comparación de las infecciones causadas por cepas portadoras y no portadoras de la toxina LPV.....	162
4.5. Comparación de las infecciones causadas por cepas LPV positivas y negativas estratificando por la resistencia a meticilina.....	165
5. Epidemiología molecular.....	168
5.1. Estudio de los aislamientos de SARM por electroforesis en campo pulsado.....	168
5.2. Estudio de los aislamientos de SARM por MLST.....	171
5.3. Determinación del tipo de SCC <i>mec</i> por PCR.....	172
5.4. Estudio de los aislamientos portadores de la LPV por electroforesis en campo pulsado.....	172
5.5. Estudio de los aislamientos portadores de la LPV por MLST.....	175
5.6. Estudio de los aislamientos de SASM no portadores de la LPV.....	175
5.7. Determinación del tipo de <i>agr</i> por PCR.....	177
5.8. Estudio de los linajes de <i>S.aureus</i> en función de la resistencia a meticilina, la adquisición y la presencia de la LPV.....	178
5.8.1. Comparación de los linajes de <i>S.aureus</i> en función de la resistencia a meticilina.....	178

5.8.2. Comparación de los linajes de <i>S.aureus</i> en función de la adquisición.....	179
5.8.3. Comparación de los linajes de <i>S.aureus</i> en función de la LPV...181	
5.8.4. Estudio de los linajes de <i>S.aureus</i> en función de la adquisición y la resistencia a meticilina.....	182
5.8.5. Estudio de los linajes de <i>S.aureus</i> en función de la LPV y de la resistencia a meticilina.....	184
5.8.6. Visión global de los aislamientos de <i>S.aureus</i> LPV positivos y negativos en función de la resistencia a meticilina y de la adquisición.....	187
5.9. Relación entre los linajes de <i>S.aureus</i> y los síndromes clínicos.....	190
6. Estudio del contenido genético (factores de virulencia y de resistencia) de los linajes más prevalentes en la población pediátrica.....	192
6.1. Factores de virulencia y de resistencia de los linajes de SARM más prevalentes.....	193
6.1.1 Contenido genético de los aislamientos de SARM pertenecientes al linaje ST8.....	193
6.1.2. Contenido genético de los aislamientos de SARM pertenecientes a los tipos de secuencias ST5 y ST125	195
6.2. Factores de virulencia y de resistencia de los linajes de SASM más prevalentes.....	200
6.2.1. Contenido genético de los aislamientos de SASM pertenecientes al linaje ST121.....	200
6.2.2. Contenido genético de los aislamientos de SASM pertenecientes al linaje ST30.....	202
6.3. Comparación del contenido genético de los aislamientos LPV positivos y negativos de los principales linajes portadores de la toxina.....	206
6.4. Comparación del contenido genético de los aislamientos LPV positivos y negativos estratificando por la resistencia a meticilina.....	210
6.5. Comparación del contenido genético de los aislamientos causantes de bacteriemia frente a los aislamientos causantes de otros síndromes clínicos.....	213
V-DISCUSIÓN.....	218

1. Infecciones por <i>S.aureus</i>: Resistencia a meticilina y a los antibióticos no β-lactámicos.....	221
2. Emergencia de infecciones pediátricas por SARM en la comunidad.....	225
3. Infecciones por <i>S.aureus</i> asociadas al sistema sanitario.....	230
4. Papel de la toxina LPV en las infecciones por <i>S.aureus</i>.....	233
5. Diversidad clonal de las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a meticilina en población pediátrica.....	239
5.1. Epidemiología molecular de SARM asociado a la comunidad.....	240
5.2. Epidemiología molecular de SARM asociado al sistema sanitario.....	244
6. Diversidad clonal de <i>S.aureus</i> portador de la toxina LPV.....	249
7. Estudio del contenido genético de los linajes más prevalentes en la población pediátrica.....	251
8. Estudio comparativo del contenido genético de los aislamientos LPV positivos y negativos.....	261
9. Estudio de los genes de virulencia asociados a los aislamientos causantes de bacteriemia.....	265
10. Limitaciones del estudio.....	268
VI-CONCLUSIONES.....	272
VII-BIBLIOGRAFÍA.....	278

1. LISTADO DE FIGURAS

Figura 1A. Crecimiento de *Staphylococcus aureus* en placa de agar sangre.

Figura 1B. Tinción de gram de *Staphylococcus aureus*.

Figura 2. Estructura del peptidoglicano de *Staphylococcus aureus*.

Figura 3. Unión de un antígeno convencional y un superantígeno a una célula presentadora de antígenos del CMH-II y a receptores de linfocitos T colaboradores.

Figura 4. Sistema de regulación *agr*.

Figura 5A. Resistencia a los β -lactámicos.

Figura 5B. Resistencia de alto nivel a vancomicina.

Figura 5C. Resistencia intermedia a vancomicina.

Figura 5D. Resistencia mediada por mutaciones y metilación del ARNr.

Figura 6. Estructura y elementos que conforman los distintos tipos de SCC*mec*.

Figura 7. Test de difusión en disco (D-test).

Figura 8. Distribución geográfica de aislamientos resistentes a meticilina obtenidos de infecciones invasivas en 2008.

Figura 9. Test de inducción a clindamicina o D-test positivo.

Figura 10. Etapas de la reacción de PCR.

Figura 11. Pasos básicos para la realización de una PCR.

Figura 12. Gráfico de la reacción de amplificación de ADN.

Figura 13. Curva de disociación de los fragmentos amplificados por PCR.

Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa del producto de la PCR de detección del gen *mecA*.

Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa del producto de la PCR de detección de LPV.

Figura 16. Perfiles de restricción generados tras la ECP de 12 aislamientos clínicos de *S.aureus*

Figura 17. Pasos para la realización de la técnica de microarrays.

Figura 18. Resultado de la hibridación del ADN de la muestra con las sondas fijadas en la membrana de microarray.

Figura 19. Número de casos procedentes de cada hospital.

Figura 20: Distribución de los 525 casos en función de la adquisición.

Figura 21: Tasas de SARM en función de la adquisición de los casos.

Figura 22: Tasa de SARM en cada hospital en función de la adquisición.

Figura 23. Distribución de la toxina LPV en los 525 aislamientos de *S.aureus* en función de la sensibilidad a meticilina y la adquisición.

Figura 24. Casos de infecciones y colonizaciones incluidos en el estudio en función de la adquisición y de la resistencia a meticilina.

Figura 25. Distribución del patrón de resistencias en función de la adquisición.

Figura 26. Distribución del patrón de resistencias en función de la resistencia a meticilina.

Figura 27. Distribución del patrón de resistencias de los aislamientos de SARM en función de la adquisición.

Figura 28. Distribución del patrón de resistencias de los aislamientos de SASM en función de la adquisición.

Figura 29. Distribución del patrón de resistencias de los aislamientos asociados a la comunidad en función de la resistencia a meticilina.

Figura 30. Distribución del patrón de resistencias de los aislamientos asociados al sistema sanitario en función de la resistencia a meticilina.

Figura 31. Distribución del patrón de resistencias en función de la LPV.

Figura 32. Dendograma con los patrones electroforéticos de los aislamientos de SARM.

Figura 33. Estudio de los 46 aislamientos de SARM por MLST.

Figura 34. Dendograma con los patrones electroforéticos y las características de los aislamientos portadores de la toxina LPV.

Figura 35. Estudio de los 75 aislamientos portadores de la LPV por MLST.

Figura 36. Estudio de una selección de 82 aislamientos de SASM no portadores de la LPV por MLST.

Figura 37. Distribución de los linajes en función de la resistencia a meticilina.

Figura 38. Distribución de los linajes en función de la adquisición.

Figura 39. Distribución de los linajes en función de la LPV.

Figura 40. Distribución de los linajes de los aislamientos asociados a la comunidad en función de la sensibilidad a meticilina.

Figura 41. Distribución de los linajes de los aislamientos asociados al sistema sanitario en función de la sensibilidad a meticilina.

Figura 42. Distribución de los linajes de SARM en función de la LPV.

Figura 43. Distribución de los aislamientos de SASM en función de la LPV.

Figura 44. Distribución de los linajes de los aislamientos portadores de la LPV en función de la adquisición y de la resistencia a meticilina.

Figura 45. Distribución de los linajes de los aislamientos no portadores de la LPV en función de la adquisición y de la resistencia a meticilina.

2. LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. MSCRAMMs y factores de adhesión de *Staphylococcus aureus*.

Tabla 2. Factores extracelulares de *Staphylococcus aureus* involucrados en la patogénesis.

Tabla 3. Genes reguladores y factores de transcripción de *Staphylococcus aureus*.

Tabla 4. Tipos de resistencia a glucopéptidos de *Staphylococcus aureus*.

Tabla 5. Principales clones epidémicos de SARM-AH.

Tabla 6. Principales clones epidémicos de SARM-AC LPV positivos.

Tabla 7. Secuencias de los iniciadores que amplifican el gen *mecA*.

Tabla 8. Secuencias de los iniciadores que amplifican la LPV.

Tabla 9. Secuencias de los cebadores empleados en la amplificación de los fragmentos de los 7 genes metabólicos.

Tabla 10. Secuencias de los cebadores empleados para la caracterización del *cassette* cromosómico SCC*mec*.

Tabla 11. Tamaño del amplificado de los locus en los distintos tipos de SCC*mec*.

Tabla 12. Secuencias de los iniciadores empleados para determinar los tipos de *agr*.

Tabla 13. Características demográficas de la población estudiada.

Tabla 14. Distribución de los casos en función de la adquisición en los 4 hospitales.

Tabla 15. Tasa global de resistencia a meticilina en los 4 hospitales.

Tabla 16. Patrón de resistencias a los antibióticos no β -lactámicos en función de la resistencia a meticilina.

Tabla 17. Porcentaje de los aislamientos de *S.aureus* portadores de la LPV en función de la adquisición y de la sensibilidad a meticilina.

Tabla 18. Distribución de los aislamientos de *S.aureus* portadores de la LPV en función de la adquisición y de la sensibilidad a meticilina en los 4 hospitales.

Tabla 19. Porcentaje de infecciones causadas por SARM en función de la adquisición en los 4 hospitales.

Tabla 20. Porcentaje de los aislamientos de *S.aureus* causantes de infección portadores de la LPV en función de la adquisición y de la sensibilidad a meticilina.

Tabla 21. Características demográficas de los niños con infecciones por *S.aureus*.

Tabla 22. Comparación de las características demográficas, clínicas y microbiológicas causadas de las infecciones causadas por *S.aureus* en niños en función de la adquisición.

Tabla 23. Comparación de las características demográficas, clínicas y microbiológicas de las infecciones causadas por *S.aureus* en función de la resistencia a meticilina.

Tabla 24. Comparación de las características demográficas, clínicas y microbiológicas de las infecciones causadas por SARM-AC Y SARM-ASS.

Tabla 25. Comparación de las características demográficas, clínicas y microbiológicas de las infecciones causadas por SASM-AC y SASM-ASS.

Tabla 26. Comparación de las características demográficas, clínicas y microbiológicas de las infecciones causadas por SARM-AC y SASM-AC.

Tabla 27. Comparación de las características demográficas, clínicas y microbiológicas de las infecciones causadas por SARM-ASS y SASM-ASS.

Tabla 28. Comparación de las características demográficas, clínicas y microbiológicas de las cepas portadoras y no portadoras de la toxina LPV.

Tabla 29. Comparación de las características de las infecciones causadas por cepas LPV positivas y LPV negativas estratificando por la resistencia a meticilina.

Tabla 30. Tipos de SCC mec asignados a los linajes de SARM.

Tabla 31. Número de aislamientos correspondientes a cada tipo de *agr*.

Tabla 32. Tipo de *agr* asignado a cada linaje.

Tabla 33. Frecuencia de los linajes de *S.aureus* en los diferentes síndromes clínicos.

Tabla 34. Comparación entre los linajes causantes de IPTBs y de bacteriemias.

Tabla 35. Contenido genético de los linajes de SARM más prevalentes.

Tabla 36. Contenido genético de los linajes de SASM más prevalentes.

Tabla 37. Comparación del contenido genético de los aislamientos LPV positivos y negativos de los principales linajes portadores de la toxina.

Tabla 38. Comparación del contenido genético de los aislamientos LPV positivos y negativos estratificando por la resistencia a meticilina.

Tabla 39. Comparación del contenido genético de los aislamientos causantes de bacteriemia y de los aislamientos causantes de otros síndromes clínicos.

3.LISTADO DE ABREVIATURAS

AAP: *Accumulation Associated Protein*

AC: Asociado a la Comunidad

ACME: *Arginine Catabolic Mobile Element*

ADVPs: Adictos a Drogas por Vía Parenteral

AGR: *Accessory Gene Regulator*

AH: Asociado al Hospital

AIP: *Auto Inducing Peptide*

ArlS: *Autolysis-Related Locus Sensor*

ASS: Asociado al Sistema Sanitario

ATCC: *American Type Culture Collection*

Bap: *Biofilm Associated Protein*

BORSA: *Borderline Staphylococcus aureus*

CAMP test: Test de Christie, Athkins y

Muench-Petersen

CC: Complejo clonal

CDC: *Center for Disease Control and Prevention*

Cfr: *Chloramphenicol-Florfenicol Resistance*

CHIPS: *Chemotaxis Inhibitory Protein*

CHUAC: Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña.

Cif: *Clumping Factor*

CLSI: *Clinical Laboratory Standards Institute*

CMH: Complejo Mayor de Histocompatibilidad

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

CNA: *Collagen-binding Adhesin*

DE: Desviación Estándar

DNasa: Desoxirribonucleasa

dNTPs: Desoxirribonucleótidos Fosfato

DO: Densidad Óptica

EARSS: *European Antimicrobial Resistance Surveillance System*

ECP: Electroforesis en Campos Pulsados

EDIN: *Epidermal cell Differentiation Inhibitor*

FnBP: *Fibronectin-Binding Protein*

G: N-acetil-D-glucosamina

GISA o VISA: *Glycopeptide or Vancomycin Intermediate S.aureus*

GTPasas: Guanosina Trifosfatasa

hGISA o hVISA: *Heterogeneous Glycopeptide or Vancomycin intermediate Staphylococcus aureus*

Ica: *Intercellular Adhesion-protein*

IleS: Isoleucil-RNAt-Sintetasa

IPTBs: Infecciones de Piel y Tejidos Blandos

LPV: Leucocidina de Pantón Valentine

M: N-acetil-D-murámico

MLS: *Macrolides Lincosamides Streptogramines*

MLST: *Multilocus Sequence Typing*

MODSA: *Modified Staphylococcus aureus*

MSCRAMMs: *Microbial Surface Components Recognising Adhesive Matrix Molecules*

Orf: *Open Reading frame*

Opp: *Operon Oligopeptide Permease*

PBP: *Penicillin Binding Protein*

PCR: *Polimerase Chain Reaction*

PIA: *Polysaccharide Intercellular Adhesin*

PSM: *Phenol-Soluble Modulines*

REIPI: Red Española de Investigación en Patología Infecciosa

Sae: *Staphylococcus aureus Exoproteins*

SaPI: *Staphylococcus aureus Pathogenicity Islands*

Sar: *Staphylococcal Accessory Regulator*

SARM: *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina

SARM-AC: *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina Asociado a la Comunidad

SARM-AH: *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina Asociado al Hospital

SARM-ASS: *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina Asociado al Sistema Sanitario

SASM: *Staphylococcus aureus* Sensible a Meticilina

SCCmec: *Staphylococcal Cassette
Chromosome Mec*

SCIN: *Staphylococcal Complement Inhibitor*

SrrAB: *Staphylococcal Respiratory Response*

SST: Síndrome del Shock Tóxico

ST: *Sequence Type*

TCS: *Two Component System*

TM/ST: Trimetoprim/Sulfametoxazol

Tn: Transposón

TSST-1: Toxina del Síndrome del Shock
Tóxico

UDG: Uracil DNA Glicosilasa

UPGMA: *Unweighted Pair Group Method
using Arithmetic Averages*

VRSA: *Vancomycin Resistant S.aureus*

I-INTRODUCCIÓN

1. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DE *S. AUREUS*

La bacteria *S. aureus* fue descubierta en 1880 por el médico escocés Alexander Ogston que demostró que ciertas bacterias con forma cocoide eran responsables de la producción de abscesos piógenos. Varios años después, a dichas bacterias se les denominó *Staphylococcus*, nombre que deriva de las palabras griegas *Staphyle* (“racimos de uvas”) y *kokkus* (“baya, grano”) [1]. Este género está considerado como uno de los mayores responsables de infección en el ser humano.

El género *Staphylococcus* se ha incluido tradicionalmente en la familia *Micrococaceae* junto a los géneros *Micrococcus*, *Stomatococcus* y *Plasmococcus* de escasa importancia clínica. Sin embargo, estudios recientes realizados mediante secuenciación de ADN, hibridación ADN-ARNr y secuenciación comparativa del ARNr 16S, han demostrado que los géneros *Staphylococcus* y *Micrococcus* están poco relacionados, por lo que el género *Staphylococcus* se ha incluido junto a los géneros *Gemella*, *Macrococcus* y *Salinicoccus* en la familia *Staphylococcae* dentro del orden *Bacillales*. El género *Staphylococcus* incluye 35 especies y 17 subespecies diferentes, destacando como patógenos humanos las especies *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. lugdunensis*, *S. haemolyticus*, *S. scheiffleri*, *S. warnieri* y *S. saprophyticus*. Entre estas especies, destaca *S. aureus* como la más importante como causa de patología en el ser humano.

Las bacterias del género *Staphylococcus* morfológicamente son cocos gram positivos con un tamaño que varía desde los 0,5 a 1 μm de diámetro, y se pueden observar al microscopio como células únicas o dispuestas en parejas, tétradas, pequeñas cadenas o racimos inmóviles (Figura1).

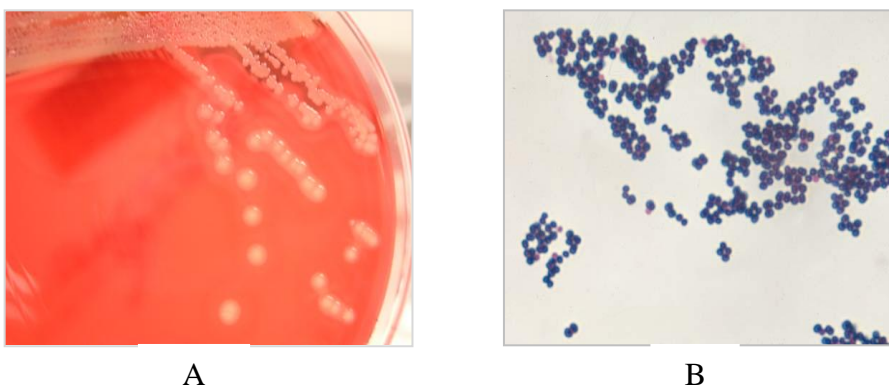


Figura 1.

(A) Crecimiento de *Staphylococcus aureus* en placa de agar sangre. Colonias doradas y β -hemolíticas características de *Staphylococcus aureus*.

(B) Tinción de gram de *Staphylococcus aureus*. Se observan cocos dispuestos en tetradas y en racimos característicos del género *Staphylococcus*.

La mayor parte de las cepas de *Staphylococcus aureus* se caracterizan por presentar en cultivo colonias de un color amarillo dorado, lo que se debe a la producción de pigmentos carotenoides. De esta característica proviene el nombre de esta bacteria que deriva de la palabra latina con la que se designa el oro (Figura1). Otra de las características que presentan la mayor parte de las cepas, es la formación de un halo de β -hemólisis cuando crecen en un medio de cultivo con sangre. *S. aureus* es una bacteria que crece sin dificultad en medios con altas concentraciones de NaCl y que es poco exigente ya que puede crecer en medios no selectivos, a excepción de algunas cepas descritas poco comunes, que podrían requerir para su crecimiento de la presencia de CO₂, de ciertos metabolitos (hemina, menadiona, etc...) o de medios hipertónicos [2,3].

Las características que definen a la gran mayoría de los miembros del género *Staphylococcus* son la producción de catalasa, que son bacterias anaerobias facultativas, que no producen esporas, y que en general, son bacterias no capsuladas. Algunas excepciones son *Staphylococcus saccharolyticus* y *S. aureus* subespecie *anaerobious*,

que son especies anaerobias, no producen la enzima catalasa, y no forman gas a partir de carbohidratos. Algunas de las características propias de *Staphylococcus aureus* son la actividad DNAsa (Desoxirribonucleasa), la fermentación del manitol y la producción de la enzima coagulasa, esta última es la principal característica que diferencia a *Staphylococcus aureus* del resto de las especies del género *Staphylococcus* que se denominan estafilococos coagulasa negativos [4].

2. EL GENOMA DE S.AUREUS: ESTRUCTURA Y ELEMENTOS QUE LO CONFORMAN

En los últimos años se han producido grandes avances sobre el conocimiento del genoma de *S.aureus* gracias a la secuenciación del genoma completo de diferentes cepas. Los genomas de algunas cepas como N315, Mu50, MW2, MRSA252, MSSA476 y USA 300 están publicados en la literatura [5-8] y los de otras cepas se encuentran disponibles en internet (www.ebi.ac.uk/genomes/bacteria.html).

El tamaño del genoma de *S. aureus* varía en función de la cepa secuenciada pero oscila aproximadamente entre 2,742 y 3,043 Mb. La comparación de los genomas secuenciados muestra que un 50% de las proteínas codificadas por el cromosoma de *S.aureus* tienen una gran homología con las de la bacteria *Bacillus subtilis* [5], lo que sugiere que ambos microorganismos provienen de un ancestro común. De la comparación de los genomas se ha obtenido además, mucha información acerca del contenido y estructura del genoma de *S.aureus* y por ello, se ha propuesto dividir el genoma en 3 categorías el core, el core variable y el genoma accesorio [9].

Los genes que conforman el núcleo o core de la bacteria comprenden aproximadamente el 75% del genoma, se encuentran muy conservados en todas las

cepas, y en su mayoría se asocian al metabolismo central y a otras funciones esenciales para la bacteria.

Los genes que conforman el core variable, comprenden aproximadamente el 10% del genoma de la bacteria, están muy conservados entre las cepas que se encuentran relacionadas evolutivamente y codifican fundamentalmente proteínas de superficie y proteínas reguladoras. La secuenciación y comparación de algunos genes del core variable, se está utilizando para la tipificación de las bacterias. Uno de estos métodos de tipificación es el *Multilocus Sequence Typing* (MLST), que clasifica las cepas en complejos clonales y de esta manera, se puede conocer su evolución y la epidemiología a nivel mundial.

La otra parte del genoma denominada como genoma accesorio comprende aproximadamente el 25% del genoma, contiene genes que se encuentran únicamente en algunas cepas y en su mayor parte, lo forman elementos genéticos móviles que se transfieren horizontalmente entre las cepas. Estos elementos móviles incluyen los bacteriófagos, las islas de patogenicidad, los *cassettes* cromosómicos, los plásmidos y los transposones [10].

Los transposones (Tn) son elementos genéticos móviles, que suelen llevar además de los genes esenciales para la transposición, genes que codifican determinantes de patogenicidad y de resistencia a los antimicrobianos o a metales pesados. Hay transposones de pequeño tamaño como el Tn552 que lleva el gen *bla* que codifica una penicilinasasa, o el Tn554 que lleva genes de resistencia a la eritromicina y a la espectinomicina [11]. Otros transposones de mayor tamaño llevan genes de resistencia a las tetraciclinas, al trimetoprim o a los aminoglucósidos.

Otros elementos móviles que pueden conformar el genoma accesorio son los bacteriófagos, que suelen ser portadores de genes que codifican determinantes de

patogenicidad como el gen *sea* o *entA* que codifica la enterotoxina A [5], los genes *LukS* y *LukF* que codifican la Leucocidina de Pantón Valentine (LPV) [6], el gen *scin* que codifica una proteína inhibidora del complemento, el gen *chip* que codifica una proteína inhibidora de la quimiotaxis, y el gen *sak* que codifica la estafiloquinasa [12-14]. Los bacteriófagos se encuentran ampliamente diseminados entre las cepas de *Staphylococcus aureus* de tal modo, que casi todas las cepas son portadoras de al menos uno.

Otro de los elementos móviles que pueden formar parte del genoma accesorio son las islas de patogenicidad o genómicas, que son estructuras parecidas a los bacteriófagos pero que carecen de genes que les permitan la transferencia horizontal y por ello, necesitan de bacteriófagos que les permitan la transferencia [15]. Se han descrito varias islas genómicas como SaPI1 (*Staphylococcus aureus Pathogenicity Island*), y SaPI2 que son portadoras del gen *tst-1*, que codifica la toxina del síndrome del shock tóxico, las islas SaPI3 y SaPI4 que llevan genes que codifican enterotoxinas, la isla de patogenicidad SaPIbov que es portadora de un gen que codifica una versión bovina del gen *tst-1* y SaPIbap que codifica una proteína de adhesión que podría estar implicada en la mastitis bovina. Se están descubriendo nuevas islas de patogenicidad y por ello la nomenclatura de las mismas está siendo revisada. La mayor parte de las cepas de *S.aureus* son portadoras de al menos una isla de patogenicidad.

Los plásmidos, son moléculas extracromosómicas de ADN circular de diversos tamaños, que pueden transferirse de una célula a otra mediante conjugación. Los plásmidos de pequeño tamaño suelen contener 1 o 2 genes que codifican resistencias a los antimicrobianos y los de mayor tamaño pueden además, llevar genes que codifican determinantes de resistencia a metales pesados y a detergentes [16].

Estos elementos genéticos móviles en muchos casos, son portadores de genes que codifican factores de virulencia o de resistencia a los antimicrobianos y tienen la capacidad de transferirse horizontalmente de una cepa a otra, adquiriendo la cepa receptora nuevos factores de virulencia o de resistencia a antibióticos que antes no tenía. Por lo tanto, la transferencia horizontal entre cepas de este tipo de elementos, es de gran importancia debido a las implicaciones clínicas que conlleva. El contenido genético de las distintas cepas probablemente influya en la patogénesis y en la capacidad de supervivencia y diseminación de las mismas, y es probable que sea la razón por la que unos grupos clonales predominan sobre otros. Por ello, el conocimiento del contenido genético de las distintas cepas de *S.aureus* puede ser importante para dilucidar que genes están asociados a las distintas cepas, cuales se asocian a una mayor virulencia o a un tipo de infección [17].

3. ESTRUCTURA BACTERIANA DE *S. AUREUS* Y FACTORES DE VIRULENCIA

Staphylococcus aureus es la especie del género *Staphylococcus* más virulenta para el hombre. Se caracteriza por poseer ciertos componentes estructurales y producir numerosas enzimas y toxinas considerados factores de virulencia. La forma y severidad de la infección son el resultado de una interacción compleja, entre las defensas del huésped y la actividad de los factores de virulencia que la bacteria produce en las distintas fases de la infección.

Los factores de virulencia de *S.aureus* clásicamente se han clasificado en 2 grandes grupos (Tabla 1):

- 1. Los componentes de la superficie bacteriana, como el polisacárido capsular, ciertos componentes del peptidoglicano, y proteínas de superficie implicadas en

la adhesión a las células del huésped denominadas MSCRAMMs (*Microbial Surface Components Recognising Adhesive Matrix Molecules*).

- 2. Toxinas y enzimas extracelulares, que son producidas y excretadas por la bacteria y que tienen diversas funciones y capacidades como la actividad citotóxica, la actividad superantigénica o la capacidad de evadir el sistema inmune del huésped.

Los factores de virulencia también se han clasificado en relación a su función biológica en 3 grupos:

- 1. Los factores que intervienen en la colonización, facilitando la adhesión de la bacteria a las células huésped.
- 2. Los factores que intervienen en la diseminación y penetración en los tejidos del huésped.
- 3. Los factores que actúan facilitando la evasión del sistema inmune del huésped.

3.1. Componentes de la superficie bacteriana

3.1.1. La pared celular

La pared celular de las bacterias gram positivas es más gruesa que la de las bacterias gram negativas y está formada por péptidoglicano que es lo que da consistencia y forma a la célula y la protege de medios hipotónicos. El péptidoglicano es un biopolímero compuesto por unidades alternativas de N-acetil-D-murámico (M) y N-acetil-D-glucosamina (G) unidos por enlaces glucosídicos β (1-4). Unido a cada unidad M hay un tetrapéptido o pentapéptido formado por los péptidos L-alanina, D-glutamina, L-lisina, D-alanina (D-alanina) [18]. Las unidades de tetrapéptido se unen

entre sí por puentes pentapeptídicos de glicina entre la D-alanina de un tetrapéptido y la L-lisina de otro (Figura 2). El peptidoglicano está implicado de forma indirecta en la patogénesis, ya que por un lado, es reconocido por el sistema inmune del huésped desencadenando la liberación de citoquinas y produciendo una respuesta inflamatoria, y por otro lado, el peptidoglicano es la superficie de anclaje para la mayoría de las MSCRAMMs.

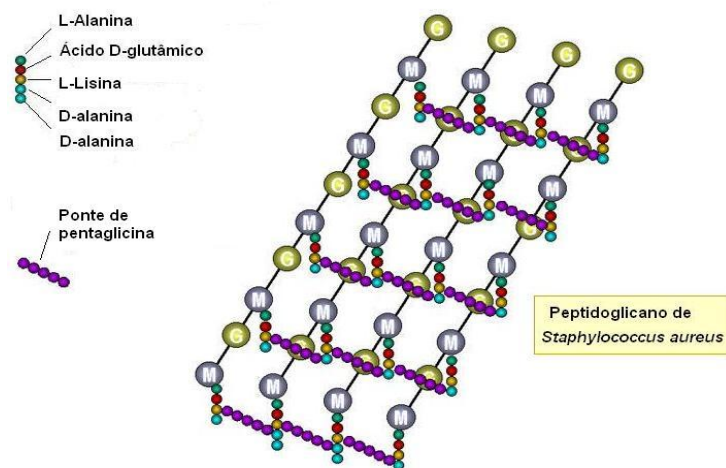


Figura 2. Estructura del peptidoglicano de *Staphylococcus aureus*. Se observan los residuos M y G unidos por los enlaces glicosídicos β (1-4) y el tetrapéptido unido a los residuos de M y los enlaces peptídicos transversales de pentaglicina.

Otros componentes de la pared celular son las proteínas fijadoras de penicilina PBPs (*Penicillin Binding Proteins*). *Staphylococcus aureus* es capaz de producir 4 PBPs denominadas PBP1, PBP2, PBP3 y PBP4, que están implicadas en el ensamblaje del peptidoglicano de la pared celular [19]. La actividad biológica de las PBPs es similar a la de las proteasas de serina y actúan como transpeptidasas en el cruzamiento de las cadenas de glucano [20]. La PBP2 es una proteína bifuncional que además de la actividad transpeptidasa, también actúa como transglicosilasa [21].

Los ácidos teicoicos son componentes de la pared celular que contribuyen en un 50% al peso de la misma. Estos ácidos están constituidos por polímeros de ribitol-fosfato y se encuentran unidos al N-acetilmurámico del peptidoglicano. Se desconoce si los ácidos teicoicos desempeñan alguna función directa en la patogénesis pero indirectamente son el sitio de unión de enzimas y proteínas, de hecho se han implicado en la colonización nasal, ya que interviene en la unión a las células epiteliales [22].

Los ácidos lipoteicoicos también forman parte de la pared celular, y se caracterizan por ser estructuralmente semejantes a los ácidos teicoicos excepto porque están compuestos por glicerol fosfato y se unen a la membrana plasmática [23].

3.1.2. Proteínas de superficie implicadas en la adhesión

El primer paso en el establecimiento de la infección es la adherencia de la bacteria a los tejidos del huésped al que infecta. Para ello, *Staphylococcus aureus* utiliza diferentes proteínas que se encuentran ancladas a la pared celular y que tienen la capacidad de unirse a moléculas de la matriz extracelular del huésped y a componentes del plasma, favoreciendo así la adhesión y el comienzo de la infección. Estas proteínas en su conjunto se denominan MSCRAMMs y su importancia individual y su implicación en el proceso de colonización e infección, se ha establecido de manera concluyente únicamente en algunos casos [24].

Se han descrito un gran número de MSCRAMMs pero sobre las que más se ha estudiado y se conoce son la proteína de unión al colágeno CNA (*Collagen-binding Adhesin*), las proteínas de unión a la fibronectina A y B denominadas FnBPA y FnBPB (*Fibronectin-binding Protein*), las proteínas de unión al fibrinógeno ClfA y B (*Clumping factor*) y la proteína A. En la tabla 1 se muestran además otros factores de

adhesión que se han descrito en *S.aureus* de algunos de los cuales, se desconoce su función por el momento.

Las proteínas de adhesión FnBPA y FnBPB son producidas por la mayor parte de las cepas de *S.aureus* y están codificadas por 2 genes estrechamente vinculados: *fnbA* y *fnbB* [25].

Estas proteínas median la unión de la bacteria a la fibronectina y contribuyen en la adherencia de *S.aureus* a los coágulos sanguíneos y a los biomateriales, con lo que se encuentran implicadas en la colonización e inicio de la infección de biomateriales como prótesis y catéteres intravasculares [26-28]. Hay estudios que han demostrado que también intervienen el proceso de invasión intracelular de los fagocitos [29, 30], en la colonización del epitelio respiratorio [31] y también podrían tener una implicación directa en el comienzo de la infección endovascular [32].

TABLA1. MSCRAMMs Y FACTORES DE ADHESIÓN DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* [Adaptada de 23].

GEN	PROTEÍNA	FUNCIÓN	POSIBLE IMPLICACIÓN EN LA PATOGÉNESIS
<i>spa</i>	Proteína A	Unión al fragmento Fc de anticuerpos	Modelos experimentales de sepsis y artritis
<i>clfA</i>	Factor de agregación A	Unión al fibrinógeno	Modelos de endocarditis
<i>clfB</i>	Factor de agregación B	Unión al fibrinógeno	
<i>cna</i>	Proteína de unión al colágeno	Unión al colágeno	Modelos de osteomielitis
<i>fnbA</i>	Proteína de unión a fibronectina	Unión a la fibronectina	Modelos endocarditis e invasión celular
<i>fnbB</i>	Proteína de unión a fibronectina	Unión a la fibronectina	
<i>SdrC</i>	Proteína serina aspartato	Unión al fibrinógeno	
<i>SdrD, SdrE</i>	Proteína serina aspartato	Posible unión al fibrinógeno	
<i>pls</i>	Proteína <i>Plasmin-sensitive</i>	Unión a células de mucosa nasal	Colonización de la mucosa nasal
<i>sasA, B, C, E, F, I, J, K</i>	Proteínas de superficie	Indeterminada	
<i>sasG</i>	Proteína de superficie G	Unión a células de la mucosa nasal	Asociada con infección invasiva
<i>sasH</i>	Proteína de superficie H	Indeterminada	Asociada con infección invasiva
<i>Ebh</i>	Proteína de unión a fibronectina asociada a la pared celular	Unión a la fibronectina	
<i>fib</i>	Proteína de unión al fibrinógeno	Unión al fibrinógeno	
<i>ebps</i>	Proteína de unión a la fibronectina asociada a la pared celular	Unión a la fibronectina	
<i>bbp</i>	Proteína de unión a la sialoproteína ósea	Unión a la sialoproteína ósea	
<i>vwb</i>	Proteína de unión al factor Von Willebrand	Unión al factor Von Willebrand	

Otro factor de adhesión descrito en *S.aureus* es la proteína CNA que media la adherencia bacteriana al colágeno. A diferencia de otras adhesinas, CNA es producida

por una menor proporción de las cepas (del 38 al 56% aproximadamente) [33, 34] y está codificada por el gen *cna* que se encuentra localizado en una isla de patogenicidad. Hay estudios que demuestran que la proteína CNA es suficiente y necesaria para la adhesión de la bacteria al cartílago [35], sin embargo, el papel que desempeña en las infecciones de hueso y articulaciones no está del todo claro. [36].

Las proteínas ClfA y ClfB son proteínas de unión al fibrinógeno y están codificadas por 2 genes distintos denominados *clfA* y *clfB*. ClfA media la unión de la bacteria a los coágulos sanguíneos y al biomaterial plástico *in vitro* [27,28], por lo que probablemente es un factor implicado en las infecciones de prótesis y de heridas. En modelos animales de endocarditis se ha demostrado que la delección del gen *clfA* hace que las cepas isogénicas sean menos virulentas que las cepas salvajes [37]. Por otro lado, se ha demostrado que ClfB media la adherencia al fibrinógeno inmovilizado y al biomaterial *ex vivo* [38]. Aunque no se conoce la razón exacta por la cual *S.aureus* expresa dos proteínas con capacidad de unión al fibrinógeno, se piensa que probablemente actúen de forma sinérgica, ya que ambas reconocen diferentes partes del ligando y de este modo la bacteria puede unirse más firmemente a los trombos en condiciones de flujo en el torrente sanguíneo.

Otra proteína perteneciente a esta familia es la proteína A, que tiene la capacidad de unirse a la fracción Fc de la inmunoglobulina G e inhibir la opsonización y la fagocitosis. Otra de sus características es la capacidad de unión al factor Von Willebrand que está presente en el endotelio dañado, pudiendo jugar un papel en la adhesión durante el inicio de la infección intravascular [36].

3.1.3. El polisacárido capsular

La mayoría de los aislados de *S.aureus* se encuentran revestidos por una cápsula formada por polisacáridos, que se produce durante la fase postexponencial de crecimiento de la bacteria [39]. Se conocen 11 serotipos capsulares. Los serotipos denominados 1 y 2 no se suelen encontrar en los aislados clínicos y las cepas que los producen se caracterizan fenotípicamente por formar colonias mucosas. Algunos estudios realizados en modelos animales demuestran que estas cepas son capaces de resistir la opsonización y la fagocitosis y por ello son más virulentas que las cepas no mucosas. El resto de los serotipos poseen un fenotipo no mucoide y su morfología es indistinguible. Los serotipos 5 y 8 son los que se encuentran con más frecuencia en los aislados clínicos y su papel en la patogénesis no está del todo claro. Algunos estudios sugieren que los polisacáridos capsulares 5 y 8 no aportan una mayor virulencia a las cepas en modelos animales, en cambio otros estudios demuestran que las cepas productoras de cápsula del serotipo 5, son más virulentas que las mismas cepas no capsuladas en cuanto a la formación de abscesos y en modelos de artritis séptica [40].

Los antígenos capsulares han sido los primeros antígenos empleados en la investigación de vacunas frente a *S.aureus* [41].

3.1.4. El biofilm

Una forma de resistencia del género *Staphylococcus* y de otros géneros, es la formación de biofilm o biopelículas. Las biopelículas se forman cuando los microorganismos se adhieren a una superficie produciendo polímeros extracelulares que dan lugar a una matriz estructural que a su vez, facilita la adhesión de más

microorganismos. Esta estructura permite la colonización y la persistencia de la bacteria en catéteres y biomateriales. La producción de un polisacárido denominado PIA (*Polysaccharide Intercellular Adhesin*) constituido por cadenas de β (1-6) glucosamina que son sustituidas en el nitrógeno por residuos de succinato [42], es fundamental para la formación del biofilm. Este polisacárido está codificado por el operón *ica* (*Intercellular Adhesion Protein*) que está compuesto por los genes biosintéticos *icaA*, *icaD*, *icaB* e *icaC* y el gen regulador *icaR*. Se han descrito también otras proteínas que contribuyen a la formación del biofilm como AltE, AAP (*Accumulation Associated Protein*) y Bap (*Biofilm Associated Protein*) [43]. La producción de biofilm se ha estudiado fundamentalmente en *S.epidermidis*, aunque también se ha descrito en *S.aureus* un homólogo del gen *ica* [44]. La implicación exacta de la formación del biofilm en la patogenia de *S.aureus* no se conoce con exactitud, ya que la presencia de otras adhesinas producidas por la bacteria, enmascara la contribución de este elemento en la colonización e infección.

3.2. Factores extracelulares producidos por *Staphylococcus aureus*

S.aureus es capaz de producir y secretar proteínas que desempeñan funciones diversas en la patogenia de la bacteria. Estas proteínas pueden ser enzimas o ciertas toxinas.

3.2.1. Enzimas extracelulares

S.aureus es capaz de producir y secretar una serie de enzimas que probablemente en mayor o menor medida intervienen en el proceso de infección. Sin embargo, se

desconoce con exactitud en la mayor parte de las mismas el papel concreto que desempeñan en la patogénesis. Algunas de las enzimas más estudiadas son:

- La catalasa, que degrada el peróxido de hidrógeno protegiendo a la bacteria de la fagocitosis.
- La coagulasa, que se encuentra de 2 formas, como factor de agregación o coagulasa ligada y como coagulasa libre. Ambas favorecen la formación de coágulos, convierten el fibrinógeno en fibrina y favorecen la formación de abscesos y procesos sépticos. La detección de la coagulasa libre es la prueba que diferencia *S.aureus* del resto de *Staphylococcus* denominados como coagulasa negativos.
- La hialuronidasa, cuya función es degradar el ácido hialurónico facilitando la propagación de la infección.
- La penicilinasas, que es una enzima producida por la práctica totalidad de las cepas de *S.aureus* y que es capaz de inactivar la penicilina hidrolizando el anillo β -lactámico.

3.2.2. Proteínas extracelulares

S.aureus es capaz de producir una gran variedad de exoproteínas que desempeñan diversas funciones en la patogenia. Algunas de las exoproteínas que se han descrito son las hemolisinas, las leucocidinas, la toxina del síndrome del shock tóxico (TSST-1), las enterotoxinas, las toxinas exfoliativas y otras menos conocidas como las proteínas EDIN (*Epidermal Cell Differentiation Inhibitor*), SCIN (*Staphylococcal Complement Inhibitor*) o CHIPS (*Chemotaxis Inhibitory Protein*). En la tabla 2 se muestran los principales factores extracelulares producidos por *S.aureus*.

TABLA 2. FACTORES EXTRACELULARES DE *S.AUREUS* INVOLUCRADOS EN LA PATOGÉNESIS [Adaptada de 23].

GEN	PROTEÍNA	LOCALIZACIÓN	FUNCIÓN
CITOTOXINAS			
<i>hla</i>	α -hemolisina	Cromosoma	Citotoxina. Hemolisina
<i>hlb</i>	β -hemolisina	Cromosoma	Citotoxina. Hemolisina
<i>hld</i>	δ -hemolisina	Cromosoma	Citotoxina. Hemolisina
<i>hlg</i>	γ -hemolisina	Cromosoma	Citotoxina. Hemolisina
<i>lukS/F</i>	LPV	Fago	Lisis leucocitos , necrosis
SUPERANTÍGENOS			
<i>tst</i>	TSST-1	SaPI1,2,bov	Síndrome shock tóxico (SST)
<i>eta</i>	Toxina exfoliativa A	Fago	Síndrome piel escaldada
<i>etb</i>	Toxina exfoliativa B	Plásmido	Síndrome piel escaldada
<i>sea</i>	Enterotoxina A	Fago	Intoxicación alimentaria.SST
<i>seb</i>	Enterotoxina B	SaPI3	Intoxicación alimentaria.SST
<i>sec</i>	Enterotoxina C	SaPI4	Intoxicación alimentaria.SST
<i>sed</i>	Enterotoxina D	Plásmido	Intoxicación alimentaria.SST
ENZIMAS			
<i>spIA-F</i>	Serin proteasa	Cromosoma	Proteasa
<i>ssp</i>	Proteasa	Cromosoma	Factor de diseminación
<i>aur</i>	Metaloproteasa (aureolisina)		Enzimas procesadoras
<i>sspB</i>	Cisteína proteasa		Enzimas procesadoras
<i>scp</i>	Proteasa		Diseminación. Nutrición
<i>geh</i>	Glicerol ester hidrolasa	Cromosoma	Diseminación. Nutrición
<i>lip</i>	Lipasa		Diseminación. Nutrición
<i>fme</i>	FAME	Cromosoma	Esterificación de ácidos grasos
<i>plc</i>	Fosfolipasa		
<i>nuc</i>	Nucleasa	Cromosoma	Nutrición
<i>hys</i>	Hialuronidasa	Cromosoma	Factor de diseminación. Degradación ácido hialurónico
<i>coa</i>	Coagulasa	Cromosoma	Formación coágulos
<i>sak</i>	Estafiloquinasa	Fago	Activa plasminógeno Modula sistema inmune
OTROS			
<i>EdinA, EdinB, EdinC</i>	EDINA,EDINB, EDINC	<i>edinB</i> : SaPI <i>edinC</i> : plásmido	Inhibir la diferenciación de células epidérmicas
<i>scn</i>	SCIN	Fago	Inhibición complemento
<i>chips</i>	CHIPS	Fago	Inhibición quimiotaxis

3.2.2.a. Las hemolisinas

S.aureus es capaz de producir cuatro tipos de hemolisinas que se denominan con letras del alfabeto griego (hemolisinas alfa, beta, gamma y delta).

La hemolisina alfa o toxina alfa es una toxina que está codificada por el gen *hla* y que se encuentra presente en el genoma de un elevado porcentaje de las cepas de *S.aureus*. Esta toxina tiene la capacidad de formar poros en las células, provocando la lisis de las mismas. También se ha descrito que posee cierta actividad dermonecrótica y neurotóxica [45], aunque el papel de la hemolisina alfa en la infección humana no se ha establecido de manera irrefutable.

Otra de las hemolisinas que la bacteria puede producir es la hemolisina beta o esfingomielinasa C. Esta toxina está codificada por el gen *hlb* y se produce en grandes cantidades en la mayoría de las cepas de *S.aureus*, particularmente las aisladas en animales. La hemolisina beta posee actividad esfingomielinasa [46], pero el papel que desempeña en la infección humana no se comprende con claridad. Es la hemolisina que da lugar al CAMP test (Test de Christie, Athkins y Muench-Petersen).

La hemolisina gamma está formada por 2 componentes, las proteínas S y F, que están codificadas por los genes *hlgA* (gamma 1) y *hlgC* (gamma 2) y *hlgB* respectivamente, estos genes se encuentran en el cromosoma de la práctica totalidad de las cepas de *S.aureus*. En cuanto a su actividad, la hemolisina gamma es capaz de lisar los eritrocitos de los mamíferos y también tiene actividad frente a neutrófilos y macrófagos.

La hemolisina delta es una toxina codificada por el gen *hld* que se encuentra presente en el cromosoma del 97% de las cepas de *S.aureus*. Es una toxina que posee la capacidad de lisar eritrocitos y otras células de mamíferos, ya que tiene propiedades

surfactante y formadora de poros. También se ha descrito que posee cierta actividad dermonecrótica [47].

3.2.2.b. La Leucocidina de Pantón Valentine

La LPV es una citotoxina formada por 2 subunidades, LuKF-PV y LukS-PV, y que está codificada por dos genes contiguos, *LukS* y *LukF*, que se cotranscriben y se localizan en bacteriófagos [14]. La LPV posee la capacidad de destruir los leucocitos mediante la formación de poros en la membrana de los mismos, y es capaz de producir necrosis en los tejidos del huésped al que infecta. Un reducido porcentaje de las cepas de *S.aureus* es portador de los genes que codifican la LPV, sin embargo, es frecuente encontrar estos genes en las cepas de *S.aureus* resistentes a meticilina asociadas a la comunidad (SARM-AC). Aunque la producción de LPV por parte de la bacteria se ha asociado con determinados síndromes clínicos, fundamentalmente con infecciones de piel y tejidos blandos (IPTBs) [48-50] y con neumonía necrosante severa [51-54], también se ha detectado su presencia en cepas productoras de otro tipo de infecciones [55-62]. La contribución de la LPV en la virulencia y patogénesis de estas cepas ha sido objeto de numerosos estudios que muestran resultados confusos y contradictorios. Estudios recientes realizados en modelos animales de neumonía, IPTBs y sepsis, muestran que no existen diferencias significativas en cuanto a la virulencia entre las cepas USA 300, USA 400 y sus variantes isogénicas a las cuales se delecciona la LPV. [63-65]. Sin embargo, hay estudios que demuestran con modelos animales que la presencia de la LPV está directamente relacionada con la producción de neumonía necrosante [66]. Un hecho que evidencia la confusión en cuanto a la implicación de la LPV en la virulencia de SARM-AC, es que estudios que se han llevado a cabo

empleando los mismos modelos animales de infección de piel y neumonía y las mismas cepas, muestran resultados opuestos [67, 65] por ello, el papel que desempeña la LPV en la patogénesis y la virulencia permanece sin ser aclarado, y sigue siendo motivo de estudio.

3.2.2.c. Toxinas con actividad superantigénica

S.aureus es capaz de producir 3 tipos de exotoxinas denominadas toxinas pirógenas superantigénicas, cuya producción es la causa de los síndromes toxigénicos. En este grupo se encuentran la TSST-1, las enterotoxinas y las toxinas exfoliativas o epidermolíticas.

El término pirógeno hace referencia a la capacidad para producir fiebre, y el término superantigénico a la habilidad para estimular inespecíficamente un gran número de linfocitos T CD4+ en el huésped, provocando la liberación masiva de citoquinas. Esta capacidad es debida a que a diferencia de los antígenos convencionales, los superantígenos se unen a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (CMH-II) fuera de la hendidura clásica de unión al antígeno, y a la vez se unen a los linfocitos T en puntos específicos de la región variable de la cadena β (Figura3). Esta interacción da lugar a la activación de grandes cantidades de linfocitos T CD4+ y a la producción masiva de citoquinas [68].

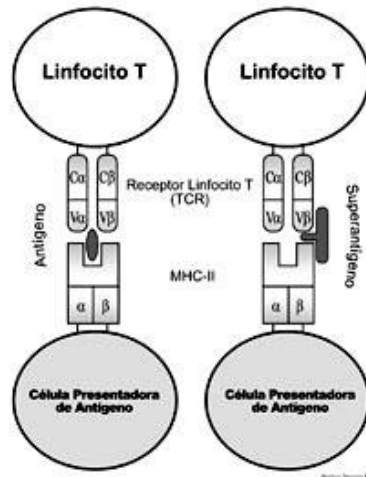


Figura 3. Unión de un antígeno convencional y un superantígeno a una célula presentadora de antígenos del CMH-II y a receptores de linfocitos T colaboradores. A diferencia de los antígenos convencionales, los superantígenos se unen al CMH-II fuera de la hendidura clásica de unión al antígeno y a la vez se unen a los linfocitos T en puntos específicos de la región variable de la cadena β.

La producción por parte de la bacteria de la toxina TSST-1 es la causa del síndrome del shock tóxico (SST). Esta toxina está codificada por el gen *tst* que se encuentra localizado en el cromosoma de la bacteria en islas de patogenicidad (SaPI1, SaPI2 y SaPIbov) [69]. La TSST-1 tiene una serie de características únicas como la capacidad de atravesar superficies mucosas y también se piensa que podría desempeñar algún papel en la artritis reactiva. [70, 71].

Otras toxinas con capacidad superantigénica son las enterotoxinas, cuya producción por parte de la bacteria es la causa del síndrome de intoxicación alimentaria estafilocócica. Este síndrome ocurre debido a la ingestión de alimentos contaminados con enterotoxinas ya preformadas. Hasta el momento se han descrito 18 enterotoxinas: SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER y SEU. Cada una de ellas está codificada por un gen que se suele denominar

con el prefijo *se* o *ent* seguido de la letra a la que corresponda la enterotoxina que codifica. La mayoría de estos genes se encuentran localizados en elementos móviles, de este modo, los genes que codifican las enterotoxinas SEA y SEE se encuentran en un fago, los que codifican las enterotoxinas SED y SEJ se encuentran en plásmidos y los que codifican las enterotoxinas SEB, SEC, SEK, SEL Y SEP se localizan en islas de patogenicidad (SaPI3, SaPI4, SaPIbov). Los genes *seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo* y a veces *seu*, pertenecen a un operón denominado *egc* [69, 72].

Las enterotoxinas son toxinas termoestables, resisten la inactivación por parte de las proteasas, y como la mayoría de las proteínas secretadas, se producen mayoritariamente en la fase postexponencial de crecimiento de la bacteria. También se ha asociado la producción de algunas enterotoxinas (SEA, SEB, SEC, SED y SEG-SEQ) con el SST.

Otro tipo de toxinas que algunas cepas de *S.aureus* son capaces de producir son las toxinas exfoliativas. La producción de estas toxinas por parte de la bacteria es la causa del síndrome de la piel escaldada. Se han descrito 4 tipos de toxinas exfoliativas ETA, ETB, ETC y ETD, pero las que se han asociado con el síndrome tóxico de escaldadura estafilocócica son las toxinas ETA y ETB [73]. La toxina ETC es la que más se diferencia genéticamente del resto, únicamente presenta un 13% de homología con la toxina ETD y mucho menos con el resto de las toxinas exfoliativas, y se ha detectado en una cepa aislada en caballos [74]. Las toxinas exfoliativas están codificadas por los genes *eta*, *etb*, *etc* y *etd*, cada uno de ellos localizados en diferentes regiones del genoma de la bacteria. El gen *eta* se localiza en el cromosoma y en el fago Φ ETA. El gen *etb* está localizado en un plásmido, el cual a su vez es portador de otros elementos implicados en la patogénesis, como el gen que codifica la resistencia al

cadmio y el gen que codifica la exotoxina EDIN-C. El gen *etd* se encuentra en una isla de patogenicidad en la que se localiza también el gen que codifica la toxina EDIN-B [75, 76]. La adquisición por parte de la bacteria de estos elementos genéticos móviles, no solo implicaría la adquisición de las toxinas exfoliativas, sino también de otros factores de virulencia.

El mecanismo por el cual las toxinas exfoliativas producen patología no se conoce con exactitud. Se sabe que las toxinas son producidas por la bacteria cuando esta se encuentra en el torrente sanguíneo, y por difusión desde los capilares alcanzan la zona granulosa de la epidermis. Una vez en la epidermis, se unen a la desmogleína-1, que es una proteína importante en el mantenimiento de la adhesión entre las células de la epidermis, y ahí parece ser que actúan como proteasas destruyendo la cohesión intercelular.

3.2.2.d. Las toxinas EDIN

La familia de exotoxinas EDIN está compuesta por las toxinas EDIN-A, EDIN-B y EDIN-C. Se conoce bastante poco sobre las características de estas toxinas y su implicación en la patogenia, ya que son muy pocos los estudios publicados al respecto. En cuanto a su implicación en la patogenia y mecanismo de acción, algunos estudios demuestran que la toxina EDIN-A es capaz de bloquear la diferenciación del queratinocito e inducir hiperplasia de la dermis in vivo [77], mediante la inactivación de las GTPasas (Guanosina Trifosfatasa) RhoA y RhoB [78]. Las GTPasas Rho son reguladores centrales del citoesqueleto de actina de las células eucariotas, y su inactivación bloquea algunas funciones de las células del sistema inmune, como la quimiotaxis y la fagocitosis [79]. En cuanto a la toxina EDIN-B, esta presenta un 78%

de homología con EDIN-A, y también se ha descrito su capacidad para inhibir las GTPasas RhoE y RhoA [80]. Los genes *edinB* y *edinC* que codifican las toxinas EDIN-B y EDIN-C se localizan en elementos móviles. Estos a su vez llevan genes que codifican otros factores de virulencia, de este modo, *edinB* se localiza en una isla de patogenicidad junto con el gen *etd*, y el gen *edinC* se encuentra en un plásmido junto con el gen que codifica la resistencia al Cadmio y el gen *etb* [81].

A pesar de que podría tratarse de una familia de toxinas importantes en la patogenia de la infección causada por *S.aureus*, las toxinas EDIN no han sido estudiadas en profundidad y su papel exacto en la patogénesis está todavía por descubrir.

3.2.2.e. Proteínas implicadas en la evasión del sistema inmune

En algunas cepas de *S.aureus* se han descrito unos factores de virulencia que actúan modulando el sistema inmune innato del huésped. Uno de estos factores es el denominado SCIN. Este factor es un inhibidor de la C3 convertasa que actúa bloqueando la formación de C3b en la superficie de la bacteria, y por lo tanto impide la fagocitosis del microorganismo por los neutrófilos humanos [82]. Otro de estos factores es el denominado CHIPS, este factor de virulencia bloquea dos receptores de los neutrófilos humanos que están involucrados en la quimiotaxis [83, 84]. Tanto SCIN como CHIPS son factores de virulencia que protegen a la bacteria del sistema inmune del huésped al que infecta. Los genes que codifican los factores SCIN (*scn*) y CHIPS (*chp*) se encuentran localizados en unos fagos denominados *β -hemolysin-converting bacteriophages* [13]. Estos fagos se insertan en el cromosoma de *S.aureus* en el gen que codifica la β -hemolisina truncando este gen e inhibiendo la expresión de la misma. Estos fagos además de ser portadores de los genes *scn* y *chp* también pueden llevar los

genes *sak* que codifica la estafiloquinasa, y *entA*, que codifica la enterotoxina A, estos genes se introducen en el cromosoma de la bacteria en diferentes combinaciones en función del fago que se inserte.

4. SISTEMAS DE REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA

Los factores de virulencia, tanto los relacionados con factores de adhesión como las proteínas secretadas, son controlados por una serie de sistemas de regulación que en función de las condiciones ambientales controlan la expresión de ciertos determinantes metabólicos y de virulencia. Estos sistemas reguladores reciben e integran señales ambientales y en función de las necesidades, regulan positiva o negativamente la expresión de los factores virulencia, para así producirlos en el momento y en las cantidades necesarias para el microorganismo.

El sistema regulador más conocido y estudiado es el *agr* (*Accessory Gene Regulator*). El *agr* es un sistema de 2 componentes denominados TCS (*Two Component System*) que regula la expresión de genes en función de la densidad bacteriana, de modo que, permite la expresión de adhesinas durante la fase exponencial de crecimiento cuando la densidad bacteriana es baja, y activa la expresión de exoproteínas durante la fase postexponencial y estacionaria de crecimiento, cuando la densidad bacteriana es elevada. El sistema *agr* es un locus de aproximadamente 3 Kb que contiene unidades de transcripción divergentes dirigidas por los promotores P1 y P2. El promotor P2 dirige la transcripción de la proteína transmembrana AgrB, que está implicada en el procesamiento y la secreción de AgrD, proteína precursora del péptido auto inducible AIP (*Auto Inducing Peptide*). El operón P2 también codifica el receptor

transmembrana AgrC y el AgrA que es un regulador de la transcripción. El operón P3 codifica la hemolisina delta y el ARNIII, que es un regulador intracelular que regula la expresión de muchos genes de virulencia. En la fase exponencial de crecimiento se activa la transcripción de AIP, lo que resulta en una activación a su vez del promotor P3 y una retroalimentación positiva que resulta en la producción de exoproteínas y en la inhibición de la producción de factores de adhesión (Figura 4) [85]. En función de la diversidad de las secuencias de la región hipervariable se han descrito cuatro tipos de *agr* en *S.aureus* (*agr*I-IV).

Aunque el sistema *agr* es esencial en la regulación de la expresión de factores de virulencia no es el único. Se han descrito al menos otros 3 sistemas de regulación de dos componentes, denominados *sae* (*Staphylococcus aureus Exoproteins*), *arlS* (*Autolysis-Related Locus Sensor*), y *srrAB* (*Staphylococcal Respiratory Response*). También se ha descrito un factor sigma denominado σ^B y un gran número de factores de transcripción entre los que se encuentran *sarA* (*Staphylococcal Accesory Regulator*), *sarS*, *sarT*, *sarR* y Rot (Tabla 3). Los sistemas reguladores de dos componentes, actúan transmitiendo señales directamente a los genes diana, o a factores de transcripción intermediarios que son los que regulan los genes diana y que en ocasiones, actúan independientemente de los sistemas de dos componentes.

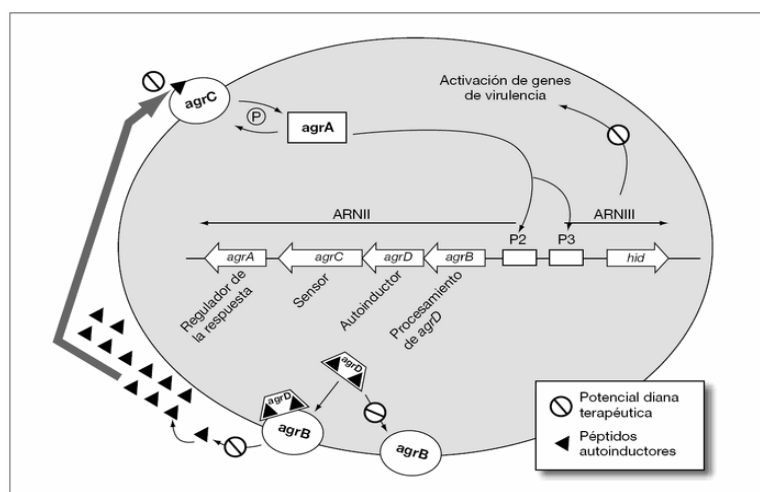


Figura 4. Sistema de regulación *agr*. Al aumentar la densidad bacteriana el promotor P2 activa la transcripción de AIP. El AIP interacciona con su receptor AgrC y activa al regulador de la transcripción AgrA, proceso que conlleva la fosforilación o defosforilación de AgrA. Una vez activado el regulador AgrA, este activa la transcripción desde el promotor P2, generando un sistema de retroalimentación positiva y desde el promotor P3, activándose la transcripción de hemolisina delta y ARNIII. El ARNIII es un ARNm con funciones reguladoras globales que activa la expresión de la mayoría de las proteínas secretadas y reprime la expresión de los factores de adhesión.

Los sistemas reguladores se componen por una red compleja que integra tanto las señales externas como internas de la célula, respondiendo de la forma más adecuada en función de las necesidades de la bacteria. Estos circuitos pueden complementarse y por lo tanto la interrupción de uno de estos sistemas puede ser compensada por los demás. El sistema *agr* parece ser el centro donde convergen muchos otros sistemas reguladores.

TABLA 3. GENES REGULADORES Y FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

[Adaptada de 85]

UNIDAD REGULADORA	DESCRIPCIÓN	FUNCIÓN
<i>AgrACDB/ARNIII</i>	TCS	Regula múltiples genes accesorios que codifican proteínas extracelulares y citoplasmáticas
<i>SaePQRS</i>	TCS	Regula múltiples genes que codifican proteínas Activa la transcripción de <i>hla</i> , <i>hly</i> , <i>nuc</i> y <i>coa</i> .
<i>ArIRS</i>	TCS	Regula la autólisis y algunos genes accesorios
<i>SrrAB</i>	TCS	Regula algunos genes accesorios cuando la presión de oxígeno es baja como <i>tst</i> y <i>spa</i>
σ^B	Factor sigma Rpo	Regula muchos genes accesorios. Activa la transcripción de <i>coa</i> y proteínas de unión a la fibronectina en la fase temprana de crecimiento. Reprime la expresión de algunas proteínas secretadas en la fase estacionaria.
<i>SarA</i>	Factor de transcripción	Está implicado en la autoinducción del <i>agr</i> en ciertas condiciones. Activa la transcripción de <i>fnbA</i> y B, <i>cap5</i> , <i>hld</i> , <i>tst</i> y <i>coa</i> .
<i>SarS</i>	Factor de transcripción	Activa la transcripción del gen <i>spa</i> y posiblemente de otras proteínas de superficie.
<i>SarT</i>	Factor de transcripción	Reprime la transcripción de <i>hla</i> y posiblemente de otros genes que codifican exoproteínas.
<i>SarR</i>	Factor de transcripción	Factor de transcripción menor de <i>SarA</i> y posiblemente de <i>SarS</i> .
<i>Rot</i>	Factor de transcripción	Factor de transcripción mayor para <i>hla</i> y otros genes que codifican para exoproteínas.
Complejo RAP-TRAP	TCS	Activación del <i>agr</i>

5. COLONIZACIÓN POR S.AUREUS

Staphylococcus aureus coloniza la piel y las mucosas del ser humano y de algunos animales. Las regiones anatómicas que principalmente suele colonizar son las axilas, región perineal, orofaringe, mucosa genital y tracto digestivo, sin embargo, son las fosas nasales su verdadero nicho ecológico.

La prevalencia de la colonización nasal por *S.aureus* es variable [86]. Aproximadamente un 20% de la población está colonizada de manera permanente, a este grupo de población se les denomina portadores persistentes, un 60% de la población está colonizada de manera intermitente, y aproximadamente el 20% no ha estado nunca colonizada. Hay estudios que demuestran que el estado de portador persistente es más frecuente en niños que en adultos [87, 88]. Un hecho demostrado es que el riesgo de infección por *S.aureus* es mayor en pacientes portadores nasales que en no portadores [89]. Este riesgo es especialmente elevado en pacientes sometidos a cirugía, en pacientes en hemodiálisis, diálisis peritoneal o en pacientes ingresados en UCI [90-93]. Algunos estudios sugieren, que la colonización por SARM (*Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina) comporta un mayor riesgo de infección que la colonización por SASM (*Staphylococcus aureus* Sensible a Meticilina) [92, 94, 95].

6. SÍNDROMES CLÍNICOS CAUSADOS POR S.AUREUS

Aparte de colonizar, *S.aureus* es un patógeno capaz de causar una gran variedad de cuadros clínicos ya sea por invasión de los tejidos debido a lesiones traumáticas o

quirúrgicas, o por diseminación hematógena causando cuadros metastásicos, también puede causar infecciones toxigénicas debido a la producción de ciertas toxinas.

6.1. Infecciones toxigénicas

Los síndromes causados por la producción de toxinas por parte de la bacteria son el síndrome de la piel escaldada causado por la producción de toxinas exfoliativas, el síndrome del shock tóxico debido a la producción de TSST-1 y algunas enterotoxinas, y la intoxicación alimentaria causada por la producción de enterotoxinas.

El SST es una infección multisistémica generalizada que incluye siguientes criterios clínicos: fiebre mayor o igual a 38,9°C, hipotensión, rash eritematoso difuso, compromiso de varios órganos, y descamación cutánea. Este síndrome ocurre cuando grandes cantidades de toxinas superantigénicas (TSST-1 o enterotoxinas) se diseminan a través del torrente sanguíneo [69]. Existen 2 formas clínicas del SST, la forma clínica menstrual y la no menstrual. El SST menstrual está relacionado con el uso de tampones y está causado por la producción por parte de la bacteria de la toxina TSST-1, que tiene la capacidad de atravesar membranas mucosas. El SST no menstrual está relacionado con otras entidades clínicas como la sobreinfección de lesiones traqueales causadas por el virus influenza, el SST postquirúrgico o el SST postparto, entre otros. El SST no menstrual puede ser causado por la producción de la toxina TSST-1 y también de algunas enterotoxinas (SEA, SEB, SEC, SED y SEG-SEQ). La mortalidad del SST es de aproximadamente un 5%, y son los casos de SST no menstrual los que presentan mayores índices de mortalidad [47, 69].

El síndrome de la piel escaldada es una entidad clínica que afecta fundamentalmente a neonatos y a niños, aunque también a adultos con ciertas patologías de base. Este síndrome comprende un espectro de desórdenes de la piel causados por las toxinas exfoliativas ETA y ETB. En la infección generalizada, que afecta a toda la superficie del cuerpo, las toxinas exfoliativas se diseminan por el torrente sanguíneo desde el foco de la infección causando daño en la epidermis y la piel se descama dejando zonas desnudas. Si la zona afectada es muy localizada la infección se denomina como impétigo bulloso, y clínicamente se muestra como ampollas llenas de pus (pústulas). La mortalidad es variable en función de la extensión de la infección, en niños es baja (<5%) pero en adultos puede llegar entorno al 60% dependiendo del tamaño del área afectada y las comorbilidades.

La intoxicación alimentaria estafilocócica es un síndrome que resulta del consumo de alimentos que contienen enterotoxinas ya formadas. Las enterotoxinas son capaces de resistir el calor y son resistentes también a la acción de las proteasas intestinales como la pepsina. La cantidad de enterotoxinas requerida para causar intoxicación es muy pequeña, siendo una dosis de 20 a 35µg suficiente para causar vómitos en humanos. El cuadro clínico se caracteriza por un corto periodo de incubación de aproximadamente 4 horas y una sintomatología caracterizada principalmente por náuseas y vómitos violentos normalmente acompañados de dolor abdominal y diarrea. La duración de los síntomas suele ser de un día y generalmente se autolimitan. En la población general la mortalidad es muy baja, de aproximadamente un 0,03% sin embargo, en determinados grupos de población como ancianos o niños la mortalidad puede llegar a un 4,4%. Las enterotoxinas además de tener capacidad superantigénica, también actúan sobre los centros nerviosos del intestino de modo que

las señales son transmitidas a través del nervio vago y del sistema simpático al centro reflejo emético de la médula [69].

6.2. Infecciones de piel y tejidos blandos

S.aureus es el principal agente etiológico de las IPTBs. Estas infecciones comprenden varias entidades clínicas que se clasifican en función de la estructura anatómica involucrada.

El impétigo es una infección de la epidermis que afecta principalmente a áreas expuestas. La foliculitis es la infección del folículo piloso y de las áreas colindantes, la extensión de la infección al tejido perifolicular da lugar al forúnculo, que se produce en las zonas vellosas del cuerpo sobre todo cara, cuello, axilas y nalgas. El carbunco es una infección de piel y tejidos blandos más profunda, que involucra varios folículos pilosos y que resulta de la diseminación del proceso infeccioso en el tejido subcutáneo profundo, suele haber afectación del estado general y fiebre, pudiendo ser un foco de bacteriemia. La mastitis es la infección de las glándulas mamarias y afecta de un 1 a un 3% de las mujeres en el periodo de lactancia, las manifestaciones pueden variar desde nódulos eritematosos dolorosos hasta abscesos canaliculares, y la fiebre y la alteración del estado general suelen estar presentes.

La extensión tanto superficial como profunda de la infección puede resultar en erisipela, celulitis o fascitis. La característica común a estas 3 entidades clínicas es el intenso dolor. La erisipela aparece como una zona delimitada eritematosa e inflamada en la piel, la celulitis afecta a estructuras anatómicas más profundas y no produce las lesiones en la piel típicas de la erisipela, y la fascitis necrosante es el cuadro más grave

aunque paradójicamente no presenta signos importantes en la exploración visual de la piel y los tejidos pero el dolor es muy intenso.

Por otro lado *S.aureus*, es la principal causa de infecciones de heridas quirúrgicas ya que es un colonizador habitual y es un patógeno endémico en la mayoría de los hospitales [23].

El tratamiento de las IPTBs depende de la profundidad y la gravedad de la infección. Las infecciones superficiales suelen ser leves y se pueden tratar habitualmente de forma local y raramente requieren de tratamiento antibiótico oral. Sin embargo, las infecciones más profundas requieren tratamiento antibiótico, drenaje y en ocasiones desbridamiento quirúrgico.

6.3. Bacteriemia

S.aureus es una causa común de bacteriemia y su incidencia se ha incrementado en las últimas décadas [96]. Según la adquisición de la bacteriemia se pueden diferenciar dos categorías: hospitalarias y comunitarias. Se considera que la bacteriemia es de origen nosocomial cuando esta se inicia después de 48 horas del ingreso hospitalario, en cambio las comunitarias son las que ocurren en pacientes en la comunidad o se manifiestan en las primeras 48 horas del ingreso hospitalario. El foco inicial de la infección no se llega a conocer en un tercio de los casos de bacteriemia. Las bacteriemias de origen nosocomial se relacionan con el uso de catéteres y otros procedimientos invasivos, sin embargo, el foco de las bacteriemias de origen comunitario es extravascular, como complicación de infecciones osteoarticulares, IPTBs o neumonías. La bacteriemia puede complicarse debido a la diseminación de focos metastásicos.

6.4. Endocarditis

La endocarditis infecciosa en válvula nativa es una de las complicaciones más severas de la bacteriemia causada por *S.aureus*. La endocarditis típicamente cursa con la formación de múltiples émbolos sépticos, destrucción valvular, miocarditis y un cuadro mixto de shock séptico y cardiogénico. Los pacientes con factores de riesgo clásicos como la fiebre reumática, han sido reemplazados por nuevos grupos de riesgo como adictos a drogas por vía parenteral (ADVPs), pacientes ancianos con esclerosis de las válvulas, pacientes con prótesis vasculares y pacientes en hemodiálisis. *S.aureus* es responsable de más de un 30% de las endocarditis de válvula nativa, causa el 69% de los casos de endocarditis en ADVPs y el 20% de los casos de endocarditis de válvula protésica [97]. En la población pediátrica, la incidencia de esta complicación es muy baja, excepto en pacientes con patología cardíaca de base [98].

6.5. Pericarditis

El origen de la pericarditis purulenta causada por *S.aureus* suele ser hematógeno, por embolización de material séptico en las arterias coronarias, aunque también puede ocurrir tras una intervención quirúrgica, por un traumatismo penetrante o por extensión de una infección paravalvular.

6.6. Meningitis

La meningitis por *S.aureus* no es frecuente y ocurre normalmente como consecuencia de un traumatismo craneal, como consecuencia de una infección

postquirúrgica, debido a la infección de material extraño o por contigüidad desde otro foco de infección. Aunque también puede ser debida a la diseminación hematológica de material séptico desde un foco que se encuentre fuera del sistema nervioso central [99].

6.7. Infecciones de las vías respiratorias

La neumonía estafilocócica se puede producir por aspiración de secreciones respiratorias (neumonía primaria) o por diseminación hematológica (neumonía secundaria), y en ambos casos la infección respiratoria puede dar lugar a complicaciones como abscesos o empiema. *S.aureus* es responsable de menos de un 10% de los casos microbiológicamente confirmados de neumonía adquirida en la comunidad [100]. Sin embargo, supone entre un 20 y un 30% de los casos de neumonía nosocomial [101]. Los síntomas son con frecuencia indistinguibles de los de la neumonía causada por otros patógenos, pero la neumonía causada por *S.aureus* es típicamente una infección necrosante con una rápida progresión hacia la destrucción del tejido y la cavitación. La neumonía necrosante adquirida en la comunidad, está relacionada con cepas de *S. aureus* productoras de la LPV, es una entidad clínica que afecta principalmente a niños previamente sanos y adultos jóvenes, y típicamente va precedida de un síndrome gripal. El pronóstico de la neumonía necrosante es muy desfavorable, siendo la tasa de mortalidad muy elevada (de un 36 a un 60%) [102-104].

6.8. Infecciones musculoesqueléticas

S.aureus es la causa del 50 al 70% de los casos de osteomielitis [105, 106]. La infección del hueso se puede originar tanto por vía hematológica como por contigüidad

desde otro foco. En los niños la osteomielitis hematogena suele afectar a las metáfisis de los huesos largos, en cambio en pacientes adultos se suele afectar al tejido esponjoso vertebral dando lugar a osteomielitis vertebral.

S.aureus es también la causa más frecuente de artritis séptica en niños y una de las causas de artritis no gonocócica en adultos [23]. La infección puede ser consecuencia de una diseminación hematogena, debida a un traumatismo local, o puede ser iatrogénica en el caso de punción de la articulación o artroscopia. El pronóstico de la artritis séptica en niños es favorable, y en adultos depende de la enfermedad de base.

La bursitis séptica es una infección aguda de la bursa periarticular, y más de un 80% de las bursitis son causadas por *S.aureus* [107]. La puerta de entrada frecuentemente es local y el pronóstico es normalmente favorable.

La piomiositis primaria también denominada como miositis tropical, miositis infectiva, miositis piógena y miositis tropical purulenta, es una infección poco común de los músculos esqueléticos. *S.aureus* es el agente etiológico en un 80% de los casos. La piomiositis se ve con más frecuencia en países como África y en la zona Sur del Pacífico, pero es muy poco frecuente en el hemisferio norte. El origen más común es hematogeno y puede verse afectado cualquier músculo, aunque el cuádriceps y el psoas son los músculos más frecuentemente afectados. La infección puede ocurrir en todos los rangos de edad aunque es dos veces más frecuente en niños y adultos menores de 30 años [108].

6.9. Infecciones protésicas

Aproximadamente el 2% de las prótesis se infectan y *S.aureus* representa la segunda causa de infección de prótesis después de los estafilococos coagulasa negativos.

Las infecciones se dividen en tempranas o precoces, si ocurren en las primeras 12 semanas tras la implantación de la prótesis, y crónicas, si ocurren de 12 semanas a 24 meses tras la intervención. *S.aureus* es la primera causa de infección temprana de las prótesis.

6.10. Infección de las vías urinarias

La infección de las vías urinarias por *S.aureus* es muy infrecuente y cuando este microorganismo está presente en la orina suele ser debido a un origen hematógeno. Las infecciones ascendentes suelen ser debidas a una manipulación instrumental.

7. RESISTENCIAS A LOS ANTIMICROBIANOS

S.aureus es una bacteria con una gran capacidad de adaptación y cambio, por ello este microorganismo ha sido capaz de desarrollar resistencias a prácticamente todos los antibióticos utilizados en la práctica clínica. La resistencia a los antimicrobianos puede ser adquirida por la bacteria mediante la transferencia horizontal de genes de resistencia, y también puede ser debida a mutaciones cromosómicas, fenómeno en el que está implicada la presión antibiótica.

7.1. Resistencia a los β -lactámicos

Los β -lactámicos son un grupo de antibióticos con actividad bactericida que actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular. Esto es debido, a que se unen a unas enzimas de la membrana celular de la bacteria denominadas PBPs que tienen actividad

transpeptidasa y algunas de ellas actividad transglicosilasa, y que son responsables de la inserción de los precursores del peptidoglicano en la pared celular que se está sintetizando. Los β -lactámicos son análogos del fragmento Dala-Dala de los precursores y compiten con ellos en la unión al sitio activo de las PBPs.

El mecanismo más común de resistencia a los β -lactámicos es la producción de penicilinas, una enzima que hidroliza el anillo β -lactámico inactivándolo. La penicilinas está codificada por el gen *bla*, que se encuentra localizado en un transposón (Tn552) y es un gen inducible que va precedido por los reguladores *blaRI* y *blaI*. La enzima penicilinas es inactivada por los inhibidores de β -lactamasas y no hidroliza las cefalosporinas. Las primeras cepas productoras de penicilinas se describieron en los años 1940 poco después de la introducción de la penicilina en la práctica clínica [109].

Los primeros antibióticos β -lactámicos estables frente a la penicilinas, como las cefalosporinas, la meticilina semisintética y la nafacilina, se introdujeron a finales de los años 1950, pero poco tiempo después en 1961 se describieron las primeras cepas resistentes [110]. El principal mecanismo de resistencia a la meticilina es la adquisición del gen *mecA* que codifica una proteína fijadora de penicilina (PBP2a) que no posee afinidad por los β -lactámicos y por lo tanto el antibiótico no interactúa con su diana (Figura 5.A) [111]. La expresión fenotípica de la resistencia a meticilina puede ser homogénea o heterogénea. Las cepas con una expresión heterogénea de la resistencia se caracterizan porque sólo una pequeña proporción de la población bacteriana ($\leq 0,1\%$) sobrevive a concentraciones de oxacilina superiores a $10\mu\text{g/ml}$ y fenotípicamente se caracterizan porque el tamaño de las colonias es bastante heterogéneo. Sin embargo, la expresión homogénea se caracteriza porque la mayor parte de la población expresa la resistencia y el tamaño de las colonias es homogéneo. Las cepas de *S.aureus* que son

resistentes a meticilina por este mecanismo, también lo son a todos los β -lactámicos incluyendo las penicilinas, cefalosporinas, carbapenems y monobactámicos.

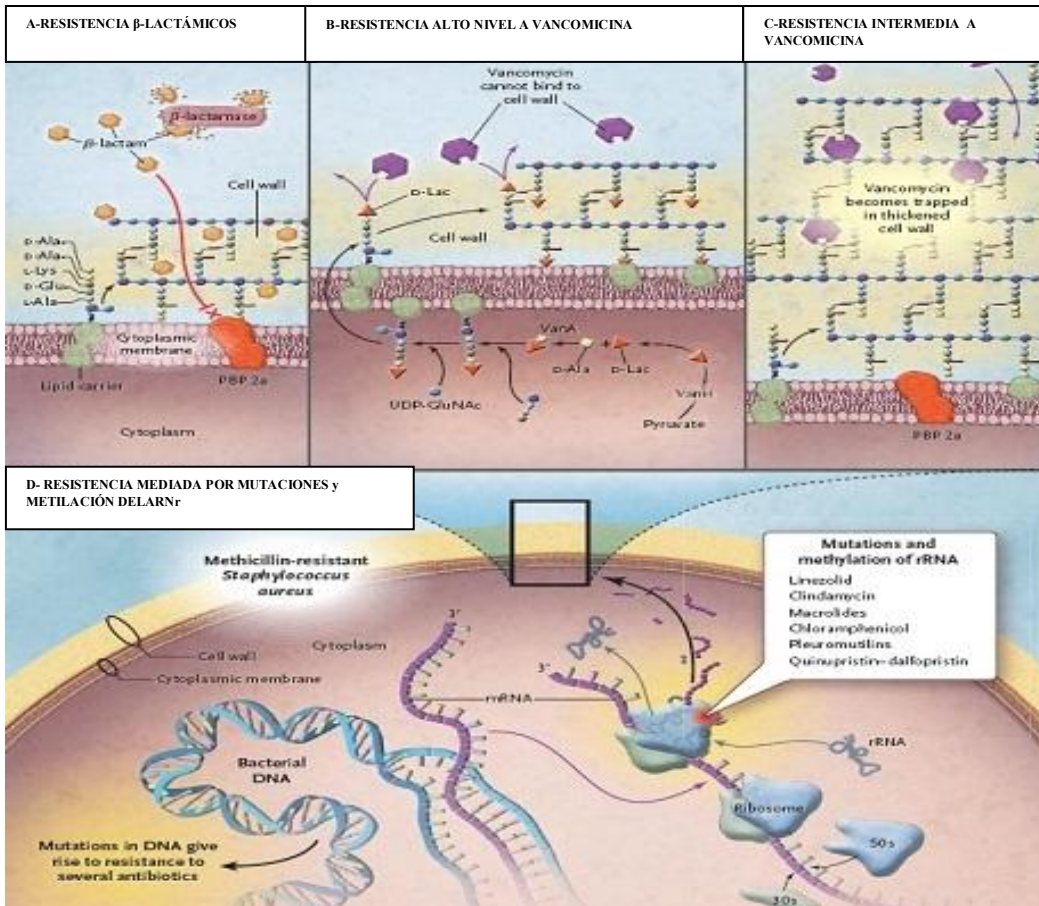


Figura 5 [112].

- Resistencia a los β -lactámicos. La β -lactamasa actúa sobre el antibiótico hidrolizando el anillo β -lactámico. El gen *mecA* codifica una proteína fijadora de penicilina PBP2a que no posee afinidad por los β -lactámicos y por lo tanto el antibiótico no interactúa con su diana
- Resistencia de alto nivel a vancomicina. Esta resistencia resulta de la adquisición del transposón Tn1546 portador del gen *VanA* que codifica un residuo de D-ala-D-ala modificado (D-ala-D-lactato) y que posee una menor afinidad por los glucopéptidos.
- Resistencia intermedia a vancomicina. Debido a una serie de mutaciones, las cepas sintetizan una gran cantidad de peptidoglicano de manera que la pared celular está engrosada y contiene un mayor número de residuos D-ala-D-ala libres, que actúan atrapando el antibiótico antes de que este alcance su diana.
- Resistencia mediada por mutaciones y metilación del ARNr. Las mutaciones en el ARNr producen una disminución de la unión del antibiótico a su diana.

El gen *mecA* forma parte de una estructura de *cassette* en el cromosoma estafilocócico denominada *SCCmec* (*Staphylococcal Cassette Chromosome Mec*). El *SCCmec* es un elemento genético móvil, insertado en el cromosoma de SARM en una localización específica en el extremo 3' del fragmento de lectura abierta *OrfX* (*Open Reading frame*) y su función es desconocida por el momento [5, 6,113]. Se han descrito elementos *SCCmec* estructuralmente diferentes, pero estos elementos comparten las siguientes características: son portadores del complejo génico *mec* y del complejo génico *ccr*, que codifica recombinasas específicas de sitio responsables de la movilidad del *SCCmec* [114]. Estos elementos se integran en lugares específicos en el cromosoma de la bacteria denominados secuencias de inserción, que sirven de diana para las recombinasas *ccr* y en los extremos presentan secuencias repetidas que contienen las secuencias de inserción.

El complejo génico *ccr* consta de genes *ccr* y de las secuencias de lectura abierta *Orf* adyacentes. Existen 3 genes *ccr* filogenéticamente distintos *ccrA*, *ccrB* y *ccrC*, cuyas secuencias de ADN tienen una similitud inferior al 50%. Los genes *ccrA* y *ccrB* se clasifican en 4 alotipos diferentes en función de la similitud de sus secuencias de ADN, de modo que los genes *ccr* con una similitud superior al 85% pertenecen al mismo alotipo. El gen *ccrC* sin embargo, posee un único alotipo. Basándose en las variaciones alélicas que existen en los genes *ccr* se han definido 5 complejos génicos *ccr*: el tipo 1 (*ccrA1B1*), el tipo 2 (*ccrA2B2*), el tipo 3 (*ccrA3B3*), el tipo 4 (*ccrA4B4*) y el tipo 5 (*ccrC*) [115].

El complejo génico *mec* está compuesto por el gen *mecA* y los genes reguladores *mecR1*, que es el gen regulador de la señal de transducción del gen *mecA*, y el gen *mecI*, que codifica la proteína represora de la transcripción del gen *mecA* y las secuencias de inserción asociadas. Se han descrito 4 clases de complejos *mec*:

- El complejo *mec* de clase A, que está compuesto por el gen *mecA*, los genes *mecR1* y *mecI*, una región hipervariable y la secuencia de inserción IS431.
- El complejo *mec* de clase B, que está compuesto por el gen *mecA*, el gen regulador *mecR1* truncado debido a la inserción de IS1272, una región hipervariable y la secuencia de inserción IS431.
- El complejo *mec* de clase C, que contiene el gen *mecA* y el *mecR1* truncado por la secuencia de inserción IS431, una región hipervariable y la secuencia de inserción IS431. Existen dos complejos génicos de clase C (C1 y C2) clasificados en función de la orientación de la secuencia de inserción IS431.
- El complejo *mec* de clase D, que está compuesto por el gen *mecA* y Δ *mecR1* y que no lleva ninguna secuencia de inserción [114].

Las regiones del *cassette* que no comprenden los complejos génicos *mec* y *ccr* se denominan regiones J (*junkyard*), que contienen genes y pseudogenes no esenciales del *cassette* exceptuando algunos genes de resistencia a antibióticos β -lactámicos y a metales pesados [114, 116-120]. La región J1 es la región que se encuentra entre el extremo derecho del *cassette* y el complejo *ccr*, la región J2 es la que se encuentra entre el complejo génico *ccr* y el complejo *mec* y la región J3 la que se encuentra entre el complejo *mec* y el fragmento *orfX* (Figura 6). Las variaciones en las regiones J definen los subtipos de SCC*mec* [121, 122].

Los elementos SCC*mec* son muy diversos en cuanto a la organización estructural y el contenido genético, y se han clasificado en tipos y subtipos. Se han descrito 8 tipos de elementos SCC*mec* que se definen según la combinación de la clase de complejo génico *mec* y del tipo de complejo génico *ccr* [123, 124]:

- SCC*mec* tipo I (1B), compuesto por el complejo génico *ccr* tipo1 y el complejo génico *mec* de clase B.
- SCC*mec* tipo II (2A), compuesto por el complejo *ccr* tipo 2 y el complejo *mec* clase A.
- SCC*mec* tipo III (3A), formado por el complejo *ccr* tipo 3 y el complejo *mec* clase A.
- SCC*mec* tipo IV (2B), formado por el complejo *ccr* tipo 2 y el complejo *mec* clase B.
- SCC*mec* tipo V (5C2), formado por el complejo *ccr* tipo 5 y el complejo *mec* clase C2.
- SCC*mec* tipo VI (4B), compuesto por el complejo *ccr* tipo 4 y el complejo *mec* clase B.
- SCC*mec* tipoVII (5C1), compuesto por el complejo *ccr* tipo 5 y el complejo *mec* clase C1.
- SCC*mec* tipoVIII (4A), compuesto por el complejo *ccr* tipo 4 y el complejo *mec* clase A.

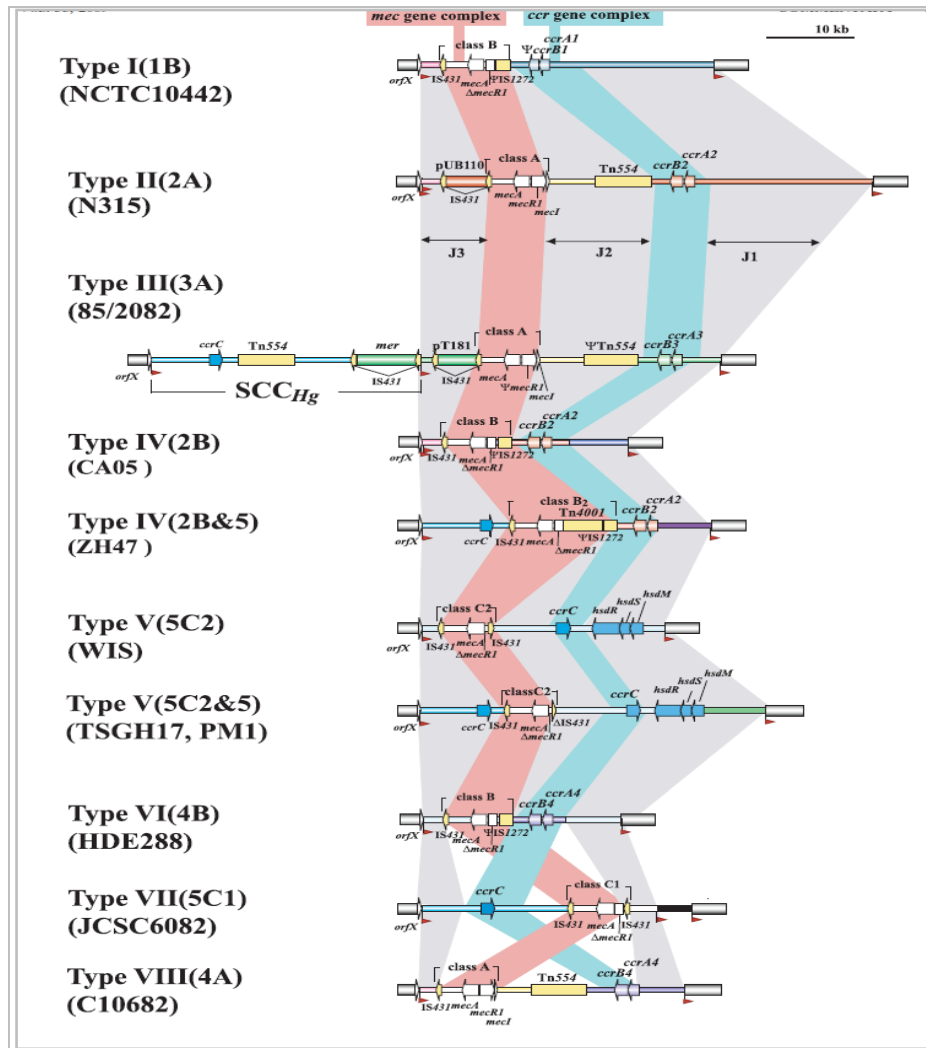


Figura 6. Estructura y elementos que conforman los distintos tipos de SCC_{mec} [125].

Se han descrito otros mecanismos de resistencia a meticilina que se asocian a CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) a meticilina entre 8 y 16 μ g/ml. Uno de estos mecanismos es la hiperproducción de penicilinasas, estas cepas son resistentes a meticilina pero sensibles a inhibidores de β -lactamasas y se denominan BORSA (*Borderline Staphylococcus aureus*). Otro mecanismo es la producción de una meticilinasas capaz de hidrolizar la meticilina, pero el gen responsable y la implicación clínica no se conocen [126-128]. También se han descrito cepas que presentan resistencia a meticilina debido a una modificación de sus PBPs causada por mutaciones

genéticas o por la hiperproducción de estas, y se les denomina MODSA (*Modified Staphylococcus aureus*) [129]. Recientemente, se ha descrito otro mecanismo de resistencia mediado por un gen homólogo del *mecA* (*mecA_{LGA251}*) que no se detecta por los métodos moleculares convencionales [130].

7.2. Resistencia a los antibióticos de los grupos macrólidos, lincosamidas y estreptograminas

Los antibióticos macrólidos, lincosamidas y estreptograminas son estructuralmente distintos, pero tienen el mismo mecanismo de acción y la resistencia a los tres grupos de antibióticos es causada por los mismos mecanismos.

Los macrólidos estructuralmente, están formados por un anillo lactónico y el número de carbonos de este anillo permite clasificarlos en 3 tipos, los macrólidos de 14 átomos como la eritromicina, de 15 átomos como la claritromicina y la azitromicina, y de 16 átomos como la espiramicina y la josamicina. Las lincosamidas incluyen 2 antibióticos, la lincomicina y su derivado clorado la clindamicina. El grupo de las estreptograminas está formado por la quinupristina (estreptogramina B) y la dalfopristina (estreptogramina A).

El mecanismo de acción de estos antibióticos es la inhibición de la síntesis de proteínas mediante la unión al ARN ribosomal 23S en la subunidad 50S del ribosoma y la inhibición de la fase de elongación de la síntesis proteica. Los macrólidos y las lincosamidas son agentes bacteriostáticos, y las estreptograminas A y B por separado son bacteriostáticas pero asociadas son bactericidas.

La resistencia desarrollada por *S.aureus* a estos tres grupos de antibióticos puede ser debida a 4 mecanismos [131, 132]:

1. Modificación de la diana (ARNr 23S) por la acción de metilasas codificadas por los genes *erm* (A, B y C y menos frecuentes F e Y), que es el mecanismo de resistencia más frecuente. Los genes *erm* codifican una metilasa que añade dos grupos metilo al ARNr 23S, lo que resulta en una alteración estérica que disminuye la afinidad del antibiótico por la diana (Figura 5.D). Estos genes pertenecen a una familia de genes metilasa localizados principalmente en elementos móviles como transposones (*ermA* en Tn554 y *ermB* en Tn551) o plásmidos (*ermC* en pMS97) [133]. La presencia de los genes *erm* da lugar a un fenotipo de resistencia denominado MLS_B (*Macrolides, Lincosamides, Streptogramines*) que confiere resistencia a macrólidos de 14, 15 y 16 átomos de carbono, a lincosamidas y a estreptograminas del grupo B. Las estreptograminas del grupo A no están afectadas por lo que la asociación con las del grupo B permanece activa. Este fenotipo puede ser de expresión constitutiva o inducible (c MLS_B o i MLS_B) [134]. Cuando la expresión es inducible, el gen se expresa únicamente en presencia de antibióticos que lo induzcan. Únicamente los macrólidos son buenos inductores de los genes *erm* por ello, si se estudia la sensibilidad de estas cepas a macrólidos de 16 átomos, lincosamidas y estreptograminas del grupo B en ausencia de eritromicina, se manifestarán como sensibles a estos antibióticos. El mecanismo inducible es el más frecuente en *S.aureus* (Figura 7).

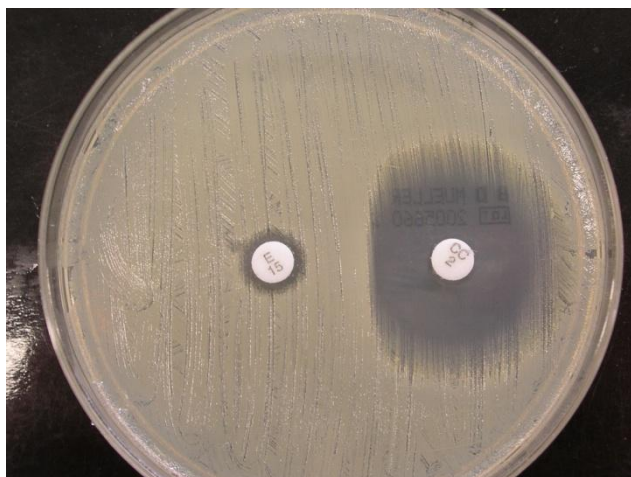


Figura 7. Test de difusión en disco (D-test). En la imagen se observa un achatamiento en el halo que hay alrededor del disco de clindamicina en el lado donde se encuentra la eritromicina, lo que es indicativo de una resistencia inducible.

2. Expulsión activa del antibiótico, relacionada con los genes *mefA*, *mefE*, *msrA*, *msrB*, *erpB*, *vgaA* y *vgaB*. El gen *msrA* se localiza en un plásmido y confiere resistencia a macrólidos de 14 y 15 átomos, y a estreptograminas del grupo B (fenotipo MS) [135].
3. Inactivación del antibiótico, relacionada con los genes *lnuA*, *vatA*, *vatB*, *vatC*, *vgbA* y *vgbB*. El gen *lnuA* inactiva las lincosamidas, y los genes *vatA*, *vatB* y *vatC* y los genes *vgbA* y *vgbB* las estreptograminas.
4. Modificación de la diana por mutación del ARNr 23S y/o proteínas ribosomales. Este mecanismo es muy poco frecuente.

Los mecanismos de resistencia más frecuentes son la modificación de la diana por la acción de las metilasas y las bombas de expulsión, el resto de los mecanismos son muy poco frecuentes.

7.3. Resistencia a las quinolonas

Las quinolonas son agentes bactericidas que actúan sobre la replicación del ADN bacteriano inhibiendo la ADN girasa o la Topoisomerasa IV. Este grupo de antibióticos se introdujeron en la práctica clínica en 1960 y los derivados fluorados como norfloxacino, ciprofloxacino, y ofloxacino en 1980. Los mecanismos de resistencia a las quinolonas que se han descrito son de dos tipos:

1. La sobreexpresión de la bomba de expulsión *NorA*
2. Mutaciones estructurales en las dianas del antibiótico, como mutaciones en los genes *gyrA* y *gyrB*, que codifican la ADN girasa (Topoisomerasa II), y mutaciones en los genes *parC* y *parE*, que codifican la Topoisomerasa IV. Esta resistencia se adquiere en varios pasos, una primera mutación en la topoisomerasa IV produciría una resistencia de bajo nivel. Esta primera mutación favorecería la aparición de una segunda mutación en la ADN girasa, que resultarían en una resistencia de alto nivel a las fluoroquinolonas. Es importante detectar la resistencia de bajo nivel en el laboratorio para evitar en estos casos el tratamiento con este grupo de antibióticos [136].

7.4. Resistencia a los glucopéptidos

Los glucopéptidos son fármacos que actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular uniéndose al residuo D-ala-D-ala de los precursores y bloqueando la transpeptidación. Los principales componentes que integran este grupo son la vancomicina y la teicoplanina. La vancomicina se ha considerado la principal alternativa para el tratamiento de cepas de *S.aureus* resistentes a metilina durante más

de 40 años pero su uso a veces excesivo, ha llevado a la aparición de resistencias. Se han descrito dos tipos de resistencia a los glucopéptidos:

1. La resistencia intermedia, cuando la CMI se encuentra entre 1 y 8 µg/ml. En función de si la resistencia tiene una expresión homogénea o heterogénea las cepas se denominan GISA o VISA (*Glycopeptide or Vancomycin Intermediate S.aureus*) o hGISA o hVISA (*Heterogeneous Glycopeptide or Vancomycin Intermediate S.aureus*) (Tabla 4).
2. La resistencia de alto nivel, cuando la CMI es igual o mayor de 16 µg/ml, estas cepas se denominan VRSA (*Vancomycin Resistant S.aureus*).

Ambos fenotipos tienen mecanismos diferentes y pueden tener una relevancia clínica y epidemiológica muy distinta.

TABLA 4. TIPOS DE RESISTENCIA A GLUCOPÉPTIDOS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*.

SENSIBILIDAD	DENOMINACIÓN	CMI* (µg/ml)
Sensible	VSSA	≤ 2
Heteroresistente	hVISA/hGISA	1-2**
Intermedia	VISA/GISA	4-8
Resistente	VRSA	≥ 16

*Recomendaciones del CLSI (*Clinical Laboratory Standards Institute*)

**Menos de un 10% de la población es capaz de crecer a concentraciones > 2µg/ml de vancomicina

En 1997 Hiramatsu *et al.* [137] describieron el primer aislamiento con resistencia intermedia a la vancomicina en un paciente pediátrico con una infección de herida quirúrgica causada por SARM. Esta cepa es la denominada Mu50 y su CMI a la vancomicina es de 8 µg/ml. Los mismos autores describieron otro aislamiento

denominado como Mu3, clonalmente relacionado con la cepa Mu50, pero que a diferencia esta presentaba la característica de que solo una parte de la población era capaz de crecer con una concentración de 6 a 8 µg/ml de vancomicina [138]. A este tipo de cepas con una expresión heterogénea de la resistencia se les denomina hGISA o hVISA y a las que poseen una expresión homogénea se les denomina GISA o VISA. Tras la publicación de estos casos se han ido publicando sucesivamente nuevos casos de infección causados por cepas con resistencia intermedia a la vancomicina [139-143], siendo la prevalencia de cepas hGISA más elevada que la de cepas con una expresión homogénea de la resistencia. Estas cepas se han relacionado con fracasos terapéuticos y por ello es importante su detección en el laboratorio.

El mecanismo de resistencia de las cepas GISA es debido a mutaciones cromosómicas que afectan a la estructura del peptidoglicano [144]. Debido a estas mutaciones, las cepas sintetizan una gran cantidad de peptidoglicano de manera que la pared celular está engrosada y contiene un mayor número de residuos D-ala-D-ala libres, que actúan atrapando el antibiótico antes de que este alcance su diana (Figura 5.C).

La resistencia de alto nivel a vancomicina se conoce en *Enterococcus* desde hace más de una década [145]. Esta resistencia resulta de la adquisición del transposón Tn1546 que es portador del gen *VanA* que codifica un residuo de D-ala-D-ala modificado (D-ala-D-lactato) y que posee una menor afinidad por los glucopéptidos. (Figura 5.B) [146]. Aunque la resistencia de *S. aureus* a vancomicina se había observado en el laboratorio, ya que el gen *VanA* había sido transferido experimentalmente de *Enterococcus faecalis* a *S.aureus* [147], no ha sido hasta el año 2002 en Michigan cuando se describió el primer caso de una cepa resistente a la vancomicina portadora del gen *VanA* en la práctica clínica [148]. Desde entonces, se han publicado numerosos casos de infección por este tipo de cepas [149-153].

Existe una cierta evidencia de que la sensibilidad a la vancomicina va disminuyendo progresivamente y aunque hay controversia sobre el significado clínico de las cepas hVISA y las cepas que tienen una CMI >1 µg/ml, parece que estas infecciones tienen más complicaciones. Estudios publicados muestran una relación entre CMIs elevadas a vancomicina y un peor pronóstico en los pacientes con bacteriemia causada por SARM [154, 155, 156]. Estas cepas con CMI >1 µg/ml también se han detectado en SASM y se ha observado que las bacteriemias causadas por cepas de SASM con CMI >1,5 µg/ml presentan más complicaciones que las que tienen CMI <1,5 µg/ml [157]. Estas cepas son difíciles de detectar actualmente en el laboratorio usando los métodos convencionales [158].

La resistencia de alto nivel a la vancomicina es muy poco frecuente pero es motivo de gran preocupación, ya que el elemento móvil donde se localiza el gen *vanA* es capaz de transferirse al género *Staphylococcus* y podría establecerse en este microorganismo como lo han hecho otros elementos móviles.

7.5. Resistencia a la mupirocina

La mupirocina (ácido pseudomónico A) es un análogo de la isoleucina que inhibe la síntesis de proteínas uniéndose competitivamente a la enzima isoleucil-RNAt sintetasa (ileS) bacteriana. Esta unión impide la incorporación de la isoleucina en los péptidos nacientes. Se han descrito dos tipos de resistencia a la mupirocina:

1. La resistencia de bajo nivel (CMIs = 8-256 µg/ml), que es debida a mutaciones en el gen que codifica la enzima ileS que dan lugar a una pérdida de afinidad de la enzima por el antibiótico.

2. La resistencia de alto nivel (CMI>256 µg/ml), mediada por el gen *ile2* que está localizado en un plásmido y que codifica una enzima ileS que no posee afinidad por la mupirocina.

Desde que este antibiótico fuera introducido en el año 1980, su uso indiscriminado ha ido unido a un incremento en las tasas de resistencia [159, 160] y aunque de momento no son elevadas, obligan a mantener una vigilancia y un uso racional de este antibiótico [161].

7.6. Resistencia a linezolid

El linezolid es un derivado de las oxazolidinonas que es activo frente a la mayor parte de bacterias gram positivas, incluyendo VRSA y MRSA. Su mecanismo de acción es la inhibición de la síntesis proteica, de modo que el antibiótico se une al dominio V del ARNr 23S e inactiva la subunidad 50S del ribosoma. El linezolid es un antibiótico que se introdujo en la práctica clínica en el año 2000 y un año después se describió la primera cepa de SARM resistente [162].

El mecanismo de resistencia más frecuente es debido a mutaciones que producen sustituciones de nucleótidos en el ADN cromosómico que codifica el dominio V del ARNr 23S, las sustituciones más frecuentes son G2576T y T2500A [163, 164]. Otro mecanismo de resistencia es el codificado por el gen *cfr* (*Chloramphenicol-Florfenicol Resistance*) que se encuentra localizado en un plásmido y que codifica una ARNr 23S metiltransferasa que metila la posición A2503 del ribosoma. Este mecanismo confiere resistencia a las oxazolidinonas, lincosamidas, fenicoles, pleuromutilinas, y a la estreptogramina A (Figura 5.D) [165].

7.7. Resistencia a daptomicina

La daptomicina es un antibiótico bactericida del grupo de los lipopéptidos, cuyo mecanismo de acción consiste en la unión a la membrana de la célula bacteriana en presencia de iones de calcio, causando una despolarización de la misma, lo que conduce a la inhibición de la síntesis de proteínas, de ADN y de ARN. La daptomicina fue introducida en la práctica clínica en el año 2003 y dos años después se describió la primera cepa de SARM resistente a este antibiótico [166]. Mutaciones en los genes *mprF* que codifica la lisilfosfatidilglicerol sintetasa, *ycyG* que codifica el sensor histidina quinasa y *rpoB* y *rpoC* que codifican las subunidades β y β' de la ARN polimerasa respectivamente, se han relacionado con CMIs por encima del rango de sensibilidad para la daptomicina [167]. Es necesario que se lleven a cabo estudios para determinar los mecanismos exactos que causan las mutaciones que producen una disminución de la sensibilidad de *S.aureus* a este antibiótico.

8. EPIDEMIOLOGÍA DE S.AUREUS

8.1. Evolución de S.aureus a través de la historia

Desde que *S.aureus* fuera descubierto en los años 1880 este microorganismo ha ido evolucionando y adquiriendo la capacidad de resistir a los agentes antimicrobianos que se han ido introduciendo en la práctica clínica. A mediados de los años 1940, poco después de haberse introducido la penicilina en la práctica clínica y al mismo tiempo que la proporción de infecciones causadas por *S.aureus* se iba incrementando en los hospitales, surgió la primera cepa productora de penicilinasas [109]. Esta cepa

denominada fagotipo 80/81 se diseminó en la comunidad, y en los años 1950 y 1960 ya era pandémica tanto en los hospitales como en la comunidad. Tras la introducción de la meticilina a finales de los años 1950 esta cepa prácticamente desapareció, sin embargo la prevalencia de cepas productoras de penicilinas se ha mantenido muy elevada desde entonces. En 1961, poco después de la introducción de la meticilina, se describió la primera cepa resistente a este antibiótico [110]. Una de las primeras cepas de SARM fue la cepa denominada “genotipo arcaico o ancestral” perteneciente al linaje ST250, que se diseminó por los hospitales de toda Europa [168] y que por razones desconocidas desapareció en los años 1980. A partir de entonces, han ido emergiendo otros linajes algunos de ellos descendientes del “genotipo arcaico”, que en un principio comenzaron causando brotes en hospitales de EEUU entre los años 1970 y 1980 y que posteriormente se diseminaron por los hospitales de todo el mundo, dando lugar a la pandemia que persiste hoy en día. El incremento de cepas resistentes a la meticilina conllevó un cambio de la terapia antimicrobiana y la vancomicina comenzó a usarse de forma masiva, bajo esta presión antibiótica aparecieron las primeras cepas VISA y VRSA [137, 148, 169].

Hasta los años 1990 la mayoría de las infecciones por SARM estaban confinadas al medio hospitalario, y las escasas infecciones por SARM de comienzo comunitario se habían descrito en pacientes que residían en centros sociosanitarios de larga estancia o en pacientes ADVPs [170]. Fue en el año 1993 cuando se describieron en Australia los primeros casos de infección por SARM-AC en población aborigen que no tenía factores de riesgo, y que previamente no habían sido hospitalizados. Se estudió la epidemiología molecular de estas cepas, y se observó que tanto el patrón de campo pulsado como el patrón de resistencia a los antimicrobianos, eran distintos a los descritos en las cepas que circulaban en los hospitales hasta entonces, demostrándose de este modo, la

emergencia de una nueva cepa [171]. Pocos años después en 1999, se notificaron cuatro casos de infecciones graves en niños causadas por cepas de SARM-AC [172]. Los pacientes eran niños previamente sanos, sin factores de riesgo, y todos ellos fallecieron a consecuencia de la infección lo que alertó sobre la virulencia de estas cepas. Al igual que las cepas descritas en Australia, el patrón de campo pulsado era diferente que el de las cepas hospitalarias, y eran cepas sensibles a la mayoría de los antibióticos. Desde entonces, se han descrito un gran número de casos de infección causados por SARM-AC en pacientes sanos sin ninguna relación con el sistema sanitario. Esta explosión ha ocurrido sobre todo en EEUU, aunque también se han descrito casos en otros países, y algunos estudios demuestran que este incremento se ha producido en mayor medida en la población pediátrica [173].

8.2. Métodos de tipificación molecular

8.2.1. Fundamentos y aplicaciones de los métodos de tipificación molecular

Durante las últimas décadas, se han desarrollado métodos de tipificación molecular que han sido de gran ayuda para el estudio de la evolución, la epidemiología y la diseminación de SARM.

Los métodos de tipificación molecular, comprenden un gran número de técnicas que se basan en la comparación de los ácidos nucleicos de las bacterias, con el fin de determinar si los aislados que se comparan están relacionados genéticamente. La elección de la técnica de tipificación depende del problema y el objetivo a evaluar. Las técnicas como la electroforesis en campos pulsados (ECP), la ribotipificación o la amplificación por PCR (*Polimerase Chain Reaction*) de regiones de ADN repetidas, se

basan en la comparación de los patrones que generan los fragmentos de ADN en geles de agarosa, y son adecuadas cuando el objetivo es estudiar un brote o la diseminación de una cepa en un lugar concreto como un hospital. Si el objetivo es conocer la diseminación de las cepas a nivel global, cómo es la epidemiología a nivel mundial o cómo han evolucionado las cepas a lo largo de los años, la mejor técnica es el MLST.

8.2.2. Electroforesis en campos pulsados

La ECP es la técnica de tipificación molecular con un mayor poder de discriminación, y es el mejor método para detectar brotes hospitalarios. La ECP se basa en la digestión del ADN bacteriano con una enzima de restricción denominada *SmaI*, y la posterior separación de los fragmentos que resultan de la digestión, mediante electroforesis en un gel de agarosa empleando un gradiente de voltaje alterno. El principal problema de esta técnica ha sido la falta de estandarización de la técnica y de los criterios para el análisis de los patrones. Por ello, se ha propuesto un protocolo para unificar esta técnica y que los resultados sean reproducibles, de manera que los patrones electroforéticos de las cepas de los distintos países puedan ser comparados [174]. Para interpretar los patrones de restricción, actualmente se siguen en casi todos los estudios los criterios propuestos por Tenover en el año 1995 [175].

8.2.3. *Multilocus sequence typing*

El método MLST es el mejor para el estudio de la evolución de las cepas y para conocer la diseminación y la epidemiología a nivel mundial. La técnica se basa en la secuenciación de determinados fragmentos (de 450 a 500 pb) de 7 genes “*housekeeping*”

(*arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi* y *yqiL*), y la alineación de esas secuencias con las que ya se han depositado en una base de datos centralizada (www.mlst.net). A cada una de las secuencias de los 7 genes, el programa le asigna un número que identifica a cada alelo, y a ese perfil alélico de 7 números se le asigna un ST (*Sequence Type*). Las cepas que tienen secuencias idénticas en los fragmentos de los 7 genes secuenciados se considera que pertenecen al mismo clon, y se les asigna el mismo ST. Cuando las cepas se considera que están estrechamente relacionadas evolutivamente, se agrupan en un mismo complejo clonal (CC). La relación evolutiva entre los distintos STs y la agrupación de estos en complejos clonales se realiza gracias al algoritmo eBURST (eburst.mlst.net).

La técnica MLST permite el estudio de la evolución de las cepas a lo largo del tiempo ya que al ser los genes “*housekeeping*” genes muy conservados, es infrecuente que se produzcan mutaciones en ellos, y por ello los clones mantienen el mismo ST durante largos periodos de tiempo. Gracias a esta base de datos, accesible a través de internet, se puede realizar el análisis de los aislados caracterizados y también se pueden enviar nuevos perfiles alélicos para que les sea asignado un nuevo ST. De esta manera, se genera una base de datos central con la información epidemiológica global, donde se pueden detectar nuevos clones y se puede hacer un seguimiento de su diseminación.

8.3. Evolución y epidemiología de SARM asociado al hospital

El primer aislado de *S.aureus* resistente a meticilina se describió en el año 1961 en el Reino Unido, 2 años después de la introducción de la meticilina en la práctica clínica [110]. Durante los años siguientes, las cepas de SARM se diseminaron por toda Europa, y en los años 1970 ya se habían propagado por todo el mundo. Durante la

última década, se ha producido una diseminación de SARM desde los grandes hospitales a otros con un menor número de camas, e incluso a otros centros sociosanitarios como geriátricos, centros de enfermos crónicos o centros de diálisis, por ello actualmente, ya no se habla de cepas de SARM hospitalarias sino asociadas al hospital (SARM-AH) o al sistema sanitario (SARM-ASS). Las infecciones por SARM-AH o SARM-ASS se definen como las infecciones causadas por SARM en pacientes ingresados, con un cultivo positivo después de las primeras 48 horas del ingreso, o las infecciones que ocurren en pacientes con alguno de los siguientes factores de riesgo: presentar historia previa de infección o colonización por SARM, haber sido hospitalizados en alguna ocasión durante el año que precede al aislamiento a estudiar, haber recibido asistencia en centros sociosanitarios o de diálisis, o haberse sometido a cirugía o implantación de catéteres permanentes u otros dispositivos médicos [176].

Estudios internacionales de vigilancia epidemiológica, muestran una gran variedad en cuanto a la prevalencia de SARM en función de los hospitales y de los países estudiados. Los datos del sistema de vigilancia SENTRY recogidos durante los años 1997 y 1999 determinaron la prevalencia de SARM en los hospitales de países de todo el mundo. La prevalencia de SARM fue muy variable en función de la región geográfica estudiada, de este modo, mientras que la prevalencia en Japón ascendía al 67%, en los países de Sudamérica la prevalencia fue más moderada aunque igualmente elevada (40%), al igual que en EEUU (32%) y sin embargo, países como Australia presentaron una tasa de prevalencia sustancialmente inferior (23%). La situación en Europa fue muy variable y completamente distinta en función de cada país. Un estudio realizado por Tiemersma *et al.* durante los años 1999 a 2002 en los distintos países de Europa, mostró esta situación de gran variabilidad en la prevalencia de SARM en los distintos países. Los datos reflejan que en los países del norte de Europa la prevalencia

de SARM es muy baja siendo de aproximadamente un 1%, mientras que en los países del sur de Europa la prevalencia asciende hasta un 45%. España mostró una tasa de prevalencia moderada siendo esta de un 24,8% [177].

Datos de prevalencia más recientes, del año 2008, proporcionados por el sistema de vigilancia EARSS (*European Antimicrobial Resistance Surveillance System*), muestran unas tasas de prevalencia similares. La prevalencia global de SARM en Europa durante ese año fue del 21%, siendo en general muy baja (<5%) en los países del norte de Europa, a excepción de Lituania (11%) y Letonia (13%), y hasta de un 50% en países del sur de Europa. En los países mediterráneos, balcánicos, el Reino Unido e Irlanda, a excepción de Francia, Bosnia y Bulgaria, la prevalencia fue mayor al 25%. Solo dos países muestran una prevalencia de SARM superior al 50%, Malta (56%) y Portugal (53%). España se encuentra entre los países con una tasa de SARM moderada, entorno a un 25% (Figura 8).

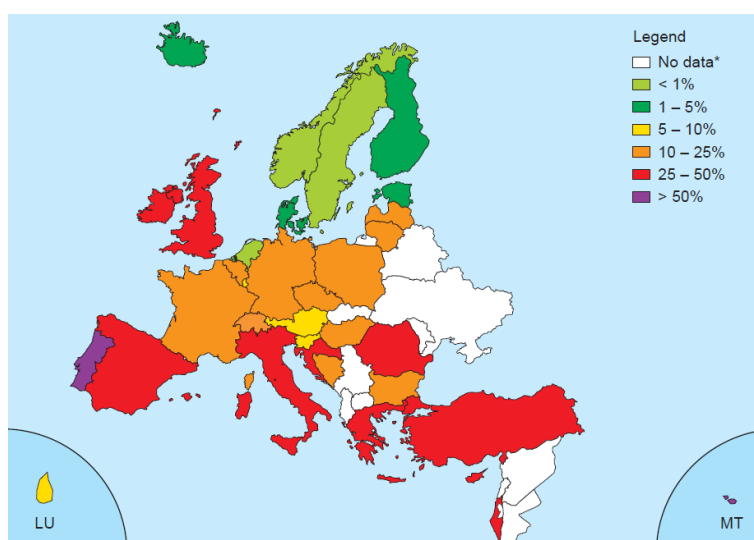


Figura 8. Distribución geográfica de aislamientos resistentes a meticilina obtenidos de infecciones invasivas en 2008. Datos obtenidos del estudio EARSS 2008 (www.earss.rivm.nl).

Estas grandes diferencias entre países europeos en cuanto a la prevalencia de SARM se podría deber a que las políticas antibióticas y los programas de prevención y control de la infección son diferentes cada país.

8.4. Principales clones epidémicos de SARM-AH

Un número limitado de clones de SARM se han diseminado por los hospitales del mundo, estos pertenecen principalmente a los complejos clonales: CC1, CC5, CC8, CC22, CC30 y CC45 (Tabla 5). El predominio de un pequeño número de clones de SARM en los hospitales y otros centros sociosanitarios sugiere, que estas cepas tienen una habilidad especial para sobrevivir y diseminarse en este tipo de ambientes, y una vez que se establecen son muy difíciles de erradicar. De momento, no se conoce el porqué unas cepas son más exitosas que otras a la hora de diseminarse y permanecer a lo largo del tiempo sin ser desplazadas por otras cepas.

TABLA 5. PRINCIPALES CLONES EPIDÉMICOS DE SARM-AH [Adaptada de 178]

<i>DENOMINACIÓN DEL CLON</i>	<i>PERFIL MLST</i>	<i>ST</i>	<i>CC</i>	<i>TIPO SCCmec</i>
Clon arcaico	3-3-1-1-4-4-16	250	8	I
Clon Berlin (USA600)	10-14-8-6-10-3-2	45	45	IV
Clon Brasileño/Húngaro	2-3-1-1-4-4-3	239	8	III
Clon Ibérico	3-3-1-12-4-4-16	247	8	I
Clon Irlandés-1	3-3-1-1-4-4-3	8	8	II
Clon Nueva York/Japón (USAA100)	1-4-1-4-12-1-10	5	5	II
Clon Pediátrico (USA800)	1-4-1-4-12-1-10	5	5	IV
Clon Sur de Alemania	1-4-1-4-12-24-29	228	5	I
Clon UK EMRSA-2/6 (USA 500)	3-3-1-1-4-4-3	8	8	IV
UK EMRSA-3	1-4-1-4-12-1-12	5	5	I
UK EMRSA-15	7-6-1-5-8-8-6	22	22	IV
UK EMRSA-16 (USA200)	2-2-2-2-3-3-2	36	36	II

Existen 2 teorías sobre el origen de las cepas de SARM y la relación que existe entre los clones de *S.aureus* sensibles y resistentes a meticilina. Una de ellas es la teoría del único clon, que sugiere que los clones de SARM poseen un ancestro común que adquirió el elemento *SCCmec* una única vez [179], y la otra teoría es la policlonal, que sugiere que el elemento móvil *SCCmec* ha sido capaz de integrarse en varios linajes de *S.aureus* [180-182]. Esta teoría está respaldada por un trabajo publicado Enright *et al.* en el que se estudiaron 359 aislados de SARM y 553 aislados de SASM, y se tipificaron mediante MLST y la detección del tipo de *SCCmec*. El estudio mostró que los aislados de SARM que pertenecían a un mismo ST podían ser portadores de distintos tipos de *SCCmec* [168].

8.5. Epidemiología de la infecciones causadas por SARM asociado a la comunidad

8.5.1. Infecciones por SARM asociado a la comunidad definición y características

Desde que fuera descrito por primera vez en Australia en los años 1990, SARM-AC ha emergido y se ha diseminado con preocupante rapidez por todo el mundo.

Las cepas de SARM-AC han sido definidas de varias formas, pero el CDC (*Center for Disease Control and Prevention*) ha establecido unos criterios que las definen como aquellas cepas que producen infecciones en pacientes en la comunidad, o en pacientes ingresados siempre que el aislamiento se realice en las primeras 48 horas del ingreso. Además estos pacientes no han de presentar factores de riesgo establecidos para la infección por SARM-AH, como presentar historia previa de infección o colonización por SARM, haber sido hospitalizados durante el año previo a la obtención

del aislamiento, ni haber recibido asistencia en centros sociosanitarios, ni de diálisis, ni tampoco haberse sometido a cirugía o implantación de catéteres permanentes u otros dispositivos médicos [176]. Otra manera de definir estas cepas es por sus características genéticas y fenotípicas. Las cepas de SARM-AC se caracterizan por presentar el elemento *SCCmec* de los tipos IV, V y VII. Estos son *cassettes* de pequeño tamaño, por lo que generalmente sólo presentan el gen *mecA* y no otros genes de resistencia asociados como ocurre en las cepas hospitalarias portadoras de elementos *SCCmec* más grandes, por ello las cepas de SARM-AC son generalmente sensibles a múltiples antibióticos. En España el *SCCmecIV* es también el más frecuente entre los aislados hospitalarios, por lo que en nuestro país la simple caracterización del *SCCmec* no sería válida para diferenciar los aislados hospitalarios de los comunitarios [183]. Fenotípicamente se podría sospechar que estamos ante una cepa de SARM-AC cuando la cepa sea resistente a los β -lactámicos y generalmente presente heteroresistencia a oxacilina y además, presente sensibilidad a múltiples antibióticos especialmente a ciprofloxacino, ya que en España prácticamente todas las cepas de SARM-AC son sensibles a este antibiótico. Pero un hecho a tener en cuenta es que las cepas pueden adquirir resistencias a los antimicrobianos mediante la adquisición de plásmidos y cada vez es más frecuente que los aislados comunitarios presenten resistencia a eritromicina y a clindamicina por la adquisición de los genes *erm* y *msrA*, o a las tetraciclinas por la adquisición de genes *tet* [184]. Una de las características del clon prevalente en EEUU, el USA300 (ST8-IV), es la alta tasa de resistencia a los macrólidos pero no a clindamicina [48]. Sin embargo, muchas cepas sensibles *in vitro* a la clindamicina poseen genes que codifican la resistencia inducible a los macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B, y por ello pueden desarrollar resistencias a la clindamicina durante el tratamiento. El clon Europeo ST80-IV se caracteriza por ser resistente a las

tetraciclinas y a la doxiciclina debido a la presencia del gen *tet(M)* [185]. Otra diferencia genotípica entre los aislados comunitarios y hospitalarios es el patrón electroforético y los diferentes tipos de secuencias de MLST.

8.5.2. Patogenia y factores de virulencia asociados a SARM-AC

La mayoría de las infecciones producidas por SARM-AC son infecciones leves, normalmente de piel y tejidos blandos como forúnculos, carbunco y abscesos, pero en ocasiones, estas lesiones progresan a celulitis e incluso a infecciones invasivas y fatales como la fascitis necrosante. La neumonía necrosante se ha asociado a cepas de SARM-AC productoras de la toxina LPV, esta entidad clínica se produce fundamentalmente en niños y jóvenes y la mortalidad es muy elevada. La neumonía necrosante se produce frecuentemente como complicación de una infección viral previa, normalmente la gripe. [102-104].

Algunos determinantes de virulencia se han asociado como causa de la diferencia en el espectro de infecciones producidas por las cepas de SARM-AC y SARM-AH, y de la elevada virulencia atribuida a las cepas comunitarias [186]. Una característica genética muy frecuente de SARM-AC es la presencia en estas cepas de los genes *lukS-PV/lukF-PV*, que se encuentran integrados en un bacteriófago y que codifican la LPV. Esta toxina produce la destrucción de los leucocitos mediante la formación de poros y necrosis tisular y se ha asociado con la mayor virulencia atribuida a estas cepas a la hora de causar IPTBs. Sin embargo, esta asociación no está del todo clara, ya que existe cierta controversia entre la evidencia clínica y los resultados encontrados en los diferentes modelos experimentales de infección [63, 65, 67]. La LPV también se ha asociado a la producción de neumonía necrosante [66], aunque hay

estudios llevados a cabo con modelos animales de infección que no encuentran una implicación directa de la toxina en una mayor mortalidad [64]. La LPV también se ha relacionado epidemiológicamente con la capacidad de diseminación de las cepas de SARM-AC, sin embargo esta relación epidemiológica no es suficiente para establecer si la LPV contribuye directamente a la misma [187, 188], ya que hay variantes de las cepas de SARM-AC LPV negativas que también causan infecciones en la comunidad [189]. Un ejemplo es la cepa ST1, la variante LPV positiva es prevalente en USA pero la variante LPV negativa fue una cepa endémica en algunas comunidades del oeste de Australia [171]. Lo mismo ocurre con la cepa ST59, la variante LPV positiva es endémica en Taiwan y en Vietnam, pero en EEUU la mayor parte de estas cepas son LPV negativas [190-192].

Otro de los factores que se piensa que puede estar implicado en la patogénesis de SARM-AC es el elemento genético móvil denominado ACME (*Arginine Catabolic Mobile Element*), que se ha relacionado epidemiológicamente a la cepa USA300. El elemento ACME es un fragmento de ADN de 31Kb que se encuentra situado en el gen *orfX*, adyacente al elemento *SCCmec* en la cepa USA300. El elemento ACME codifica una ruta de metabolismo de la arginina (arginina desaminasa) y el operón *opp-3* (*Operon Oligopeptide Permease*), y se ha sugerido que podría estar implicado en la patogénesis de la cepa USA300 y que podría contribuir al “*fitness*” de la bacteria [193]. Sin embargo, existe cierta controversia en cuanto a la implicación del elemento ACME en la patogénesis, ya que en el estudio publicado por Montgomery *et al.* en el que se emplea un modelo animal de neumonía e infección de piel, no encuentran diferencias en cuanto a la virulencia entre aislamientos isogénicos portadores y no portadores del ACME [194].

Recientemente, se han descrito unos péptidos denominados PSM (*Phenol-Soluble Modulines*) que se han implicado en la patogenia de SARM-AC. Estos péptidos tienen la capacidad de reclutar, activar y lisar los neutrófilos humanos eliminando así la principal línea de defensa celular frente a las infecciones causadas por *S.aureus*. Los PSMs se codifican en un operon presente en el genoma de todas las cepas secuenciadas, pero se expresan en cantidades mayores en las cepas de SARM-AC que en las cepas de SARM-AH en las que la producción de estos péptidos es nula o muy pequeña. En el estudio publicado por Wang *et al.* se demuestra que estos péptidos contribuyen a la virulencia de las cepas de SARM-AC en modelos de infección de piel y sepsis [195].

Otro factor de virulencia relacionado con la patogénesis de SARM-AC es la hemolisina alfa. Esta toxina tiene la capacidad de formar poros en las células de los mamíferos lo que conlleva a la ruptura de las mismas. La hemolisina alfa es producida por un elevado porcentaje de las cepas de *S. aureus*, sin embargo, la expresión de la misma podría ser diferente en las distintas cepas. En cuanto a su implicación en la patogenia, algunos estudios revelan que la hemolisina alfa interviene de forma esencial en la patogénesis de la neumonía [64, 196].

8.5.3. Principales clones epidémicos de SARM-AC

En los últimos años la epidemiología de SARM-AC está cambiando. Hasta hace relativamente pocos años, la presencia de los distintos linajes de SARM-AC estaba restringida a determinadas áreas geográficas, de este modo, los linajes ST1-SCC*mecIV* y ST8-SCC*mecIV* se encontraban confinados en EEUU, el linaje ST30-SCC*mecIV* en Australia, y el linaje ST80-SCC*mecIV* en Europa [197]. Estudios recientes demuestran que esta situación ha comenzado a cambiar. En la actualidad, los principales clones de

SARM-AC se están diseminando por todo el mundo. De este modo, ST1-SCC*mec*IV se ha detectado en Asia, Europa y EEUU, ST8-SCC*mec*IV en Europa y EEUU, ST30-SCC*mec*IV se ha descrito en Australia, Europa y Sudamérica, ST59-SCC*mec*IV en Asia y EEUU y ST80-SCC*mec*IV también está ampliamente diseminada por Europa, Asia y Oriente Medio [178]. Se ha observado que en países con un mayor intercambio poblacional, ya sea debido a los flujos migratorios o a viajes internacionales, la diversidad clonal de las cepas de SARM-AC es mayor. En la tabla 6 se describen los principales clones epidémicos de SARM-AC.

TABLA 6. PRINCIPALES CLONES EPIDÉMICOS DE SARM-AC LPV POSITIVOS [Adaptada de 178].

<i>DENOMINACIÓN DEL CLON</i>	<i>PERFIL MLST</i>	<i>ST</i>	<i>CC</i>	<i>TIPO DE SSC<i>mec</i></i>
Clon Europeo	1-3-1-14-11-51-10	80	80	IV
Clon del sudoeste del Pacífico (USA110)	2-2-2-2-6-3-2	30	30	IV
USA400	1-1-1-1-1-1-1	1	1	IV
USA300	3-3-1-1-4-4-3	8	8	IV
USA100	19-23-15-2-19-20-15	59	59	IV

Aunque la mayor parte de los clones de SARM-AC son portadores de la LPV, también se han descrito otros clones que no son portadores de esta toxina y que causan infecciones comunitarias como los tipos de secuencia ST5-SCC*mec*V, ST22-SCC*mec*IV, ST37-SCC*mec*IV, ST93-SCC*mec*IV, ST377-SCC*mec*V y el ST766-SCC*mec*IV. Un hecho preocupante, es la adquisición de la toxina LPV por parte de ciertos linajes asociados al sistema sanitario como ST22 y ST5, ya que estos linajes causan infecciones en pacientes que con frecuencia tienen otras enfermedades de base o están inmunodeprimidos.

Recientemente se ha descrito un nuevo linaje de SARM en los Países Bajos causante de infección en cerdos y en granjeros que trabajan con estos animales, que está cambiando la epidemiología en estos países. A este linaje se le ha asignado el ST398. La mayor parte de los aislados pertenecientes a ST398 son portadores de los elementos SCC*mec* IV o V, y la característica que diferencia este linaje del resto, es que no se digiere con la enzima de restricción *Sma*I. En el año 2006, el 25% de los SARM aislados en hospitales holandeses pertenecían al ST398 [198], y varios estudios revelan que este genotipo se encuentra presente en otros países de Europa y del mundo [199, 200]. Un hecho preocupante es la publicación de aislados pertenecientes a ST398 portadores del SCC*mec*III, que son multirresistentes y portadores de la toxina LPV [201 202], ya que la presencia de esta toxina en este linaje y su emergencia en la comunidad, podría causar un problema de salud pública.

8.5.4. Infecciones por SARM-AC en población pediátrica

Desde que fueran descritas por primera vez en Australia en el año 1993, se ha producido una explosión en el número de casos publicados de infecciones causadas por SARM-AC en pacientes sin factores de riesgo, ni relación alguna con el sistema sanitario. Algunos estudios señalan que este aumento es especialmente importante en niños [173].

La epidemiología de la infección por *S.aureus* en la comunidad se ha estudiado fundamentalmente en EEUU, debido a la elevada prevalencia de este tipo de infecciones en este país [203, 204], donde la tasa de SARM-AC en niños se ha ido incrementando a lo largo de los años. En algunas áreas geográficas de EEUU el número de infecciones causadas por SARM-AC supera al de las infecciones causadas por cepas sensibles a

meticilina [173]. A pesar de que SARM-AC parece estar diseminándose por todo el mundo, existen pocos trabajos en los que se haya estudiado la prevalencia y la epidemiología de estas infecciones fuera de EEUU, a pesar de que esta información es de gran importancia a la hora de definir tratamientos empíricos para este tipo de infecciones.

Algunos de los trabajos publicados muestran realidades muy distintas en función de la región geográfica objeto de estudio. Por ejemplo Grecia, es uno de los países con la tasa de SARM-AC más elevada de Europa, este hecho lo demuestran estudios como el realizado por Nihiou *et al.* que mostró que un 44% de los aislados de *S.aureus* que causan infecciones en niños en la comunidad fueron resistentes a la metilina, siendo ST80-SCC*mecIV* la cepa más prevalente [205]. Este estudio revela además, que los pacientes con infecciones por SARM-AC fueron ingresados o intervenidos quirúrgicamente en un porcentaje significativamente mayor que los pacientes con infecciones causadas por cepas sensibles a metilina. Una revisión realizada en el Reino Unido de los casos de infección causados por SARM-AC mostró, que la tasa de infección por SARM-AC aunque era inferior a un 1%, presentaba una tendencia significativamente creciente a lo largo de los años [206]. Otro estudio prospectivo realizado en Argentina entre los años 1993 al 2007 en pacientes pediátricos que presentaban bacteriemia asociada a la comunidad mostró, que mientras que hasta el año 2004 solo el 3% de los aislamientos eran resistentes a metilina, en el segundo periodo del estudio (2004-2007) el porcentaje ascendió al 47% [207]. En Australia estudios de vigilancia de infecciones por SARM-AC, realizados durante los años 2000, 2002 y 2004, mostraron un incremento significativo en la tasa de SARM en la comunidad. El porcentaje pasó a ser de un 4,7% en el año 2000 a un 7,3% en el año 2004, aunque la prevalencia fue variable en función de las ciudades estudiadas. De este modo, en

algunas ciudades la tasa fue del 2% mientras que la prevalencia en otras llegaba hasta el 10% [208]. Este mismo hecho ha ocurrido en Taiwán, donde la prevalencia se ha incrementado desde el año 2000 según muestran estudios realizados en distintas áreas geográficas del país [209]. En España la primera vez que se describieron casos de infecciones asociadas a la comunidad causadas por SARM en población pediátrica, fue en el año 2006 en un estudio realizado en Madrid entre los años 2003 al 2005 [210]. Desde entonces, se han descrito ya varias series de casos fundamentalmente en niños y adultos jóvenes, que con frecuencia eran originarios de países de Sudamérica, sobre todo de Ecuador [185, 211]. Un estudio realizado por Daskalaki *et al.* en el servicio de urgencias de pediatría, en el que se recogieron durante el año 2007 todas las infecciones de piel y tejidos blandos, mostró una prevalencia relativamente alta (13%) de SARM-AC, siendo ST8-SCC*mecIV* el clon predominante [49]. Otro estudio publicado recientemente, describe en Barcelona una serie de 12 casos de infecciones comunitarias causadas por SARM en niños. Las infecciones fueron sobre todo IPTBs pero también se describen casos de infecciones graves como neumonía necrosante o fascitis necrosante [212].

***II-JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO Y
OBJETIVOS***

El primer aislado de *S.aureus* resistente a meticilina se describió en el año 1961, 2 años después de la introducción de la meticilina en la práctica clínica [110]. Durante los años siguientes, las cepas de SARM se diseminaron por toda Europa, y en los años 1970 ya se habían propagado por todo el mundo. El primer brote de infección producida por SARM en España fue descrito en el año 1981 [213], en los años siguientes, se fueron sucediendo una serie de comunicaciones de brotes de infección por SARM [214-216] lo que indicaba, que la situación de prevalencia de SARM en los hospitales españoles se iba incrementando a lo largo de los años. De este modo, en el año 2008 los datos del sistema de vigilancia EARSS mostraron que en España la prevalencia de SARM estaba entorno a un 25%. Estos datos de prevalencia se refieren fundamentalmente a población adulta, pero no hay estudios que evalúen cuál es la prevalencia de SARM-AH en niños en nuestro país.

Hasta la década de 1990 las infecciones por SARM se confinaban al medio hospitalario y las infecciones por SARM a las que se les atribuía un origen comunitario, ocurrían en pacientes que tenían un contacto frecuente con el hospital, en residentes de centros sociosanitarios de larga estancia o en ADVPS. Los primeros casos de infecciones causadas por SARM-AC fueron descritas en Australia en el año 1993, desde entonces, el número de casos publicados de infección por SARM-AC en pacientes sin factores de riesgo se ha incrementado significativamente. Los casos publicados confirman, que uno de los grupos poblacionales más afectados por este tipo de infecciones es la población pediátrica [173, 217]. A pesar de que el número de casos publicados parece estar aumentando en muchos países, la prevalencia y la epidemiología de este tipo de infecciones se ha estudiado fundamentalmente en EEUU, donde la tasa de infecciones por SARM-AC es muy elevada, sobre todo en algunos

estados donde supera los casos de infección causados por cepas sensibles a meticilina [173]. En España, desde que se describieran los primeros casos de infección por SARM-AC en población pediátrica en el año 2006 [210], se han ido sucediendo varias publicaciones que describen series de casos fundamentalmente en niños y adultos jóvenes, que con frecuencia eran originarios de países de Sudamérica, sobre todo de Ecuador [185, 211, 212]. En estas series de casos se describen sobre todo infecciones de piel y tejidos blandos, pero también se describen casos de infecciones graves como neumonía necrosante o fascitis necrosante. Un estudio realizado por Daskalaki *et al.* en el servicio de urgencias de pediatría, en el que se recogieron durante el año 2007 todas las infecciones de piel y tejidos blandos, mostró una prevalencia relativamente alta (13%) de SARM-AC [49], lo que nos indica que las infecciones por SARM-AC en niños podrían estar siendo infravaloradas en nuestro país. Los estudios y series de casos de infección por SARM-AC publicados en España nos alertan sobre la existencia de este tipo de infecciones en nuestro país, pero presentan la limitación de que se refieren a un área geográfica concreta y por ello los resultados de los mismos no se pueden extrapolar a la totalidad de la población pediátrica. Por otro lado, no existen hasta la fecha estudios poblacionales y multicéntricos que indiquen claramente cuál es la verdadera prevalencia de este tipo de infecciones en nuestro país, por lo que no se puede evaluar la magnitud del problema. Esta situación pone de manifiesto una necesidad de profundizar en el conocimiento de las infecciones por *S.aureus* en población pediátrica, y cuantificar su importancia en este grupo poblacional. Es importante conocer la prevalencia real de SARM-AC en nuestro país, así como también la epidemiología molecular, sobre todo en un momento en el que los cambios poblacionales y migratorios han aumentado en la población infantil y con ello, la circulación de cepas entre los diferentes países y continentes. También es importante conocer las características

clínicas y demográficas de las infecciones por SARM-AC en nuestro país, para de este modo, poder valorar la gravedad de este tipo de infecciones y conocer las características de los niños a los que afectan. El disponer de esta información tendrá importantes implicaciones clínicas, ya que ayudará en la toma de decisiones acerca de la prevención y tratamiento de este tipo de infecciones.

A pesar de que muchas de las infecciones descritas por SARM-AC son infecciones leves de piel y tejidos blandos [48-50], también se han descrito muchos casos de IPTBs profundas, y en ocasiones se han descrito cuadros extremadamente graves de infecciones invasivas y fatales [55, 58, 59, 61], destacando una entidad clínica que se ha asociado a este tipo de cepas que es la neumonía necrosante [102, 103, 104]. Este cuadro se produce fundamentalmente en niños y adultos jóvenes, y su mortalidad es muy elevada. Algunos determinantes de virulencia se han asociado como causa de la diferencia en el espectro de infecciones producidas por las cepas de SARM-AC y SARM-AH, y de la elevada virulencia atribuida a las cepas comunitarias [186]. Una característica genética muy frecuente de SARM-AC es la presencia en estas cepas de la toxina LPV. Esta toxina produce la destrucción de los leucocitos mediante la formación de poros y produce necrosis tisular y se ha asociado con la mayor virulencia atribuida a estas cepas a la hora de causar IPTBs. Sin embargo, esta asociación no está del todo clara, ya que existe cierta controversia entre la evidencia clínica y los resultados encontrados en los diferentes modelos experimentales de infección [63, 65, 67]. La LPV también se ha asociado a la producción de neumonía necrosante [66], aunque estudios publicados ponen en duda esta asociación [64].

Otro de los factores que se piensa que puede estar implicado en la patogénesis de SARM-AC es el elemento ACME. Este elemento se ha sugerido que podría estar

implicado en patogénesis de la cepa USA300 y que también podría contribuir “*fitness*” de la bacteria [193], pero hay estudios que ponen en duda esta implicación [194].

Los péptidos PSM también se han implicado en la patogenicidad de SARM-AC en modelos de infección de piel y sepsis [195], ya que estos péptidos tienen la capacidad de reclutar, activar y lisar los neutrófilos humanos eliminando así la principal línea de defensa celular frente a las infecciones causadas por *S.aureus*.

Otro factor de virulencia relacionado con la patogénesis de SARM-AC es la hemolisina alfa, ya que algunos estudios sugieren, que interviene de forma esencial en la patogénesis de la neumonía [64, 196]. Esto se debe a su capacidad de formar poros en las células de mamíferos lo cual conlleva a la ruptura de las mismas.

Estos son algunos de los factores que se han asociado como causa de la mayor virulencia atribuida a las cepas de SARM-AC y al espectro de infecciones producidas por estas, pero a ninguno de estos factores se le ha atribuido de una implicación directa e irrefutable, con lo que la razón por la que estas cepas son tan virulentas y producen un espectro de infecciones diferente a otras cepas de SARM sigue siendo objeto de estudio. *S.aureus* es un microorganismo capaz de producir una gran cantidad de factores de virulencia como exoproteínas, factores de adhesión o componentes de la estructura de la bacteria que de forma individual o coordinada están implicadas en la patogenia de este microorganismo. La expresión de estos factores de virulencia está coordinada y regulada por una serie de sistemas reguladores, de estos sistemas el más conocido y estudiado es el *agr*. El *agr* permite o bloquea la expresión de los factores de virulencia en función de las necesidades de la célula bacteriana [85].

El contenido genético de las distintas cepas probablemente influya en la patogénesis, en la capacidad de supervivencia y de diseminación de las cepas y puede que sea la explicación de que algunas cepas se diseminen y predominen sobre otras. El

conocimiento del contenido genético de las cepas de *S.aureus* puede ser de gran importancia a la hora de dilucidar qué genes están asociados a una mayor virulencia, a un tipo de infección o a un tipo de cepa, lo que puede tener importantes implicaciones en el diagnóstico y tratamiento de estas infecciones.

Por todo ello nos decidimos a realizar este estudio con los siguientes objetivos:

1. OBJETIVO GENERAL

Determinar las características clínicas, microbiológicas y moleculares de las infecciones producidas por *S. aureus* en población pediátrica, con especial atención de aquellas causadas por SARM-AC.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el porcentaje de resistencia a meticilina de las cepas de *S. aureus* causantes de infecciones asociadas a la comunidad y al sistema sanitario en población pediátrica, de cuatro ciudades de España
2. Conocer las tasas de resistencia a los antibióticos no β -lactámicos de las cepas que circulan en nuestro país en la población pediátrica.
3. Estudiar el porcentaje de aislamientos de *S.aureus* que son portadores de la toxina LPV, tanto SARM como SASM.
4. Describir las características epidemiológicas, clínicas, y microbiológicas de las infecciones por *S.aureus* en niños en función de la adquisición, de la resistencia a meticilina, y de la presencia de la toxina LPV.

5. Determinar la posible implicación de la toxina LPV en las infecciones por *S. aureus*.
6. Estudiar la epidemiología molecular de los aislados de SARM, mediante las técnicas de ECP, MLST y tipificación del SCC mec , y determinar las cepas más prevalentes en la comunidad y en el hospital.
7. Estudiar la diversidad clonal de las cepas productoras de la toxina LPV.
8. Estudiar el contenido genético de los principales linajes que circulan en nuestro país en la población pediátrica.
9. Analizar el contenido genético de las cepas portadoras y no portadoras de la toxina LPV, y determinar si existe algún factor de virulencia que pudiera estar asociado a la presencia de la LPV.
10. Analizar el contenido genético de las cepas causantes de bacteriemia y de las cepas causantes de otros síndromes clínicos y determinar si existen genes que se pudieran asociar a las cepas causantes de bacteriemia.

III-MATERIAL Y MÉTODOS

1. DISEÑO DEL ESTUDIO

1.1. Tipo de estudio

Se trata de un estudio multicéntrico y prospectivo, que incluyó todos los casos de infecciones y colonizaciones causados por *S. aureus* (sensible y resistente a meticilina) en pacientes pediátricos atendidos en cuatro hospitales españoles. El estudio se focalizaba especialmente en dos grupos de infecciones en niños: 1) las infecciones por *S. aureus* asociadas a la comunidad, y 2) las infecciones por *S. aureus* asociadas al sistema sanitario.

1.2. Ámbito del estudio

El estudio incluyó la participación de cuatro hospitales de distintas áreas geográficas de España:

- Hospital Universitario 12 de Octubre (Madrid). Este hospital dispone de un total de 173 camas pediátricas, 43 de neonatos, y atiende aproximadamente 67.000 urgencias pediátricas anuales (67.861 en 2007).
- Hospital Vall d'Hebron (Barcelona). Dispone de 217 camas pediátricas, 77 de neonatos, y atiende aproximadamente 47.000 urgencias pediátricas anuales (46.936 en 2007).
- Hospital Son Dureta (Palma de Mallorca). Dispone de 82 camas pediátricas, y atiende aproximadamente 24.000 urgencias pediátricas anuales (23.646 en 2007).

- Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC) (La Coruña).
Dispone de 98 camas pediátricas, y atiende aproximadamente 35.000 urgencias pediátricas anuales (34.693 en 2007).

1.3. Criterios de inclusión y periodo del estudio

Se incluyeron todos los niños ≤ 14 años de edad atendidos en los diferentes servicios clínicos de pediatría (urgencias pediátricas, consultas externas, y servicios clínicos de hospitalización) con un aislamiento de *S. aureus* en una muestra clínica. El periodo de estudio fue de 1 año, de enero a diciembre del año 2009. Se excluyeron los pacientes pediátricos atendidos en las unidades clínicas de fibrosis quística, por ser un grupo de pacientes con características especiales, y con diferente representación en los cuatro hospitales participantes. El estudio contó con la colaboración de investigadores de los hospitales participantes, microbiólogos y pediatras, que participaban en la identificación de los casos clínicos y en la recogida de datos demográficos, clínicos y microbiológicos. Este estudio ha sido en parte financiado por el Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) del Instituto de Salud Carlos III (Proyecto FIS PI08/81520 y la Red Española de Investigación en Patología Infecciosa, RD 08/0011). El protocolo del estudio fue aprobado por el comité de ética de los hospitales participantes.

1.4. Definiciones

Los casos se clasificaron en función de la adquisición en casos asociados a la comunidad, casos asociados al hospital y casos asociados al sistema sanitario.

- **Los casos asociados a la comunidad (AC)** se definieron como aquellos que ocurrieron en pacientes en la comunidad o en pacientes ingresados siempre que el aislamiento microbiológico se realizase en las primeras 48 horas del ingreso. Además estos pacientes no presentaban factores de riesgo relacionados con la asistencia sanitaria. Los factores de riesgo establecidos fueron: padecer ciertas enfermedades de base (insuficiencia renal crónica, enfermedad tumoral previa, inmunodepresión, asma o enfermedades cutáneas crónicas), presentar historia previa de infección o colonización por SARM, historia de ingreso en los 6 últimos meses, haber recibido asistencia en centros sociosanitarios o de diálisis, haberse sometido a cirugía (excluyendo a los neonatos), o ser portador de catéteres permanentes u otros dispositivos médicos.
- **Los casos asociados al hospital (AH)** se definieron como aquellos que ocurrieron en pacientes hospitalizados cuando al ingreso no existía evidencia de infección y el aislamiento de *S.aureus* se realizó después de las primeras 48 horas del ingreso.
- **Los casos asociados al sistema sanitario (ASS)** se definieron como aquellos cuyo comienzo ocurrió en la comunidad en pacientes con alguno de los siguientes factores de riesgo: presentar ciertas enfermedades de base (insuficiencia renal crónica, enfermedad tumoral previa, inmunodepresión, asma o enfermedades cutáneas crónicas), historia previa de infección o colonización por SARM, historia de ingreso en los 6 últimos meses, haber recibido asistencia en centros sociosanitarios o de diálisis, haberse sometido a cirugía, o ser portador de catéteres permanentes u otros dispositivos médicos.

A los efectos del análisis de los resultados, los casos asociados al hospital y los casos de comienzo en la comunidad, pero asociados al sistema sanitario, se consideraron todos ellos asociados al sistema sanitario.

Todos los casos incluidos en el estudio eran considerados como infecciones o colonizaciones, de acuerdo a las siguientes definiciones:

- **Colonización por *S.aureus*:** se define como el establecimiento y proliferación de *S.aureus* en la piel o membranas mucosas del huésped sin causar enfermedad. Consideramos colonizaciones los casos en los que no existían síntomas clínicos o pruebas diagnósticas que evidenciaran enfermedad, siempre y cuando el facultativo responsable del paciente así lo considerase, haciéndolo constar en la historia clínica del paciente.
- **Infección por *S.aureus*:** se define como la invasión local o sistémica de *S.aureus* en el huésped desarrollando una enfermedad y una respuesta del huésped que conlleva generalmente una serie de manifestaciones clínicas. Consideramos infección todos aquellos casos en los que existían síntomas clínicos o pruebas diagnósticas que evidenciaran enfermedad, siempre y cuando el facultativo responsable del paciente así lo considerase, y lo hiciese constar en la historia clínica del paciente.

1.5. Protocolo de recogida de los datos clínicos y microbiológicos

En los casos incluidos en el estudio se recogieron una serie de datos demográficos, clínicos y microbiológicos mediante un protocolo de recogida de datos previamente definido (Anexo1. Página 128).

2. ESTUDIOS MICROBIOLÓGICOS

En cada uno de los hospitales participantes en el estudio, los pediatras que atendían los niños eran los encargados de indicar la recogida de las diferentes muestras clínicas para el diagnóstico de las infecciones por *S. aureus*. Los laboratorios de microbiología de los hospitales participantes, se encargaban de la identificación a nivel de especie y de la realización de las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos. Todos los aislamientos de *S. aureus* recogidos en cada uno de los hospitales participantes se enviaban al laboratorio de microbiología del Hospital 12 de Octubre, donde se llevaron a cabo todos los estudios moleculares incluidos en el estudio.

2.1. Identificación fenotípica de los aislados

En el Hospital 12 de Octubre, la identificación fenotípica a nivel de especie se realizó mediante el sistema automático Wider (Soria Melguizo, Madrid). Este sistema realiza la identificación bacteriana mediante la interpretación de una serie de reacciones bioquímicas incluidas en cada placa de identificación mediante medidas colorimétricas. También se realizaron la prueba de la coagulasa en tubo, mediante la cual se detecta la coagulasa libre y unida, y la prueba de aglutinación de látex. La coagulasa es una enzima capaz de coagular el plasma y que diferencia a *S. aureus* de otras especies de *Staphylococcus*. La prueba se realizó inoculando la colonia en un tubo con plasma de conejo citratado y observando si había formación de coágulo a las 4 horas. En el caso de que la prueba fuera negativa a las 4 horas se incubó durante 24 horas. La prueba de aglutinación de látex Staphaurex Plus (Remel, RU) se basa en la interacción de las partículas de látex o eritrocitos recubiertos con fibrinógeno o con fibrinógeno e

inmunoglobulina G, con el factor de coagulación, la proteína A y los antígenos de superficie de *S.aureus*.

2.2. Estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos

El estudio de sensibilidad a los antibióticos se llevó a cabo por microdilución mediante el sistema automático Wider (Soria Melguizo, Madrid). Este sistema consta de una serie de pocillos con diferentes concentraciones de los antibióticos a estudiar, y mediante medidas de turbidez se determina la CMI del microorganismo a los antimicrobianos [218].

Los antibióticos estudiados fueron:

- Penicilina
- Amoxicilina/Clavulánico
- Oxacilina
- Eritromicina
- Clindamicina
- Gentamicina
- Ciprofloxacino
- Vancomicina
- Rifampicina
- Trimetoprim/Sufametoxazol (TM/ST)
- Linezolid
- Mupirocina
- Ácido fusídico
- Tetraciclinas

En caso de ser necesario, los resultados de la sensibilidad antibiótica obtenidos mediante microdilución se confirmaron mediante el método disco-difusión. Para ello se preparó un inóculo de la bacteria con una turbidez de 0,5 de la escala McFarland a partir de un cultivo joven y se sembró de forma homogénea en una placa de agar Mueller-Hinton (Soria Melguizo, Madrid). Posteriormente, tras esperar unos minutos para el secado del inóculo, se colocaron los discos impregnados de una determinada concentración del antibiótico a estudiar, y tras 24 horas de incubación a 35°C se realizó la lectura de los halos de inhibición.

Para la detección de la resistencia a oxacilina por el método disco-difusión se emplearon discos de oxacilina (1 µg) y de cefoxitina (30 µg) (Becton Dickinson, EEUU), ya que la cefoxitina es mejor inductor de la expresión del gen *mecA* [219]. La cepa ATCC 29213 (*American Type Culture Collection*) fue utilizada como cepa control

Cuando los resultados de sensibilidad de macrólidos y lincosamidas obtenidos mediante microdilución mostraban que la cepa era resistente a eritromicina y sensible a clindamicina, se comprobó mediante disco-difusión por el método del D-test la posible existencia del fenotipo MLS_B inducible a clindamicina. Para ello se preparó un inóculo de la bacteria con una turbidez de 0,5 de la escala de McFarland a partir de un cultivo joven, y se sembró de forma homogénea por toda la placa de agar Mueller-Hinton. Tras esperar unos minutos, se colocó un disco de eritromicina (15 µg) y un disco de clindamicina (2 µg) (Becton Dickinson, EEUU) a una distancia de entre 15 a 25mm. Tras 24 horas de incubación a 35°C se realizó la interpretación según la forma y tamaño de los halos de inhibición. La existencia de un achatamiento en el halo de inhibición de la clindamicina en el lado donde se encontraba la eritromicina (D-zona) indicaba una

resistencia inducible a la clindamicina (Figura 9). En estos casos se consideró que la cepa era resistente a este antibiótico.

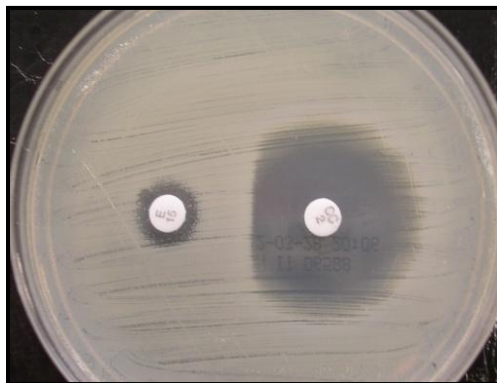


Figura 9. Test de inducción a clindamicina o D-test positivo. En la placa se encuentran colocados los antibióticos E (eritromicina) y CC (clindamicina) a una distancia de 15 a 25mm y se observa un achatamiento de halo de inhibición de la clindamicina en la zona adyacente a la eritromicina (efecto D-zona) lo que es indicativo de resistencia inducible a clindamicina.

Los resultados de las CMI's obtenidas mediante microdilución y de las medidas de los halos de inhibición obtenidas mediante el método disco-difusión fueron interpretados siguiendo los criterios del CLSI [220].

Tras realizar la identificación y la detección del patrón de resistencias de las cepas estudiadas estas se congelaron a -70°C en crioviales (Microbank, Canada).

3. CONFIRMACIÓN DE LA RESISTENCIA A METICILINA MEDIANTE LA DETECCIÓN DEL GEN *mecA*

Una vez identificados fenotípicamente todos los aislados, y realizada la sensibilidad a los antibióticos por microdilución o por disco-difusión en caso de ser necesario, se llevó a cabo la confirmación de la resistencia a meticilina mediante la

detección del gen *mecA* por la técnica de PCR. El gen *mecA* codifica la síntesis de la proteína fijadora de penicilina PBP2a que no posee afinidad por los β -lactámicos, y por lo tanto es la responsable de la resistencia a meticilina. La técnica de elección para la detección del gen *mecA* es la amplificación del ADN mediante una reacción de PCR. Mediante la técnica de PCR se consigue la amplificación exponencial de un fragmento específico de ADN, para el cual se han diseñado unos iniciadores que contienen una secuencia de ADN homóloga al fragmento que queremos amplificar. Si este fragmento de ADN se encuentra presente en la muestra habrá amplificación, en caso contrario no habrá amplificación del ADN. La reacción de PCR consta de distintas fases para las cuales se emplea un ciclo térmico específico (Figura 10):

- La primera fase de la PCR es la **desnaturalización** donde las dos hebras de ADN se separan por acción de la alta temperatura.
- Posteriormente tiene lugar el ***annealing* o anillamiento** en el que se produce un apareamiento entre las secuencias de ADN homólogas, de los iniciadores y de la muestra.
- Por último, se produce la fase de **extensión** donde la ADN polimerasa se une al iniciador y sintetiza la hebra complementaria incorporando dNTPs (Desoxirribonucleótidos fosfato).

Estos pasos se repiten varias veces normalmente entre 30 y 40 veces. La amplificación del ADN es exponencial ya que las cadenas de ADN recién sintetizadas actúan también como molde.

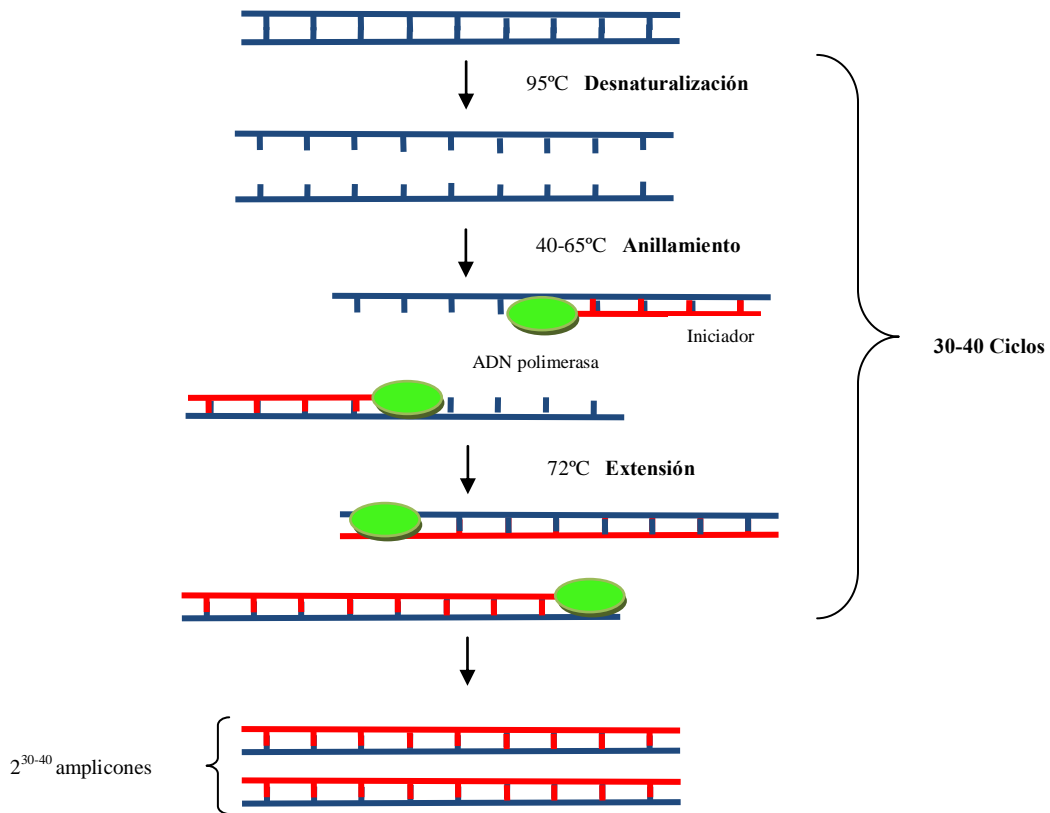


Figura 10. Etapas de la reacción de PCR.

Los pasos básicos para la realización de la técnica de PCR son los que se muestran en la figura 11.

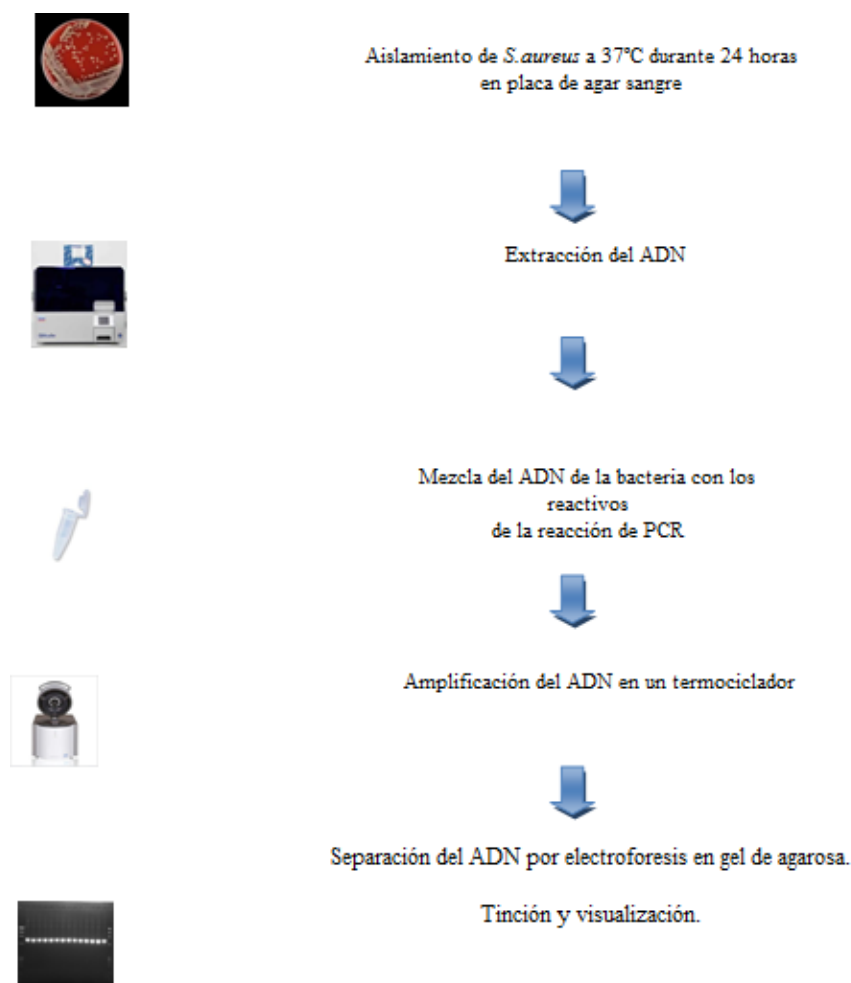


Figura 11. Pasos básicos para la realización de una PCR. En primer lugar se lleva a cabo un cultivo de la bacteria de 24 horas, posteriormente se extrae el ADN de la bacteria y este ADN en una concentración determinada, se mezcla con los reactivos necesarios para la reacción de la PCR (ADN polimerasa, dNTPs, $MgCl_2$, cebadores, UDG). Esta mezcla se introduce en un termociclador donde se aplica un ciclo térmico que incluye las fases que hemos descrito anteriormente. Para confirmar el resultado de la PCR se separa el ADN producto de la amplificación por electroforesis en gel de agarosa. El gel se tiñe, se visualiza y se comprueba el tamaño del fragmento amplificado.

El protocolo que se llevó a cabo para la detección del gen *mecA* fue el siguiente:

1-La extracción del ADN: la extracción del ADN de los aislados de *S. aureus* se realizó mediante el sistema automático QIAcube (Qiagen, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante. Previamente los aislamientos de *S. aureus* fueron tratados con lisozima (20 mg/ml)

2- **Amplificación del ADN:** una vez extraído el ADN se procedió a la reacción de amplificación del ADN empleando los cebadores MECA P4 y MECA P7 (Tabla 7) [221].

TABLA 7. SECUENCIAS DE LOS INICIADORES QUE AMPLIFICAN EL GEN *mecA*.

CEBADORES	SECUENCIA (5'-3')	TAMAÑO DEL AMPLIFICADO (pb)*
MECA P4	TCCAGATTACAACCTTCACCAGG	162
MECA P7	CCACTTCATATCTTGTAACG	

*pb: pares de bases

La PCR se realizó en un volumen de 10 µl con el Light Cycler Start DNA Master SYBR Green I (Roche, Mannheim, Alemania). La mezcla de reactivos de PCR para cada muestra incluía: 1 µL de DNA master SYBRgreen (10x) (Roche, Mannheim, Alemania), 1,2 µL de MgCl₂ (4 mM), 0,5 µl de los iniciadores (10pm/µL), 0,5 µl de UDG (1 U/µL) (Uracil DNA Glicosilasa) (Roche, Mannheim, Alemania) y 4,3 µl de agua bidestilada estéril. A esta mezcla se añadieron 2 µL del ADN extraído de la muestra clínica. La amplificación y detección del producto amplificado se realizó en un termociclador Light Cycler (Roche, Mannheim, Alemania) en el que se llevó a cabo una reacción de PCR a tiempo real. Mediante esta reacción se monitoriza en cada ciclo la aparición de ADN producto de la reacción mediante el uso del fluoróforo SYBR Green, de manera que cada vez que se realiza una copia de ADN molde se libera una fluorescencia proporcional a la cantidad de ADN que se genera (Figura 12).

El ciclo térmico empleado para la amplificación fue: desnaturalización a 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de amplificación, primero a 95°C durante 2 segundos para desnaturalizar, seguido de una temperatura de 53°C durante 10 segundos

para la hibridación, y una temperatura de 72°C durante 8 segundos para la extensión, y por último, un ciclo de desnaturalización mediante la aplicación de un gradiente de temperaturas desde 50°C hasta 95°C para monitorizar la cinética de disociación de los fragmentos amplificados y determinar la temperatura de fusión (Figura 13).

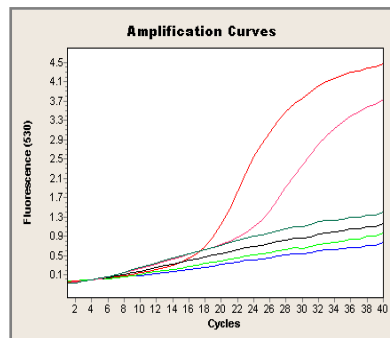


Figura 12. Gráfico de de la reacción de amplificación de ADN. En el gráfico se expresa la fluorescencia leída por el termociclador en el eje de las ordenadas y el número de ciclos de la PCR en el eje de abscisas. En el gráfico se observan dos curvas correspondientes al control positivo y a una de las muestras problema, en estas muestras ha habido amplificación de ADN. Las curvas constan de 3 fases, en la fase inicial la producción de fluorescencia (ADN producto) está por debajo del nivel de detección del termociclador, en la segunda fase hay un incremento de la fluorescencia exponencial y en la tercera fase se estabiliza la fluorescencia ya que ya no hay amplificación de ADN.

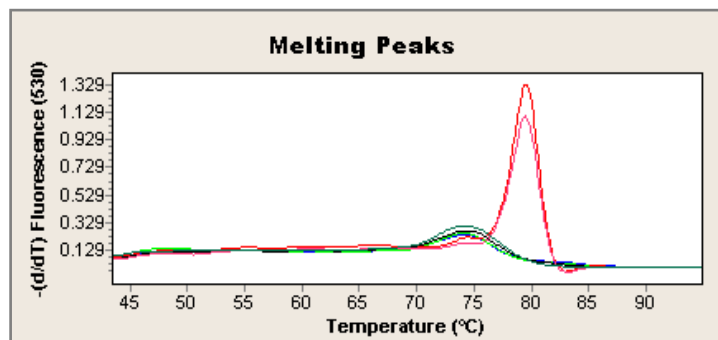


Figura 13. Curva de disociación de los fragmentos amplificados por PCR. Mediante un aumento gradual de la temperatura se consigue la total desnaturalización del ADN. La lectura de la fluorescencia durante este proceso permite analizar la temperatura de fusión de los fragmentos de ADN en función de su tamaño. La temperatura de disociación es la misma en las 2 curvas, una corresponde al control positivo y la otra a la muestra problema lo que confirma que el fragmento de ADN amplificado en la muestra problema es el que buscamos.

3-Electroforesis en gel de agarosa: para confirmar si los fragmentos de ADN amplificados correspondían al gen *mecA*, estos fueron separados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% (Conda, Madrid, España) en TBE (0,5X) (Tris-HCl 50 mM , H₃BO₃ 50 mM , EDTA 0,2 mM) a 100 voltios durante 70 minutos. Para ello el gel de agarosa fue cargado con los 10 µl del producto amplificado y el marcador de peso molecular ϕ X174RF DNA/HaeIII (Invitrogen, EEUU). Una vez realizada la electroforesis se tiñó el gel con SYBR[®]Gold (Invitrogen, EEUU) durante 15 minutos y se visualizó con un transiluminador de luz ultravioleta. La detección de gen *mecA* se confirmó cuando el fragmento amplificado daba lugar a una banda de 162pb (Figura 14). La cepa de SARM ATCC 1556 se utilizó como control positivo, y la cepa ATCC 29213 como control negativo con el fin de confirmar que la reacción PCR funcionó correctamente.

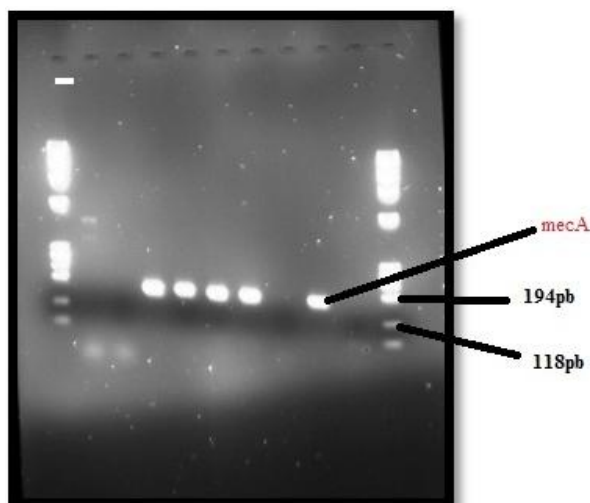


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa del producto de la PCR de detección del gen *mecA*. Las bandas que se observan en los carriles 2, 3, 4 y 5 de 162pb corresponden al fragmento del gen *mecA* amplificado de las muestras problema y la banda que se observa en el carril 7 corresponde al control positivo. Los carriles de los extremos del gel corresponden al marcador de peso molecular ϕ X174RF DNA/HaeIII.

4. DETECCIÓN DE LA LEUCOCIDINA DE PANTON VALENTINE

En todos los aislados recogidos en el estudio se estudió la presencia de la toxina LPV. Esta toxina está formada por dos componentes, las proteínas F y S, y los genes que las codifican son los genes *lukS*-PV y *lukF*-PV. La técnica empleada para la detección de la toxina fue la PCR o amplificación del ADN del gen *luk*-PV. Los pasos que se siguieron fueron los siguientes:

1-La extracción de ADN: la extracción del ADN de los aislados de *S.aureus* se realizó a partir de un cultivo puro, empleando el sistema automático QIAcube (Qiagen, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los aislamientos fueron previamente tratados con lisozima (20 mg/ml)

2- Amplificación del ADN: una vez extraído el ADN se procedió a la reacción de amplificación del ADN empleando los cebadores *luk-PV1* y *luk-PV2* (Tabla 8) [222].

TABLA 8. SECUENCIAS DE LOS INICIADORES QUE AMPLIFICAN LA LPV.

CEBADORES	SECUENCIA (5'-3')	TAMAÑO DEL AMPLIFICADO (pb)
Luk-PV1	ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA	432
Luk-PV2	GCATCAAGTGTATTGGATAGCAAAAAG	

La PCR se realizó en un volumen de 10 µl con el Light Cycler Start DNA Master SYBR Green I (Roche, Mannheim, Alemania). La mezcla de reactivos de PCR para cada muestra incluía: 1 µL de DNA master SYBRgreen (10x), 1,2 µL de MgCl₂ (4

mM), 0,5 µl de los cebadores (10pm/µl), 0,5 µl de enzima UDG (1 U/µL) (Roche, Mannheim, Alemania) y 4,3 µl de agua bidestilada estéril. La amplificación y detección del producto amplificado se realizó en un termociclador Light Cycler (Roche, Mannheim, Alemania) donde se llevó a cabo una PCR a tiempo real. El ciclo térmico empleado fue: desnaturalización a 95°C durante 10 minutos y a continuación 40 ciclos de amplificación (primero una desnaturalización a 95°C durante 5 segundos, seguido de la hibridación a 58°C durante 5 segundos y de una extensión a 72°C durante 12 segundos), y por último, un ciclo de desnaturalización mediante la aplicación de un gradiente de temperaturas desde 50°C hasta 95°C para monitorizar la cinética de disociación de los fragmentos amplificados y determinar la temperatura de fusión.

3-Electroforesis en gel de agarosa: los fragmentos de ADN amplificados fueron separados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2% (Conda, Madrid, España) en TBE (0,5x) (Tris-HCl 50 nM, H₃BO₃ 50 nM, EDTA 0,2 nM) a 100 voltios durante 70 minutos. El gel fue cargado con los 10 µl del producto amplificado y el marcador de peso molecular φX174RF DNA/HaeIII (Invitrogen, EEUU). La visualización de las bandas de amplificación se realizó tiñendo el gel con SYBR[®]Gold (Invitrogen, EEUU) y empleando un transiluminador de luz ultravioleta. Las cepas portadoras del gen que codifica la LPV presentaban una banda de 432pb en el gel de agarosa (Figura 15). Se incluyó la cepa control ATCC 1556, para confirmar que la PCR había funcionado correctamente.

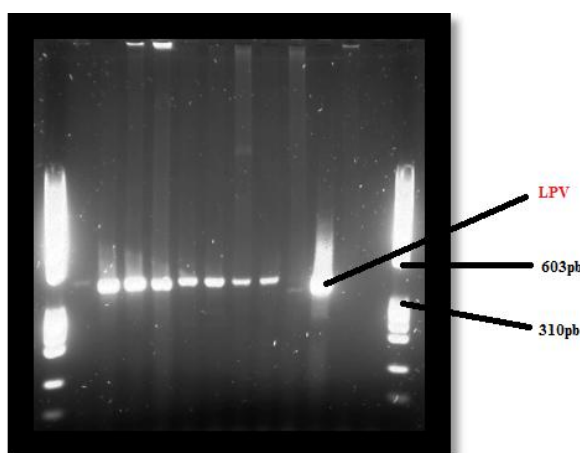


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa del producto de la PCR de detección de LPV. Las bandas que se observan en los carriles 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 de 432 pb corresponden al fragmento del gen *Luk-PV* amplificado de las muestras problema y la banda que se observa en el carril 10 corresponde al control positivo. Los carriles de los extremos del gel corresponden al marcador de peso molecular ϕ X174RF DNA/HaeIII.

5. CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA

La tipificación molecular se realizó en todos los aislamientos resistentes a meticilina, en todos los aislamientos portadores de LPV, y en una selección de aislamientos sensibles a meticilina y no portadores de la LPV. La caracterización molecular incluyó la realización de electroforesis en campo pulsante, MLST, tipificación del *cassette* cromosómico SCC*mec*, y la determinación del tipo de *agr*.

5.1. Electroforesis en campo pulsante

La ECP se realizó en todos los aislamientos resistentes a meticilina y en todos los aislamientos portadores de la LPV. La ECP se basa en la digestión del ADN bacteriano con una enzima de restricción denominada *Sma*I, y la posterior separación de los fragmentos que resultan de la digestión, mediante electroforesis en un gel de agarosa empleando un gradiente de voltaje alterno.

La tipificación molecular mediante electroforesis en campo pulsante se realizó siguiendo el siguiente protocolo:

1-Cultivo bacteriano: a partir de un cultivo puro de *S. aureus*, se inoculó una única colonia en medio de Luria-Bertani (10 g triptona, 10 g NaCl, 5 g extracto de levadura y ajustar con agua destilada a 1 L), y se incubó a una temperatura 37°C durante 17 horas en agitación a 150 r.p.m.

2- Preparación de los insertos de agarosa: Tras agitar la suspensión bacteriana con el fin de homogeneizarla, se pipetearon 0,5 ml de la misma y se centrifugó durante 2 minutos a 8.000 r.p.m. El sobrenadante se desechó y el sedimento se resuspendió en 0,5 ml de buffer PIV (0,01 mM Tris-HCl (PH=8), 1 M NaCl). La suspensión bacteriana se volvió a centrifugar, desechando posteriormente el sobrenadante y resuspendiendo el sedimento en 200 µl de buffer PIV. Posteriormente se ajustó la concentración bacteriana mediante la lectura de la densidad óptica (DO). Para ello se añadió 1 ml de PIV a 5µl de suspensión bacteriana y se midió la densidad óptica en un espectrofotómetro modelo Gene Quant II RNA/DNA Calculator (Pharmacia Biotech) a una longitud de onda de 620 nm. Mediante la siguiente fórmula se calculó para cada muestra, el volumen de PIV a añadir a la suspensión bacteriana para que todas ellas tuvieran la misma concentración:

$$\text{Volumen de PIV} = (\text{DO}_{620} \times 40 \times 210) - 210$$

Una vez realizado el cálculo y añadido el volumen necesario, se mezclaron 200 µl de suspensión bacteriana y 200 µl de agarosa de bajo punto de fusión al 2% (Biorad, Hercules, California), y se dispensaron en los moldes. Los moldes de agarosa se dejaron solidificar durante 30 minutos a 4°C.

3-Lisis: Una vez solidificados, los moldes se extrajeron y se incubaron a 37° C durante 5 horas con 1 ml de solución de tampón de lisis compuesto por 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 Lisoestafina (50 µg/ml), y 5 µl de RNasa (10 mg/mL). Tras las 5 horas de incubación se retiró la solución de lisis y se añadió 1 mL de una solución compuesta por buffer ES (0,5 M EDTA pH=9; 1% sarcosyl) y proteinasa-K (10 mg/mL). Los insertos de agarosa se incubaron con esta solución durante 18 horas a 50°C. A continuación, se retiró la solución de proteinasa-K, y se lavaron los insertos 4 veces con 10 mL de buffer TE (1x) (10 mM Tris-HCl pH=8; 0,1 M EDTA pH=8) en agitación suave a temperatura ambiente con el fin de eliminar las impurezas. Tras aspirar la solución de lavado los insertos se conservaron a 4°C para su posterior uso.

4-Digestión del ADN: para la digestión del ADN se utilizó una enzima de baja frecuencia de corte que permite digerir el ADN cromosómico en fragmentos grandes. Se añadieron 300 µl de la solución de restricción compuesta por 3 µl de *SmaI* (60 Unidades), 30 µl de *SmaI* buffer (Biolabs, New England, EEUU), y 267 µl de agua. Los insertos se incubaron con la solución de restricción a 25°C durante 18 horas.

5- Electroforesis en gel de agarosa: para realizar la electroforesis se emplearon geles de agarosa (Biorad, California, EEUU) al 1% en un buffer TBE (0,5x) (Tris-HCl 50 nM, H₃BO₃ 50 nM , EDTA 0,2 nM).

Los insertos se cargaron en los pocillos y en los extremos del gel se incluyeron marcadores de peso molecular *Lambda ladder* (Biolabs, New England, EEUU). La electroforesis se llevó a cabo en un sistema CHEF-DR III (BioRad®, Richmond,

EEUU) utilizando como solución tampón TBE (0,5x) (Tris-HCl 50 mM, H₃BO₃ 50 mM, EDTA 0,2 mM). Los fragmentos de restricción se separaron con las siguientes condiciones de electroforesis: la temperatura de electroforesis fue de 14°C, el gradiente de voltaje fue de 6 v/cm, y se utilizaron dos bloques de pulsos (un primer bloque con pulsos de 5 a 15 segundos durante 11,5 horas y el segundo bloque durante 11,5 horas con pulsos de 15 a 40 segundos).

6-Interpretación de los resultados: una vez finalizada la electroforesis, el gel se tiñó con SYBR[®]Gold (Invitrogen, EEUU) durante 20 minutos en agitación a temperatura ambiente. Una vez teñido el gel, se lavó con agua durante 10 minutos. El gel se observó en un transiluminador con luz UV y a continuación se procedió a obtener una imagen de los patrones electroforéticos de los aislamientos clínicos analizados (Figura 16). 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 similaridad superior al 80% fue utilizado para definir un patrón de ECP, siguiendo los criterios descritos por Tenover [175].

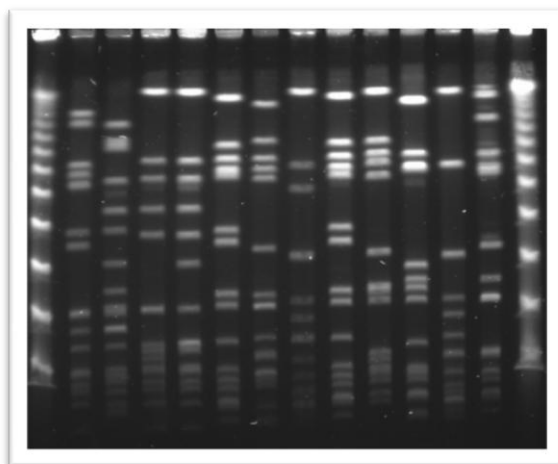


Figura 16. Perfiles de restricción generados tras la ECP de 12 aislamientos clínicos de *S.aureus*. Los perfiles de bandas correspondientes al primer y último carril corresponden al marcador de peso molecular *lambda ladder*

5.2. Multilocus sequence typing

La técnica de MLST se realizó en todas las cepas que se estudiaron por electroforesis en campo pulsante y que poseían un patrón electroforético distinto, y en una selección de aislamientos sensibles a meticilina y LPV negativos, con el fin de conocer a que tipo de ST pertenecían. Para ello se utilizó la técnica desarrollada por Enright *et al.* [223] que consiste en secuenciar los fragmentos internos (de 450 a 500 pb) de 7 genes “housekeeping” denominados *arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi* e *yqiL* que codifican distintos enzimas metabólicos bacterianos. Para determinar el tipo de ST del aislado se alinean las secuencias de los fragmentos internos de los genes housekeeping con las que ya se han depositado en una base de datos centralizada (www.mlst.net). A cada una de las secuencias de los 7 genes el programa le asigna un número que identifica a cada alelo, y a ese perfil alélico de 7 números se le asigna un ST.

El protocolo empleado para la técnica de MLST fue el siguiente:

1-Extracción del ADN: la extracción del ADN cromosómico de los aislamientos se realizó mediante el sistema automático QIAcube (Qiagen, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los aislados de *S.aureus* fueron sometidos a un tratamiento previo con lisozima (20 mg/ml).

2- Reacción de amplificación de los genes metabólicos: una vez extraído el ADN se procedió a la reacción de amplificación de los fragmentos internos de los 7 genes metabólicos empleando los cebadores descritos por Enright *et al.* [223]:

TABLA 9. SECUENCIAS DE LOS CEBADORES EMPLEADOS EN LA AMPLIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE LOS 7 GENES METABÓLICOS.

GEN	CEBADORES	SECUENCIAS (5'-3')	TAMAÑO DEL AMPLIFICADO (pb)
Carbamato quinasa (<i>arcC</i>)	arcC-Up arcC-Dn	TTGATTCACCAGCGCGTATTGTC AGGTATCTGCTTCAATCAGCG	456
Shikimato deshidrogenasa (<i>aroE</i>)	aroE-Up aroE-Dn	ATCGGAAATCCTATTTACATTC GGTGTTGTATTAATAACGATATC	456
Glicerol quinasa (<i>glpF</i>)	glpF-Up glpF-Dn	CTAGGAACTGCAATCTTAATCC TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC	465
Guanilato quinasa (<i>gmk</i>)	gmk-Up gmk-Dn	ATCGTTTTATCGGGACCATC TCATTAACTACAACGTAATCGTA	429
Fosfato acetiltransferasa (<i>pta</i>)	pta-Up pta-Dn	GTAAAATCGTATTACCTGAAGG GACCCTTTTGTGAAAAGCTTAA	474
Triosefosfato isomerasa (<i>tpi</i>)	tpi-Up tpi-Dn	TCGTTCAATTCTGAACGTCGTGAA TTTGCACCTTCTAACAATGTAC	402
Acetil coenzima A acetiltransferasa (<i>yqiL</i>)	yqiL-Up yqiL-Dn	CAGCATACAGGACACCTATTGGC CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC	516

La PCR se realizó en un volumen de 10 μ l con el reactivo Light Cycler Start DNA Master SYBR Green I (Roche, Mannheim, Alemania). La mezcla de reactivos de PCR para cada muestra incluía: 1 μ L de DNA master SYBRgreen (10x), 1,2 μ L de $MgCl_2$ (4mM), 0,5 μ l de los cebadores (20 μ M), 0,5 μ l de la enzima UDG (1 U/ μ L) (Roche, Mannheim, Alemania) y 4,3 μ l de agua bidestilada estéril. La amplificación y detección del producto amplificado se realizó en un termociclador de PCR en tiempo real (Light Cycler, Roche, Mannheim, Alemania). 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.

Una vez realizada la reacción de amplificación se procedió a purificar los productos de la PCR con el reactivo ExoSAP-IT (Affymetrix) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Posteriormente, se cuantificó el ADN mediante la medida de la absorbancia a 260nm en un espectrofotómetro modelo Gene Quant II RNA/DNA Calculator (Pharmacia Biotech) y se comprobó el ratio A260/A280 para comprobar la pureza del producto de PCR.

3- Secuenciación de los genes metabólicos: para cada gen a secuenciar se llevaron a cabo dos reacciones de secuenciación, una para cada hebra de ADN, empleando para ello el iniciador 3'-5' en una de las reacciones y el iniciador 5'-3' en la otra. Las reacciones de secuenciación de los productos de PCR purificados se realizaron en un volumen final de 10 µl, añadiendo 2,5 µl del reactivo BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, EEUU) y 1 µl de cebadores (4 µM). La cantidad del producto de PCR se añadió en función de la concentración de ADN (siempre que no superara los 90 ng/µl) del mismo, que se midió con un espectrofotómetro modelo Gene Quant II RNA/DNA Calculator (Pharmacia Biotech). La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador modelo 2720 ThermalCycler (Applied Biosystems) con las siguientes condiciones: primero una temperatura de 96°C durante un minuto, seguido de 35 ciclos de 96°C durante 10 segundos, 50°C durante 5 segundos, y 60°C durante 4 minutos, y finalmente se llevó la temperatura del termociclador a 4°C.

Para evitar que ciertos componentes de la reacción pudieran interferir en la correcta asignación de bases, se procedió a purificar el producto de la reacción de secuenciación mediante el método manual de precipitación con etanol. Para ello, en primer lugar se añadió a cada producto de la reacción de secuenciación 52 µl de una mezcla de 2 µl de acetato sódico 3 M (pH 4,6) y 50 µl de etanol al 100%. Tras añadir la mezcla se procedió a la agitación y posterior centrifugación a 2000g durante 20 minutos. Después se decantó el sobrenadante, y se volvió a centrifugar con la placa invertida durante 1 minuto a 150g para eliminar bien el sobrenadante. Tras la centrifugación se añadieron 150µl de etanol al 70% en cada uno de los pocillos de la reacción, y se centrifugó la placa a 2000g durante 5 minutos. Se volvió a decantar el sobrenadante y se centrifugó a 150g durante un minuto con la placa invertida para asegurarnos de eliminar bien el sobrenadante. Una vez finalizado el proceso de purificación se resuspendió el

sedimento en 20 µl de formamida y tras agitar de 10 a 15 segundos se centrifugó durante 30 a 40 segundos a 2000g. Una vez finalizado este proceso, las muestras se introdujeron en el secuenciador modelo Abi Prism 3100 (Applied Biosystems).

4-Análisis de las secuencias e interpretación de los resultados: las secuencias obtenidas fueron analizadas y ensambladas mediante el programa contigExpress (Invitrogen, EEUU). La asignación de alelos se realizó mediante la comparación de las secuencias obtenidas con las depositadas en la base de datos de *S. aureus* (<http://www.mlst.net>). Al perfil alélico de 7 números correspondientes a los 7 genes secuenciados se le asignó un ST.

5.3. Caracterización del cassette cromosómico SCCmec

En todos los aislamientos de SARM se determinó el tipo de SCCmec mediante una reacción de PCR. Se amplificaron algunos de los elementos más característicos de cada tipo de SCCmec, según el método descrito por Oliveira [221]. El método para caracterizar el SCCmec se llevó a cabo empleando el siguiente protocolo:

1-La extracción de ADN: la extracción del ADN cromosómico se realizó a partir de un cultivo puro de *S. aureus* mediante el sistema automático QIAcube (Qiagen, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante. Previamente la bacteria fue sometida a un tratamiento de lisis con lisozima (20 mg/ml).

2-Amplificación del ADN: Una vez extraído el ADN de la bacteria se procedió a la reacción de PCR, amplificando por separado ocho locus distintos (A-H), y utilizando el

gen *mecA* como control interno. Los cebadores empleados fueron los descritos por Oliveira *et al.* (Tabla 10) [221]:

TABLA 10. SECUENCIAS DE LOS CEBADORES EMPLEADOS PARA LA CARACTERIZACIÓN DEL CASSETTE CROMOSÓMICO SCC*mec*.

LOCUS*	CEBADORES	SECUENCIA (5'-3')	TAMAÑO (pb)	TIPO SCC <i>mec</i>
A	CIF2 F2	TTCGAGTTGCTGATGAAGAAGG	495	I
	CIF2 R2	ATTTACCACAAGGACTACCAGC		
B	KDP F1	AATCATCTGCCATTGGTGATGC	284	II
	KDP R1	CGAATGAAGTGAAAGAAAGTGG		
C	MECI P2	ATCAAGACTTGCATTCAGGC	209	II, III
	MECI P3	GCGGTTTCAATTCACTTGTC		
D	DCS F2	CATCCTATGATAGCTTGGTC	342	I, II, IV
	DCS R1	CTAAATCATAGCCATGACCG		
E	RIF4 F3	GTGATTGTTGAGATATGTGG	243	III
	RIF4 R9	CGCTTTATCTGTATCTATCGC		
F	RIF5 F10	TTCTTAAGTACACGCTGAATCG	414	III
	RIF5 R13	GTCA CAGTAATTCATCAATGC		
<i>mecA</i>	MECA P4	TCCAGATTACAACCTCACCAGG	162	Control interno
	MECA P7	CCACTTCATATCTTGTAACG		

***Locus A:** corresponde al gen CIF situado debajo del gen *pls*, es específico del SCC*mec* tipo I. **Locus B:** se encuentra en el operon *Kdp* que es específico del SCC*mec* tipo II. **Locus C:** se encuentra en el gen *mecI* presente en los SCC*mec* del los tipos II y III. **Locus D:** se encuentra en la región *dcs* presente en los tipos I, II y III. **Locus E:** está localizado en la región integrada entre el plásmido pI258 y el transposón Tn554 que es específico del tipo III. **Locus F:** se encuentra situado en la región entre el Tn554 y la unión cromosómica (*orfX*).

La PCR se realizó en reacciones individuales en un volumen de 10 µl con el Light Cycler Start DNA Master SYBR Green I (Roche, Mannheim, Alemania). La mezcla de reactivos de PCR para cada muestra incluía: 1 µL de DNA master SYBRgreen (10x), 1,2 µL de MgCl₂ (4 mM), 0,5 µl de los cebadores (10 pm/µl), 0,5µl de la enzima UDG (1 U/µL) (Roche, Mannheim, Alemania) y 4,3 µl de agua bidestilada estéril. La amplificación y detección del producto amplificado se realizó en un termociclador de PCR a tiempo real (Light Cycler, Roche, Mannheim, Alemania). El

ciclo térmico utilizado fue primero un ciclo de desnaturalización a 95°C durante 10 minutos, seguido de 35 ciclos de amplificación (primero una desnaturalización a 95°C durante 3 segundos, seguido de la hibridación a 55°C durante 6 segundos, y la extensión a 72°C 10 segundos), a continuación un ciclo de extensión a 72°C durante 3 minutos, 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.

Los controles empleados fueron cedidos por el Centro Nacional de Microbiología (Instituto de Salud Carlos III).

3- Electroforesis en gel de agarosa: los fragmentos de ADN amplificados fueron separados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2% (Conda, Madrid, España) en TBE (0,5X) (Tris-HCl 50 mM, H₃BO₃ 50 mM, EDTA 0,2 mM) a 100 voltios durante 70 minutos. El gel fue cargado con los 10 µl del producto amplificado, y el marcador de peso molecular ϕ X174RF DNA/HaeIII (Invitrogen, EEUU). La observación de las bandas de amplificación se realizó tiñendo el gel con SYBR[®]Gold (Invitrogen, EEUU) y visualizándolo con un transiluminador de luz ultravioleta. Para interpretar los resultados se siguieron los criterios descritos en la tabla 11.

TABLA 11. TAMAÑO DEL AMPLIFICADO DE LOS LOCUS EN LOS DISTINTOS TIPOS DE SCC_{mec}.

TIPO SCC _{mec}	LOCUS	TAMAÑO AMPLIFICADO (pb)
I	A, D	495, 342
IA	A, D, G	495, 342, 381
II	B, C, D, G	284, 209, 342, 381
III	C, E, F, H	209, 243, 414, 303
IV	D	342
IVA	D, G	342, 381

5.4. Determinación del tipo de agr

El *agr* es un sistema regulador de la expresión de factores de virulencia de *S. aureus* que está formado de 2 componentes y que en función de la densidad bacteriana favorece o reprime la expresión de ciertos factores de virulencia de la bacteria como adhesinas o exoproteínas. Existen 4 tipos de *agr* denominados con números romanos del I al IV. La determinación del tipo de *agr* se llevó a cabo mediante PCR en todos los aislamientos en los que se había realizado previamente MLST. La ejecución de la técnica se llevó a cabo mediante los siguientes pasos:

1-La extracción de ADN: la extracción del ADN cromosómico se realizó a partir de un cultivo puro de *S. aureus* empleando el sistema automático QIAcube (Qiagen, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante, previa lisis de la bacteria con lisozima (20mg/ml).

2-Amplificación del ADN: una vez extraído el ADN de la bacteria se procedió a la reacción de PCR para cada tipo de *agr* a determinar. Los cebadores empleados fueron Pan-F, agrI-R, agrII-R, agrIII-R, agrVI-R (Tabla 12) [224]:

TABLA 12. SECUENCIAS DE LOS INICIADORES EMPLEADOS PARA DETERMINAR LOS TIPOS DE AGR.

CEBADORES	SECUENCIA (5'-3')	TAMAÑO (pb)
Pan-F	ATGCACATGGTGCACATGC	
agrI-R	GTCACAAGTACTATAAGCTGCGAT	441
agrII-R	TATTACTAATTGAAAAGTGGCCATAGC	575
agrIII-R	GTAATGTAATAGCTTGTATAATAATACCCAG	323
agrIV-R	CGATAATGCCGTAATACCCG	659

La PCR se realizó en un volumen de 1 μ l con el reactivo Light Cycler Start DNA Master SYBR Green I (Roche, Mannheim, Alemania). La mezcla de reactivos de PCR para cada muestra incluía: 1 μ L de DNA master SYBRgreen (10x), 1,2 μ L de $MgCl_2$ (4 mM), 0,5 μ l de los cebadores (10 μ M), 0,5 μ l de UDG (1 U/ μ L) (Roche, Mannheim, Alemania) y 4,3 μ l de agua bidestilada estéril. La amplificación y detección del producto amplificado se realizó en un termociclador de PCR en tiempo real (Light Cycler, Roche, Mannheim, Alemania). El ciclo térmico empleado fue: 1) desnaturalización a 95°C durante 10 minutos, 2) 35 ciclos de amplificación (primero una desnaturalización a 95°C durante 5 segundos, seguido de la hibridación a 55°C durante 10 segundos y la extensión a 72°C 20 segundos), 3) un ciclo de extensión a 72°C durante 3 minutos, y 4) un ciclo de desnaturalización mediante la aplicación de un gradiente de temperaturas desde 50°C hasta 95°C para monitorizar la cinética de disociación de los fragmentos amplificados y determinar la temperatura de fusión.

3- Electroforesis en gel de agarosa: los fragmentos de ADN amplificados fueron separados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2% en TBE (0,5x) (Tris-HCl 50 mM, H_3BO_3 50 mM, EDTA 0,2 mM) a 100 voltios durante 70 minutos. El gel fue cargado con los 10 μ l del producto amplificado y el marcador de peso molecular ϕ X174RF DNA/HaeIII (Invitrogen, EEUU). La observación de las bandas de amplificación se realizó tiñendo el gel con SYBR[®]Gold (Invitrogen, EEUU) y visualizándolo con un transiluminador de luz ultravioleta.

6. ESTUDIO DEL CONTENIDO GENÉTICO DE LOS AISLAMIENTOS DE *S.AUREUS* MEDIANTE MICROARRAYS

Con el objetivo de estudiar el contenido genético de las cepas de *Staphylococcus aureus* que circulan en nuestro país, se realizó una técnica de microarrays en una selección de las cepas aisladas de SARM, de las cepas portadoras de la LPV, y de las cepas de SASM que no contenían el gen que codifica la toxina LPV.

La caracterización del contenido genético de las cepas se llevó a cabo con el método comercial StaphyType™ Kit (Alere, Jena, Alemania). Este kit contiene 334 sondas correspondientes a 185 genes distintos y sus variantes alélicas, y permite la detección de los genes que codifican marcadores de especie, determinantes de resistencia, exotoxinas y superantígenos, proteínas de adhesión, tipos capsulares y genes reguladores como los distintos tipos de *agr*. Por otra parte, esta técnica también permite determinar el tipo de SCC*mec*, y en un elevado número de cepas el complejo clonal al que pertenece la cepa estudiada. Las fases de la técnica de microarrays se muestran en la figura 17.

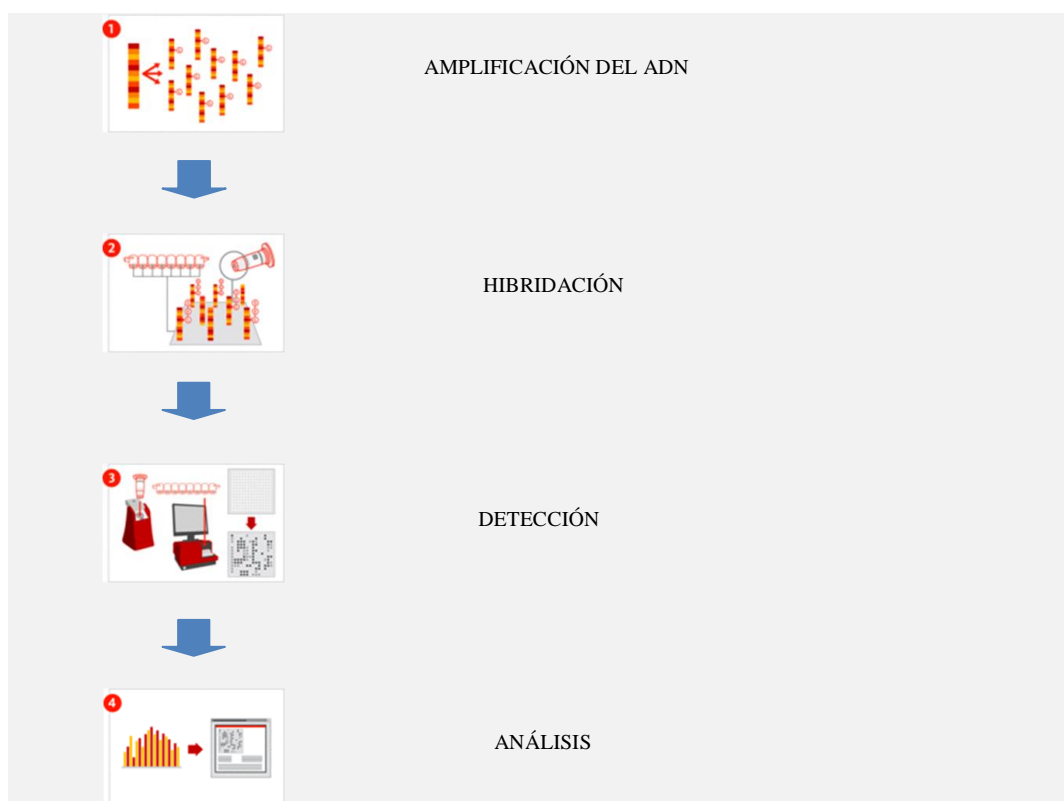


Figura 17. Pasos para la realización de la técnica de microarrays. 1-Amplificación: el ADN se amplifica mediante una PCR lineal y se marca con biotina. 2-Hibridación: el ADN producto de la PCR hibrida con las sondas del microarray. 3-Detección: mediante un conjugado de estreptavidina peroxidasa se puede visualizar el precipitado producto de la hibridación. El lector ArrayMate permite capturar y visualizar la imagen del array. La presencia de círculos negros indica que ha habido hibridación. 4-Análisis: el software del ArrayMate mide la intensidad de la señal de cada sonda y determina que genes están presentes en la muestra.

La técnica se llevó a cabo según las instrucciones del fabricante:

1- Extracción del ADN: la extracción del ADN se realizó con el sistema automático QIAcube (Qiagen, EEUU) a partir de un cultivo puro de *S. aureus* al que previamente se incubó durante 1 hora a 37°C con un reactivo de lisis que proporciona el fabricante. Posteriormente, se midió la concentración de ADN extraído en un espectofotómetro modelo Gene Quant II RNA/DNA Calculator (Pharmacia Biotech) a 260nm, con el objetivo de ajustar la concentración del ADN según las especificaciones del fabricante (0,5 a 2 µg).

2-Amplificación del ADN: la amplificación del ADN se llevó a cabo mediante una reacción de PCR lineal mediante la cual el ADN fue amplificado 40 veces aproximadamente y marcado con biotina.

3-Hibridación con las sondas de ADN: el ADN amplificado y marcado se transfirió a la membrana del microarray donde el producto de la amplificación se hibridó con las sondas de ADN presentes en la membrana del microarray.

4-Detección del producto de hibridación: tras realizar 3 lavados con el fin de retirar el exceso de ADN que podría haber hibridado inespecíficamente, se incubó la membrana de microarray con un conjugado de estreptavidina peroxidasa. Este conjugado se une a través de la estreptavidina a la biotina presente en los productos amplificados que a su vez se encuentran unidos a las sondas, y la actividad de la peroxidasa provoca la aparición de un producto insoluble que precipita sobre las zonas del microarray en las que ha habido hibridación.

5-Lectura e interpretación de los resultados: la lectura e interpretación se realizó con un aparato que provee el fabricante llamado ArrayMate (Alere, Jena, Alemania). 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 (Figura 18). A continuación, mediante un software específico proporcionado por el fabricante se interpretaron los resultados, comparándolos con la lectura de los controles y los marcadores de especie. Una vez interpretados los resultados, el ArrayMate emite un informe con los resultados positivos,

negativos o indeterminados para cada gen, y se asigna a la cepa estudiada el complejo clonal al que pertenece, el tipo de *agr* y el tipo de *cassette* cromosómico SCC*mec*.

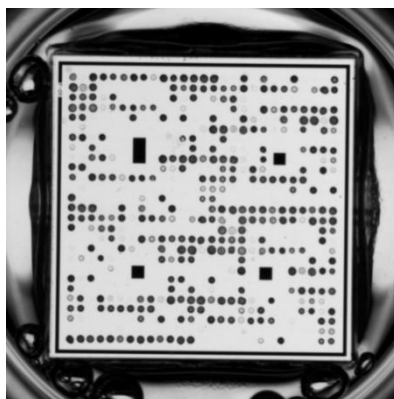


Figura 18. Resultado de la hibridación del ADN de la muestra con las sondas fijadas en la membrana de microarray. En la imagen tomada por el ArrayMate se observan las manchas que se han formado debido al precipitado que se forma al hibridar el ADN de la muestra con las sondas específicas del microarray.

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Para la recogida de las variables clínicas, demográficas, microbiológicas y moleculares se creó una base de datos con el programa Microsoft Excel para Windows. Los datos se analizaron con el programa informático SPSS versión 10.0 (SPSS, Chicago, EEUU) y con el programa Epi Info (CDC; Atlanta, EEUU).

Se realizó la estadística descriptiva de las variables recogidas. Las variables cuantitativas se expresaron con media y desviación estándar (DE). La edad se expresó también con medianas y rangos. Las variables categóricas se expresaron con su frecuencia.

Las variables cuantitativas continuas se compararon mediante el test de t Student o mediante pruebas no paramétricas (si la muestra es pequeña y se vulnera el supuesto de normalidad) como el U test de Mann-Whitney. Las variables cuantitativas discretas se analizaron mediante el test de X^2 o el test de Fisher si alguno de los valores esperados era menor de 5. Las variables cualitativas categóricas fueron analizadas mediante la prueba de X^2 . Si alguna de las frecuencias esperadas era menor de 5 se utilizó el test de Fisher. Las diferencias entre los grupos se consideraron significativas cuando el valor de p era $\leq 0,05$.

ANEXO 1. PROTOCOLO DE RECOGIDA DE DATOS CLÍNICOS Y MICROBIOLÓGICOS DE LAS INFECCIONES POR S. AUREUS EN NIÑOS

Hospital:

Lugar de diagnóstico: Urgencias UCI Planta Consultas Externas

Fecha de recogida (día/mes/año): _____ Especialidad _____

Nº muestra laboratorio:

Nº historia:

Nombre:

Teléfono:

FICHA CLÍNICA

Características demográficas:

Edad (en años y meses): _____ Sexo: niña niño

País de nacimiento: niño: _____ madre: _____ padre: _____

Factores de riesgo

Inmunodepresión (oncológico, trasplante, VIH) si no (especificar)

Dermatitis atópica si no

Portador de catéter de diálisis o vascular si no

Hospitalización en los últimos 6 meses: si no

Planta UCI Cirugía

Lesión cutánea (herida, varicela, eccema/dermatitis) si no

Infección SARM en año anterior: si no

Infección SASM en año anterior: si no

Antecedente de infección cutánea en familia si no

Tipo de infección:

Superficial:

Exudado de herida /supuración superficial quirúrgica

Exudado de herida /supuración superficial no quirúrgica

Exudado ombligo

Impétigo: ampolloso no ampolloso

Foliculitis Panadizo Exudado conjuntivitis Exudado otitis

Celulitis / Absceso/s

Profunda: Piomiositis Osteomielitis Artritis Neumonía

Onfalitis Mastitis neonatal

Bacteriemia sin foco Otros _____

Adquisición de la infección:

Comunitaria Asociada al Sistema Sanitario Hospitalaria

Tratamiento ANTIBIÓTICO (antibiótico y duración en días):

Evolución (curación, complicaciones):

DATOS MICROBIÓLOGICOS

Fecha de recogida (día/mes/año):

Nº muestra laboratorio:

TIPO DE MUESTRA: _____

Tipo *S aureus*: SASM SARM

Antibiograma

Penicilina: Amox –clav: Cefazolina: Ciprofloxacino: Gentamicina:

Eritromicina: Clindamicina: TM/ST: Rifampicina :

Tetraciclina:..... Vancomicina: Ácido fusídico: Mupirocina (S/IR):

Linezolid:.....

Fenotipo MLS-D-test (inducción) si no

LPV: positiva negativa

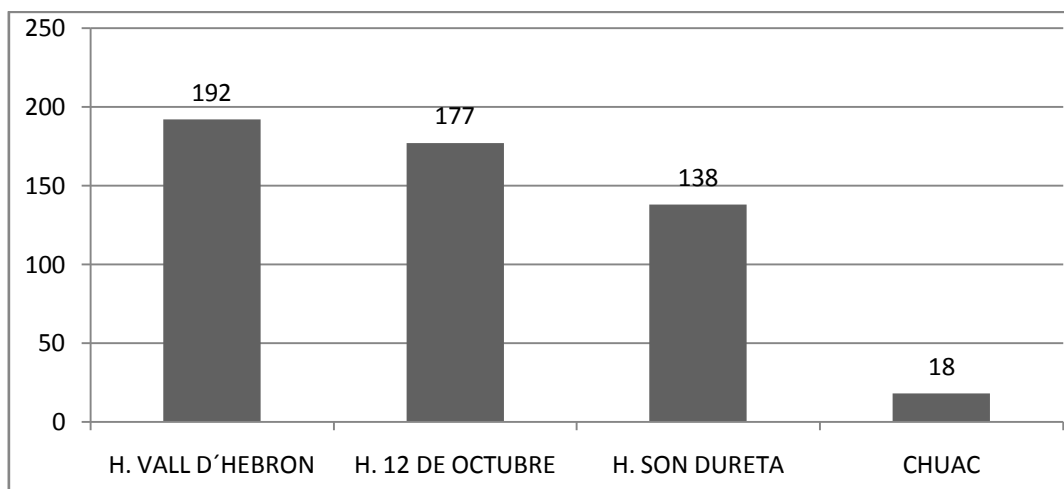
IV-RESULTADOS

1. RESULTADOS GENERALES

Durante el año 2009 se recogieron un total de 525 aislamientos de *S.aureus*, cada aislamiento correspondiente a un único paciente. El número de aislamientos enviados por cada hospital fue (Figura 19):

- ❖ Hospital 12 de Octubre : 177 aislamientos de *S.aureus*
- ❖ Hospital Vall d'Hebron: 192 aislamientos de *S.aureus*
- ❖ Hospital Son Dureta: 138 aislamientos de *S.aureus*
- ❖ Complejo Hospitalario Universitario de La Coruña: 18 aislamientos de *S.aureus*

FIGURA 19: NÚMERO DE CASOS PROCEDENTES DE CADA HOSPITAL



1.1. Características demográficas de la población estudiada

Las características demográficas generales de la población analizada procedente de los 4 hospitales se describen en la tabla 13. La edad media de los 525 pacientes incluidos en el estudio fue de 51,28 ($\pm 56,23$) meses, (4,27 [$\pm 4,68$] años), 288 eran varones (57,3%), y 346 eran niños de origen español (65,9%).

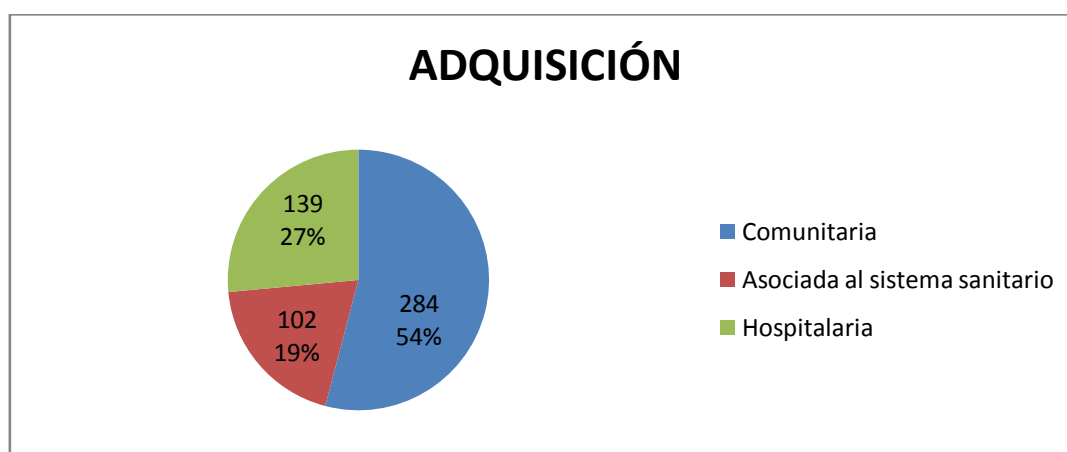
TABLA 13: CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA

Edad (meses)	
-Media (\pm DE)	51,28 (\pm 56,23)
-Mediana (p25-p75)	27,0 (3,0-85,0)
Procedencia	
-Español	346 (65,9%)
-Origen extranjero	179 (34,1%)
Sexo	
-Varón	288 (57,3%)
-Mujer	215 (42,7%)

1.2. Estudio de los casos en función de la adquisición

Los casos, tanto infecciones como colonizaciones, se clasificaron en función de su adquisición en: asociados a la comunidad, asociados al hospital y asociados al sistema sanitario. En la figura 20 se muestra la distribución de los casos según la adquisición.

FIGURA 20: DISTRIBUCIÓN DE LOS 525 CASOS EN FUNCIÓN DE LA ADQUISICIÓN



A efectos prácticos, en los posteriores análisis llevados a cabo en el estudio la distribución se clasificó en dos grupos: casos asociados a la comunidad (AC) (n=284) y casos asociados al hospital o al sistema sanitario (n=241), estos últimos los denominaremos de forma global como asociados al sistema sanitario (ASS).

La distribución de los casos en función de la adquisición en cada uno de los cuatro hospitales que participaron en el estudio se muestra en la tabla 14. Como se puede observar en la tabla, la distribución de los casos en función de la adquisición fue similar en cada uno de los hospitales participantes, no existiendo diferencias significativas en ninguno de ellos.

TABLA 14: DISTRIBUCIÓN DE LOS CASOS EN FUNCIÓN DE LA ADQUISICIÓN EN LOS 4 HOSPITALES

HOSPITAL	CASOS TOTALES	ASOCIADOS A LA COMUNIDAD	ASOCIADOS AL SISTEMA SANITARIO	P
Hospital 12 de Octubre	177	94 (53,1%)	83 (46,9%)	0,242
Hospital Vall d'Hebron	192	104 (54,2%)	88 (45,8%)	0,102
Hospital Son Dureta	138	76 (55,1%)	62 (44,9%)	0,092
CHUAC	18	10 (55,6%)	8 (44,4%)	0,510

2. CARACTERÍSTICAS DE LOS AISLAMIENTOS DE *S. AUREUS*. RESISTENCIAS A LOS ANTIMICROBIANOS

2.1. Resistencia a metilina

El estudio microbiológico de los 525 aislamientos recibidos de los cuatro hospitales confirmó mediante pruebas bioquímicas, que todos ellos correspondían a aislados de *S.aureus*. De los 525 aislamientos de *S. aureus* estudiados, 46 (8,8%) fueron

resistentes a meticilina y 479 (91,2%) sensibles. La resistencia a meticilina de los 525 aislamientos fue confirmada mediante la detección del gen *mecA* por PCR, existiendo una correlación entre los métodos fenotípicos y genotípicos en todos los aislamientos a excepción de uno. Este aislamiento de *S. aureus* presentaba resistencia fenotípica a meticilina, y sin embargo, no se detectaba la presencia del gen *mecA*.

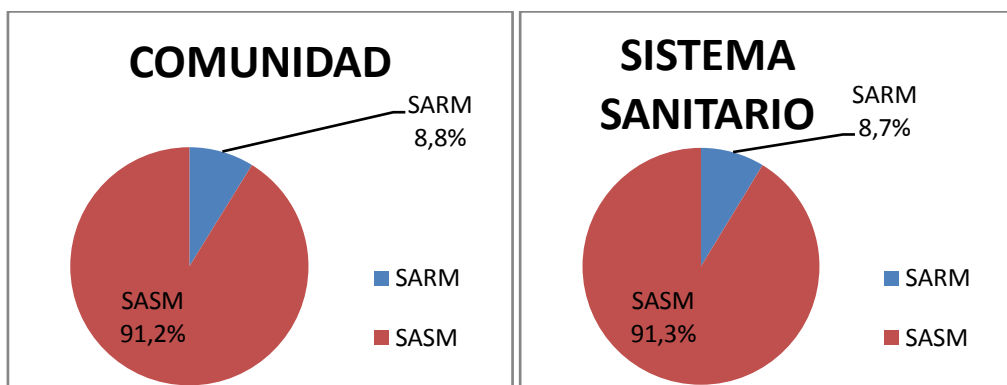
Los resultados de la resistencia a meticilina se analizaron en cada hospital. Estos datos se muestran en la tabla 15, donde se objetiva una variabilidad en las tasas globales de SARM en cada hospital, que van desde el 5,6% al 10,9%.

TABLA 15: TASA GLOBAL DE RESISTENCIA A METICILINA EN LOS 4 HOSPITALES

HOSPITAL	SARM N° aislamientos (%)	SASM N° aislamientos (%)
Hospital 12 de Octubre	14 (7,9%)	163 (92,1%)
Hospital Vall d'Hebron	16 (8,3%)	176 (91,7%)
Hospital Son Dureta	15 (10,9%)	123 (89,1%)
CHUAC	1 (5,6%)	17 (94,4%)

Con el objetivo de conocer la tasa de SARM asociada a la comunidad y asociada al sistema sanitario, se analizó la resistencia a meticilina de los aislamientos en función de la adquisición. Como queda reflejado en la figura 21, de los 284 casos asociados a la comunidad, 25 fueron causados por cepas resistentes a meticilina, es decir, que el porcentaje de SARM-AC fue del 8,8% y de los 241 casos clasificados como asociados al sistema sanitario, 21 fueron causados por cepas resistentes a meticilina, es decir que el porcentaje SARM-ASS fue del 8,7%.

FIGURA 21: PORCENTAJE DE SARM EN FUNCIÓN DE LA ADQUISICIÓN DE LOS CASOS.



Las cifras de los porcentajes de SARM en función de la adquisición en cada uno de los hospitales que participaron en el estudio se muestran en la figura 22. Los datos reflejan una cierta variabilidad en la prevalencia de SARM-AC en función del área geográfica estudiada, pero esta variabilidad es mucho más evidente en los porcentajes de SARM-ASS que van desde el 0% en el CHUAC hasta el 17,7% en el hospital Son Dureta.

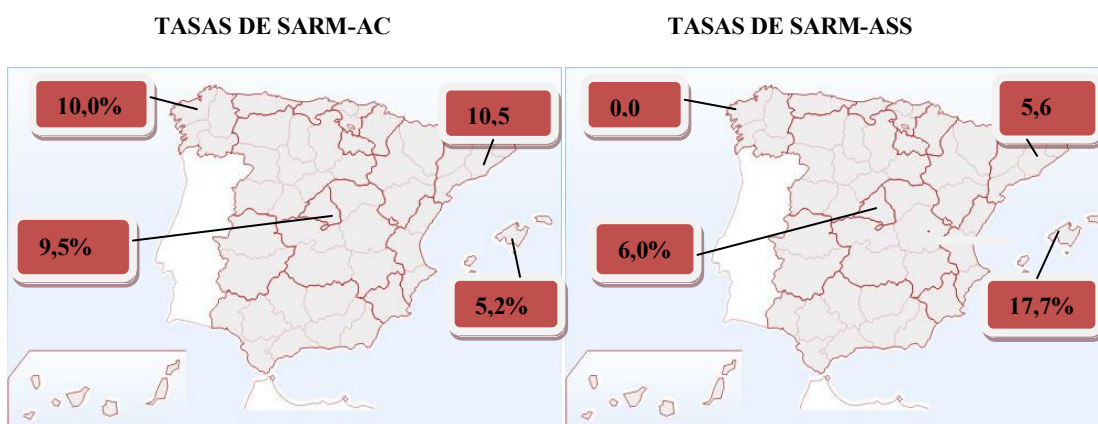
Los porcentajes de SARM-AC en cada hospital fueron los siguientes:

- Hospital 12 de Octubre : 9,5% (9/94)
- Hospital Vall d'Hebron : 10,5% (11/104)
- Hospital Son Dureta : 5,2 (4/76)
- Complejo Hospitalario Universitario de La Coruña : 10,0% (1/10)

Los porcentajes de SARM-ASS en cada hospital fueron los siguientes:

- Hospital 12 de Octubre: 6,0% (5/83)
- Hospital Vall d'Hebron: 5,6% (5/88)
- Hospital Son Dureta: 17,7% (11/62)
- Complejo Hospitalario Universitario de La Coruña: 0,0% (0/8)

FIGURA 22: PORCENTAJE DE SARM EN CADA HOSPITAL EN FUNCIÓN DE LA ADQUISICIÓN



2.2. Estudio de la sensibilidad a los antibióticos no β -lactámicos en función de la resistencia a meticilina

La detección de las resistencias a los antibióticos no β -lactámicos se llevó a cabo mediante métodos fenotípicos en los 525 aislamientos de *S.aureus*. Cuando los resultados de sensibilidad a macrólidos y lincosamidas obtenidos mediante microdilución mostraban que la cepa era resistente a la eritromicina y sensible a la clindamicina, se comprobó mediante disco-difusión por el método del D-test la posible existencia del fenotipo MLS_B inducible a clindamicina. Los datos de resistencia a los antibióticos no β -lactámicos se analizaron en función de la resistencia a meticilina como queda reflejado en la tabla 16. En general, los aislamientos de SARM fueron más resistentes a los antibióticos analizados que los de SASM y de forma significativa a eritromicina, fluoroquinolonas, gentamicina, y mupirocina. No se detectó ningún aislamiento resistente a rifampicina, vancomicina, ni a linezolid.

TABLA 16: PATRÓN DE RESISTENCIAS A LOS ANTIBIÓTICOS NO β -LACTÁMICOS EN FUNCIÓN DE LA RESISTENCIA A METICILINA

ANTIBIÓTICOS	SARM N=46	SASM N=479	P
Eritromicina	17 (37,0%)	63(13,2%)	<0,001
Clindamicina*	8 (17,4%)	54 (11,2%)	0,219
D-test	4/13 (30,8%)	48/58 (82,8%)	<0,001
Fluoroquinolonas	16 (34,8%)	8 (1,7%)	<0,001
Gentamicina	8 (17,4%)	11 (2,3%)	<0,001
Mupirocina	6 (13,0%)	14 (2,9%)	0,004
Ácido fusídico	1 (2,2%)	2(0,4%)	0,240
TM/ST	1 (2,2%)	5 (1,0%)	0,424
Rifampicina	0	0	-
Tetraciclinas	0/33	9/355 (2,5%)	0,445
Vancomicina	0	0	-
Linezolid	0	0	-

*Resistencia constitutiva e inducible

3. INCIDENCIA Y DISTRIBUCIÓN DE LA LEUCOCIDINA DE PANTON VALENTINE

La detección de los genes que codifican la LPV se llevó a cabo mediante PCR en los 525 aislamientos incluidos en el estudio. Los resultados mostraron que 75 (14,3%) aislamientos de *S.aureus* eran portadores de la toxina LPV. Si analizamos estos datos en función de la resistencia a meticilina, 22 de los 46 aislamientos de SARM (47,8%) y 53 de los 479 aislamientos de SASM (11,1%) eran portadores de la toxina LPV (P<0,001).

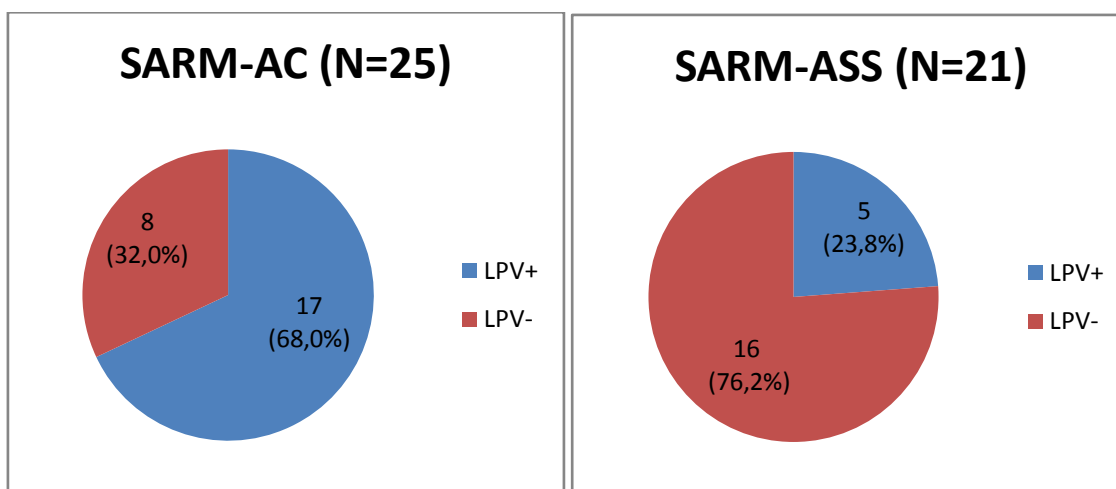
Se analizó también la distribución de la toxina LPV en función de la sensibilidad a la meticilina y de la adquisición de los aislamientos, AC o ASS. Al comparar los aislamientos de SARM y SASM en función de la adquisición observamos, que el

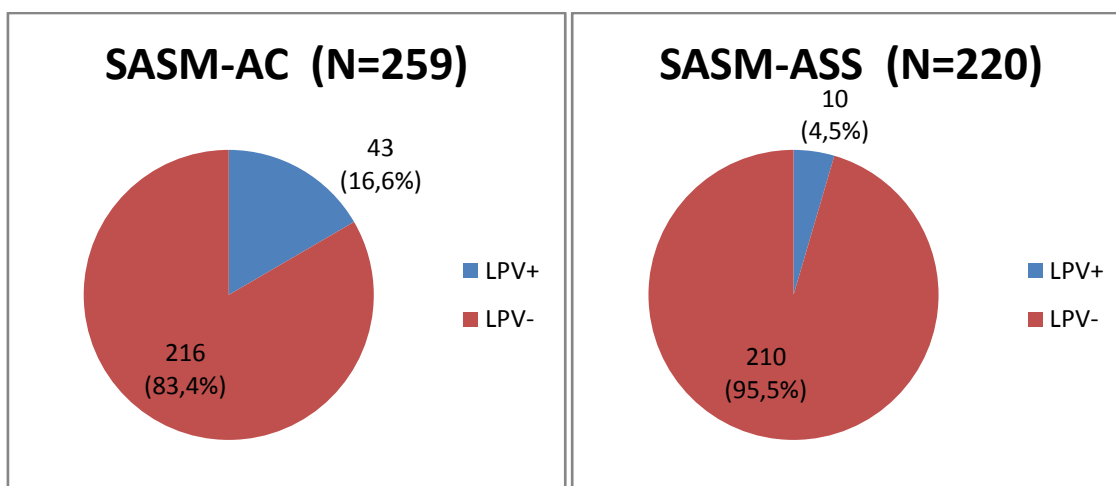
porcentaje de cepas portadoras de LPV fue mayor tanto en las cepas de SARM-AC como en las cepas de SASM-AC (Tabla 17 y Figura 23).

TABLA 17: PORCENTAJE DE LOS AISLAMIENTOS DE *S. AUREUS* PORTADORES DE LA LPV EN FUNCIÓN DE LA ADQUISICIÓN Y DE LA SENSIBILIDAD A METICILINA

	COMUNIDAD	SISTEMA SANITARIO	P
SARM	17/25 (68,0%)	5/21 (23,8%)	P=0,003
SASM	43/259 (16,6%)	10/220 (4,5%)	P<0,001

FIGURA 23: DISTRIBUCIÓN DE LA TOXINA LPV EN LOS 525 AISLAMIENTOS DE *S.AUREUS* EN FUNCIÓN DE LA SENSIBILIDAD A METICILINA Y LA ADQUISICIÓN





El estudio de la distribución de los aislamientos de *S. aureus* portadores de LPV en función de la resistencia a meticilina y de la adquisición en cada uno de los hospitales mostró, que aunque los aislamientos de *S. aureus* AC eran más frecuentemente portadores de la toxina LPV en tres de los hospitales, únicamente se observó significación estadística en los aislamientos de SASM-AC de los hospitales 12 de Octubre y Vall d'Hebron (Tabla 18).

TABLA 18: DISTRIBUCIÓN DE LOS AISLAMIENTOS DE *S.AUREUS* PORTADORES DE LA LPV EN FUNCIÓN DE LA ADQUISICIÓN Y DE LA SENSIBILIDAD A METICILINA EN LOS 4 HOSPITALES.

HOSPITAL		AC	ASS	P
H.12 de Octubre	SARM	6/9 (66,7%)	2/5 (40,0%)	0,580
	SASM	18/85 (21,2%)	1/78 (1,3%)	<0,001
H.Vall d'Hebron	SARM	8/11 (72,7%)	1/5 (20,0%)	0,105
	SASM	19/93 (20,4%)	8/83 (9,6%)	0,047
H.Son Dureta	SARM	3/4 (75,0%)	2/11 (18,2%)	0,076
	SASM	6/72 (8,3%)	1/51 (2,0%)	0,238
CHUAC	SARM	0	0	-
	SASM	0	0	-

4. COMPARACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS, CLÍNICAS Y MICROBIOLÓGICAS DE LAS INFECCIONES CAUSADAS POR *S.AUREUS* EN NIÑOS

De los 525 casos recogidos en el estudio, 432 (82,3%) correspondían a casos de infección por *S.aureus* y 93 (17,7%) a casos de colonización. Los 432 casos de infección recogidos correspondían a los siguientes síndromes clínicos:

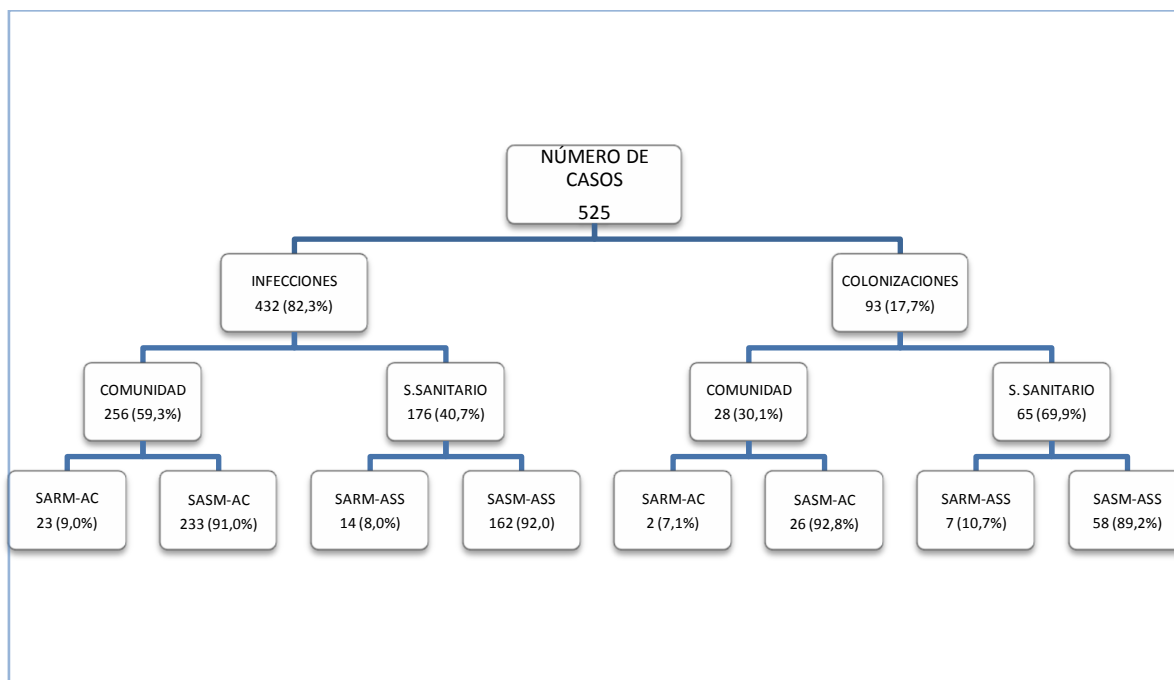
- IPTBs: 245 (46,7%)
- Bacteriemias: 51 (9,7%)
- Infecciones de la herida quirúrgica: 51 (9,7%)
- Infecciones óticas: 38 (7,2%)
- Infecciones oculares: 25 (4,8%)
- Infecciones respiratorias: 16 (3,0%)
- Infecciones óseas y articulares: 9 (1,7%)
- Otras infecciones: 10 (1,9%). En este apartado se incluyeron: un caso de peritonitis en relación con diálisis peritoneal, 5 infecciones de catéter, 1 endocarditis, 2 infecciones del tracto urinario y 1 infección del sistema nervioso.

Trece de los casos se incluyeron en más de un síndrome clínico: 5 casos de bacteriemia e infección de la herida quirúrgica, 2 casos de bacteriemia y artritis séptica, 3 casos de bacteriemia y osteomielitis, 1 caso de bacteriemia y endocarditis, un caso de bacteriemia y celulitis, y un caso de lesiones impetiginizadas y bacteriemia.

El 59,3% de estas infecciones correspondían a infecciones asociadas a la comunidad, y el 40,7% eran infecciones asociadas al sistema sanitario. El porcentaje global de infecciones causadas por SARM fue del 8,6% (37/432). Si analizamos este

dato en función de la adquisición vemos que el porcentaje de infecciones causadas por SARM-AC fue del 9,0% y el de infecciones causadas por SARM-ASS del 8,0% ($p=0,707$) (Figura 24).

FIGURA 24: CASOS DE INFECCIONES Y COLONIZACIONES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO EN FUNCIÓN DE LA ADQUISICIÓN Y DE LA RESISTENCIA A METICILINA.



Los porcentajes de SARM causantes de infección en función de la adquisición en cada uno de los hospitales, se muestran en la tabla 19. Los datos reflejan una cierta variabilidad en la prevalencia de SARM-AC en función del área geográfica estudiada, que van desde el 6,8% al 10% en SARM-AC y del 0% al 13,6% en SARM-ASS.

TABLA 19: PORCENTAJE DE INFECCIONES CAUSADAS POR SARM EN FUNCIÓN DE LA ADQUISICIÓN EN LOS 4 HOSPITALES

HOSPITAL	SARM-AC	SARM-ASS	SARM total
H. 12 DE OCTUBRE	9/94 (9,6%)	4/72 (5,6%)	13/166 (7,8%)
H. VALL D'HEBRON	9/93 (9,7%)	4/52 (7,7%)	13/145 (9%)
H. SON DURETA	4/59 (6,8%)	6/44 (13,6%)	10/103 (9,7%)
CHUAC	1/10 (10%)	0/8 (0%)	1/18 (5,6%)

El porcentaje global de aislamientos de *S.aureus* causantes de infección portadores de la LPV fue del 16,4%.

El análisis de la distribución de la LPV en los aislamientos causantes de infección en función de la sensibilidad a la meticilina y de la adquisición se muestra en la tabla 20, donde se observa que el porcentaje de cepas portadoras de LPV fue mayor en los aislamientos asociados a la comunidad independientemente de la sensibilidad a meticilina.

TABLA 20: PORCENTAJE DE LOS AISLAMIENTOS DE *S. AUREUS* CAUSANTES DE INFECCIÓN PORTADORES DE LA LPV EN FUNCIÓN DE LA ADQUISICIÓN Y DE LA SENSIBILIDAD A METICILINA

	COMUNIDAD	SISTEMA SANITARIO	p
SARM	16/23 (69,6%)	4/14 (28,6%)	P=0,016
SASM	43/233 (18,5%)	8/162 (4,9%)	P<0,001

Las características demográficas de los niños afectados por una infección por *S.aureus* se describen en la tabla 21. La edad media de los 432 niños fue de de 53,46 ($\pm 55,79$) meses, 248 eran varones (57,4%), y 294 eran niños de origen español (68,1%).

TABLA 21. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DE LOS NIÑOS CON INFECCIONES POR *S.AUREUS*

EDAD (meses)	
-Media (\pm DE)	53,46 ($\pm 55,79$)
-Mediana (p25-p75)	35,0 (5,0-89,0)
PROCEDENCIA	
-Español	294 (68,1%)
-Origen extranjero	138 (31,9%)
SEXO	
-Varón	248 (57,4%)
-Mujer	184 (42,6%)

4.1. Comparación de las infecciones por *S.aureus* asociadas a la comunidad y al sistema sanitario

Con el objetivo de conocer si existían diferencias entre las infecciones por *S. aureus* asociadas a la comunidad y al sistema sanitario, se compararon las características demográficas, clínicas y microbiológicas de ambos grupos de pacientes (Tabla 22 y Figura 25). De la comparación es destacable el hecho de que ambos grupos de infecciones presentaron porcentajes similares de resistencia a meticilina, 9% para las infecciones AC y 8% para las infecciones ASS ($p=0,707$).

Las infecciones asociadas a la comunidad se caracterizaron por afectar a una población de edad significativamente mayor (media: 58,4 [$\pm 54,68$] vs. 46,17 [$\pm 56,76$] meses, y mediana: 43,0 [12-93] vs. 13,0 [1-84] meses, $p=0,025$). En cuanto a las características clínicas, destacaba que el 76,2% de las infecciones por *S.aureus* AC fueron IPTBs, frente al 28,4% de las infecciones asociadas al sistema sanitario ($p<0,001$), y estas diferencias se observaban tanto en las IPTBs más profundas (celulitis y abscesos) como en las infecciones superficiales de la piel. Por otra parte, también se observó que las infecciones AC se diagnosticaron con mayor frecuencia (67,6%) en el servicio de urgencias pediátricas que las infecciones ASS (21,6%), $p<0,001$. En cuanto a las características microbiológicas destaca, que los aislamientos de *S.aureus* causantes de infecciones AC fueron más frecuentemente portadores de la toxina LPV (23,0% vs. 6,8%, $p<0,001$).

Las infecciones por *S.aureus* ASS afectaron a niños de edad significativamente inferior que las infecciones AC, y los síndromes clínicos fueron totalmente distintos. Las infecciones de herida quirúrgica (29% vs. 0%, $p<0,001$), las bacteriemias (18,8% vs. 7%, $P<0,001$), y las infecciones respiratorias (6,3% vs 2%,

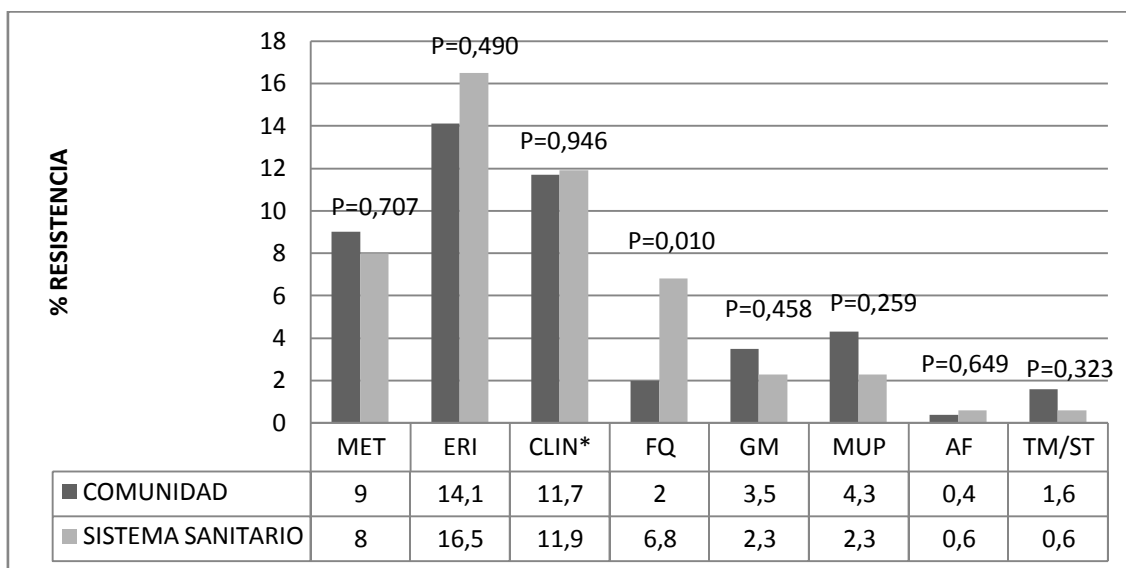
p=0,020) fueron las entidades clínicas más frecuentemente ASS, siendo las infecciones de herida quirúrgica el tipo de infección más representado (29%).

En cuanto a las resistencias a los antibióticos, los porcentajes de resistencia fueron muy similares en ambos grupos, con excepción de una mayor resistencia a las fluoroquinolonas en las cepas causantes de infecciones ASS (6,8% vs. 2%, p=0,010).

TABLA 22: COMPARACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS, CLÍNICAS Y MICROBIOLÓGICAS DE LAS INFECCIONES CAUSADAS POR *S.AUREUS* EN NIÑOS EN FUNCIÓN DE LA ADQUISICIÓN

	COMUNIDAD N=256	SISTEMA SANITARIO N=176	P
HOSPITALES			
H.12 de Octubre	94 (36,7%)	72 (40,9%)	0,379
H. Vall d'Hebron	93 (36,3%)	52 (29,5%)	0,142
H.Son Dureta	59 (23,0%)	44 (25,0%)	0,640
CHUAC	10 (3,9%)	8 (4,5%)	0,744
EDAD (MESES)			
-Media (\pm DE)	58,4 (\pm54,68)	46,17 (\pm 56,76)	0,025
-Mediana (p25-p75)	43,0 (12,0-93,0)	13,0 (1,0-84,0)	
Sexo varón	141 (55,7%)	107 (60,8%)	0,238
Origen extranjero	82 (32,0%)	56 (31,8%)	0,962
Servicio de urgencias	173 (67,6%)	38 (21,6%)	<0,001
SARM	23 (9,0%)	14 (8,0%)	0,707
LPV	59 (23,0%)	12 (6,8%)	<0,001
TIPOS DE INFECCIÓN			
Infecciones piel y tejidos blandos	195 (76,2%)	50 (28,4%)	<0,001
-Infecciones profundas (abscesos y celulitis)	98 (38,3%)	20 (11,4%)	<0,001
-Infecciones superficiales	97 (37,9%)	30 (17,0%)	<0,001
Infecciones de la herida quirúrgica	0	51 (29,0%)	<0,001
Bacteriemia	18 (7,0%)	33 (18,8%)	<0,001
Infecciones osteoarticulares	6 (2,3%)	3 (1,7%)	0,463
Infecciones respiratorias	5 (2,0%)	11 (6,3%)	0,020
Otitis	25 (9,8%)	13 (7,4%)	0,391
Infecciones oculares	12 (4,7%)	13 (7,4%)	0,238
Otros	2 (0,8%)	8 (4,5%)	0,013

FIGURA 25: DISTRIBUCIÓN DEL PATRÓN DE RESISTENCIAS EN FUNCIÓN DE LA ADQUISICIÓN



*Resistencia a clindamicina constitutiva e inducible. D-test positivos → AC :25/31 (80,6%), ASS: 17/26 (65,4%), p=0,196

MET: Meticilina

ERI: Eritromicina

CLIN: Clindamicina

FQ: Fluoroquinolonas

GM: Gentamicina

MUP: Mupirocina

AF: Ácido Fusídico

TM/ST: Trimetoprim/Sulfametoxazol

4.2. Comparación de las infecciones causadas por SARM y SASM

Con el objetivo de estudiar si existían ciertas características que pudieran estar asociadas a las infecciones por SARM, se compararon las características demográficas, clínicas, y microbiológicas de este tipo de infecciones con las características de aquellas producidas por SASM. En la tabla 23 se muestra esta comparación y se observan algunas diferencias estadísticamente significativas entre las que se encuentran el origen de los niños y el tipo de infección. En cuanto a las características microbiológicas se observaron diferencias en la presencia de LPV y en el patrón de resistencia a los antimicrobianos (Figura 26).

Las infecciones causadas por SARM afectaron en un porcentaje significativamente mayor a niños de origen extranjero (48,6% vs. 30,4%, $p=0,022$). En cuanto al tipo de infección, aunque globalmente las IPTBs eran similares en ambos grupos, las IPTBs más profundas, como los abscesos y celulitis, se asociaban con más frecuencia a las infecciones por SARM (45,9% vs. 25,6%, $p=0,007$). También se observó una mayor frecuencia de infecciones respiratorias en el grupo de SARM (16,2% vs. 2,5%, $p=0,001$). Las infecciones de herida quirúrgica sin embargo, se encontraron con más frecuencia asociadas a las infecciones por SASM (12,7% vs. 2,7%, $p=0,049$).

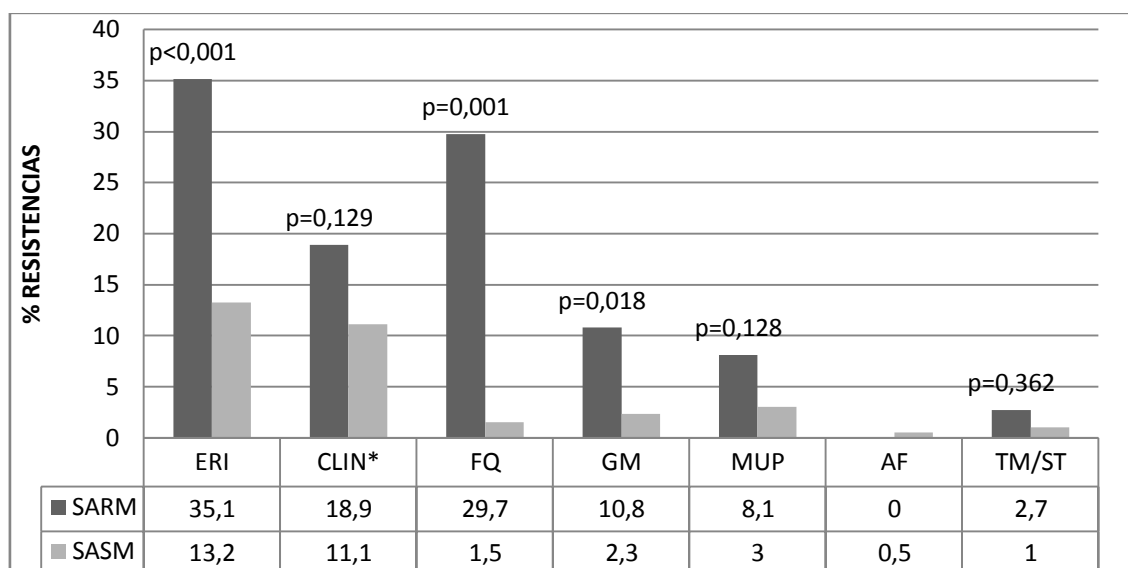
En cuanto a las características microbiológicas, los aislamientos de SARM fueron más frecuentemente portadores de la toxina LPV (54,1%) que los aislamientos de SASM (12,9%), ($p=0,001$).

En cuanto al patrón de resistencias, en la figura 28 queda reflejado que los aislamientos de SARM, eran en general más resistentes a todos los antibióticos estudiados que los aislamientos de SASM, y de forma significativa a la eritromicina (35,1% vs. 13,2%, $p<0,001$), a las fluoroquinolonas (29,7% vs. 1,5%, $p=0,001$), y a la gentamicina (10,8% vs. 2,3%, $p=0,018$). Es importante resaltar, que aunque la resistencia a clindamicina fue similar en las cepas de SARM y SASM, la presencia de resistencia inducible a clindamicina (fenotipo MLS_B) fue mayor en las cepas de SASM (81,3%) que en las cepas de SARM (33,3%), $p=0,007$.

TABLA 23: COMPARACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS, CLÍNICAS Y MICROBIOLÓGICAS DE LAS INFECCIONES CAUSADAS POR *S.AUREUS* EN FUNCIÓN DE LA RESISTENCIA A METICILINA

	SARM N=37	SASM N=395	P
EDAD (MESES)			
-Media (\pm DE)	55,98 (\pm 65,3%)	53,23 (\pm 54,89)	0,774
-Mediana (p25-p75)	27,0 (10,0-76,0)	35,0 (5,0-92,0)	
Sexo varón	18 (48,6%)	230 (58,2%)	0,260
Origen extranjero	18 (48,6%)	120 (30,4%)	0,022
ADQUISICIÓN			
Comunidad	23 (62,2%)	233 (59,0%)	0,707
Sistema sanitario	14 (37,8%)	162 (41,0%)	
Servicio de urgencias	21 (56,8%)	190 (48,1%)	0,314
LPV	20 (54,1%)	51 (12,9%)	0,001
TIPOS DE INFECCIÓN			
Infecciones piel y tejidos blandos	23 (62,2%)	222 (56,2%)	0,484
-Infecciones profundas (abscesos y celulitis)	17 (45,9%)	101 (25,6%)	0,007
-Infecciones superficiales	6 (16,3%)	121 (30,6%)	0,065
Infecciones herida quirúrgica	1 (2,7%)	50 (12,7%)	0,049
Bacteriemia	3 (8,1%)	48 (12,2%)	0,339
Infecciones osteoarticulares	0	9 (2,3%)	0,443
Infecciones respiratorias	6 (16,2%)	10 (2,5%)	0,001
Otitis	3 (8,1%)	35 (8,9%)	0,586
Infecciones oculares	1 (2,7%)	24 (6,1%)	0,348
Otros	1(2,7%)	9 (2,3%)	0,595

FIGURA 26: DISTRIBUCIÓN DEL PATRÓN DE RESISTENCIAS EN FUNCIÓN DE LA RESISTENCIA A METICILINA



*Resistencia a clindamicina constitutiva e inducible. D-test positivo → SARM: 3/9 (33,3%), SASM: 39/48 (81,3%), p=0,007

4.3. Comparación de las infecciones asociadas a la comunidad y al sistema sanitario en función de la resistencia a meticilina

La comparación de las características de las infecciones causadas por *S.aureus* asociadas a la comunidad y al sistema sanitario nos permitió observar que una serie de variables se asociaban de forma significativa con las infecciones comunitarias (Tabla 22). De este modo, con la finalidad de conocer si estas características dependían de alguna manera de la sensibilidad a meticilina, se compararon por una parte, las infecciones causadas por SARM-AC con las causadas por SARM-ASS por otra, las infecciones causadas por SASM-AC con las causadas por SASM-ASS, y por otro lado, se compararon las infecciones AC en función de la resistencia a meticilina (SARM-AC con SASM-AC) y las infecciones ASS en función de la resistencia a meticilina (SARM-ASS con SASM-ASS).

4.3.1. Características de las infecciones causadas por SARM en función de la adquisición

La comparación de las características demográficas, clínicas y microbiológicas de las infecciones causadas por SARM-AC con las producidas por SARM-ASS se muestra en la tabla 24 y en la figura 27, donde se observa que no existieron diferencias significativas en cuanto a las características demográficas de los niños (edad, sexo, y país de origen). Sin embargo, si se encontraron diferencias significativas en cuanto al tipo de infección, el servicio de diagnóstico, la presencia de la toxina LPV y en el patrón de resistencias a los antimicrobianos.

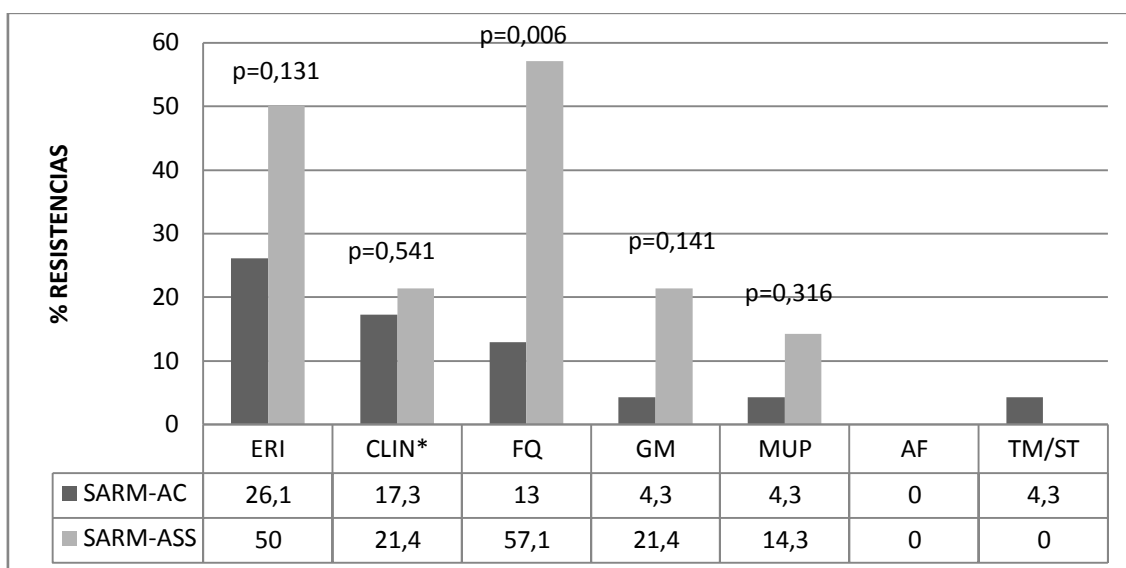
Las infecciones producidas por SARM-AC eran más frecuentemente diagnosticadas en el servicio de urgencias (73,9% vs. 28,6%, $p=0,007$) y causaban con mayor frecuencia IPTBs (87% vs. 21,4%, $p=0,001$), en particular infecciones profundas como abscesos y celulitis (73,9% vs. 0%, $p<0,001$). Los aislamientos de SARM-ASS sin embargo, se asociaban significativamente con las infecciones respiratorias (35,7% vs. 4,3%, $p=0,021$).

En cuanto a las características microbiológicas, los aislamientos de SARM-AC producían con más frecuencia la toxina LPV (69,6% vs. 28,6%, $p=0,016$) y en cuanto al patrón de resistencias, como se muestra en la figura 27, ambos grupos eran muy similares, con excepción de una menor resistencia a las fluoroquinolonas en las cepas de SARM-AC (13% vs. 57,1%, $p=0,006$).

TABLA 24: COMPARACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS, CLÍNICAS Y MICROBIOLÓGICAS DE LAS INFECCIONES CAUSADAS POR SARM-AC Y SARM-ASS.

	SARM-AC N=23	SARM-ASS N=14	P
EDAD (MESES)			
-Media (±DE)	64,39 (±68,52)	42,17 (±59,66)	0,323
-Mediana(p25-p75)	40 (14,0-84,0)	7,0 (0,5-72,0)	
Sexo varón	11 (47,8%)	7 (50,0%)	0,899
Origen extranjero	14 (60,9%)	4 (28,6%)	0,060
Servicio de urgencias	17 (73,9%)	4 (28,6%)	0,007
LPV	16 (69,6%)	4 (28,6%)	0,016
TIPOS DE INFECCIÓN			
Infecciones de piel y tejidos blandos	20 (87%)	3 (21,4%)	0,001
-Infecciones profundas (abscesos y celulitis)	17 (73,9%)	0	0,001
-Infecciones superficiales	3 (13,1%)	3 (21,4%)	0,653
Infecciones de herida quirúrgica	0	1 (7,1%)	0,378
Bacteriemia	2 (8,7%)	1 (7,1%)	0,683
Infecciones osteoarticulares	0	0	
Infección respiratoria	1 (4,3%)	5 (35,7%)	0,021
Otitis	1 (4,3%)	2 (14,3%)	0,316
Infecciones oculares	0	1 (7,1%)	0,378
Otros	0	1 (7,1%)	0,378

FIGURA 27: DISTRIBUCIÓN DEL PATRÓN DE RESISTENCIAS DE LOS AISLAMIENTOS DE SARM EN FUNCIÓN DE LA ADQUISICIÓN.



*Resistencia a clindamicina constitutiva e inducible. . D-test positivo → SARM-AC: 1/3 (33,3%), SARM-ASS: 2/6 (33,3%), p=0,761.

4.3.2. Características de las infecciones causadas por SARM en función de la adquisición

La comparación de las características de las infecciones causadas por SARM-AC con las producidas por SARM-ASS se muestra en la tabla 25 y en la figura 28, donde se observan diferencias estadísticamente significativas en la edad de los pacientes, el servicio de diagnóstico, el tipo de infección, y en la presencia de la toxina LPV.

Las infecciones producidas por SARM-AC se caracterizaron por afectar a una población de edad significativamente mayor, que las causadas por SARM-ASS (media: 57,86 meses [±53,26] vs. 46,52 [±56,68] y mediana: 43,0 [12-93] vs. 14,5 [1-88] meses, p=0,044). Las infecciones por SARM-AC eran con más frecuencia diagnosticadas en el servicio de urgencias (67,0% vs. 21%, p<0,001), causaban más frecuentemente IPTBs (75,1% vs. 29,0%, p<0,001), tanto infecciones superficiales (40,4% vs. 16,7%, p<0,001) como profundas (34,8% vs. 12,3%, p<0,001), y eran portadoras de la toxina LPV en un

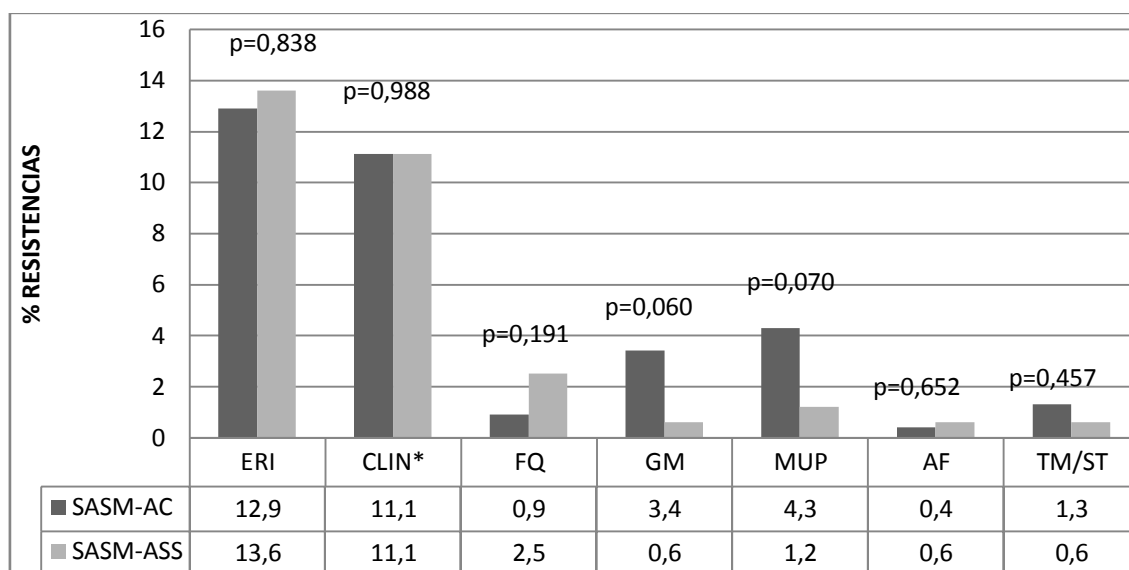
porcentaje significativamente mayor que las causadas por SASM-ASS (18,5% vs. 4,9%, $p<0,001$).

En contraste, las infecciones causadas por aislamientos de SASM-ASS causaban más frecuentemente bacteriemia (19,8% vs. 6,9%, $p<0,001$) e infecciones de la herida quirúrgica (30,9% vs. 0%, $p<0,001$).

TABLA 25: COMPARACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS, CLÍNICAS Y MICROBIOLÓGICAS DE LAS INFECCIONES CAUSADAS POR SASM-AC Y SASM-ASS

	SASM-AC N= 233	SASM-ASS N=162	P
EDAD (MESES)			
-Media (\pm DE)	57,86 (\pm53,26)	46,52 (\pm 56,68)	0,044
-Mediana(p25-p75)	43,0 (12,0-93,0)	14,5 (1,0-88,0)	
Sexo varón	130 (55,8%)	11 (6,7%)	0,240
Origen extranjero	68 (29,2%)	52 (32,1%)	0,536
Servicio de urgencias	156 (67,0%)	34 (21,0%)	<0,001
LPV	43 (18,5%)	8 (4,9%)	<0,001
TIPOS DE INFECCIÓN			
Infecciones de piel y tejidos blandos	175 (75,1%)	47 (29,0%)	<0,001
-Infecciones profundas (Abscesos y celulitis)	81 (34,8%)	20 (12,3%)	<0,001
-Infecciones superficiales	94 (40,4%)	27 (16,7%)	<0,001
Infecciones de herida quirúrgica	0	50 (30,9%)	<0,001
Bacteriemia	16 (6,9%)	32 (19,8%)	<0,001
Infecciones osteoarticulares	6 (2,6%)	3 (1,9%)	0,456
Infecciones respiratorias	4 (1,7%)	6 (3,7%)	0,180
Otitis	24 (10,3%)	11 (6,8%)	0,227
Infecciones oculares	12 (5,2%)	12 (7,4%)	0,356
Otros	2 (0,9%)	7 (4,3%)	0,027

FIGURA 28: DISTRIBUCIÓN DEL PATRÓN DE RESISTENCIAS DE LOS AISLAMIENTOS DE SASM EN FUNCIÓN DE LA ADQUISICIÓN



*Resistencia a clindamicina constitutiva e inducible. . D-test positivo → SASM-AC: 24/28 (85,7%), SASM-ASS: 15/20 (75,0%), p=0,284.

4.3.3. Características de las infecciones asociadas a la comunidad en función de la resistencia a meticilina

Con el objetivo de conocer las características clínicas, demográficas y microbiológicas de las infecciones asociadas a la comunidad en función de la resistencia a meticilina, se compararon las características de las infecciones causadas por SARM-AC con las producidas por SASM-AC (Tabla 26 y Figura 29). La comparación mostró que existían diferencias estadísticamente significativas en el origen de los pacientes, el tipo de infección, la presencia de LPV y el patrón de resistencias.

Las infecciones producidas por SARM-AC se caracterizaron por afectar en un porcentaje significativamente mayor a una población de origen extranjero (60,9% vs. 29,2%, p=0,001) y eran más frecuentemente IPTBs profundas (73,9% vs. 34,8%, p<0,001).

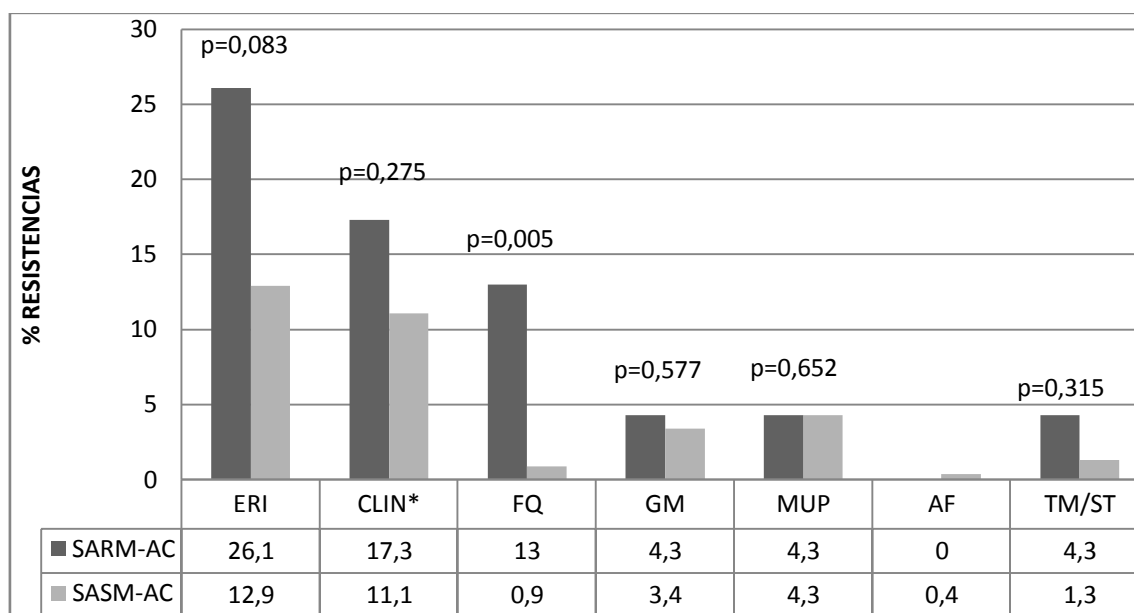
En lo que a las características microbiológicas se refiere, los aislamientos de SARM-AC eran portadores de la toxina LPV en un porcentaje significativamente mayor que los aislamientos de SASM-AC (69,6% vs. 18,5%, $p<0,001$) y presentaban un porcentaje de resistencias a fluoroquinolonas mayor (13,0% vs. 0,9%, $p=0,005$).

En cambio, los aislamientos de SASM-AC causaban más frecuentemente IPTBs superficiales (40,3% vs. 13,0%, $p<0,010$) que los aislamientos de SARM-AC.

TABLA 26: COMPARACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS, CLÍNICAS Y MICROBIOLÓGICAS DE LAS INFECCIONES CAUSADAS POR SARM-AC Y SASM-AC

	SARM-AC N=23	SASM-AC N=233	P
EDAD (MESES)			
-Media (\pm DE)	64,39 (\pm 68,5)	57,86 (\pm 53,26)	0,585
-Mediana(p25-p75)	40,0 (14,0-84,0)	43,0 (12,0-93,0)	
Sexo varón	11 (47,8%)	130 (55,8%)	0,464
Origen extranjero	14 (60,9%)	68 (29,2%)	0,001
Servicio de urgencias	17 (73,9%)	156 (67,0%)	0,497
LPV	16 (69,6%)	43 (18,5%)	<0,001
TIPOS DE INFECCIÓN			
Infecciones de piel y tejidos blandos	20 (87,0%)	175 (75,1%)	0,204
-Infecciones profundas (Abscesos y celulitis)	17 (73,9%)	81 (34,8%)	<0,001
-Infecciones superficiales	3 (13,0%)	94 (40,3%)	0,010
Infecciones de herida quirúrgica	0	0	--
Bacteriemia	2 (8,7%)	16 (6,9%)	0,496
Infecciones osteoarticulares	0	6 (2,6%)	0,565
Infecciones respiratorias	1 (4,3%)	4 (1,7%)	0,377
Otitis	1 (4,3%)	24 (10,3%)	0,314
Infecciones oculares	0	12 (5,2%)	0,314
Otros	0	2 (0,9%)	0,828

FIGURA 29: DISTRIBUCIÓN DEL PATRÓN DE RESISTENCIAS DE LOS AISLAMIENTOS ASOCIADOS A LA COMUNIDAD EN FUNCIÓN DE LA RESISTENCIA A METICILINA



*Resistencia a clindamicina constitutiva e inducible. D-test positivo → SARM-AC: 1/3 (33,3%), SASM-AC: 24/28 (85,7%),

p=0,087

4.3.4. Características de las infecciones asociadas al sistema sanitario en función de la resistencia a meticilina

La comparación de las características demográficas, clínicas y microbiológicas de las infecciones causadas por SARM-ASS con las producidas por SASM-ASS se muestra en la tabla 27 y en la figura 30, donde se observa que no existían diferencias significativas en cuanto a las características demográficas de los niños (edad, sexo, y país de origen). Sin embargo, si existían diferencias significativas en cuanto al tipo de infección, la presencia de la toxina LPV y en el patrón de resistencias a los antimicrobianos.

Las infecciones producidas por SARM-ASS causaron con mayor frecuencia infecciones respiratorias que las producidas por SASM-ASS (35,7% vs. 3,7%, $p < 0,001$).

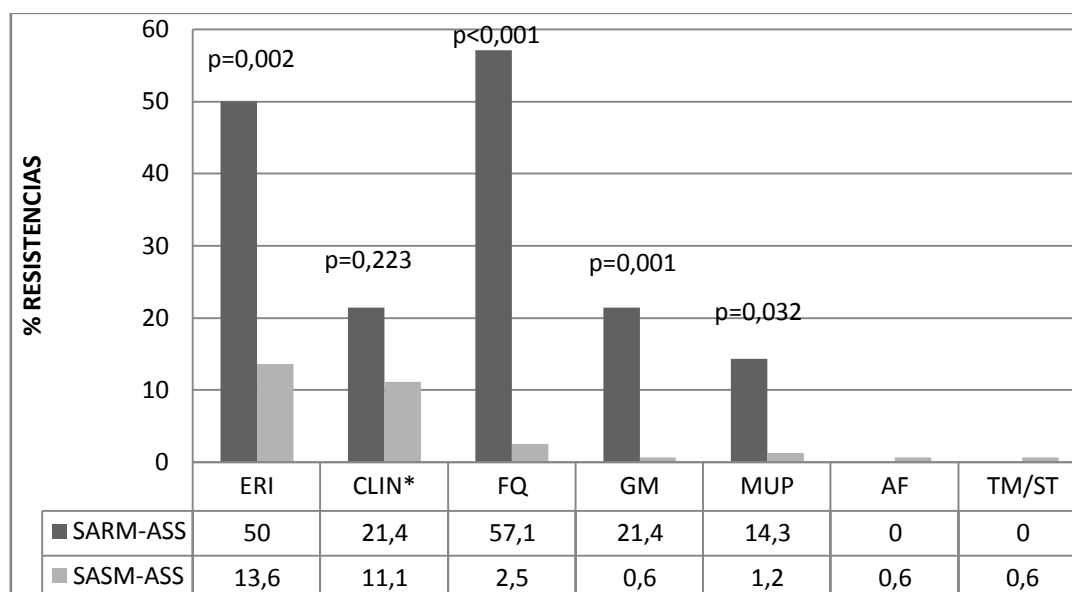
En cuanto a las características microbiológicas, los aislamientos de SARM-ASS producían con más frecuencia la toxina LPV (28,6% vs. 4,9%, $p = 0,008$) y en

cuanto al patrón de resistencias, como se muestra en la figura 30, los aislamientos de SARM-ASS fueron más resistentes a la eritromicina (50% vs. 13,6%, $p=0,002$), a las fluoroquinolonas (57,1% vs. 2,5%, $p<0,001$), a la gentamicina (21,4% vs. 0,6%, $p=0,001$) y a la mupirocina (14,3% vs. 1,2%, $p=0,032$).

TABLA 27: COMPARACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS, CLÍNICAS Y MICROBIOLÓGICAS DE LAS INFECCIONES CAUSADAS POR SARM-ASS Y SASM-ASS

	SARM-ASS N=14	SASM-ASS N=162	P
EDAD (MESES)			
-Media (\pm DE)	42,1 (\pm 59,66)	46,52 (\pm 56,68)	0,784
-Mediana(p25-p75)	7 (0,5-72,0)	14,5 (1,0-88,0)	
Sexo varón	7 (50,0%)	100 (61,7%)	0,389
Origen extranjero	4 (28,6%)	52 (32,1%)	0,523
Servicio de urgencias	4 (28,6%)	34 (21,0%)	0,355
LPV	4 (28,6%)	8 (4,9%)	0,008
TIPOS DE INFECCIÓN			
Infecciones de piel y tejidos blandos	3 (21,4%)	47 (29,0%)	0,398
-Infecciones profundas (Abscesos y celulitis)	0	20 (12,3%)	0,172
-Infecciones superficiales	3 (21,4%)	27 (16,6%)	0,438
Infecciones de herida quirúrgica	1 (7,1%)	50 (30,9%)	0,048
Bacteriemia	1 (7,1%)	32 (19,8%)	0,219
Infecciones osteoarticulares	0	3 (1,9%)	0,778
Infecciones respiratorias	5 (35,7%)	6 (3,7%)	<0,001
Otitis	2 (14,3%)	11 (6,8%)	0,276
Infecciones oculares	1 (7,1%)	12 (7,4%)	0,673
Otros	2 (14,3%)	11 (6,8%)	0,276

FIGURA 30: DISTRIBUCIÓN DEL PATRÓN DE RESISTENCIAS DE LOS AISLAMIENTOS ASOCIADOS AL SISTEMA SANITARIO EN FUNCIÓN DE LA RESISTENCIA A METICILINA



*Resistencia a clindamicina constitutiva e inducible. D-test positivo → SARM-ASS: 2/6 (33,3%), SASM-ASS: 15/20 (75,0%), p=0,084.

4.4. Comparación de las infecciones causadas por cepas portadoras y no portadoras de la toxina LPV

De los estudios anteriores observamos que los aislamientos que causaron infecciones asociadas a la comunidad en población pediátrica, independientemente de la sensibilidad a meticilina, se diagnosticaron más frecuentemente en el servicio de urgencias, causaron fundamentalmente IPTBs, y fueron portadoras de la toxina LPV en un porcentaje significativamente mayor que los que causaban infecciones asociadas al sistema sanitario. En el caso de SARM-AC el porcentaje de aislamientos que fueron portadores de la LPV era muy elevado (69,6%) y eran la causa de un elevadísimo número de infecciones profundas de piel y tejidos blandos (73,9%). Con el objetivo de conocer la posible implicación de la LPV en este tipo de cuadros clínicos, se

compararon las infecciones causadas por aislados productores de la LPV y no productores de la misma (Tabla 28 y Figura 31).

Las infecciones causadas por aislamientos portadores de la LPV se observaron en un porcentaje significativamente mayor en niños de origen extranjero (43,7% vs. 29,6%, $p=0,020$) y fueron infecciones en su mayoría asociadas a la comunidad (83,1% vs. 54,6%, $p<0,001$) y al servicio de urgencias (64,8% vs. 45,7%, $p=0,003$). En cuanto al tipo de infección, las cepas productoras de la LPV causaron un porcentaje significativamente mayor de IPTBs que las cepas no productoras de la toxina (87,3% vs. 50,7%, $p<0,001$) y de estas, eran las infecciones profundas (abscesos y celulitis) las que se asociaron significativamente a las cepas portadoras de la LPV (67,6% vs. 19,4%, $p<0,001$).

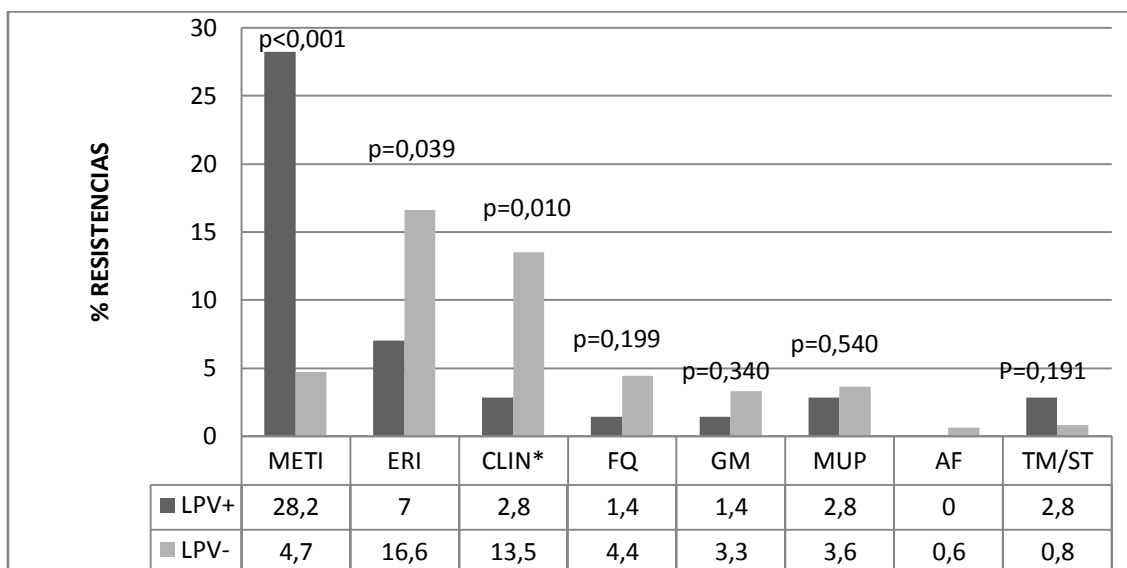
Los aislados no portadores de la LPV fueron más frecuentemente causa de bacteriemia (13,3% vs. 4,2%, $p=0,030$), de infecciones de la herida quirúrgica (14,1% vs. 0%, $p<0,001$) y de otitis (10,2% vs. 1,4%, $p=0,016$) que los que producían la toxina. Además, los aislamientos LPV negativos, a pesar de causar un porcentaje significativamente inferior de IPTBs que los aislamientos portadores de la toxina, se asociaron de forma significativa a las IPTBs superficiales (31,3% vs. 19,7%, $p=0,050$).

En cuanto a las características microbiológicas, los aislamientos LPV positivos fueron más frecuentemente resistentes a metilina (28,2% vs. 4,7%, $p<0,001$). Sin embargo, presentaron porcentajes de resistencia significativamente inferiores a los de las cepas LPV negativas a la eritromicina (16,6% vs. 7%, $p=0,039$) y a la clindamicina (13,5% vs. 2,8%, $p=0,010$) (Figura 31).

TABLA 28: COMPARACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS, CLÍNICAS Y MICROBIOLÓGICAS DE LAS CEPAS PORTADORAS Y NO PORTADORAS DE LA TOXINA LPV

	LPV+ N=71	LPV- N=361	P
EDAD (MESES)			
-Media (±DE)	56,85 (±53,31)	52,79 (±56,32)	0,576
-Mediana(p25-p75)	45,0 (14,0-76,0)	31,0 (4,0-93,0)	
Sexo varón	35 (49,3%)	213 (59,0%)	0,130
Origen extranjero	31 (43,7%)	107 (29,6%)	0,020
Servicio de urgencias	46 (64,8%)	165 (45,7%)	0,003
SARM	20 (28,2%)	17 (4,7%)	<0,001
ADQUISICIÓN			
Comunidad	59 (83,1%)	197 (54,6%)	<0,001
Sistema sanitario	12 (16,9%)	164 (45,4%)	
TIPOS DE INFECCIÓN			
Infecciones de piel y tejidos blandos	62 (87,3%)	183 (50,7%)	<0,001
-Infecciones profundas (Abscesos y celulitis)	48 (67,6%)	70 (19,4%)	<0,001
-Infecciones superficiales	14 (19,7%)	113 (31,3%)	0,050
Infecciones de herida quirúrgica	0	51 (14,1%)	<0,001
Bacteriemia	3 (4,2%)	48 (13,3%)	0,030
Infecciones osteoarticulares	3 (4,2%)	6 (1,7%)	0,170
Infecciones respiratorias	3 (4,2%)	13 (3,6%)	0,505
Otitis	1 (1,4%)	37 (10,2%)	0,016
Infecciones oculares	1 (1,4%)	24 (6,6%)	0,061
Otros	0	10 (2,8%)	0,162

FIGURA 31: DISTRIBUCIÓN DEL PATRÓN DE RESISTENCIAS EN FUNCIÓN DE LA LPV



*Resistencia a clindamicina constitutiva e inducible. D-test positivo → LPV+: 1/4 (25,0%), LPV-: 41/53 (77,4%), $p=0,051$.

4.5. Comparación de las infecciones causadas por cepas LPV positivas y LPV negativas estratificando por la resistencia a meticilina

Los aislamientos portadores de la LPV eran en un elevado porcentaje resistentes a la meticilina, lo que podría ser un sesgo a la hora de atribuir a esta toxina un papel como causa de IPTBs profundas. Por ello, se analizaron las características de los aislamientos LPV positivos y negativos estratificándolas por la resistencia a meticilina, con el objetivo de comprobar si estas características se mantenían independientemente de este tipo de resistencia (Tabla 29).

Los resultados de este análisis mostraron que las únicas características que se asociaban a las cepas portadoras de LPV, independientemente de la resistencia a meticilina, fueron el origen comunitario de las cepas de *S. aureus* LPV positivas (SARM: 80,0% vs. 41,2%, $p=0,016$; SASM: 84,3% vs. 55,2%, $p<0,001$), y las infecciones profundas (abscesos y celulitis) de piel y tejidos blandos (SARM: 70,0% vs. 17,6%, $p=0,001$; SASM: 66,7 vs. 19,5%, $p<0,001$).

En cuanto al patrón de resistencias a los antibióticos, independientemente de la sensibilidad a meticilina, fueron más resistentes a los antibióticos en general, los aislamientos LPV negativos y a la eritromicina de forma significativa (SARM 58,8% vs. 15%, $p=0,006$; SASM 14,5% vs. 3,9%, $p=0,036$).

TABLA 29: COMPARACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LAS INFECCIONES CAUSADAS POR CEPAS LPV POSITIVAS Y LPV NEGATIVAS ESTRATIFICANDO POR LA RESISTENCIA A METICILINA

	SARM			SASM		
	LPV+ (N=20)	LPV- (N=17)	P	LPV+ (n=51)	LPV- (n=344)	P
EDAD (meses)						
--Media (±DE)	49,82 (±51,44)	63,23 (±79,82)	0,541	59,61 (±54,28)	52,27 (±55,0)	0,374
--Mediana (p25-p75)	33,50 (13,0-67,5)	26,0 (8,0-76,0)		56,0 (17,0-85,0)	31,0 (4,0-93,0)	
Sexo varón	9 (45,0%)	9 (52,9%)	0,634	26 (51,0%)	204 (59,3%)	0,261
Origen extranjero	10 (50%)	8 (47,1%)	0,860	21 (41,2%)	99 (28,8%)	0,072
ADQUISICIÓN						
Comunidad	16 (80,0%)	7 (41,2%)	0,016	43 (84,3%)	190 (55,2%)	<0,001
Sistema sanitario	4 (20,0%)	10 (58,8%)		8 (15,7%)	154 (44,8)	
Servicio de urgencias	16 (80,0%)	5 (29,4%)	0,002	30 (58,8%)	160 (46,5%)	0,100
TIPOS DE INFECCIÓN						
IPTBs	17 (85,0%)	6 (35,3%)	0,002	45 (88,2%)	177 (51,5%)	<0,001
--Infecciones profundas	14 (70,0%)	3 (17,6%)	0,001	34 (66,7%)	67 (19,5%)	<0,001
--Infecciones superficiales	3 (15,0%)	3 (17,6%)	1,000	11 (21,5%)	110 (32,0%)	0,132
Infecciones de herida quirúrgica	0	1 (5,9%)	0,459	0	50 (14,5%)	0,003
Bacteriemia	2 (10,0%)	1 (5,9%)	0,562	1 (2,0%)	47 (13,7%)	0,017
Infecciones osteoarticulares	0	0		3 (5,9%)	6 (1,7%)	0,094
Infecciones respiratorias	0	6 (35,3%)	0,005	3 (5,9%)	7 (2,0%)	0,126
Otitis	1 (5,0%)	2 (11,8%)	0,437	0	35 (10,2%)	0,006
Infecciones oculares	1 (5,0%)	0	0,540	0	24 (7,0%)	0,032
Otros	0	1 (5,9%)	0,459	0	9 (2,6%)	0,284
PATRÓN DE RESISTENCIA						
Eritromicina	3 (15,0%)	10 (58,8%)	0,006	2 (3,9%)	50 (14,5%)	0,036
Clindamicina*	1 (5,0%)	6 (35,2%)	0,025	0	5 (1,5%)	0,499
D-test	0	3 (42,9%)	0,416	½ (50,0%)	36/43 (83,7%)	0,327
Fluoroquinolonas	0	11 (64,7%)	<0,001	1 (2,0%)	5 (1,5%)	0,566
Gentamicina	0	4 (23,5%)	0,036	1 (2,0%)	8 (2,3%)	0,672
Mupirocina	0	3 (17,6%)	0,086	2 (3,9%)	10 (2,9%)	0,473
Ácido fusídico	0	0		0	2 (0,6%)	0,758
Trimetoprim-Sulfametoxazol	1 (5,0%)	0	0,540	1 (2,0%)	3 (0,9%)	0,420

*Resistencia constitutiva e inducible

5. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR

5.1. Estudio de los aislamientos de SARM por electroforesis en campo pulsado

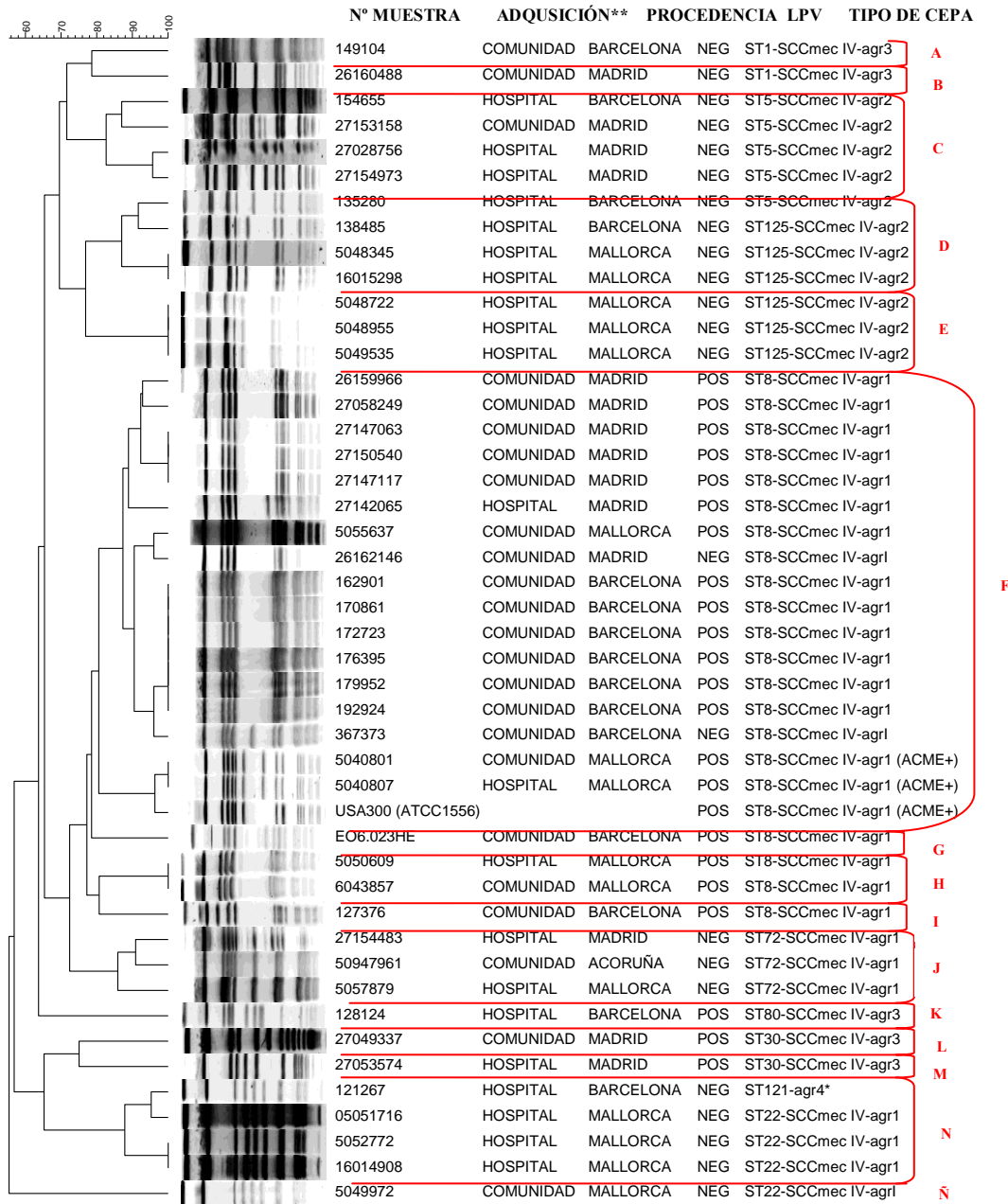
El análisis genotípico mediante ECP se realizó en los 46 aislamientos de SARM, tanto en los que causaban infecciones como en los causantes de colonizaciones. No se obtuvo el perfil electroforético de uno de los aislamientos de SARM ya que el ADN del mismo no se digería con la enzima de restricción *SmaI*, con lo que finalmente se pudo llevar a cabo el análisis molecular de 45 aislamientos de SARM. El análisis comparativo de los perfiles proporcionó, 15 genotipos o patrones electroforéticos diferentes (Figura 32) que se identificaron con letras mayúsculas de la A a la Ñ.

La mayor parte de los aislamientos se agruparon en el genotipo denominado F (n=17, 37,7%). El resto de los genotipos se encontraron con una frecuencia mucho menor. Los genotipos C, D y N agruparon 4 (8,8%) aislamientos de SARM cada uno, los genotipos E y J agruparon 3 aislamientos (6,6%), el genotipo H agrupó 2 aislamientos (4,4%), y el resto de los genotipos (A, B, G, I, K, L, M y Ñ) agruparon 1 aislamiento cada uno de ellos (2,2%).

Algunos de los genotipos presentaron subtipos, es decir aislamientos que aunque pertenecen al mismo clon presentan variaciones genéticas, que se denominaron con la letra que define al genotipo al que pertenecen y un subíndice numérico. El genotipo C presentó 4 subtipos (C₁, C₂, C₃ y C₄), el genotipo D presentó 3 subtipos (D₁, D₂ y D₃), el genotipo F, el más prevalente, presentó 9 subtipos (F₁, F₂, F₃, F₄, F₅, F₆, F₇, F₈ y F₉), el genotipo J 3 subtipos (J₁, J₂ y J₃), y el genotipo N presentó 4 subtipos (N₁, N₂, N₃ y N₄). Se realizó también ECP de la cepa USA300 (ATCC 15556), con el fin de conocer si entre los aislamientos encontrados en pacientes pediátricos en nuestro país existía

alguno con un patrón idéntico al de la cepa más prevalente en EEUU. Como se observa en la figura 32, el perfil electroforético de la cepa USA300 se agrupó en el genotipo F. Sin embargo, el perfil de bandas de ADN de esta cepa no fue exactamente igual a ninguno de los aislamientos de SARM, ya que una banda lo diferenciaba del resto de los aislamientos agrupados en el genotipo F.

FIGURA 32: DENDOGRAMA CON LOS PATRONES ELECTROFORÉTICOS DE LOS AISLAMIENTOS DE SARM. .

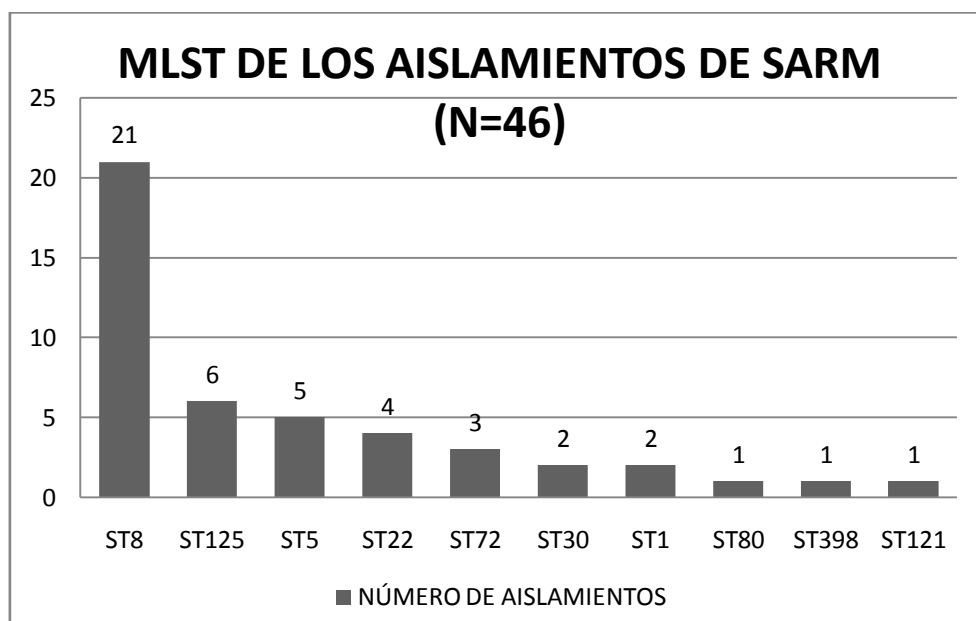


** Los aislados de adquisición "hospital" incluyen los aislados asociados al hospital y al sistema sanitario

5.2. Estudio de los aislamientos de SARM por MLST

Con el objetivo de conocer que linajes circulaban en nuestro país en la población pediátrica se realizó la técnica de MLST en todos los aislamientos de SARM (n=46). Como se observa en la figura 33, el 45,6% (n=21) de los aislamientos de SARM pertenecían al tipo de secuencia ST8, que agrupaba los genotipos de ECP F, G, H e I. Los siguientes STs encontrados con más frecuencia fueron ST125 (n=6; 13,0%) y ST5 (n=5; 10,8%), ambos pertenecientes al complejo clonal CC5. Estos aislamientos se agruparon en los genotipos de ECP C, D y E. Los 16 aislamientos de SARM restantes se consideraron minoritarios (<10%) y pertenecían a 7 diferentes tipos de ST: 4 (8,6%) pertenecían al tipo de secuencia ST22, 3 (6,5%) a ST72, 2 (4,3%) a ST30, 2 (4,3%) a ST1, 1 (2,1%) a ST80, 1 (2,1%) a ST121 (*mecA* -), y 1 (2,1%) a ST398 (cepa porcina). Este último aislamiento fue del que no se obtuvo un perfil electroforético con la técnica de ECP, ya que el ADN de esta cepa no se digiere con la enzima de restricción *Sma*I.

FIGURA 33: ESTUDIO DE LOS 46 AISLAMIENTOS DE SARM POR MLST.



5.3. Determinación del tipo de SCCmec por PCR

La determinación del tipo de SCCmec se realizó en 45 de los 46 aislamientos de SARM recogidos en el estudio. En la cepa ST121 no se realizó la técnica debido a que a pesar de ser resistente a meticilina no era portadora del gen *mecA*. El estudio mostró que todas las cepas eran portadoras del SCCmec tipo IV a excepción de la cepa ST398 (cepa porcina) que era portadora del SCCmec tipo V (Tabla 30).

TABLA 30: TIPOS DE SCCmec ASIGNADOS A LOS LINAJES DE SARM

ST	Tipo de SCCmec
ST8	SCCmecIV
ST5	SCCmecIV
ST125	SCCmecIV
ST22	SCCmecIV
ST72	SCCmecIV
ST30	SCCmecIV
ST1	SCCmecIV
ST80	SCCmecIV
ST398	SCCmecV

5.4. Estudio de los aislamientos portadores de LPV por electroforesis en campo pulsado

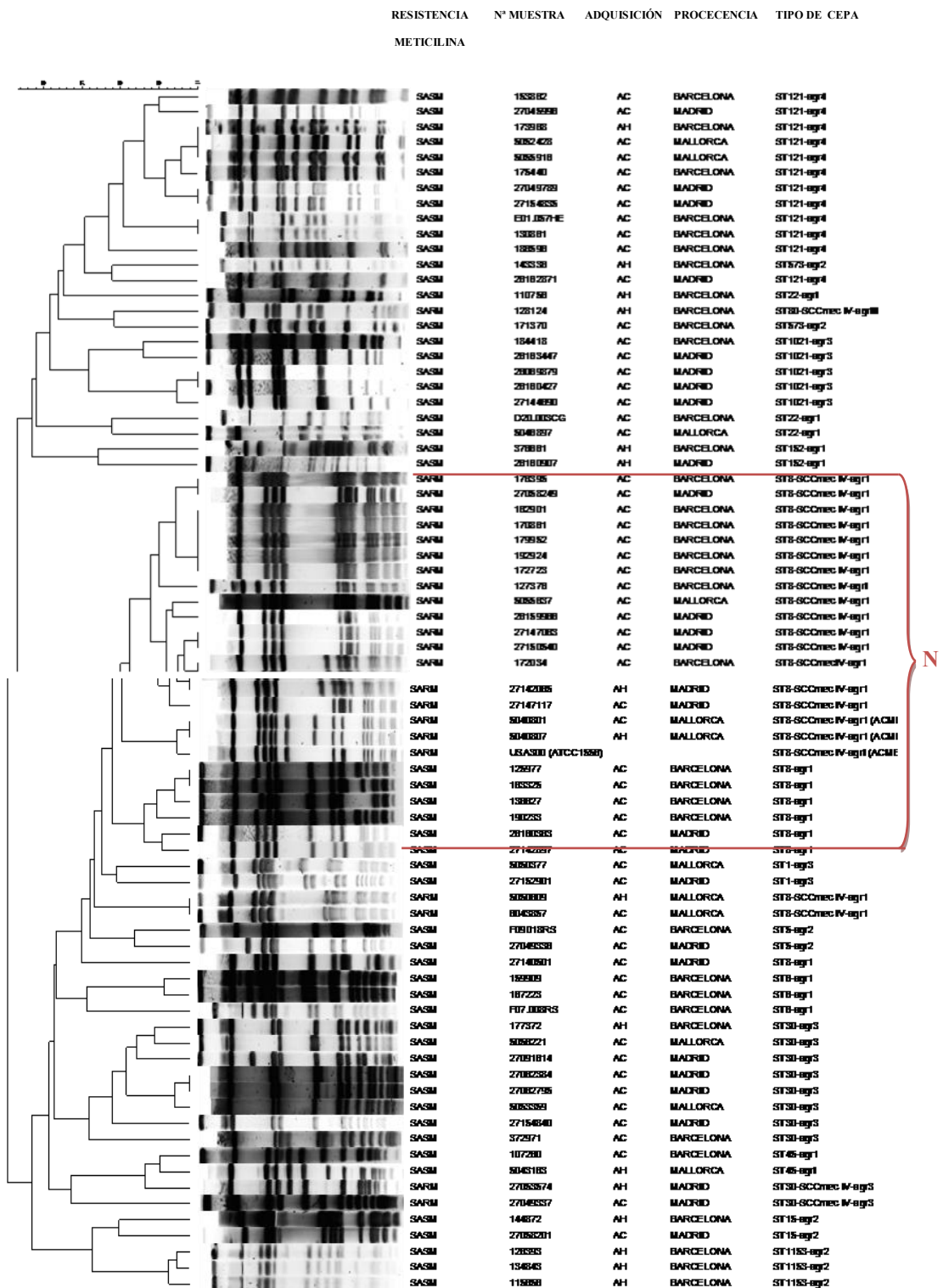
Se llevó a cabo un análisis genotípico mediante ECP en los 75 aislamientos que fueron portadores de la toxina LPV (Figura 34). El análisis comparativo de los perfiles de ADN proporcionó 27 genotipos o patrones electroforéticos diferentes que se identificaron con letras mayúsculas de la A a la Z.

El genotipo que agrupó un mayor número de aislamientos fue el genotipo N (n=23, 30,6%), seguido del genotipo A (n=10, 13,3%) y del genotipo U (n=7, 9,3%). En el resto de los genotipos se agruparon un número mucho menor de aislamientos. En los

genotipos I, W y Z se agruparon 3 aislamientos respectivamente (4,0%), en los genotipos H, P, Q, S e Y se agruparon 2 aislamientos respectivamente (2,6%), y en el resto de los genotipos (B, C, D, E, F, G, J, K, L, M, Ñ, O, R, T, V y X) se agrupó 1 aislamiento en cada uno de ellos (1,3%).

Algunos de los genotipos presentaron subtipos, que se denominaron con la letra que define al genotipo al que pertenecen y un subíndice numérico. El genotipo A presentó 6 subtipos (A₁, A₂, A₃, A₄, A₅ y A₆), el genotipo H presentó 2 subtipos (H₁ y H₂), el genotipo I presentó 2 subtipos (I₁ e I₂), el genotipo N, el más prevalente, presentó 15 subtipos (N₁ a N₁₅), en el genotipo Q encontramos 2 subtipos (Q₁ y Q₂), el genotipo S presentó 2 subtipos (S₁ y S₂), el genotipo U presentó 6 subtipos (U₁, U₂, U₃, U₄, U₅ y U₆), en el genotipo W encontramos 3 subtipos (W₁, W₂ y W₃), en el genotipo Y encontramos 2 subtipos (Y₁ e Y₂) y el genotipo Z presentó 3 subtipos (Z₁, Z₂ y Z₃).

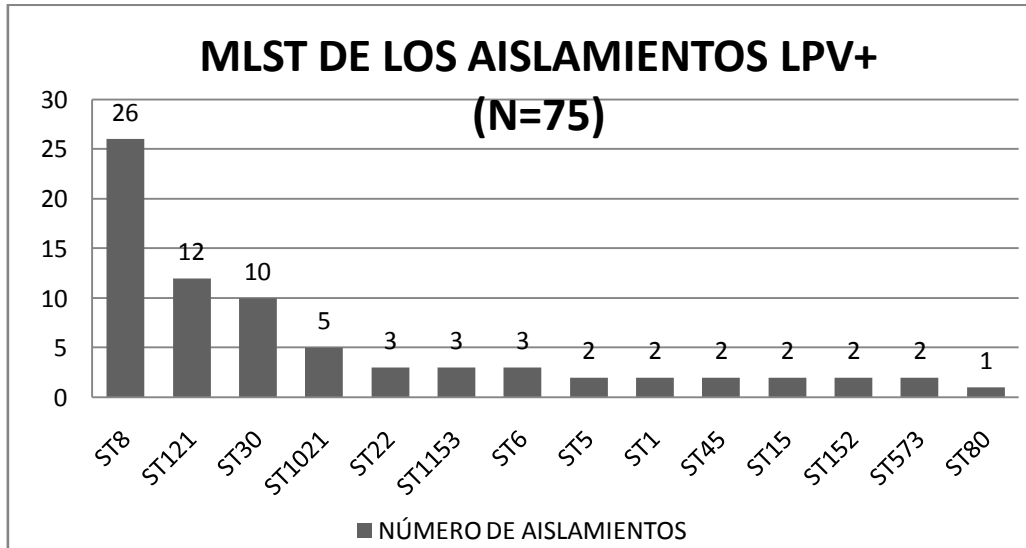
FIGURA 34: DENDOGRAMA CON LOS PATRONES ELECTROFORÉTICOS Y LAS CARACTERÍSTICAS DE LOS AISLAMIENTOS PORTADORES DE LA TOXINA LPV.



5.5. Estudio de los aislamientos portadores de la LPV por MLST

Con la finalidad de conocer a qué linajes correspondían los 75 aislamientos portadores de LPV, tanto SARM como SASM, se estudiaron mediante la técnica de MLST (Figura 35). El 34,6% pertenecían al tipo de secuencia ST8, siendo este el perfil alélico mayoritario entre los aislamientos portadores de la toxina. El 16% de los aislamientos pertenecían al linaje ST121, y el 13,3% al linaje ST30. Los 27 aislamientos de *S. aureus* restantes se consideraron minoritarios (<10%), y pertenecían a 11 diferentes tipos de secuencia: 5 (6,6%) pertenecían a ST1021, 3 (4%) a ST22, 3 (4%) a ST1153, 3 (4%) a ST6, 2 (2,6%) a ST5, 2 (2,6%) a ST1, 2 (2,6%) a ST45, 2 (2,6%) a ST15, 2 (2,6%) a ST152, y 2 (2,6%) a ST573 (2,6%), y 1 (1,3%) a ST80.

FIGURA 35: ESTUDIO DE LOS 75 AISLAMIENTOS PORTADORES DE LA LPV POR MLST

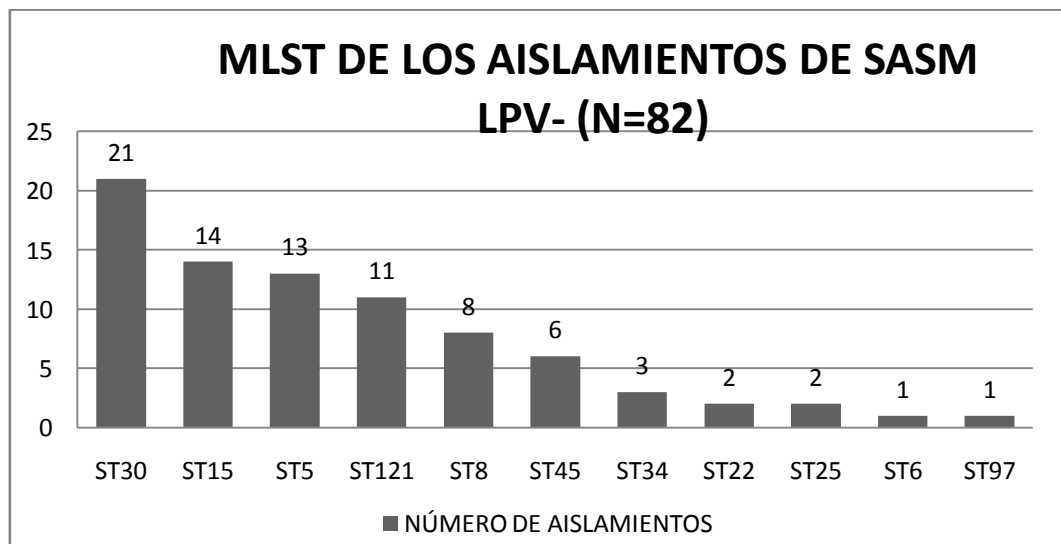


5.6. Estudio de los aislamientos de SASM no portadores de la LPV

Con el objetivo de tener una visión global de todos los linajes aislados en el estudio, y ver si algunos de los linajes correspondientes a los aislamientos LPV

positivos se encontraban también entre los aislamientos LPV negativos, se estudiaron mediante MLST una selección de 82 aislamientos de SASM LPV negativos. De estos 82 aislamientos, 45 fueron aislamientos obtenidos de hemocultivos, 27 fueron aislamientos de muestras de IPTBs, 2 aislamientos obtenidos de infecciones de herida quirúrgica, 4 obtenidos de infecciones óticas, 3 obtenidos de aspirados traqueales y 1 de un exudado oral, estos 4 últimos fueron considerados colonizaciones. Como queda reflejado en la figura 36, el perfil alélico ST30 fue el más representado dentro de este grupo (25,6%), seguido de ST15 (17,0%), ST5 (15,8%), y ST121 (13,4%). Los 23 aislamientos de SASM LPV negativos restantes se consideraron minoritarios (<10%) y pertenecían a 7 diferentes tipos de secuencias: 8 (9,7%) pertenecían a ST8, 6 (7,3%) a ST45, 3 (3,6%) a ST34, 2 (2,4%) a ST22, 2 (2,4%) a ST25, 1 (1,2%) a ST6, y 1 (1,2%) a ST 97.

FIGURA 36: ESTUDIO DE UNA SELECCIÓN DE 82 AISLAMIENTOS DE SASM NO PORTADORES DE LA LPV POR MLST



5.7. Determinación del tipo de agr por PCR

El sistema *agr* es un sistema esencial que regula la expresión de genes de virulencia. En función de las secuencias de la región hipervariable se han descrito 4 tipos de *agr*. Con el fin de conocer el tipo de *agr* que poseía cada aislamiento se determinó mediante PCR el tipo de *agr* de los 181 aislamientos estudiados por ECP y MLST (Tabla 31). En el estudio se observó que el tipo de *agr* es una característica constante de cada linaje, en la tabla 32 se muestra la correlación del tipo de *agr* con cada uno de los linajes del estudio.

TABLA 31: NÚMERO DE AISLAMIENTOS CORRESPONDIENTES A CADA TIPO DE AGR

TIPO DE AGR	NÚMERO DE AISLAMIENTOS
AGR1	65
AGR2	47
AGR3	41
AGR4	28

TABLA 32: TIPO DE AGR ASIGNADO A CADA LINAJE

ST	TIPO DE AGR
ST8	1
ST5	2
ST125	2
ST30	3
ST34	4
ST22	1
ST72	1
ST1	3
ST80	3
ST121	4
ST398	1
ST1021	3
ST1153	2
ST6	1
ST45	1
ST15	2
ST152	1
ST573	2
ST25	1
ST97	1

5.8. Estudio de los linajes de *S.aureus* en función de la resistencia a meticilina, la adquisición y la presencia de LPV

5.8.1. Comparación de los linajes de *S.aureus* en función de la resistencia a meticilina

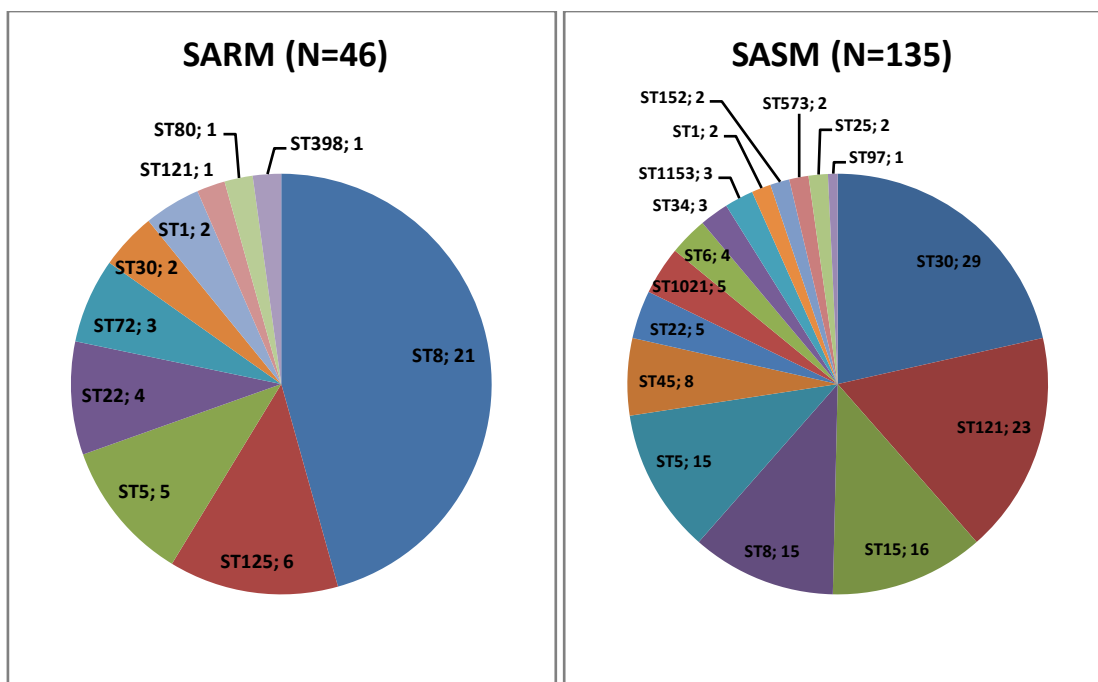
Del estudio de los aislamientos por MLST observamos que muchos de los aislamientos tanto de SARM como de SASM pertenecían al mismo ST, por ello quisimos conocer cuáles eran los STs más representados en función de la resistencia a meticilina y cuáles eran los STs que estaban representados en ambos grupos. En la figura 37 se muestran los STs asignados a los aislamientos estudiados en función de la resistencia a meticilina.

La comparación entre los perfiles alélicos de las cepas de SARM (n=46) y de SASM (n=135) mostró que los perfiles alélicos más representados en el grupo de los aislamientos de SARM eran ST8 (45,7%) y ST125 (13,0%), ambos asociados significativamente a este grupo ($p < 0,001$ respectivamente).

En el grupo de SASM los perfiles alélicos más representados fueron ST30 (21,5%), ST121 (17,0%), y ST15 (11,9%), todos ellos asociados significativamente a este grupo ($p = 0,007$, $p = 0,010$ y $p = 0,007$ respectivamente).

Algunos perfiles alélicos se encontraron representados en ambos grupos (SARM y SASM) como ST8, ST5, ST30, ST1, ST22 y ST121 (*mecA* negativo). Sin embargo, hubo linajes que únicamente se encontraban representados entre los aislamientos de SARM como ST72, ST125, ST80 y ST398 y por el contrario, los linajes ST34, ST15, ST45, ST1021, ST1153, ST6, ST152, ST97, ST573 y ST25 se encontraban representados exclusivamente en el grupo de aislamientos de SASM.

FIGURA 37: DISTRIBUCIÓN DE LOS LINAJES EN FUNCIÓN DE LA RESISTENCIA A METICILINA.



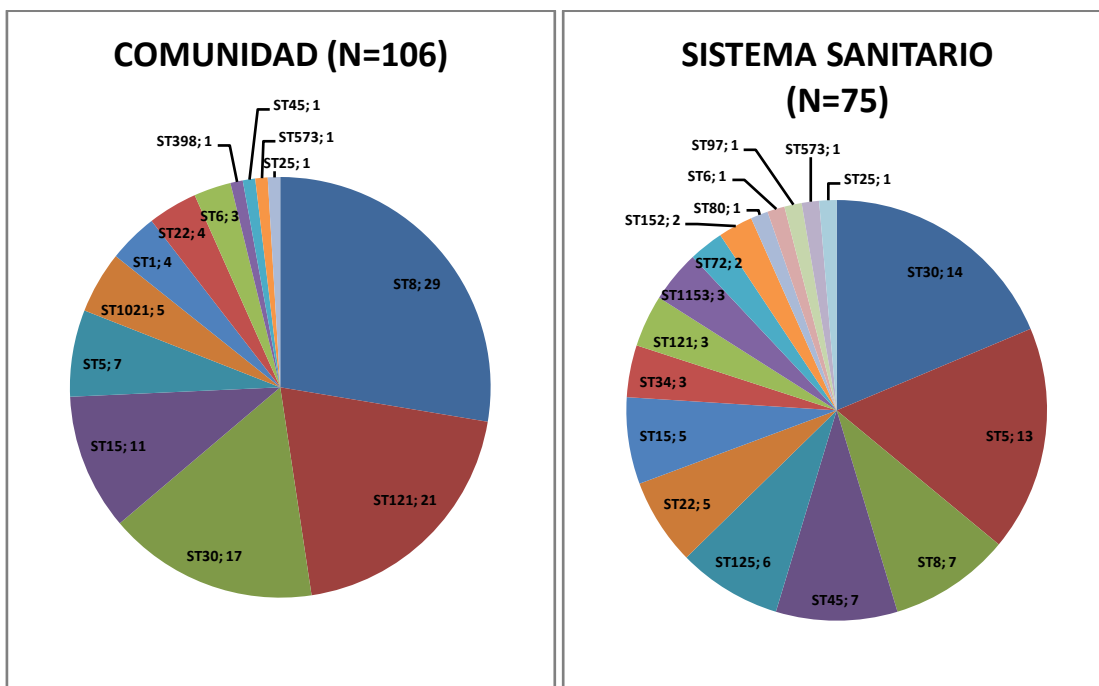
5.8.2. Comparación de los linajes de *S. aureus* en función de la adquisición

Con el objetivo de conocer que linajes circulaban causando infección y colonizando a la población pediátrica asociados a los distintos ámbitos de adquisición, se compararon los linajes de los aislamientos analizados por MLST asociados a la comunidad (106 de los 284 aislamientos totales) y los asociados al sistema sanitario (75 de los 241 aislamientos totales). En la figura 38 se muestran los STs asignados a los aislamientos estudiados en función de la adquisición. La comparación de los perfiles alélicos en función de la adquisición mostró que los perfiles alélicos más representados en el grupo de aislamientos asociados a la comunidad fueron ST8 (27,4%), ST121 (19,8%), ST30 (16,0%) y ST15 (10,4%), de estos, ST8 y ST121 son los que se asociaron a la comunidad de forma significativa ($p=0,002$ y $p=0,002$ respectivamente). Por otro lado, los perfiles alélicos que encontramos en una mayor proporción asociados

al sistema sanitario fueron ST30 (18,7%), ST5 (17,3%), ST8 (9,3%) y ST45 (9,3%), de estos, ST5 y ST45 se asociaron al sistema sanitario forma significativa ($p=0,023$ y $p=0,009$ respectivamente).

La mayor parte de los linajes, los encontramos asociados tanto a la comunidad como al sistema sanitario, aunque se encuentren más representados en uno u otro ámbito. Cabe destacar el linaje ST30 que se encontraba ampliamente distribuido en ambos ámbitos. Algunos linajes los encontramos asociados únicamente a la comunidad o al sistema sanitario pero son un reducido número de aislamientos por lo que no podemos determinar de un modo significativo que se encuentren asociadas a uno u otro ámbito, a excepción de ST125 que se asoció significativamente ($p=0,004$) al sistema sanitario y no encontramos ningún caso asociado a la comunidad.

FIGURA 38: DISTRIBUCIÓN DE LOS LINAJES EN FUNCIÓN DE LA ADQUISICIÓN



5.8.3. Comparación de los linajes de *S.aureus* en función de la LPV

Con el fin de conocer qué linajes eran portadores de la LPV y cuáles no, si existían linajes que fueran portadores de la LPV en un porcentaje significativamente mayor y qué linajes se encontraban representados en ambos grupos, se llevó a cabo la comparación entre los 75 aislamientos portadores de la LPV y 106 aislamientos de un total de 450 que no eran portadores de la toxina (Figura 39).

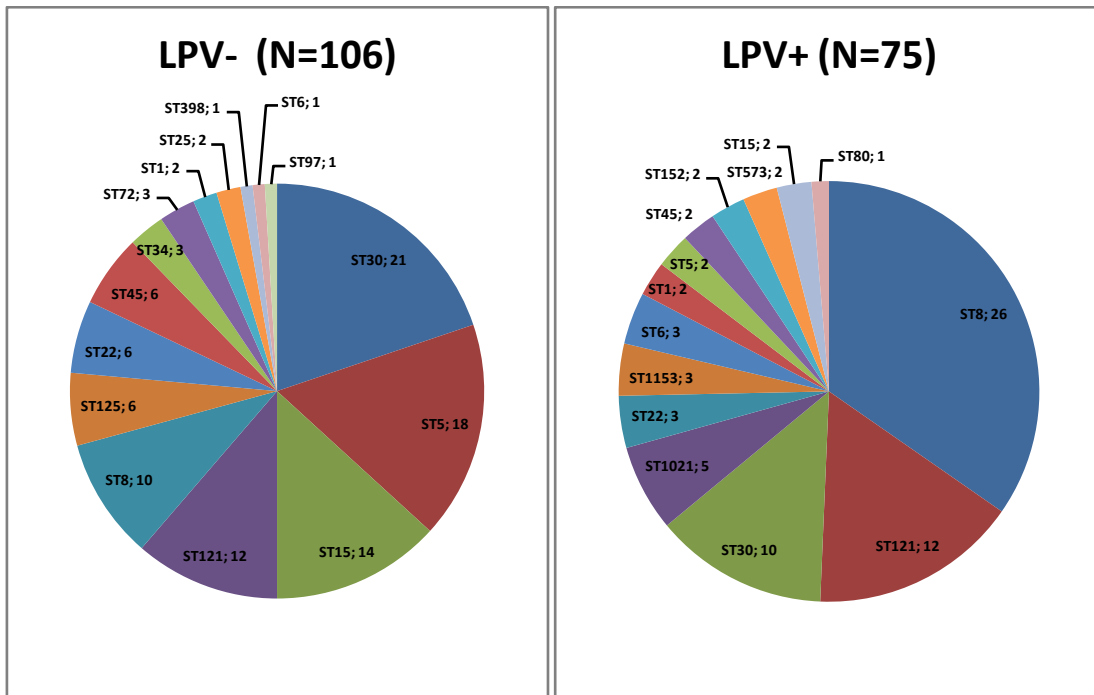
La comparación mostró que los perfiles alélicos más representados en el grupo de los aislamientos LPV positivos fueron ST8 (34,7%), ST121 (16,0%) y ST30 (13,3%). ST8 se asoció de forma significativa a este grupo ($p < 0,001$).

Los linajes más representados entre los aislamientos LPV negativos fueron ST30 (19,8%), ST5 (17%), ST15 (13,2%) y ST121 (11,3%), de estos ST5 y ST15 se asociaron significativamente a este grupo ($p = 0,002$ y $p = 0,014$, respectivamente).

Algunos linajes se encontraban representados únicamente en el grupo de los aislamientos LPV positivos como ST1153, ST152, ST573, ST80 y ST1021, este último se asoció significativamente a este grupo ($p = 0,011$).

También encontramos linajes que únicamente estaban representados entre los aislamientos LPV negativos como ST72, ST97, ST398, ST25, ST34 y ST125 pero solo los encontramos en un pequeño número de casos.

FIGURA 39: DISTRIBUCIÓN DE LOS LINAJES EN FUNCIÓN DE LA LPV



5.8.4. Estudio de los linajes de *S.aureus* en función de la adquisición y la resistencia a la meticilina.

Tras estudiar los perfiles alélicos en función de la adquisición quisimos conocer los linajes que circulaban en ambos ámbitos en función de la resistencia a meticilina.

En la figura 40 se muestran los STs asignados a los aislamientos asociados a la comunidad en función de la resistencia a meticilina. La comparación entre los linajes de SARM-AC y SASM-AC mostró que el linaje de SARM que circulaba causando un mayor número de casos en la comunidad fue ST8 (72,0%) que a su vez se asociaba significativamente a este grupo ($p < 0,001$).

En cuanto a los linajes de SASM, observamos que existía una mayor variedad, el linaje mayoritario fue ST121 (25,9%), seguido de ST30 (19,8%) y ST15 (13,6%), estos tres perfiles alélicos se asociaron de forma significativa al grupo de SASM-AC ($p = 0,001$, $p = 0,049$ y $p = 0,043$ respectivamente). Cabe destacar el linaje ST8 que lo

encontramos también en un elevado número de los casos (13,6%) entre los aislamientos sensibles a meticilina.

El análisis de los aislamientos asociados al sistema sanitario en función de la resistencia a meticilina se muestra en la figura 41, donde se analizaron 21 aislamientos de SARM-ASS y de 54 de los 220 aislamientos de SASM-ASS.

En el grupo de los aislamientos de SARM-ASS destacaron el linaje ST125 que causó el 28,6% de los casos y que se asoció significativamente a este grupo ($p=0,001$) y ST5 que causó el 19% de los mismos. ST22 y ST8 también los encontramos con relativa frecuencia en el grupo de SARM-ASS (14,3% respectivamente).

En cuanto a los aislamientos de SASM-ASS, ST30 estaba muy representado en este grupo (24,1%) y es el único linaje que se asociaba de forma significativa al mismo ($p=0,047$). Otros linajes importantes en este grupo fueron ST5 (16,7%) y ST45 (13%).

FIGURA 40: DISTRIBUCIÓN DE LOS LINAJES DE LOS AISLAMIENTOS ASOCIADOS A LA COMUNIDAD EN FUNCIÓN DE LA SENSIBILIDAD A METICILINA

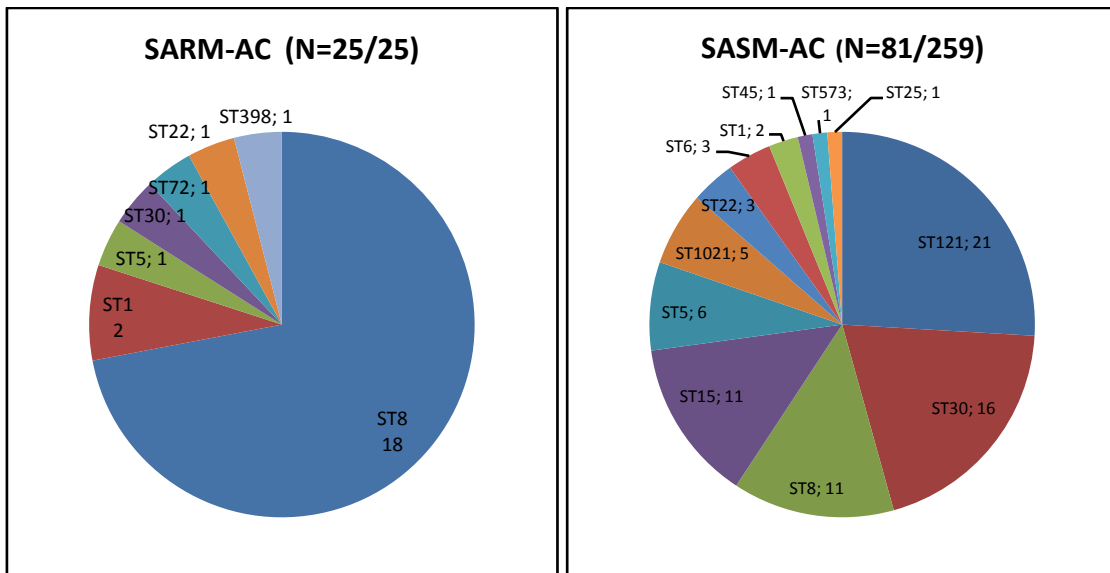
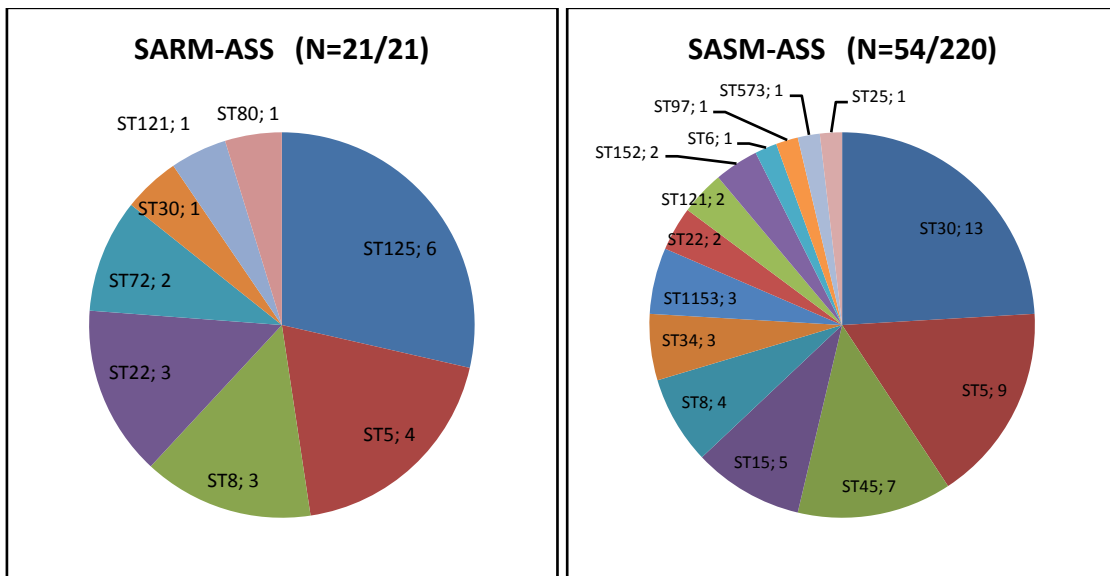


FIGURA 41: DISTRIBUCIÓN DE LOS LINAJES DE LOS AISLAMIENTOS ASOCIADOS AL SISTEMA SANITARIO EN FUNCIÓN DE LA SENSIBILIDAD A METICILINA



5.8.5. Estudio de los linajes de *S.aureus* en función de la LPV y de la resistencia a meticilina

Con el objetivo de conocer qué linajes de *S.aureus* eran portadores de la LPV y cuáles lo eran en una mayor proporción en función de la resistencia a meticilina, se llevó a cabo un estudio comparativo de los STs asignados a los aislamientos sensibles y resistentes a meticilina en función de la toxina.

En la figura 42 se observa la distribución de los linajes de SARM en función de la LPV y destaca la gran homogeneidad de los aislamientos de SARM portadores de la toxina. ST8 fue el linaje de SARM portador de la LPV mayoritario (86,4%) y se asoció significativamente a este grupo ($p < 0,001$). También encontramos los linajes ST30 y ST80 en un pequeño porcentaje (9,0% y 4,5% respectivamente).

En cuanto a los aislamientos de SARM LPV negativos destacan los linajes ST125 y ST5 como los más representados en este grupo (25,0% y 20,8% respectivamente), estos linajes en ningún caso fueron portadores de la toxina y se

asociaron de manera significativa al grupo de los SARM LPV negativos ($p=0,014$ y $p=0,031$ respectivamente).

El estudio de los 53 aislamientos de SARM LPV positivos y de 84 de los 426 aislamientos de SARM LPV negativos se muestra en la figura 43. En la figura se observa que el linaje de SARM que encontramos más representado entre los aislamientos LPV positivos fue ST121 (22,6%), también encontramos otros linajes portadores de la LPV en un número considerable de casos como ST30 (15,1%), ST8 (13,2%) y ST1021 (9,4%), este último es el único linaje que se asoció significativamente a este grupo ($p=0,008$). Hay una serie de linajes de SARM que solamente los encontramos en el grupo de los LPV positivos como ST1, ST1021, ST1153, ST152 y ST573.

Por otro lado, observamos que ST30 (25,6%), ST15 (17,0%), ST5 (15,9%), y ST121 (13,4%) fueron los linajes más representados en el grupo de aislamientos de SARM LPV negativos, pero solamente ST5 y ST15 se asociaron significativamente a este grupo ($p=0,029$ y $p=0,020$).

Los linajes ST97 y ST25 los encontramos únicamente en el grupo de los SARM LPV negativos pero en un mínimo número de casos.

FIGURA 42: DISTRIBUCIÓN DE LOS LINAJES DE SARM EN FUNCIÓN DE LA LPV

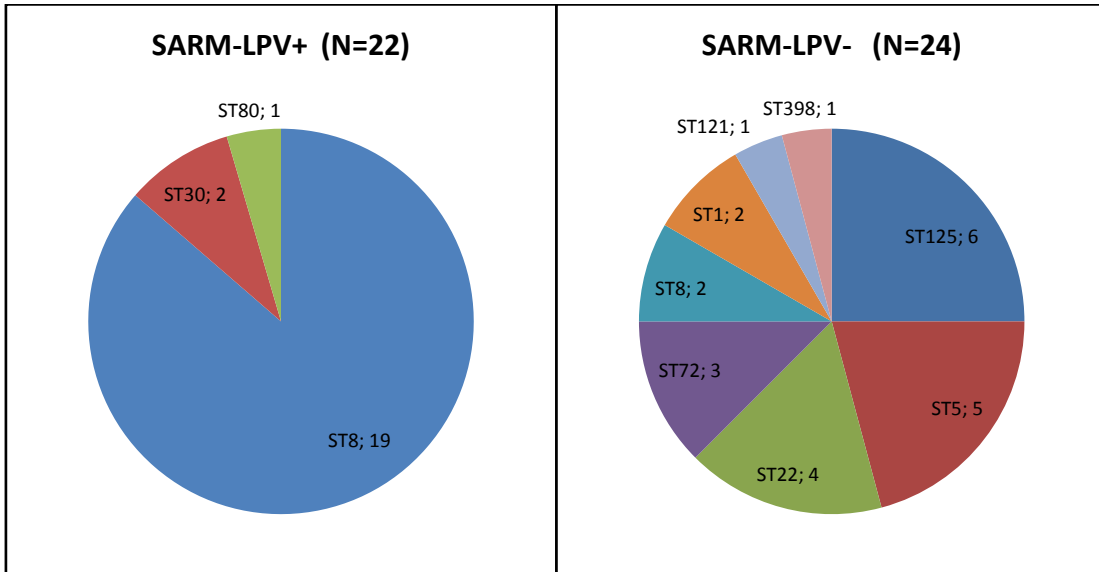
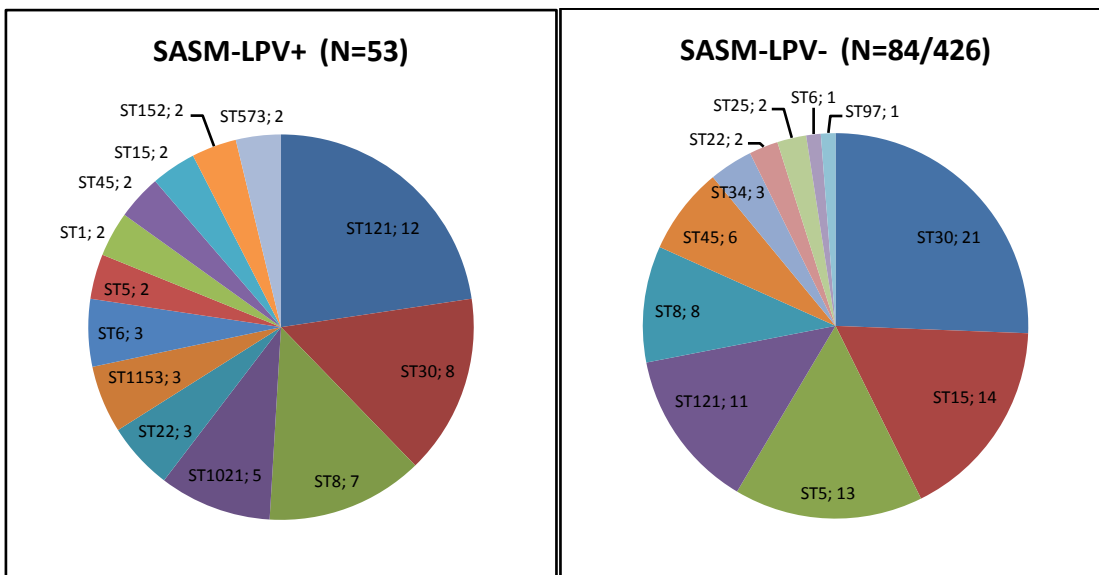


FIGURA 43: DISTRIBUCIÓN DE LOS AISLAMIENTOS DE SASM EN FUNCIÓN DE LA LPV



5.8.6. Visión global de los aislamientos de *S.aureus* LPV positivos y negativos en función de la resistencia a meticilina y de la adquisición

Con el objetivo de tener una visión global de cómo se distribuyen en la comunidad y en el sistema sanitario los linajes portadores y no portadores de la LPV en función de la resistencia a meticilina, se llevó a cabo el estudio que se muestra en las figuras 44 y 45.

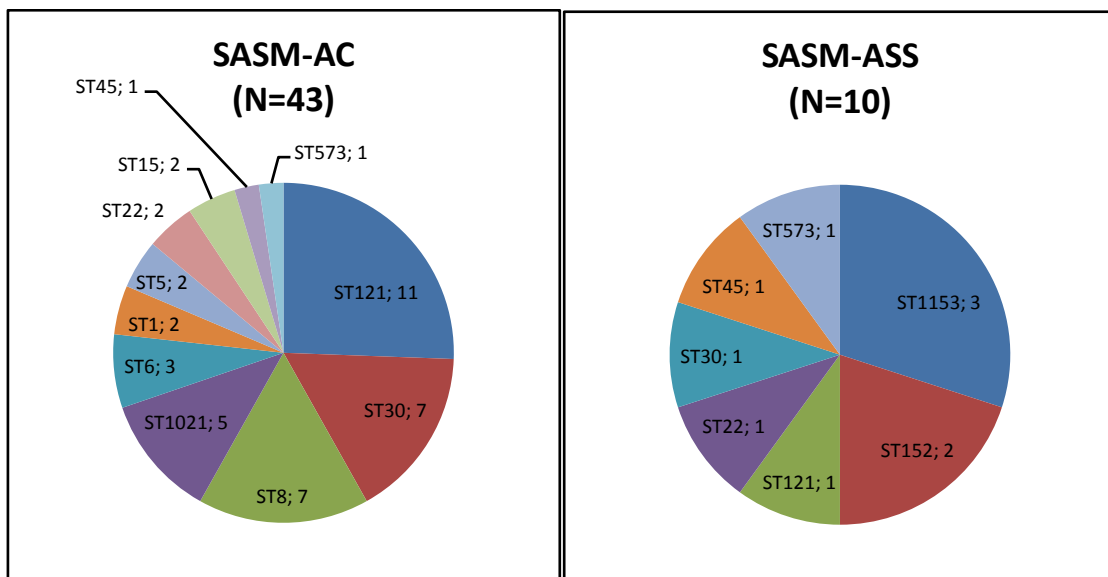
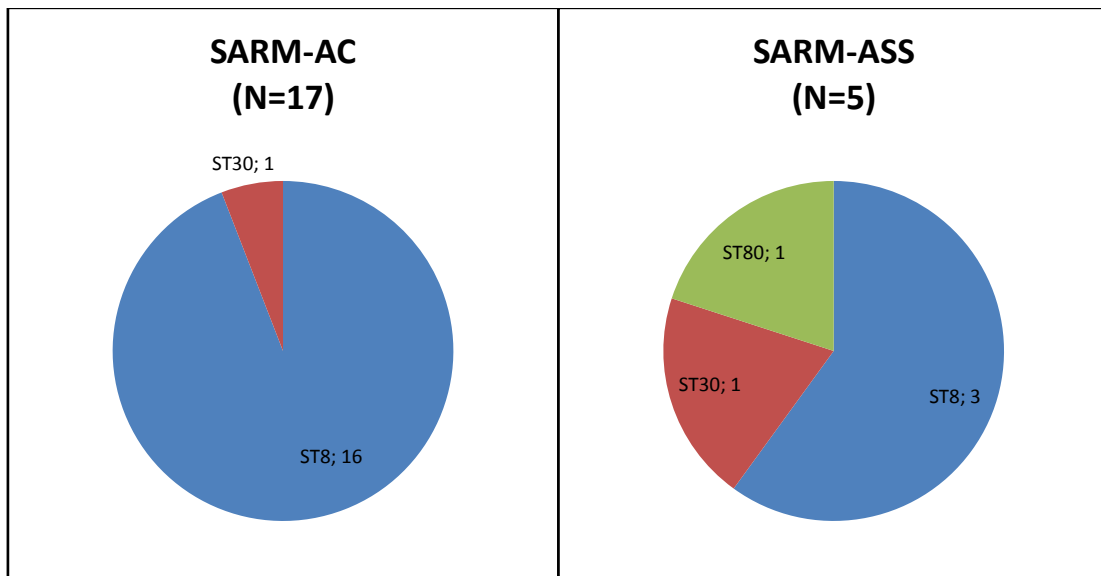
En la figura 44 se muestra la distribución de los aislamientos portadores de la LPV en función de la adquisición y la resistencia a meticilina donde se observa, que el linaje de SARM-AC LPV positivo más representado fue ST8 que representa la práctica totalidad de los casos (94%). En un pequeño porcentaje (6%) encontramos también el linaje ST30 presente en la comunidad.

Del estudio de los 5 casos de SARM-ASS LPV positivos observamos, que ST8 es también el linaje más representado (60%) en este grupo y en un menor porcentaje encontramos también los linajes ST30 y ST80 (20% respectivamente).

En cuanto a los aislamientos de SASM, observamos una mayor variedad ya que encontramos 13 linajes distintos portadores de la toxina. En el grupo de los aislamientos de SASM-AC LPV positivos el linaje más representado fue ST121 que comprende el 25% de los casos, otros linajes también muy representados en este grupo fueron ST30 (16%), ST8 (16%) y ST1021 (12%).

En cuanto a los aislamientos de SASM-ASS LPV positivos, observamos que el linaje ST1153 fue el linaje mayoritario (30%), seguido de ST152 (20%).

FIGURA 44: DISTRIBUCIÓN DE LOS LINAJES DE LOS AISLAMIENTOS PORTADORES DE LA LPV EN FUNCIÓN DE LA ADQUISICIÓN Y DE LA RESISTENCIA A METICILINA



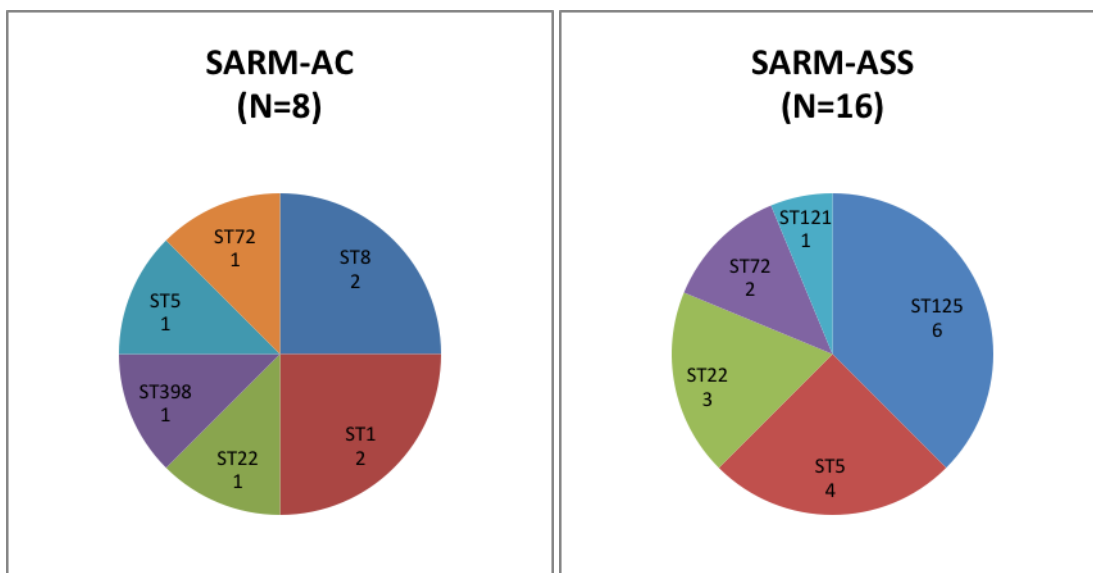
El estudio de la distribución de los aislamientos no portadores de la LPV en función de la adquisición y la resistencia a meticilina se muestra en la figura 45. En la figura se observa, que en el grupo de los SARM-AC los linajes ST8 y ST1 destacaron como los linajes más representados (25% respectivamente).

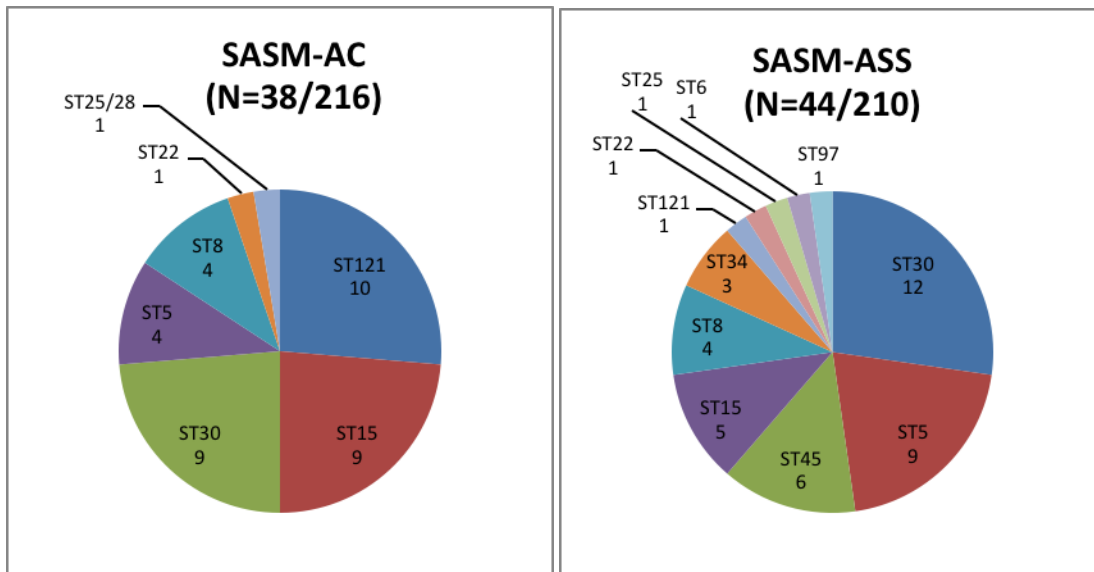
En cuanto a los aislamientos de SARM-ASS el linaje ST125 fue el linaje mayoritario ya que comprendió el 37% de los casos, seguido de ST5 que comprendió el 25% los mismos. Otros linajes también muy representados en el sistema sanitario fueron ST22 (19%) y ST72 (13%).

En cuanto a los aislamientos sensibles a meticilina, en el grupo de los aislamientos de SARM-AC el linaje mayoritario fue ST121 (26%) y los linajes ST15 y ST30 fueron también muy frecuentes ya que representaron el 24% de los casos respectivamente.

Del estudio de los 44 casos causados por SARM-ASS destacó el linaje ST30 como el más representado ya que comprendió el 27% de los casos, y otros perfiles alélicos también muy presentes en este grupo fueron ST5 (21%) y ST45 (14%).

FIGURA 45: DISTRIBUCIÓN DE LOS LINAJES DE LOS AISLAMIENTOS NO PORTADORES DE LA LPV EN FUNCIÓN DE LA ADQUISICIÓN Y DE LA RESISTENCIA A METICILINA





5.9. Relación entre los linajes de *S.aureus* y los síndromes clínicos

Con la finalidad de conocer si existía alguna relación entre los distintos linajes de *S.aureus* y los síndromes clínicos, decidimos llevar a cabo un estudio analizando que linajes causaban más frecuentemente los distintos síndromes clínicos. Es importante tener en cuenta ciertas limitaciones, como por ejemplo no haber realizado la técnica de MLST en todos los aislamientos incluidos en el estudio.

En la tabla 33 se muestra la frecuencia de los distintos STs implicados en los síndromes clínicos más frecuentes. En el caso de las IPTBs (superficiales y profundas) ST8 era el causante del mayor número de casos (26,8%), seguido de ST121 (19,6%) y ST30 (15,5%). En cuanto a los casos de IPTBs más profundas (abscesos y celulitis) vuelve a destacar ST8 como causa del 36,5% de los casos, seguido de ST30 (20,6%) y ST121 (14,3%). Como causa de bacteriemia el linaje mayoritario fue ST30 (28,6%), seguido de ST5 (18,4%) y ST8 (16,3%). En las infecciones de herida quirúrgica destacaba ST30 como causa del 37,5% de los casos, y ST8 como causa del 25,0% de los mismos. Los linajes que más frecuentemente encontramos como causa de infecciones

ostearticulares eran ST121 (37,5%) y ST5 (25,0%). En cuanto a las infecciones respiratorias hubo una gran variedad siendo ST5 y ST125 los linajes más relevantes.

Entre los síndromes clínicos más frecuentes y con más aislamientos estudiados mediante MLST se encontraban las IPTBs y los cuadros de bacteriemia. La comparación de los porcentajes de los tipos de ST entre ambos síndromes clínicos se muestra en la tabla 34 donde se observa que el linaje predominante en las IPTBs era ST8 (26,8%) y en las bacteriemias ST30 (28,6%). Sin embargo, el linaje que se encontró significativamente asociado a las IPTBs fue ST121 (19,6% vs. 6,1%, $p=0,032$) y los linajes que se asociaron significativamente a las bacteriemias fueron ST5 (18,4% vs. 6,2%, $p=0,022$) y ST45 (12,2% vs. 1,0%, $p=0,005$).

TABLA 33: FRECUENCIA DE LOS LINAJES DE *S.AUREUS* EN LOS DIFERENTES SÍNDROMES CLÍNICOS

ST	IPTBs *N=97/255	ABSCESOS Y CELULITIS N=63/118	BACTERIEMIA N=49/51	HERIDA QUIRÚRGICA N=8/51.	OSTEOARTI CULARES N=8/9	RESPIRATORIAS N=9/16	OTROS N=8/73
ST8	26 (26,8%)	23 (36,5%)	8 (16,3%)	2 (25,0%)			2 (25,0%)
ST30	15 (15,5%)	13 (20,6%)	14 (28,6%)	3 (37,5%)	1 (12,5%)		1 (12,5%)
ST5	6 (6,2%)	3 (4,8%)	9 (18,4%)		2 (25,0%)	2 (22,2%)	2 (25,0%)
ST125						2 (22,2%)	1 (12,5%)
ST121	19 (19,6%)	9 (14,3%)	3 (6,1%)		3 (37,5%)		1 (12,5%)
ST1021	5 (5,2%)	3 (4,8%)					
ST22	3 (3,1%)	2 (3,2%)	2 (4,1%)				1 (12,5%)
ST72	1 (1,0%)	1 (1,6%)		1 (12,5%)		1 (11,1%)	
ST15	10 (10,3%)	3 (4,8%)	2 (4,1%)	1 (12,5%)		1 (11,1%)	
ST34			2 (4,1%)				
ST45	1 (1,0%)		6 (12,2%)				
ST6	2 (2,1%)	1 (1,6%)	1 (2,0%)			1 (11,1%)	
ST80							
ST1	3 (3,1%)	1 (1,6%)				1 (11,1%)	
ST1153	2 (2,1%)					1 (11,1%)	
ST152	1 (1,0%)	1 (1,6%)			1 (12,5%)		
ST573	2 (2,1%)	2 (3,2%)					
ST97	1 (1,0%)	1 (1,6%)					
ST25			2 (4,1%)	1 (12,5%)	1 (12,5%)		

*N= Número de aislamientos analizados por MLST/ Número de aislamientos totales

TABLA 34: COMPARACIÓN ENTRE LOS LINAJES CAUSANTES DE IPTBs Y DE BACTERIEMIAS.

ST	IPTBs *N=97/255	BACTERIEMIA N=49/51	P
ST8	26 (26,8%)	8 (16,3%)	0,158
ST30	15 (15,5%)	14 (28,6%)	0,061
ST5	6 (6,2%)	9 (18,4%)	0,022
ST125	0	0	-
ST121	19 (19,6%)	3 (6,1%)	0,032
ST1021	5 (5,2%)	0	0,124
ST22	3 (3,1%)	2 (4,1%)	0,545
ST72	1 (1,0%)	0	1,000
ST15	10 (10,3%)	2 (4,1%)	0,165
ST34	0	2 (4,1%)	0,111
ST45	1 (1,0%)	6 (12,2%)	0,005
ST6	2 (2,1%)	1 (2,0%)	0,739
ST80	0	0	-
ST1	3 (3,1%)	0	0,550
ST1153	2 (2,1%)	0	0,550
ST152	1 (1,0%)	0	1,000
ST573	2 (2,1%)	0	0,550
ST97	1 (1,0%)	0	1,000
ST25	0	2 (4,1%)	0,111

*N= Número de aislamientos analizados por MLST/ Número de aislamientos totales

6. ESTUDIO DEL CONTENIDO GENÉTICO (FACTORES DE VIRULENCIA Y DE RESISTENCIA) DE LOS LINAJES MÁS PREVALENTES EN LA POBLACIÓN PEDIÁTRICA

Con el objetivo de adquirir más conocimientos acerca del contenido genético de las cepas más prevalentes en la población pediátrica, se llevó a cabo la detección, mediante una técnica de microarrays de ADN, de algunos factores de virulencia y de resistencia en una serie de aislamientos pertenecientes a los linajes que se encontraban más diseminados en la comunidad y en el sistema sanitario.

6.1. Factores de virulencia y de resistencia de los linajes de SARM más prevalentes

Los linajes de SARM más prevalentes en la población pediátrica fueron ST8, causante de la mayor parte de los casos asociados a la comunidad, y ST5 y ST125 que fueron los linajes más prevalentes en los casos asociados al sistema sanitario.

6.1.1. Contenido genético de los aislamientos de SARM pertenecientes al linaje ST8

Se analizó el contenido genético de 20 de los aislamientos pertenecientes a ST8, y de un aislamiento de la cepa USA300 (ATCC 1556) perteneciente al linaje ST8 y que está ampliamente diseminada en EEUU (Tabla 35).

En cuanto a los genes de resistencia destaca, que a pesar de ser ST8 un linaje resistente a meticilina era muy sensible a los antibióticos no β -lactámicos ya que encontramos en su genoma muy pocos genes de resistencia. Los genes de resistencia que encontramos en todos los aislamientos analizados fueron el gen *mecA*, el operon *bla* y el gen *tetEfflux*. En un pequeño porcentaje de los aislamientos se encontraron los genes de resistencia a macrólidos, *mrsA* y *mpbBM*, y el gen *aphA*, que codifica resistencia a aminoglicósidos (10% respectivamente). El locus de resistencia al mercurio se encontró en el 85% de los aislamientos.

En cuanto a los factores de virulencia, el 80% de los aislamientos analizados tenían en su genoma los genes que codifican las enterotoxinas K y Q, mientras que solo un aislamiento (5%) era portador de los genes *entA*, *entD* y *entJ*.

Los genes que codifican la LPV se encontraron en el 90% de los aislamientos, y en cuanto a las hemolisinas, el 95% de los aislamientos tenían en su genoma los genes que codifican las hemolisinas alfa y beta (truncada), y el 100% los genes que codifican

la hemolisina delta. Al estar el gen de la *hly* truncado, los genes que porta el bacteriófago que trunca este gen están presentes en el genoma de ST8, de modo que, *sak* se encontró en el 100% de los aislamientos estudiados, *chp* en el 95%, y *scn* en el 100%. Las toxinas exfoliativas y las toxinas EDIN estaban ausentes en todos los aislamientos analizados. Algunos genes de virulencia que estaban muy presentes en este linaje eran el gen *aur*, que codifica la aureolisina (85%), así como los genes que codifican las serinproteasas A y B (*splA* y *splB*) (100%), y el gen que codifica la serinproteasa E (*splE*) (90%). Los genes *sspA*, *sspB* y *sspP* se encontraron en el genoma todos los aislamientos estudiados. El elemento ACME, característico de la cepa USA300, se encontró únicamente en 2 de los aislamientos estudiados (10%).

El serotipo capsular que caracterizó al perfil alélico ST8 fue el 5, y los genes que codifican la formación del biofilm *icaA*, *icaC* e *icaD*, se encontraron en todos los aislamientos estudiados.

En cuanto a los factores de adhesión, encontramos una elevada presencia de estos genes, de modo que, el 100% de los aislamientos eran portadores de los genes *clfA*, *ebh*, *eno*, *fib*, *ebps*, *fnbA*, *fnbB*, *map*, *sdrC*, *vwb*, *sasG*, y el 90% de los genes *bbp* y *clfB*. El gen *cna* no se encontró en ninguno de los aislamientos estudiados.

Los genes relacionados con la evasión del sistema inmune *isaB*, *mprF*, *isdA*, *imrP* estaban presentes en todos los aislamientos analizados.

La comparación de las características genéticas de la cepa ST8 que circula en nuestro país con el de la USA300 que se ha diseminado en EEUU, mostró muchas semejanzas y algunas diferencias (Tabla 35). Las principales diferencias que encontramos en cuanto a los genes de resistencia eran los genes *ermC* y *mupR* presentes en la cepa USA300 y ausentes en todos los aislamientos estudiados, y el gen *tetK*

presente en el genoma de la cepa USA300 y que en cambio estaba únicamente presente en el 15% de los aislamientos estudiados. El locus de resistencia a mercurio y el operon *bla* estaban presentes en el 100% y 85%, respectivamente, de los aislamientos estudiados, sin embargo, no estaban presentes en la cepa USA300. Otras diferencias encontradas en los genes que codifican factores de virulencia eran los genes *hlgA* y *lukX* únicamente presentes en el 35% y 45% de los aislamientos estudiados, y sin embargo, presentes en la cepa USA300, y el elemento ACME que solo se encontró en 2 de los aislamientos de ST8 (10%), y que es un elemento característico de la cepa USA300.

6.1.2. Contenido genético de los aislamientos de SARM pertenecientes a los tipos de secuencias ST5 y ST125

Los linajes de *S.aureus* ST5 y ST125 ambos pertenecientes al CC5, eran los linajes de SARM más frecuentes como causa de infección asociada al sistema sanitario en la población pediátrica. Por ello, se estudió el contenido genético de 10 de los aislamientos pertenecientes a estos linajes (Tabla 35).

El contenido genético de ambos linajes era muy parecido en cuanto a los genes de virulencia y factores de adhesión e inmunoevasión. Esto era esperable ya que estos dos linajes pertenecen al mismo complejo clonal, y se diferencian en cuanto al MLST en un único nucleótido de uno de los alelos. Las mayores diferencias las encontramos en los genes que codifican resistencias a los antibióticos. ST125 era portador de un mayor número de genes de resistencia, de este modo observamos que el 100% de los aislamientos estudiados de ST125 eran portadores del gen *tetEfflux*, de los genes de resistencia a macrólidos *msrA* y *mpbBM*, del gen de resistencia a aminoglucósidos *aphA*

y además, el 80% de los aislamientos eran portadores de los genes *aacA-aphD* y *aadD* y del gen *mupR*. Sin embargo, en ST5 no se encontraron estos genes de resistencia, con excepción del gen *tetEfflux* presente en todos los aislamientos analizados, el gen *aadD* presente en el 20% de los aislamientos, y el gen *ermC* presente en el 40% de los mismos.

En cuanto a los factores de virulencia estas dos cepas eran muy homogéneas. El cluster de enterotoxinas *egc* estaba presente en todos los aislamientos estudiados y la enterotoxina A en el 60% de los aislamientos del linaje ST5 y en el 20% de los aislamientos estudiados del linaje ST125.

Los genes que codifican las hemolisinas alfa, delta y gamma también estaban presentes en el genoma de todos los aislamientos analizados. En cuanto a la hemolisina beta truncada hubo más diversidad, este gen lo encontramos en el 60% de los aislamientos de ST5 pero no lo encontramos en ST125. Los genes que van en el fago que trunca la hemolisina beta *sak*, *chp* y *scn* se encontraron en el 100%, 60% y 100% de los aislamientos de ST5, y en cambio solo los encontramos en el 20% de los aislamientos de ST125.

Otros genes de virulencia que estaban presentes en todos los aislamientos analizados de ambos tipos de secuencia fueron: *aur*, *spl*, *splB*, *sspA*, *sspB* y *sspP* y los genes que codifican la formación de biofilm *icaA*, *icaC* e *icaD*. No se encontró ningún aislamiento portador del gen que codifica la serinproteasa E (*splE*), y tampoco del gen *bap* implicado en la formación del biofilm.

El serotipo capsular que caracterizó a los perfiles alélicos ST5 y ST125 fue el 5.

En referencia a los factores de adhesión, se encontró también una gran homogeneidad. Todos los aislamientos estudiados eran portadores de los genes *clfA*, *clfB*, *ebh*, *eno*, *fib*, *ebps*, *fnbA*, *map*, *SdrC* y *wvb*. El gen *sasG* estaba presente en todos los aislamientos de ST5 y en el 80% de los ST125.

En cuanto a los genes implicados en la inmunoevasión *isaB*, *mprF*, *isdrA* e *ImrP*, estaban presentes en todos los aislados analizados.

TABLA 35: CONTENIDO GENÉTICO DE LOS LINAJES DE SARM MÁS PREVALENTES

		ST8	USA300 ATCC 1556	ST5	ST125
Nº de aislamientos		20	1	5	5
SCCmec		IV	IV	IV	IV
agr		1	1	2	2
LPV		18 (90,0%)	+	-	-
Genes de resistencia					
<i>mecA</i>	Methicillin, Oxacillin and all Beta-Lactams, defining MRSA	+	+	+	+
<i>blaZ /blaI/blaR</i>	Beta-Laktamase	+	-	+	+
<i>ermA</i>	Macrolide, Lincosamide, Streptogramin	-	-	-	-
<i>ermB</i>	Macrolide, Lincosamide, Streptogramin	-	-	-	-
<i>ermC</i>	Macrolide, Lincosamide, Streptogramin	-	+	2 (40,0%)	-
<i>linA</i>	Lincosamides	-	-	-	-
<i>msrA</i>	Macrolide	2 (10,0%)	-	-	+
<i>mefA</i>	Macrolide	-	-	-	-
<i>mpbBM</i>	Macrolide	2 (10,0%)	-	-	+
<i>vatA</i>	Streptogramine	-	-	-	-
<i>vatB</i>	Streptogramine	-	-	-	-
<i>vga</i>	Streptogramine	-	-	-	-
<i>vgaA</i>	Streptogramine	-	-	-	-
<i>vgb</i>	Streptogramine	-	-	-	-
<i>aacA-aphD</i>	Aminoglycoside (Gentamicin, Tobramycin)	-	-	-	4 (80,0%)
<i>aacD</i>	Aminoglycoside (Tobramycin, Neomycin)	-	-	1 (20,0%)	4 (80,0%)
<i>aphA</i>	Aminoglycoside (Kanamycin, Neomycin)	2 (10,0%)	-	-	+
<i>sat</i>	Streptothricin	1 (5,0%)	-	-	+
<i>dfrA</i>	Trimethoprim	-	-	-	-
<i>far</i>	Fusidic acid	-	-	-	-
Q6GD50	Putative Fusidic Acid Resistance Protein	-	-	-	-
<i>mupR</i>	Mupirocin	-	+	-	4 (80,0%)
<i>tetK</i>	Tetracycline	3/20 (15,0%)	+	-	-
<i>tetM</i>	Tetracycline	-	-	-	-
<i>tetEfflux</i>	Tetracyclin Efflux Protein (Putative Transport Protein)	+	+	+	+
<i>cat</i>	Chloramphenicol	-	-	-	-
<i>fexA</i>	Chloramphenicol	-	-	-	-
<i>cfr</i>	Phenicolis, Lincosamides, Oxazolidinones (Linezolid)	-	-	-	-
<i>fosB</i>	Putative Marker For Fosfomicin, Bleomycin	+	+	+	+
<i>vanA /vanB/vanC</i>	Vancomycin	-	-	-	-
mercury resistance locus	Mercury resistance operon	17 (85,0%)	-	-	-
Factores de virulencia					
<i>tst-1</i>	Toxic Shock Syndrome Toxin	-	-	-	-
<i>entA</i>	Enterotoxin A	1 (5,0%)	-	3 (60,0%)	1 (20,0%)
<i>entB</i>	Enterotoxin B	-	-	-	-
<i>entC</i>	Enterotoxin C	-	-	-	-
<i>entCM14</i>	Enterotoxin -like Protein (ORF CM14 of U109272)	-	-	-	-
<i>entD</i>	Enterotoxin D	1 (5,0%)	-	-	-
<i>entE</i>	Enterotoxin E	-	-	-	-
<i>entG</i>	Enterotoxin G	-	-	+	+
<i>entH</i>	Enterotoxin H	-	-	-	-
<i>entI</i>	Enterotoxin I	-	-	+	+
<i>entJ</i>	Enterotoxin J	1 (5,0%)	-	-	-
<i>entK</i>	Enterotoxin K	16 (80,0%)	+	-	-
<i>entL</i>	Enterotoxin L	-	-	-	-
<i>entM</i>	Enterotoxin M	-	-	+	+
<i>entN</i>	Enterotoxin N	-	-	+	+
<i>entN_1</i>	Enterotoxin N - other than RF122	-	-	+	+
<i>entO</i>	Enterotoxin O	-	-	+	+
<i>entQ</i>	Enterotoxin Q	16 (80,0%)	+	-	-
<i>entR</i>	Enterotoxin R	-	-	-	-
<i>entU</i>	Enterotoxin U	-	-	+	+
<i>egc-cluster</i>	Enterotoxins seg/sei/sem/sen/seo/seu	-	-	+	+
PVL	Pantone-Valentine Leukocidin	18 (90,0%)	+	-	-
<i>lukF</i>	Haemolysin Gamma, Component B	+	+	+	+
<i>lukS</i>	Haemolysin Gamma, Component C	+	+	+	+

Resultados

lukS-ST22+ST45	Haemolysin Gamma, Component C, allele from ST22 and ST45	1 (5,0%)	-	-	-
hlgA	Haemolysin Gamma, Component A	7 (35,0%)	+	+	+
lukD	Leukocidin D Component	+	+	+	+
lukE	Leukocidin E Component	19 (95,0%)	+	+	+
lukX	Leukocidin/Haemolysin Toxin Family Protein	9 (45,0%)	+	+	4 (80,0%)
lukY-var1	Leukocidin/Haemolysin Toxin Family Protein	19 (95,0%)	+	+	+
lukY-var2	Leukocidin/Haemolysin Toxin Family Protein, allele from MRSA252	-	-	-	-
hl	Hypothetical Protein similar to Haemolysin	+	+	+	+
hla	Haemolysin Alpha (Alpha Toxin)	19 (95,0%)	+	+	+
hld	Haemolysin Delta (Amphiphilic Membrane Toxin)	+	+	+	+
hlll	Putative Haemolysin III	+	+	+	+
hl_III_Other than RF122	Putative Haemolysin III (other than RF122)	+	+	+	+
hlb	Haemolysine Beta (Phospholipase C)	19 (95,0%)	+	3 (60,0%)	-
un-truncated hlb	Haemolysine Beta (Phospholipase C / un-truncated)	-	-	-	4 (80,0%)
sak	Staphylokinase	+	+	+	1 (20,0%)
chp(CHIPS)	Chemotaxis Inhibitory Protein (CHIPS)	19 (95,0%)	+	3 (60,0%)	1 (20,0%)
scn	Staphylococcal Complement Inhibitor (SCIN)	+	+	+	1 (20,0%)
etA					
etA	Exfoliative Toxin A	-	-	-	-
etB					
etB	Exfoliative Toxin B	-	-	-	-
etD					
etD	Exfoliative Toxin D	-	-	-	-
edinA					
edinA	Epidermal cell differentiation inhibitor A	-	-	-	-
edinB					
edinB	Epidermal cell differentiation inhibitor B	-	-	-	-
edinC					
edinC	Epidermal cell differentiation inhibitor C	-	-	-	-
aur					
aur	Aureolysin	17 (85,0%)	+	+	+
spA					
spA	Serine Protease A	+	+	+	+
spB					
spB	Serine Protease B	+	+	+	+
spE					
spE	Serine Protease E	18 (90,0%)	+	-	-
sspA					
sspA	GlutamyI Endopeptidase / V8-Protease	+	+	+	+
sspB					
sspB	Staphopain B	+	+	+	+
sspP					
sspP	Staphopain A (Staphylopain A)	+	+	+	+
ACME-locus					
ACME-locus	Arginine catabolic mobile element	2 (10,0%)	+	-	-
Cápsula / Biofilm					
capsule-1					
capsule-1	Capsule Type 1	-	-	-	-
capsule-5					
capsule-5	Capsule Type 5	+	+	+	+
capsule-8					
capsule-8	Capsule Type 8	-	-	-	-
icaA					
icaA	Intercellular Adhesion Protein A (N-glycosyltransferase)	+	+	+	+
icaC					
icaC	Intercellular Adhesion Protein C	+	+	+	+
icaD					
icaD	Biofilm PIA Synthesis Protein D	+	+	+	+
bap					
bap	Surface Protein Involved In Biofilm Formation	-	-	-	-
MSCRAMMs / Factores de adhesión					
bbp-all					
bbp-all	Bone Sialoprotein-Binding Protein	18 (90,0%)	+	3 (60,0%)	+
clfA-all					
clfA-all	Clumping Factor A	+	+	+	+
clfB-all					
clfB-all	Clumping Factor B	18 (90,0%)	+	+	+
cna					
cna	Collagen-Binding Adhesin	-	-	-	-
ebh-all					
ebh-all	Cell Wall Associated Fibronectin-Binding Protein	+	+	+	+
eno					
eno	Enolase, Phosphopyruvate Hydratase	+	+	+	+
fib					
fib	Fibrinogen Binding Protein	+	+	+	+
fib-MRSA252					
fib-MRSA252	Fibrinogen Binding Protein, allele from MRSA252	-	-	-	-
ebpS					
ebpS	Cell Wall Associated Fibronectin-Binding Protein	+	+	+	+
fnbA-all					
fnbA-all	Fibronectin-Binding Protein A	+	+	+	+
fnbB-COL					
fnbB-COL	Fibronectin-Binding Protein B	+	+	-	-
fnbB-COL+Mu50+MW2					
fnbB-COL+Mu50+MW2	Fibronectin-Binding Protein B, allele from COL / MU50 / MW2	+	+	+	+
fnbB-Mu50					
fnbB-Mu50	Fibronectin-Binding Protein B, allele from MU50	-	-	+	+
fnbB-MW2					
fnbB-MW2	Fibronectin-Binding Protein B, allele from MW2	-	-	-	-
fnbB-ST15					
fnbB-ST15	Fibronectin-Binding Protein B, allele from ST15	-	-	-	-
fnbB-ST45-2					
fnbB-ST45-2	Fibronectin-Binding Protein B, allele from ST45	-	-	-	-
map					
map	Major Histocompatibility Complex Class II Analog Protein	+	+	+	+
sdrC-all					
sdrC-all	Ser-Asp Rich Fibrinogen-Binding, Bone Sialoprotein-Binding Protein C	+	+	+	+
sdrD-COL+MW2					
sdrD-COL+MW2	Ser-Asp Rich Fibrinogen-Binding, Bone Sialoprotein-Binding Protein D	10 (50,0%)	+	-	-
sdrD-Mu50					
sdrD-Mu50	Ser-Asp Rich Fibrinogen-Binding, Bone Sialoprotein-Binding Protein D, allele from MU50	-	-	2 (40,0%)	+

<i>sdrD</i> -other	Ser-Asp Rich Fibrinogen-Binding, Bone Sialoprotein-Binding Protein D, allele from Other	-	-	-	-
<i>sdrD</i> -OtherThan252+12	Ser-Asp Rich Fibrinogen-Binding, Bone Sialoprotein-Binding Protein D, allele from Other Than MRSA252 / RF122	17 (85,0%)	+	3 (60,0%)	+
<i>vwb</i> -all	Willebrand Factor - Binding Protein	+	+	+	+
<i>sasG</i>	<i>S. aureus</i> Surface Protein G	+	+	4 (80,0%)	+
Immunevasión / Miscelánea					
<i>isaB</i>	Immunodominant Antigen B	+	+	+	+
<i>mprF</i>	Probable Lysylphosphatidylglycerol Synthetase (Defensin Resistance)	15 (75,0%)	+	+	+
<i>isdA</i>	Heme/Transferrin-Binding Protein	+	+	+	+
<i>ImrP</i>	Putative Transporter Protein	+	+	+	+

6.2. Factores de virulencia y de resistencia de los linajes de SASM más prevalentes

Los linajes de SASM que encontramos con más frecuencia como causa de infección en niños fueron ST121 y ST30. Por esta razón se estudió el contenido genético de ambos linajes mediante microarrays de ADN.

6.2.1. Contenido genético de los aislamientos de SASM pertenecientes al linaje ST121

ST121 es uno de los linajes de SASM que con más frecuencia se encontró como causa de infección en la comunidad en la población pediátrica, por ello, se analizó el contenido genético de 14 aislamientos de ST121 (Tabla 36).

En la tabla 36 se puede apreciar que los aislamientos de ST121 eran portadores de muy pocos genes de resistencia a los antibióticos. De los 14 aislamientos estudiados el 100% eran portadores del gen *tetEfflux*, 13 (92,8%) eran portadores del operon *bla*, 2 (14,2%) llevan en su genoma el gen de resistencia a macrólidos *ermC*, 1 (7,1%) era portador del gen de resistencia a aminoglucósidos *aphD*, 1 del gen *sat* (7,1%), 2 (14,2%) del gen *tetK* y 13 (92,8%) del gen *fosB*.

En cuanto a los factores de virulencia, se encontraron varios genes que codifican enterotoxinas muy presentes en ST121. El gen *entB* estaba presente en el 42,8% de los

aislamientos, el gen *entI* en el 57,1%, mientras que los genes que conforman el cluster de enterotoxinas *egc* estaba presente en todos los aislados estudiados. La toxina LPV se detectó en el 78,5% de los aislamientos, lo que confirma que un elevado porcentaje de los aislamientos de linaje ST121 eran portadores de esta toxina. En cuanto a las hemolisinas, los genes que codifican las hemolisinas alfa, beta (truncada) y gamma estaban presentes en todos los aislados estudiados

Los genes que codifican factores de inmunoevasión, y que son llevados por los fagos *β -hemolysin -converting bacteriophages*, *sak* y *scn*, estaban presentes en todos los aislamientos analizados. Sin embargo, el gen *chp* no se encontró en ninguno de los mismos.

Los genes que codifican las toxinas exfoliativas A y B se detectaron en el genoma de un pequeño porcentaje de los aislamientos. El gen *etA* se encontró en el genoma de un aislamiento (7,1%), y el gen *etB* en el de 2 (14,2%). En cuanto a la familia de toxinas EDIN, se detectó la presencia del gen *edinC* en 2 aislamientos (14,2%).

Otros genes de virulencia que con mucha frecuencia se encontraron en los aislados pertenecientes a este linaje eran el gen *aur* y los genes *sspA*, *sspB* y *sspP*, presentes en el 100% de los aislamientos analizados. En cuanto a los genes que codifican las serinproteasas, *splA* estaba presente en el 64,2% de los aislamientos analizados y el gen *splB* en el 92,8%. Sin embargo, el gen *spIE* no se encontró en ninguno de los aislamientos analizados.

El serotipo capsular que caracterizaba al linaje ST121 era el 8. Los genes que codifican la formación de biofilm *icaA*, *icaC* e *icaD* estaban presentes en el genoma del 92,8% de los aislados. Sin embargo, el gen *bap* no estaba presente en ninguno de los aislamientos estudiados.

Los genes implicados en la adhesión se encontraron en la mayoría de los aislamientos estudiados de modo que los genes *cna*, *bbp*, *clfA*, *clfB*, *ebh*, *eno*, *fib*, *ebpS*, *fnbA*, *fnbB*, *map*, *sdrC* y *D* y *vwb* estaban presentes en todos ellos. Cabe destacar el gen *cna*, que codifica una proteína de adhesión al colágeno, que a diferencia de otros linajes estudiados, estaba presente en todos los aislamientos estudiados pertenecientes a ST121. Por otra parte, observamos que el gen que codifica la proteína de superficie G, *sasG* a diferencia de los otros linajes estudiados, estaba ausente en todos los aislamientos de ST121.

Los genes relacionados con la inmunoevasión *isaB*, *mprF*, *isdrA* e *ImrP* estaban presentes en todos los aislados analizados.

6.2.2. Contenido genético de los aislamientos de SASM pertenecientes al linaje ST30

Otro linaje de SASM que con mucha frecuencia encontramos como causa de infección tanto asociado a la comunidad como al sistema sanitario es ST30. ST30 además, es un linaje que con frecuencia es portador de la LPV, por todo ello, analizamos el contenido genético de 24 aislamientos.

El contenido genético del linaje ST30 se muestra en la tabla 36 donde se observa, que los aislados pertenecientes a ST30 son en general muy sensibles a los antibióticos. De los 24 aislamientos estudiados encontramos pocos aislamientos portadores de genes de resistencia. El operon *bla*, el gen *tetEflux* y el gen *fosB* los encontramos en todos los aislados estudiados, el gen *ermA* en 3 (12,5%), el gen *linA* en 1 (4,1%), el gen *aadD* en 1 (4,1%), el gen *tetK* en 2 (8,3%), el gen *tetM* en 1 (4,1%) y el gen *mupR* en 1 de los aislamientos analizados (4,1%).

En cuanto a los genes que codifican factores de virulencia, cabe destacar el gen *tst-1* que codifica la toxina del síndrome del shock tóxico, que lo encontramos presente en el genoma del 50% de los aislamientos analizados y que no lo encontramos en ninguno de los otros linajes estudiados. En cuanto a los genes que codifican enterotoxinas encontramos los genes *entG*, *entI*, *entM*, *entN*, *entU* pertenecientes al cluster *egc* en todos los aislamientos, el gen *entA* en el 54,1%, el gen *entC* en el 8,3% y el gen *entL* en el 8,3% de los aislados estudiados. Los genes que codifican la LPV estaban presentes en 8 aislamientos (33,3%) de los 24 analizados.

En cuanto a las hemolisinas, el gen que codifica la hemolisina alfa lo encontramos en el 95,8% de los aislamientos, la hemolisina beta (truncada) en el 41,6% de los mismos, la hemolisina delta en el 100% y de los genes que codifican la hemolisina gamma el 100% de los aislamientos fueron portadores de los genes *lukF* y *lukS* y el 65% del gen *hlgA*. Los genes implicados en la inmunoevasión *sak* y *scn* se detectaron en el genoma de todos los aislamientos analizados y el gen *chp* en el 95,8% de los mismos.

El serotipo capsular que caracterizó este linaje es el 8 y en cuanto a los genes implicados en la formación del biofilm *icaA*, *icaC* e *icaD*, los encontramos en todos los aislamientos sin embargo, no encontramos ningún aislado portador del gen *bap*.

En lo que se refiere a los factores de adhesión encontramos los genes *clfA*, *clfB*, *ebh*, *eno*, *ebps*, *fnbA*, *fnbB*, *map*, *sdrC*, *sdrD* y *vwb* en todos los aislados y también encontramos en todos ellos el gen *cna* presente también en el linaje ST121. Sin embargo, los genes *fib* y *sasG* no los encontramos en ninguno de los aislamientos estudiados.

Los genes relacionados con la inmunoevasión *isaB*, *isdrA* e *ImrP* estaban presentes en todos los aislados analizados y el gen *mprF* en el 87,5% de los mismos.

TABLA 36: CONTENIDO GENÉTICO DE LOS LINAJES DE SASM MÁS PREVALENTES

		ST121	ST30
Nº de aislamientos		14	24
<i>agr</i>		4	3
LPV		11 (78,5%)	8
Genes de resistencia			
<i>mecA</i>	<i>Methicillin, Oxacillin and all Beta-Lactams, defining MRSA</i>	-	-
<i>blaZ /blaI/blaR</i>	<i>Beta-Laktamase</i>	13 (92,8%)	+
<i>ermA</i>	<i>Macrolide, Lincosamide, Streptogramin</i>	-	3 (12,5%)
<i>ermB</i>	<i>Macrolide, Lincosamide, Streptogramin</i>	-	-
<i>ermC</i>	<i>Macrolide, Lincosamide, Streptogramin</i>	2 (14,2%)	-
<i>linA</i>	<i>Lincosamides</i>	-	1 (4,1%)
<i>msrA</i>	<i>Macrolide</i>	-	-
<i>mefA</i>	<i>Macrolide</i>	-	-
<i>mpbBM</i>	<i>Macrolide</i>	-	-
<i>vatA</i>	<i>Streptogramine</i>	-	-
<i>vatB</i>	<i>Streptogramine</i>	-	-
<i>vga</i>	<i>Streptogramine</i>	-	-
<i>vgaA</i>	<i>Streptogramine</i>	-	-
<i>vgb</i>	<i>Streptogramine</i>	-	-
<i>aacA-aphD</i>	<i>Aminoglycoside (Gentamicin, Tobramycin)</i>	-	-
<i>aadD</i>	<i>Aminoglycoside (Tobramycin, Neomycin)</i>	-	1 (4,1%)
<i>aphA</i>	<i>Aminoglycoside (Kanamycin, Neomycin)</i>	1 (7,1%)	-
<i>sat</i>	<i>Streptothricin</i>	1 (7,1%)	-
<i>dfiA</i>	<i>Trimethoprim</i>	-	-
<i>far</i>	<i>Fusidic acid</i>	-	-
Q6GD50	<i>Putative Fusidic Acid Resistance Protein</i>	-	-
<i>mupR</i>	<i>Mupirocin</i>	-	1 (4,1%)
<i>tetK</i>	<i>Tetracycline</i>	2 (14,2%)	2 (8,3%)
<i>tetM</i>	<i>Tetracycline</i>	-	1 (4,1%)
<i>tetEfflux</i>	<i>Tetracyclin Efflux Protein (Putative Transport Protein)</i>	+	+
<i>cat</i>	<i>Chloramphenicol</i>	-	-
<i>fexA</i>	<i>Chloramphenicol</i>	-	-
<i>cfr</i>	<i>Phenicol, Lincosamides, Oxazolidinones (Linezolid)</i>	-	-
<i>fosB</i>	<i>Putative Marker For Fosfomicin, Bleomycin</i>	13 (92,8%)	+
<i>vanA /vanB/vanC</i>	<i>Vancomycin</i>	-	-
mercury resistance locus	<i>Mercury resistance operon</i>	-	-
Factores de virulencia			
<i>tst-1</i>	<i>Toxic Shock Syndrome Toxin</i>	-	12 (50,0%)
<i>entA</i>	<i>Enterotoxin A</i>	-	13 (54,1%)
<i>entB</i>	<i>Enterotoxin B</i>	6 (42,8%)	-
<i>entC</i>	<i>Enterotoxin C</i>	-	2 (8,3%)
<i>entCM14</i>	<i>Enterotoxin -like Protein (ORF CM14 of U10927.2)</i>	+	-
<i>entD</i>	<i>Enterotoxin D</i>	-	-
<i>entE</i>	<i>Enterotoxin E</i>	-	-
<i>entG</i>	<i>Enterotoxin G</i>	-	+
<i>entH</i>	<i>Enterotoxin H</i>	-	-
<i>entI</i>	<i>Enterotoxin I</i>	8 (57,1%)	+
<i>entJ</i>	<i>Enterotoxin J</i>	-	-
<i>entK</i>	<i>Enterotoxin K</i>	-	-
<i>entL</i>	<i>Enterotoxin L</i>	-	2 (8,3%)
<i>entM</i>	<i>Enterotoxin M</i>	+	+
<i>entN</i>	<i>Enterotoxin N</i>	+	+
<i>entN_1</i>	<i>Enterotoxin N - other than RF122</i>	+	+
<i>entO</i>	<i>Enterotoxin O</i>	+	19 (79,1%)
<i>entQ</i>	<i>Enterotoxin Q</i>	-	-
<i>entR</i>	<i>Enterotoxin R</i>	-	-
<i>entU</i>	<i>Enterotoxin U</i>	+	+
<i>egc-cluster</i>	<i>Enterotoxins seg/sei/sem/sen/seo/seu</i>	+	+
PVL	<i>Pantone-Valentine Leukocidin</i>	11 (78,5%)	8 (33,3%)
<i>lukF</i>	<i>Haemolysin Gamma, Component B</i>	+	+
<i>lukS</i>	<i>Haemolysin Gamma, Component C</i>	+	+
<i>lukS-ST22+ST45</i>	<i>Haemolysin Gamma, Component C, allele from ST22 and ST45</i>	2 (14,2%)	-
<i>hlgA</i>	<i>Haemolysin Gamma, Component A</i>	+	13/20* (65,0%)

Resultados

<i>lukD</i>	Leukocidin D Component	7 (50,0%)	-
<i>lukE</i>	Leukocidin E Component	13 (92,8%)	-
<i>lukX</i>	Leukocidin/Haemolysin Toxin Family Protein	+	20/22* (90,9%)
<i>lukY-var1</i>	Leukocidin/Haemolysin Toxin Family Protein	13 (92,8%)	-
<i>lukY-var2</i>	Leukocidin/Haemolysin Toxin Family Protein, allele from MRSA252	-	+
<i>hl</i>	Hypothetical Protein similar to Haemolysin	+	+
<i>hla</i>	Haemolysin Alpha (Alpha Toxin)	+	23 (95,8%)
<i>hld</i>	Haemolysin Delta (Amphiphilic Membrane Toxin)	+	+
<i>hlIII</i>	Putative Haemolysin III	+	+
<i>hl_III_Other than RF122</i>	Putative Haemolysin III (other than RF122)	-	+
<i>hlb</i>	Haemolysine Beta (Phospholipase C)	+	10 (41,6%)
<i>un-truncated hlb</i>	Haemolysine Beta (Phospholipase C / un-truncated)	1 (7,1%)	-
<i>sak</i>	Staphylokinase	+	+
<i>chp(CHIPS)</i>	Chemotaxis Inhibitory Protein (CHIPS)	-	23 (95,8%)
<i>scn</i>	Staphylococcal Complement Inhibitor (SCIN)	+	+
etA			
<i>etA</i>	Exfoliative Toxin A	1 (7,1%)	-
<i>etB</i>	Exfoliative Toxin B	2 (14,2%)	-
<i>etD</i>	Exfoliative Toxin D	-	-
<i>edinA</i>	Epidermal cell differentiation inhibitor A	-	-
<i>edinB</i>	Epidermal cell differentiation inhibitor B	-	-
<i>edinC</i>	Epidermal cell differentiation inhibitor C	2 (14,2%)	-
aur			
<i>aur</i>	Aureolysin	+	23 (95,8%)
<i>spIA</i>	Serine Protease A	9 (64,2%)	-
<i>spB</i>	Serine Protease B	13 (92,8%)	-
<i>spE</i>	Serine Protease E	-	22 (91,6%)
<i>sspA</i>	Glutamyl Endopeptidase / V8-Protease	+	+
<i>sspB</i>	Staphopain B	+	+
<i>sspP</i>	Staphopain A (Staphylopain A)	+	+
ACME-locus			
<i>ACME-locus</i>	Arginine catabolic mobile element	-	-
Cápsula / Biofilm			
<i>capsule-1</i>	Capsule Type 1	-	-
<i>capsule-5</i>	Capsule Type 5	-	-
<i>capsule-8</i>	Capsule Type 8	+	+
<i>icaA</i>	Intercellular Adhesion Protein A (N-glycosyltransferase)	13 (92,8%)	+
<i>icaC</i>	Intercellular Adhesion Protein C	13 (92,8%)	+
<i>icaD</i>	Biofilm PIA Synthesis Protein D	13 (92,8%)	+
<i>bap</i>	Surface Protein Involved In Biofilm Formation	-	-
MSCRAMMs / Factores de adhesión			
<i>bbp-all</i>	Bone Sialoprotein-Binding Protein	+	22 (91,6%)
<i>clfA-all</i>	Clumping Factor A	+	+
<i>clfB-all</i>	Clumping Factor B	+	+
cna			
<i>cna</i>	Collagen-Binding Adhesin	+	+
<i>ebh-all</i>	Cell Wall Associated Fibronectin-Binding Protein	+	+
<i>eno</i>	Enolase, Phosphopyruvate Hydratase	+	+
<i>fib</i>	Fibrinogen Binding Protein	+	-
<i>fib-MRSA252</i>	Fibrinogen Binding Protein, allele from MRSA252	-	+
<i>ebpS</i>	Cell Wall Associated Fibronectin-Binding Protein	+	+
<i>fnbA-all</i>	Fibronectin-Binding Protein A	+	+
fnbB-COL			
<i>fnbB-COL</i>	Fibronectin-Binding Protein B	-	-
<i>fnbB-COL+Mu50+MW2</i>	Fibronectin-Binding Protein B, allele from COL / MU50 / MW2	11 (78,5%)	8 (33,3%)
<i>fnbB-Mu50</i>	Fibronectin-Binding Protein B, allele from MU50	-	9 (37,5%)
<i>fnbB-MW2</i>	Fibronectin-Binding Protein B, allele from MW2	-	-
<i>fnbB-ST15</i>	Fibronectin-Binding Protein B, allele from ST15	-	-
<i>fnbB-ST45-2</i>	Fibronectin-Binding Protein B, allele from ST45	-	-
map			
<i>map</i>	Major Histocompatibility Complex Class II Analog Protein	+	+
<i>sdrC-all</i>	Ser-Asp Rich Fibrinogen-Binding, Bone Sialoprotein-Binding Protein C	+	+
sdrD-COL+MW2			
<i>sdrD-COL+MW2</i>	Ser-Asp Rich Fibrinogen-Binding, Bone Sialoprotein-Binding Protein D	-	-
sdrD-Mu50			
<i>sdrD-Mu50</i>	Ser-Asp Rich Fibrinogen-Binding, Bone Sialoprotein-Binding Protein D, allele from MU50	-	-
sdrD-other			
<i>sdrD-other</i>	Ser-Asp Rich Fibrinogen-Binding, Bone Sialoprotein-Binding Protein D, allele from Other	-	22 (91,6%)
<i>sdrD-OtherThan252+122</i>	Ser-Asp Rich Fibrinogen-Binding, Bone	12 (85,7%)	22 (91,6%)

	<i>Sialoprotein-Binding Protein D, allele from Other Than MRSA252 / RF122</i>		
<i>vwb-all</i>	<i>Willebrand Factor - Binding Protein</i>	+	+
<i>sasG</i>	<i>S. aureus Surface Protein G</i>	-	-
Inmuno-evasión / Miscelánea			
<i>isaB</i>	<i>Immunodominant Antigen B</i>	+	+
<i>mprF</i>	<i>Probable Lysylphosphatidylglycerol Synthetase (Defensin Resistance)</i>	+	21 (87,5%)
<i>isdA</i>	<i>Heme/Transferrin-Binding Protein</i>	+	+
<i>ImrP</i>	<i>Putative Transporter Protein</i>	+	+

*Número de aislamientos positivos/ número de aislamientos interpretables

6.3. Comparación del contenido genético de los aislamientos LPV positivos y negativos de los principales linajes portadores de la toxina

En el estudio de las características clínicas de los aislamientos portadores de la LPV se objetivó que estos aislamientos producían un número significativamente mayor de infecciones de piel y tejidos blandos profundas, como abscesos y celulitis, que los que no eran portadores la toxina. Por ello, quisimos conocer si existían otros genes que pudieran estar asociados a los aislamientos LPV positivos y que pudieran ser por sí mismos o de manera coordinada con la toxina LPV, la causa de la mayor virulencia atribuida a los mismos. Para ello comparamos el contenido genético de aislamientos portadores de la toxina LPV pertenecientes a los linajes ST8, ST30 y ST121, (que fueron los linajes que con más frecuencia fueron portadores de la LPV) con el contenido genético de aislamientos pertenecientes a los mismos linajes pero que no producían la toxina.

En la tabla 37 se muestran los resultados de la comparación del contenido genético de los aislamientos portadores y no portadores de la toxina LPV.

En el linaje ST8 observamos una serie de genes asociados significativamente a los aislamientos LPV positivos, como los genes de resistencia *mecA* (72% vs. 25%, $p=0,035$) y el locus de resistencia al mercurio (68% vs. 12,5%, $p=0,011$) y los genes de

virulencia que codifican enteroxinas *entK* y *entQ* (80% vs. 25%, $p < 0,001$) y el gen *chp* que codifica la proteína CHIPS (96% vs. 25%, $p < 0,001$).

En cuanto al linaje ST30, observamos también ciertas diferencias significativas en el contenido genético de los aislamientos LPV positivos y LPV negativos. El gen *hly* que codifica la hemolisina beta truncada se asoció significativamente a los aislados portadores de la LPV (90% vs. 18,7%, $p < 0,001$) y también 2 alelos del gen *fnb* que codifica una proteína de unión a la fibronectina, *fnb*-COL+Mu50+MW2 (70% vs. 12,5%, $p = 0,008$) y *fnb*-Mu50 (80% vs. 12,5%, $p = 0,001$).

Del análisis de los aislamientos pertenecientes al linaje ST121 comprobamos que el alelo del gen *SdrD*, *SdrD* other than 252+12, que codifica una proteína de unión a la sialoproteína del hueso, se encontraba asociado de forma significativa a los aislamientos LPV positivos (83,3% vs. 20%, $p = 0,027$).

Encontramos a su vez algunos genes asociados de forma significativa a los aislamientos no portadores de la toxina. El gen *entA* que codifica la enterotoxina A, lo encontramos asociado de forma significativa a los aislamientos LPV negativos en los linajes ST8 (62,5 vs 0%, $p < 0,001$) y ST30 (75% vs 10%, $p = 0,004$). El gen *tst* que codifica la toxina del síndrome del shock tóxico, se asoció significativamente a los aislados LPV negativos del linaje ST30 (75% vs. 20%, $p = 0,013$) y el gen *hly* que codifica la hemolisina alfa se asoció a los aislados LPV negativos pertenecientes al linaje ST121 (80% vs. 0%, $p = 0,002$).

TABLA 37: COMPARACIÓN DEL CONTENIDO GENÉTICO DE LOS AISLAMIENTOS LPV POSITIVOS Y NEGATIVOS DE LOS PRINCIPALES LINAJES PORTADORES DE LA TOXINA

		ST8 LPV +	ST8 LPV-	P	ST30 LPV +	ST30 LPV-	P	ST121 LPV+	ST121 LPV-	P
Nº de aislamientos		25	8		10	16		12	5	
Genes de resistencia										
<i>mecA</i>	Methicillin, Oxacillin and all Beta-Lactams, defining MRSA	18 (72,0%)	2 (25,0%)	0,035	2 (20,0%)	-	0,138	-	-	
<i>blaZ</i>	Beta-Laktamase	+	+		+	+		11 (91,6%)	+	1,000
<i>blaI</i>	Beta Lactamase Repressor (Regulatory Protein)	+	+		+	+		11 (91,6%)	+	1,000
<i>blaR</i>	Beta Lactamase Regulatory Protein	+	+		+	+		11 (91,6%)	+	1,000
<i>ermA</i>	Macrolide, Lincosamide, Streptogramin	-	-		-	3 (18,7%)	0,261	-	-	
<i>ermB</i>	Macrolide, Lincosamide, Streptogramin	-	-		-	-		-	-	
<i>ermC</i>	Macrolide, Lincosamide, Streptogramin	-	1 (12,5%)	0,242	-	-		-	2 (40,0%)	0,073
<i>linA</i>	Lincosamides	-	-		1 (10,0%)	-	0,384	-	-	
<i>msrA</i>	Macrolide	3 (12,0%)	-	0,560	-	-		-	-	
<i>mefA</i>	Macrolide	-	-		-	-		-	-	
<i>mpbBM</i>	Macrolide	3 (12,0%)	-	0,560	-	-		-	-	
<i>vatA</i>	Streptogramine	-	-		-	-		-	-	
<i>vatB</i>	Streptogramine	-	-		-	-		-	-	
<i>vga</i>	Streptogramine	-	-		-	-		-	-	
<i>vgaA</i>	Streptogramine	-	-		-	-		-	-	
<i>vgb</i>	Streptogramine	-	-		-	-		-	-	
<i>aacA-aphD</i>	Aminoglycoside (Gentamicin, Tobramycin)	1 (4,0%)	-	1,000	-	-		-	-	
<i>aacD</i>	Aminoglycoside (Tobramycin, Neomycin)	2 (8,0%)	-	1,000	1 (10,0%)	-	0,384	-	-	
<i>aphA</i>	Aminoglycoside (Kanamycin, Neomycin)	2 (8,0%)	-	1,000	-	-		1 (8,3%)	-	1,000
<i>sat</i>	Streptothricin	1 (4,0%)	-	1,000	-	-		1 (8,3%)	-	1,000
<i>dfrA</i>	Trimethoprim	-	-		-	-		-	-	
<i>far</i>	Fusidic acid	-	-		-	-		-	-	
Q6GD50	Putative Fusidic Acid Resistance Protein	-	-		-	-		-	-	
<i>mupR</i>	Mupirocin	2 (8,0%)	-	1,000	-	1 (6,2%)	1,000	-	-	
<i>tetK</i>	Tetracycline	4 (16,0%)	-	0,550	2 (20,0%)	-	0,138	2 (16,6%)	-	1,000
<i>tetM</i>	Tetracycline	-	1 (12,5%)	0,242	1 (10,0%)	1 (6,2%)	1,000	-	-	
<i>tetEfflux</i>	Tetracyclin Efflux Protein (Putative Transport Protein)	+	+		+	+		+	+	
<i>cat</i>	Chloramphenicol	-	-		-	-		-	-	
<i>fexA</i>	Chloramphenicol	-	-		-	-		-	-	
<i>cfp</i>	Phenicolis, Lincosamides, Oxazolidinones (Linezolid)	-	-		-	-		-	-	
<i>fosB</i>	Putative Marker For Fosfomicin, Bleomycin	+	+		+	+		+	3 (60,0%)	0,073
<i>vanA/ vanB/ vanC</i>	Vancomycin	-	-		-	-		-	-	
mercury resistance locus	Mercury resistance operon	17 (68,0%)	1 (12,5%)	0,011	-	-		-	-	
<i>qacA</i>	Unspecific efflux pump	-	-		-	-		-	-	
<i>qacC</i>	Unspecific efflux pump	1 (4,0%)	-	1,000	-	-		-	-	
Factores de virulencia										
<i>tst-1</i>	Toxic Shock Syndrome Toxin	-	-		2 (20,0%)	12 (75,0%)	0,013	-	-	
<i>entA</i>	Enterotoxin A	-	5 (62,5%)	<0,001	1 (10,0%)	12 (75,0%)	0,004	-	-	
<i>entB</i>	Enterotoxin B	-	-		1 (10,0%)	-	0,384	5 (41,6%)	1 (20,0%)	0,600
<i>entC</i>	Enterotoxin C	-	-		2 (20,0%)	2 (12,5%)	0,625	-	-	
<i>entCM14</i>	Enterotoxin-like Protein (ORF CM14 of U10927.2)	-	-		-	-		+	+	
<i>entD</i>	Enterotoxin D	5 (20,0%)	4 (50,0%)	0,169	-	-		-	-	
<i>entE</i>	Enterotoxin E	-	-		-	-		-	-	
<i>entG</i>	Enterotoxin G	-	1 (12,5%)	0,242	+	+		11 (91,6%)	+	1,000
<i>entH</i>	Enterotoxin H	-	-		-	-		-	-	
<i>entI</i>	Enterotoxin I	-	1 (12,5%)	0,242	+	+		5 (41,6%)	1 (20,0%)	0,600
<i>entJ</i>	Enterotoxin J	5 (20,0%)	4 (50,0%)	0,169	-	-		-	-	
<i>entK</i>	Enterotoxin K	20 (80,0%)	2 (25,0%)	<0,001	1 (10,0%)	-	0,384	-	-	
<i>entL</i>	Enterotoxin L	-	-		2 (20,0%)	2 (12,5%)	0,625	-	-	
<i>entM</i>	Enterotoxin M	-	1 (12,5%)	0,242	+	+		+	+	
<i>entN</i>	Enterotoxin N	-	1 (12,5%)	0,242	+	+		+	+	
<i>entN_1</i>	Enterotoxin N - other than RF122	-	1 (12,5%)	0,242	+	+		+	+	
<i>entO</i>	Enterotoxin O	-	1 (12,5%)	0,242	8 (80,0%)	13 (81,2%)	1,000	+	4 (80,0%)	0,294
<i>entQ</i>	Enterotoxin Q	20 (80,0%)	2 (25,0%)	<0,001	1 (10,0%)	-	0,384	-	-	
<i>entR</i>	Enterotoxin R	3 (12,0%)	1 (12,5%)	1,000	-	-		-	-	
<i>entU</i>	Enterotoxin U	-	1 (12,5%)	0,242	+	+		+	+	
<i>egc-cluster</i>	Enterotoxins seg/ser/sem/seu	-	1 (12,5%)	0,242	+	+		+	+	
PVL	Pantone-Valentine Leukocidin	+	-		+	-		+	-	
<i>lukF</i>	Haemolysin Gamma, Component B	24 (96,0%)	+	1,000	+	+		+	+	
<i>lukS</i>	Haemolysin Gamma, Component C	+	+		+	+		+	+	
<i>lukS-</i>	Haemolysin Gamma,	1 (4,0%)	-	1,000	1 (10,0%)	-	0,384	1 (8,3%)	2 (40,0%)	0,191

Resultados

ST22+ST45	Component C, allele from ST22 and ST45									
hlgA	Haemolysin Gamma, Component A	9 (36,0%)	6 (75,0%)	0,101	5 (50,0%)	8 (50,0%)	1,000	11 (91,6%)	2 (40,0%)	0,191
lukD	Leukocidin D Component	+	+		-	-		7 (58,3%)	2 (40,0%)	0,619
lukE	Leukocidin E Component	22 (88,0%)	+	0,560	-	-		10 (83,3%)	4 (80,0%)	1,000
lukX	Leukocidin/Haemolysin Toxin Family Protein	13 (52,0%)	5 (62,5%)	0,699	9 (90,0%)	13 (81,2%)	1,000	11 (91,6%)	2 (40,0%)	0,052
lukY-var1	Leukocidin/Haemolysin Toxin Family Protein	+	7 (87,5%)	0,242	-	-		11 (91,6%)	4 (80,0%)	0,514
lukY-var2	Leukocidin/Haemolysin Toxin Family Protein, allele from MRSA252	-	-		+	+		-	-	
hl	Hypothetical Protein similar to Haemolysin	+	+		+	+		+	+	
hla	Haemolysin Alpha (Alpha Toxin)	24 (96,0%)	7 (87,5%)	0,431	8 (80,0%)	+	0,138	-	4 (80,0%)	0,002
hld	Haemolysin Delta (Amphiphilic Membrane Toxin)	24 (96,0%)	+	1,000	+	+		+	4 (80,0%)	0,294
hlIII	Putative Haemolysin III	+	+		+	+		+	+	
hl_III_Other than RF122	Putative Haemolysin III (other than RF122)	24 (96,0)	+	1,000	+	+		-	-	
hlyb	Haemolysine Beta (Phospholipase C)	+	7 (87,5%)	0,242	9 (90,0%)	3 (18,7%)	<0,001	+	4 (80,0%)	0,294
un-truncated hlyb	Haemolysine Beta (Phospholipase C / un-truncated)	1 (4,0%)	1 (12,5%)	0,431	-	-		-	1 (20,0%)	0,294
sak	Staphylokinase	24 (96,0%)	+	1,000	+	+		+	+	
chp(CHIPS)	Chemotaxis Inhibitory Protein (CHIPS)	24 (96,0%)	2 (25,0%)	<0,001	8 (80,0%)	+	0,138	-	-	
scn	Staphylococcal Complement Inhibitor (SCIN)	24 (96,0%)	+	1,000	+	+		+	+	
etA	Exfoliative Toxin A	-	-		-	-		-	1 (20,0%)	0,294
etB	Exfoliative Toxin B	-	-		-	-		-	2 (40,0%)	0,073
etD	Exfoliative Toxin D	-	-		-	-		-	-	
edinA	Epidermal cell differentiation inhibitor A	-	-		-	-		-	-	
edinB	Epidermal cell differentiation inhibitor B	-	-		-	-		-	-	
edinC	Epidermal cell differentiation inhibitor C	-	-		-	-		-	2 (40,0%)	0,073
aur	Aureolysin	21 (84,0%)	+	0,550	9 (90,0%)	+	0,384	+	+	
spIA	Serine Protease A	23 (92,0%)	7 (87,5%)	1,000	-	-		6	4 (80,0%)	0,338
spIB	Serine Protease B	23 (92,0%)	+	1,000	-	-		11 (91,6%)	+	1,000
spIE	Serine Protease E	22 (88,0%)	7 (87,5%)	1,000	9 (90,0%)	15 (93,7%)	1,000	-	-	
sspA	Glutaryl Endopeptidase / V8-Protease	+	+		+	+		+	+	
sspB	Staphopain B	+	+		+	+		+	+	
sspP	Staphopain A (Staphylopain A)	+	+		+	+		+	+	
ACME-locus	Arginine catabolic mobile element	2 (8,0%)	-	1,000	-	-		-	-	
Cápsula / Biofilm										
capsule-1	Capsule Type 1	-	-		-	-		-	-	
capsule-5	Capsule Type 5	+	+		-	-		-	-	
capsule-8	Capsule Type 8	-	-		+	+		+	+	
icaA	Intercellular Adhesion Protein A (N-glycosyltransferase)	+	+		+	+		+	4 (80,0%)	0,294
icaC	Intercellular Adhesion Protein C	+	+		+	+		+	4 (80,0%)	0,294
icaD	Biofilm PIA Synthesis Protein D	+	+		+	+		+	4 (80,0%)	0,294
bap	Surface Protein Involved In Biofilm Formation	-	-		-	-		-	-	
MSCRAMMS /Factores de adhesión										
bbp-all	Bone Sialoprotein-Binding Protein	22 (88,0%)	+	0,560	+	14 (87,5%)	0,507	+	3 (60,0%)	0,073
clfA-all	Clumping Factor A	+	+		+	+		+	+	
clfB-all	Clumping Factor B	23 (92,0%)	+	1,000	+	+		+	+	
cna	Collagen-Binding Adhesin	-	-		+	+		11 (91,6%)	3 (60,0%)	0,191
ebh-all	Cell Wall Associated Fibronectin-Binding Protein	+	+		+	+		+	+	
eno	Enolase, Phosphopyruvate Hydratase	24 (96,0%)	+	1,000	+	+		+	+	
fib	Fibrinogen Binding Protein	+	+		-	-		+	+	
fib-MRSA252	Fibrinogen Binding Protein, allele from MRSA252	-	-		+	+		-	-	
ebpS	Cell Wall Associated Fibronectin-Binding Protein	+	+		+	+		+	+	
fnbA-all	Fibronectin-Binding Protein A	24 (96,0%)	+	1,000	+	+		+	+	
fnbB-COL	Fibronectin-Binding Protein B	+	+		-	-		-	-	
fnbB-COL+Mu50+MW2	Fibronectin-Binding Protein B, allele from COL / MU50 / MW2	+	+		7 (70,0%)	2 (12,5%)	0,008	10 (83,3%)	2 (40,0%)	0,116
fnbB-Mu50	Fibronectin-Binding Protein B, allele from MU50	-	-		8 (80,0%)	2 (12,5%)	0,001	-	-	
fnbB-MW2	Fibronectin-Binding Protein B, allele from MW2	-	-		-	-		-	-	
fnbB-ST15	Fibronectin-Binding Protein B, allele from ST15	-	-		-	-		-	-	
fnbB-ST45-2	Fibronectin-Binding Protein B, allele from ST45	-	-		-	-		-	-	

<i>map</i>	Major Histocompatibility Complex Class II Analog Protein	+	+		+	+		+	+	
<i>sdrC</i> -all	Ser-Asp Rich Fibrinogen-Binding, Bone Sialoprotein-Binding Protein C	24 (96,0%)	+	1,000	+	+		+	+	
<i>sdrD</i> -COL+MW2	Ser-Asp Rich Fibrinogen-Binding, Bone Sialoprotein-Binding Protein D	12 (48,0%)	6 (75,0%)	0,241	-	-		-	-	
<i>sdrD</i> -Mu50	Ser-Asp Rich Fibrinogen-Binding, Bone Sialoprotein-Binding Protein D, allele from MU50	-	1 (12,5%)	0,242	-	-		-	-	
<i>sdrD</i> -other	Ser-Asp Rich Fibrinogen-Binding, Bone Sialoprotein-Binding Protein D, allele from Other	-	-		+	14 (87,5%)	0,507	-	-	
<i>sdrD</i> -OtherThan25 2+122	Ser-Asp Rich Fibrinogen-Binding, Bone Sialoprotein-Binding Protein D, allele from Other Than MRSA252 / RF122	22 (88,0%)	+	0,560	+	14 (87,5%)	0,507	10 (83,3%)	1 (20,0%)	0,027
<i>vwb</i> -all	Willebrand Factor - Binding Protein	+	+		+	+		+	+	
<i>sasG</i>	S. aureus Surface Protein G	+	+		-	-		-	-	
Inmunoevasión / Miscelánea										
<i>isaB</i>	Immunodominant Antigen B	+	+		+	+		+	+	
<i>mprF</i>	Probable Lysylphosphatidylglycerol Synthetase (Defensin Resistance)	18 (72,0%)	6 (75,0%)	1,000	9 (90,0%)	14 (87,5%)	1,000	+	4 (80,0%)	0,294
<i>isdA</i>	Heme/Transferrin-Binding Protein	+	+		+	+		+	+	
<i>ImrP</i>	Putative Transporter Protein	+	+		+	+		+	+	

6.4. Comparación del contenido genético de los aislamientos LPV positivos y negativos estratificando por la resistencia a meticilina

Al comparar el contenido genético de los aislamientos LPV positivos y negativos de cada linaje individualmente, observamos una serie de genes asociados de forma significativa a los aislamientos portadores de la toxina. Con el objetivo de ampliar el número de aislamientos estudiados, y de que la resistencia a meticilina no influyera en la comparación, llevamos a cabo un estudio comparativo del contenido genético de los aislamientos portadores de la toxina y los que no lo son, independientemente de la cepa y estratificando por la resistencia a la meticilina.

En la tabla 38 se muestran los factores de virulencia de los 43 aislamientos de SARM analizados (21 LPV positivos y 22 LPV negativos) y de los 107 aislamientos de SASM estudiados (51 LPV positivos y 56 LPV negativos). De la comparación se puede destacar la existencia de varios genes que encontramos asociados a las cepas LPV

positivas independientemente de la resistencia a meticilina. Los genes *entK* y *entQ* que codifican las enterotoxinas K y Q se encontraron significativamente asociados a las cepas LPV positivas (SARM: 76,2% vs. 4,5%, $p<0,001$) (SASM: 21,6% vs. 1,8%, $P=0,001$) así como también el gen *hly* que codifica la hemolisina beta truncada (SARM: 95,2% vs. 59,1, $p=0,009$) (SASM: 74,5% vs. 50%, $p=0,009$).

Por otro lado, encontramos una serie de genes que se encontraron más representados en las cepas LPV negativas, estos son *entG*, *entI*, *entM*, *entN* y *entU* que codifican las enterotoxinas I, M, N y U y que forman parte del cluster *egc* (SARM: 77,3% vs. 9,5%, $p<0,001$) (SASM: 82,7% vs. 60,8%, $p=0,013$). También se puede apreciar que el gen *entA* que se encontraba asociado de forma significativa a los aislamientos LPV negativos de los linajes ST30 y ST8 también en este caso se encontraron en una mayor proporción en los aislamientos LPV negativos tanto en las cepas sensibles como resistentes a meticilina, aunque el análisis estadístico es significativo para los aislados de SARM (22,7% vs 0%, $p=0,048$) pero no lo es para los de SASM (40% vs. 23,5%, $p=0,069$). También es importante destacar, que el linaje ST5 se asoció de forma significativa a los aislamientos LPV negativos independientemente de la resistencia a meticilina (SARM: 22,7% vs. 0%, $p=0,048$) (SASM: 19,6% vs. 2%, $p=0,004$).

TABLA 38: COMPARACIÓN DEL CONTENIDO GENÉTICO DE LOS AISLAMIENTOS LPV POSITIVOS Y NEGATIVOS ESTRATIFICANDO POR LA RESISTENCIA A METICILINA

		MRSA			MSSA		
		LPV+	LPV-	P	LPV+	LPV-	P
Número de aislamientos		21	22		51	56	
ST8		18 (85,7%)	2 (9,1%)	<0,001	7/50 (14,0%)	7 (12,5%)	0,820
ST30		2 (9,5%)	0	0,233	8/50 (16,0%)	16 (28,6%)	0,123
ST121		0	0		12/50 (24,0%)	5 (8,9%)	0,035
ST5		0	5 (22,7%)	0,048	1/50 (2,0%)	11 (19,6%)	0,004
Otros STs		1 (4,8%)	15 (68,2%)	<0,001	28/50 (56,0%)	17 (30,4%)	0,007
AGR							
Agr1		18 (85,7%)	10/21 (47,6%)	0,009	14/44 (31,8%)	17/53 (32,1%)	0,978
Agr2		0	9/21 (42,9%)	0,001	9/44 (20,5%)	13/53 (24,5%)	0,633
Agr3		3 (14,3%)	2/21 (9,5%)	1,0	9/44 (20,5%)	18/53 (34,0%)	0,139
Agr4		0	0		12/44 (27,3%)	5/53 (9,4%)	0,021
Genes de resistencia							
<i>mecA</i>	Methicillin, Oxacillin and all Beta-Lactams, defining MRSA	21 (100%)	22 (100%)		0	0	
<i>blaZIR</i>	Beta-Laktamase operon	21 (100%)	22 (100%)		47 (92,2%)	54 (96,4%)	0,421
<i>ermA</i>	Macrolide, Lincosamide, Streptogramin	0	0		1/50 (2,0%)	2/50 (4,0%)	1,0
<i>ermB</i>	Macrolide, Lincosamide, Streptogramin	0	0		0	0	
<i>ermC</i>	Macrolide, Lincosamide, Streptogramin	*1/20 (5,0%)	5 (22,7%)	0,187	0	7 (12,5%)	0,013
<i>msrA</i>	Macrolide	2 (9,5%)	6 (27,3%)	0,240	1 (2,0%)	0	0,477
<i>mefA</i>	Macrolide	0	0		0	0	
<i>aacA-aphD</i>	Aminoglycoside (Gentamicin, Tobramycin)	0	6 (27,3%)	0,021	1/49 (2,0%)	0/53 (0%)	0,480
<i>aacD</i>	Aminoglycoside (Tobramycin, Neomycin)	0	7/20 (35,0%)	0,003	3 (5,9%)	1 (1,8%)	0,346
<i>aphA</i>	Aminoglycoside (Kanamycin, Neomycin)	2 (9,5%)	6 (28,6%)	0,238	1 (2,0%)	0/55 (0%)	0,481
<i>dfrA</i>	Trimethoprim	0	1 (4,5%)	1,0	0	0	
<i>far</i>	Fusidic acid	1 (4,8%)	0	0,488	0	0	
<i>mupR</i>	Mupirocin	0	5 (22,7%)	0,048	2 (3,9%)	1 (1,8%)	0,604
<i>tetK</i>	Tetracycline	4 (19,0%)	1/21 (4,8%)	0,343	5/49 (10,2%)	1 (1,8%)	0,095
<i>tetM</i>	Tetracycline	1 (4,8%)	1 (4,5%)	1,0	0/49 (0%)	2/53 (3,8%)	0,496
<i>tetEfflux</i>	Tetracyclin Efflux Protein (Putative Transport Protein)	21 (100%)	18 (81,8%)	0,108	45 (88,2%)	54 (96,4%)	0,148
<i>Cfr</i>	Phenicolis, Lincosamides, Oxazolidinones (Linezolid)	0	0		0	0	
mercury resistance locus	Mercury resistance operon	16 (76,2%)	1 (4,5%)	<0,001	1 (2%)	0	0,477
Factores de virulencia							
<i>tst-1</i>	Toxic Shock Syndrome Toxin	2 (9,5%)	0	0,233	0	16/55 (29,1%)	<0,001
<i>entA</i>	Enterotoxin A	0	5 (22,7%)	0,048	12 (23,5%)	22/55 (40,0%)	0,069
<i>entB</i>	Enterotoxin B	1 (4,8%)	0	0,488	7 (13,7%)	1/53 (1,9%)	0,030
<i>entC</i>	Enterotoxin C	2 (9,5%)	3 (13,6%)	1,0	8 (15,7%)	6/55 (10,9%)	0,468
<i>entD</i>	Enterotoxin D	0	1/21 (4,8%)	1,0	5 (9,8%)	5 (8,9%)	1,0
<i>entE</i>	Enterotoxin E	0	0		0	0	
<i>entG</i>	Enterotoxin G	2 (9,5%)	13/21 (61,9%)	<0,001	24 (47,1%)	46/55 (83,6%)	<0,001
<i>entH</i>	Enterotoxin H	0	2 (9,1%)	0,488	2 (3,9%)	2/54 (3,7%)	1,0
<i>entI</i>	Enterotoxin I	2 (9,5%)	17 (77,3%)	0,001	25/49 (51,0%)	43 (76,8%)	0,006
<i>entJ</i>	Enterotoxin J	0	1 (4,5%)	1,0	5 (9,8%)	5 (8,9%)	1,0
<i>entK</i>	Enterotoxin K	16 (76,2%)	1 (4,5%)	<0,001	11 (21,6%)	1 (1,8%)	0,001
<i>entL</i>	Enterotoxin L	2 (9,5%)	3 (13,6%)	1,0	8 (15,7%)	6 (10,7%)	0,446
<i>entM</i>	Enterotoxin M	2 (9,5%)	17 (77,3%)	<0,001	32 (62,7%)	47 (83,9%)	0,013
<i>entN</i>	Enterotoxin N	2 (9,5%)	17 (77,3%)	<0,001	29/50 (58,0%)	46/55 (83,6%)	0,004
<i>entO</i>	Enterotoxin O	2 (9,5%)	17 (77,3%)	<0,001	27/50 (54,0%)	37 (66,1%)	0,205
<i>entQ</i>	Enterotoxin Q	16 (76,2%)	1 (4,5%)	<0,001	11 (21,6%)	1 (1,8%)	0,001
<i>entR</i>	Enterotoxin R	0	0		3/50 (6,0%)	3/55 (5,5%)	1,0
<i>entU</i>	Enterotoxin U	2 (9,5%)	16 (72,7%)	<0,001	31 (60,8%)	47 (83,9%)	0,007
<i>egc-cluster</i>	Enterotoxins seg/sei/sem/sen/seo/seu	2 (9,5%)	17 (77,3%)	<0,001	31 (60,8%)	43/52 (82,7%)	0,013
<i>lukF</i>	Haemolysin Gamma, Component B	21 (100,0%)	18 (81,8%)	0,108	45/50 (90,0%)	55 (98,2%)	0,098
<i>lukS</i>	Haemolysin Gamma, Component C	21 (100,0%)	18 (81,8%)	0,108	44 (86,3%)	48/52 (92,3%)	0,322
<i>hlgA</i>	Haemolysin Gamma, Component A	6/16 (37,5%)	14/20 (70,0%)	0,051	31/46 (67,4%)	39/51 (76,5%)	0,319
<i>lukY-var1</i>	Leukocidin/Haemolysin Toxin Family Protein	19 (90,5%)	19/21 (90,5%)	1,000	38/50 (76,0%)	28 (50,0%)	0,006
<i>lukY-var2</i>	Leukocidin/Haemolysin Toxin Family Protein, allele from MRSA252	2 (9,5%)	0	0,233	9 (17,6%)	25 (44,6%)	0,003
<i>hl</i>	Hypothetical Protein similar to Haemolysin	21 (100%)	22 (100%)		49 (96,1%)	56 (100%)	0,225
<i>hla</i>	Haemolysin Alpha (Alpha Toxin)	20 (95,2%)	18/21 (85,7%)	0,606	46 (90,2%)	51 (91,1%)	1,0
<i>hld</i>	Haemolysin Delta (Amphiphilic Membrane Toxin)	21 (100,0%)	21 (95,5%)	1,0	47/49 (95,9%)	53 (94,6%)	1,0
<i>hlll</i>	Putative Haemolysin III	21 (100,0%)	18 (81,8%)	0,108	48 (94,1%)	54 (96,4%)	0,668
<i>hlyB</i>	Haemolysin Beta (Phospholipase C)	20 (95,2%)	13 (59,1%)	0,009	38 (74,5%)	28 (50,0%)	0,009
un-truncated <i>hlyB</i>	Haemolysin Beta (Phospholipase C / un-truncated)	0	6 (27,3%)	0,021	3 (5,9%)	4 (7,1%)	1,0
<i>sak</i>	Staphylokinase	21 (100,0%)	15 (68,2%)	0,009	44 (86,3%)	51 (91,1%)	0,432
<i>chp</i> (CHIPS)	Chemotaxis Inhibitory Protein (CHIPS)	19 (90,5%)	11 (50,0%)	0,004	25 (49,0%)	38 (67,9%)	0,048
<i>scn</i>	Staphylococcal Complement Inhibitor (SCIN)	21 (100,0%)	15 (68,2%)	0,009	48 (94,1%)	53 (94,8%)	1,000
<i>etA</i>	Exfoliative Toxin A	0	0		0	2 (3,6%)	0,496
<i>etB</i>	Exfoliative Toxin B	0	0		0	2 (3,6%)	0,496
<i>etD</i>	Exfoliative Toxin D	0	0		0	2 (3,6%)	0,496
<i>edinA</i>	Epidermal cell differentiation inhibitor A	0	0		4 (7,8%)	0	0,048

Resultados

<i>edinB</i>	<i>Epidermal cell differentiation inhibitor B</i>	1 (4,8%)	0	0,488	2 (3,9%)	2 (3,6%)	1,0
<i>edinC</i>	<i>Epidermal cell differentiation inhibitor C</i>	0	0		0	2 (3,6%)	0,496
ACME-locus							
<i>aur</i>	<i>Aureolysin</i>	18 (85,7%)	20/21 (95,2%)	0,606	43/49 (87,8%)	48/55 (87,3%)	0,941
<i>spIA</i>	<i>Serine Protease A</i>	19 (90,5%)	17 (77,3%)	0,412	25/50 (50,0%)	26 (46,4%)	0,713
<i>spB</i>	<i>Serine Protease B</i>	19 (90,5%)	17 (77,3%)	0,412	32 (62,7%)	28 (50,0%)	0,185
<i>spE</i>	<i>Serine Protease E</i>	19 (90,5%)	1 (40,5%)	<0,001	21 (41,2%)	30 (57,6%)	0,200
<i>sspA</i>	<i>Glutamyl Endopeptidase / V8-Protease</i>	21 (100%)	22 (100%)		51 (100%)	56 (100%)	
<i>sspB</i>	<i>Staphopain B</i>	21 (100%)	22 (100%)		51 (100%)	56 (100%)	
<i>sspP</i>	<i>Staphopain A (Staphylopain A)</i>	21 (100%)	22 (100%)		51 (100%)	56 (100%)	
ACME-locus							
<i>ACME-locus</i>	<i>Arginine catabolic mobile element</i>	2 (9,5%)	0	0,233	0	0	
Cápsula / Biofilm							
<i>capsule-5</i>	<i>Capsule Type 5</i>	18 (85,7%)	20 (90,9%)	0,664	24 (47,1%)	23 (41,1%)	0,533
<i>capsule-8</i>	<i>Capsule Type 8</i>	3 (14,3%)	2 (9,1%)	0,664	27 (52,9%)	34 (60,7%)	0,417
<i>icaA</i>	<i>Intercellular Adhesion Protein A (N-glycosyltransferase)</i>	21 (100%)	22 (100%)		51 (100%)	55 (98,2%)	1,000
<i>icaC</i>	<i>Intercellular Adhesion Protein C</i>	21 (100%)	22 (100%)		51 (100%)	55 (98,2%)	1,000
<i>icaD</i>	<i>Biofilm PIA Synthesis Protein D</i>	21 (100%)	22 (100%)		51 (100%)	55 (98,2%)	1,000
<i>bap</i>	<i>Surface Protein Involved In Biofilm Formation</i>	0	0		0	0	
MSCRAMMs / Factores de adhesión							
<i>bbp-all</i>	<i>Bone Sialoprotein-Binding Protein</i>	19 (90,5%)	19 (86,4%)	1,0	48/49 (98,0%)	45/55 (81,8%)	0,008
<i>clfA-all</i>	<i>Clumping Factor A</i>	21 (100%)	22 (100%)		51 (100%)	48 (85,7%)	0,006
<i>clfB-all</i>	<i>Clumping Factor B</i>	19 (90,5%)	21 (95,5%)	0,607	51 (100%)	55 (98,2%)	1,000
<i>cna</i>	<i>Collagen-Binding Adhesin</i>	2 (9,5%)	7 (31,8%)	0,132	30/50 (60,0%)	28/55 (50,9%)	0,349
<i>ebh-all</i>	<i>Cell Wall Associated Fibronectin-Binding Protein</i>	21 (100%)	18 (81,8%)	0,108	48 (94,1%)	54 (96,4%)	0,668
<i>eno</i>	<i>Enolase, Phosphopyruvate Hydratase</i>	21 (100%)	21 (95,5%)	1,0	49 (96,1%)	56 (100%)	0,225
<i>fib</i>	<i>Fibrinogen Binding Protein</i>	19 (90,5%)	17 (77,3%)	0,412	37 (72,5%)	29 (51,8%)	0,027
<i>ebpS</i>	<i>Cell Wall Associated Fibronectin-Binding Protein</i>	21 (100%)	22 (100%)		21 (100%)	22 (100%)	
<i>map</i>	<i>Major Histocompatibility Complex Class II Analog Protein</i>	21 (100%)	19 (86,4%)	0,233	48 (94,1%)	56 (100%)	0,105
<i>sdnC-all</i>	<i>Ser-Asp Rich Fibrinogen-Binding, Bone Sialoprotein-Binding Protein C</i>	21 (100%)	21 (95,5%)	1,0	46 (90,2%)	56 (100%)	0,022
<i>vwb-all</i>	<i>Willebrand Factor - Binding Protein</i>	21 (100%)	22 (100%)		50 (98,0%)	41/48 (87,5%)	0,055
<i>sasG</i>	<i>S. aureus Surface Protein G</i>	19 (90,5%)	19 (86,4%)	1,0	28 (54,9%)	21/48 (43,8%)	0,267
Inmuno-evasión / Miscelánea.							
<i>isaB</i>	<i>Immunodominant Antigen B</i>	21 (100%)	22 (100%)		51 (100%)	56 (100%)	
<i>mprF</i>	<i>Probable Lysylphosphatidylglycerol Synthetase (Defensin Resistance)</i>	17/20 (85,0%)	18 (81,8%)	1,0	41/50 (82,0%)	39/47 (83,0%)	0,899
<i>isdA</i>	<i>Heme/Transferrin-Binding Protein</i>	21 (100%)	22 (100%)		49/50 (98,0%)	48/48 (100%)	1,000
<i>lmrP</i>	<i>Putative Transporter Protein</i>	21 (100%)	22 (100%)		51 (100%)	56 (100%)	

*Número de aislamientos positivos/ número de aislamientos interpretables

6.5. Comparación del contenido genético de los aislamientos causantes de bacteriemia con el de los aislamientos causantes de otros síndromes clínicos

Las bacteriemias fueron en el estudio el segundo síndrome clínico más frecuente después de las IPTBs. En total 51 aislamientos fueron causantes de bacteriemia constituyendo el 9,7% del total de los casos. Debido a la elevada frecuencia en nuestra serie y a la importancia clínica de las bacteriemias, estudiamos el contenido genético de 48 de los 51 aislamientos causantes de bacteriemia y lo comparamos con el de 102 aislamientos causantes de otros síndromes clínicos, en su mayor parte IPTBs, con el objetivo de conocer si existían genes asociados a las cepas causantes de bacteriemia.

Los síndromes clínicos representados en el grupo de “otros síndromes clínicos” fueron los siguientes: 72 IPTBs (70,5%), 11 colonizaciones (10,7%), 9 infecciones respiratorias (8,8%), 4 otitis (3,9%), 2 infecciones osteoarticulares (1,9%), 2 infecciones de herida quirúrgica (1,9%), 1 infección ocular (0,9%) y 1 infección de catéter (0,9%).

En la tabla 39 se muestra la comparación de los genes de resistencia y de virulencia asociados a las cepas causantes de bacteriemia y al resto de síndromes clínicos y se observan algunas diferencias significativas en cuanto a contenido genético de las mismas.

Como queda destacado en la tabla, las bacteriemias eran infecciones significativamente asociadas al sistema sanitario y fue ST30 el linaje que de forma significativa se asoció a los aislamientos causantes de bacteriemia (27,1% vs. 12,9%, $p=0,033$).

En cuanto a los genes de resistencia, fueron los aislamientos sensibles a meticilina los que se asociaron significativamente a este síndrome clínico, de modo que el gen *mecA* se encontró únicamente en el 6,3% de los aislamientos causantes de bacteriemia frente al 40,2% de los aislamientos causantes de otro síndromes clínicos ($p<0,001$).

Entre los genes de virulencia representados de forma significativa en los aislamientos causantes de bacteriemia destacan, *tst-1* que codifica la toxina del síndrome del shock tóxico (23,4% vs. 6,9%, $p=0,004$) y los genes que codifican enterotoxinas *entA* (38,3% vs. 20,6%, $p=0,022$) y *entG*, *entI*, *entM*, *entN*, *entO* y *entU* que forman parte del cluster *egc* (77,8% vs. 57,4%, $p=0,018$), el gen *luKY-var2* (43,8% vs. 14,7%, $p<0,001$) y el antígeno capsular 8 (56,3% vs. 38,2%, $p=0,038$).

Por otro lado, encontramos una serie de genes presentes con más frecuencia en los aislamientos causantes de otros síndromes clínicos, en su mayor parte IPTBs. En

cuanto a los genes de resistencia, las cepas resistentes a meticilina se asociaron de forma significativa a este grupo (40,2% vs. 6,3%, $p < 0,001$) así como el gen de resistencia a aminoglucósidos *aphA* (9% vs. 0%, $p = 0,031$) y el locus de resistencia al mercurio (15,7% vs. 4,2%, $p = 0,043$). Los genes de virulencia que encontramos asociados de forma significativa a estos aislamientos son la LPV (78% vs. 54,2%, $p = 0,003$), los genes que codifican las enterotoxinas K y Q (26,5% vs. 4,2%, $p < 0,001$), el gen *spIB* que codifica la serinproteasa B (70,6% vs. 50%, $p = 0,014$), el gen *clfA* que codifica el factor de agregación A (100% vs. 83,3%, $p < 0,001$), el gen *fib* que codifica una proteína de unión al fibrinógeno (75,5% vs. 52,1%, $p = 0,004$), el gen *vwb* que codifica una proteína de unión al factor Von Willebrand (99% vs. 85%, $p = 0,002$), el gen *sasG* que codifica una proteína de superficie (67,6% vs. 45%, $p = 0,013$), el gen *luKY-var1* que codifica una proteína de la familia de las leucocidinas y hemolisinas (78% vs. 54,2%, $p = 0,003$) y el antígeno capsular 5 (62,7% vs. 43,2%, $p = 0,029$).

TABLA 39: COMPARACIÓN DEL CONTENIDO GENÉTICO DE LOS AISLAMIENTOS CAUSANTES DE BACTERIEMIA Y DE LOS AISLAMIENTOS CAUSANTES DE OTROS SÍNDROMES CLÍNICOS

		BACTERIEMIAS	OTROS SÍNDROMES CLÍNICOS	p
Número de aislamientos		48	102	
ST8		8 (16,7%)	26/101 (25,7%)	0,217
ST30		13 (27,1%)	13/101 (12,9%)	0,033
ST5		9 (18,8%)	8/101 (7,9%)	0,052
ST121		3 (6,3%)	14/101 (13,9%)	0,172
Otros STs		15 (31,25%)	61 (59,8%)	0,001
AGR				
Agr1		*18/47 (38,3%)	41/92 (44,6%)	0,479
Agr2		11/47 (23,4%)	20/92 (21,7%)	0,823
Agr3		15/47 (31,9%)	17/92 (15,2%)	0,133
Agr4		3/47 (6,4%)	14/92 (15,2%)	<0,001
Adquisición comunitaria		15 (31,3%)	67 (65,7%)	<0,001
Genes de resistencia				
<i>mecA</i>	Methicillin, Oxacillin and all Beta-Lactams, defining MRSA	3 (6,3%)	41 (40,2%)	<0,001
<i>blaZ</i>	Beta-Laktamase	46 (95,8%)	98 (96,1%)	1,000
<i>ermA</i>	Macrolide, Lincosamide, Streptogramin	1/43 (2,3%)	2/99 (2,0%)	1,000
<i>ermB</i>	Macrolide, Lincosamide, Streptogramin	0	0	
<i>ermC</i>	Macrolide, Lincosamide, Streptogramin	5 (10,4%)	8/101 (7,9%)	0,757
<i>msrA</i>	Macrolide	0	9 (8,8%)	0,058
<i>meIA</i>	Macrolide	0	0	
<i>aacA-aphD</i>	Aminoglycoside (Gentamicin, Tobramycin)	0/47	7/98 (7,1%)	0,096
<i>aacD</i>	Aminoglycoside (Tobramycin, Neomycin)	1 (2,1%)	10/100 (10,0%)	0,104
<i>aphA</i>	Aminoglycoside (Kanamycin, Neomycin)	0	9/100 (9,0%)	0,031
<i>dfrA</i>	Trimethoprim	0/47	1/98 (1,0%)	1,000
<i>far</i>	Fusidic acid	0	1/101 (1,0%)	1,000
<i>mupR</i>	Mupirocin	1 (2,1%)	7 (6,9%)	0,437
<i>tetK</i>	Tetracycline	1 (2,1%)	10/99 (10,1%)	0,103
<i>tetM</i>	Tetracycline	2/47 (4,3%)	2/98 (2,0%)	0,595
<i>tetEfflux</i>	Tetracyclin Efflux Protein (Putative Transport Protein)	46 (95,8%)	92 (90,2%)	0,339
<i>Cfr</i>	Phenicol, Lincosamides, Oxazolidinones (Linezolid)	0	0	
mercury resistance locus	Mercury resistance operon	2 (4,2%)	16/ (15,7%)	0,043
Factores de virulencia				
<i>tst-1</i>	Toxic Shock Syndrome Toxin	11/47 (23,4%)	7 (6,9%)	0,004
<i>entA</i>	Enterotoxin A	18/47(38,3%)	21 (20,6%)	0,022
<i>entB</i>	Enterotoxin B	1/45 (2,2%)	8 (7,8%)	0,276
<i>entC</i>	Enterotoxin C	6/47 (12,8%)	13 (12,7%)	0,997
<i>entD</i>	Enterotoxin D	5 (10,4%)	6/101 (5,9%)	0,333
<i>entE</i>	Enterotoxin E	0	0	
<i>entG</i>	Enterotoxin G	37/47 (78,7%)	48/101 (47,5%)	<0,001
<i>entH</i>	Enterotoxin H	1/47 (2,1%)	5/101 (5,0%)	0,665
<i>entI</i>	Enterotoxin I	35 (72,9%)	52/100 (52,0%)	0,016
<i>entJ</i>	Enterotoxin J	5 (10,4%)	6 (5,9%)	0,330
<i>entK</i>	Enterotoxin K	2 (4,2%)	27 (26,5%)	<0,001
<i>entL</i>	Enterotoxin L	6 (12,5%)	13 (12,7%)	0,966
<i>entM</i>	Enterotoxin M	38 (79,2%)	60 (58,8%)	0,015
<i>entN</i>	Enterotoxin N	38 (79,2%)	56/100 (56,0%)	0,006
<i>entO</i>	Enterotoxin O	33 (68,8%)	47/100 (47,0%)	0,013
<i>entQ</i>	Enterotoxin Q	2 (4,2%)	27 (26,5%)	0,001
<i>entR</i>	Enterotoxin R	3/47 (6,4%)	3/101 (3,0%)	0,382
<i>entU</i>	Enterotoxin U	38 (79,2%)	38 (56,9%)	0,008
<i>egc-cluster</i>	Enterotoxins seg/sei/sem/sen/seo/seu	35/45 (77,8%)	58/101 (57,4%)	0,018
PVL				
PVL	Pantone-Valentine Leukocidin	3 (6,25%)	70 (68,62%)	<0,001
<i>lukF</i>	Haemolysin Gamma, Component B	47 (97,9%)	92/101 (91,1%)	0,168
<i>lukS</i>	Haemolysin Gamma, Component C	40/44 (90,9%)	91 (98,2%)	1,000
<i>hlgA</i>	Haemolysin Gamma, Component A	34/43 (79,1%)	56/90 (62,2%)	0,052
<i>lukY-var1</i>	Leukocidin/Haemolysin Toxin Family Protein	26 (54,2%)	78/100 (78,0%)	0,003
<i>lukY-var2</i>	Leukocidin/Haemolysin Toxin Family Protein, allele from MRSA252	21 (43,8%)	15 (14,7%)	<0,001
<i>hl</i>	Hypothetical Protein similar to Haemolysin	48 (100%)	100 (98,0%)	1,000
<i>hla</i>	Haemolysin Alpha (Alpha Toxin)	46 (95,8%)	89/101 (88,1%)	0,228
<i>hld</i>	Haemolysin Delta (Amphiphilic Membrane Toxin)	47 (97,9%)	95/100 (95,0%)	0,664
<i>hlIII</i>	Putative Haemolysin III	46 (95,8%)	95 (93,1%)	0,719
<i>hIb</i>	Haemolysine Beta (Phospholipase C)	27 (56,3%)	72 (70,6%)	0,084
<i>un-truncated hIb</i>	Haemolysine Beta (Phospholipase C / un-truncated)	3 (6,3%)	10 (9,8%)	0,551
<i>sak</i>	Staphylokinase	44 (91,7%)	87 (85,3%)	0,247
<i>chp(CHIPS)</i>	Chemotaxis Inhibitory Protein (CHIPS)	35 (72,9%)	58 (56,9%)	0,059
<i>scn</i>	Staphylococcal Complement Inhibitor (SCIN)	46 (95,8%)	91 (89,2%)	0,226
etA				
<i>etA</i>	Exfoliative Toxin A	1 (2,1%)	1 (1,0%)	0,539
etB				
<i>etB</i>	Exfoliative Toxin B	1 (2,1%)	1 (1,0%)	0,539

Resultados

<i>efD</i>	<i>Exfoliative Toxin D</i>	2 (4,2%)	0	0,101
<i>edinA</i>	<i>Epidermal cell differentiation inhibitor A</i>	0	4 (3,9%)	0,306
<i>edinB</i>	<i>Epidermal cell differentiation inhibitor B</i>	2 (4,2%)	3 (2,9%)	0,655
<i>edinC</i>	<i>Epidermal cell differentiation inhibitor C</i>	1 (2,1%)	1 (1,0%)	0,539
aur				
<i>aur</i>	<i>Aureolysin</i>	42/47 (89,4%)	87/99 (87,9%)	0,794
<i>spIA</i>	<i>Serine Protease A</i>	23 (47,9%)	64/101 (63,4%)	0,074
<i>spB</i>	<i>Serine Protease B</i>	24 (50,0%)	72 (70,6%)	0,014
<i>spE</i>	<i>Serine Protease E</i>	25 (52,1%)	46 (45,1%)	0,424
<i>sspA</i>	<i>Glutamyl Endopeptidase / V8-Protease</i>	48 (100%)	102 (100%)	
<i>sspB</i>	<i>Staphopain B</i>	48 (100%)	102 (100%)	
<i>sspP</i>	<i>Staphopain A (Staphylopain A)</i>	48 (100%)	102 (100%)	
ACME-locus				
<i>ACME-locus</i>	<i>Arginine catabolic mobile element</i>	0	2 (2,0%)	1,000
Cápsula / Biofilm				
<i>capsule-5</i>	<i>Capsule Type 5</i>	21 (43,8%)	64 (62,7%)	0,029
<i>capsule-8</i>	<i>Capsule Type 8</i>	27 (56,3%)	39 (38,2%)	0,038
<i>icaA</i>	<i>Intercellular Adhesion Protein A (N-glycosyltransferase)</i>	47 (97,9%)	102 (100%)	0,320
<i>icaC</i>	<i>Intercellular Adhesion Protein C</i>	47 (97,9%)	102 (100%)	0,320
<i>icaD</i>	<i>Biofilm PIA Synthesis Protein D</i>	47 (97,9%)	102 (100%)	0,302
<i>bap</i>	<i>Surface Protein Involved In Biofilm Formation</i>	0	0	
MSCRAMMs / Factores de adhesión				
<i>bbp-all</i>	<i>Bone Sialoprotein-Binding Protein</i>	41 (85,4%)	90/99 (90,9%)	0,316
<i>clfA-all</i>	<i>Clumping Factor A</i>	40 (83,3%)	102 (100%)	<0,001
<i>clfB-all</i>	<i>Clumping Factor B</i>	47 (97,9%)	99 (97,1%)	1,000
<i>cna</i>	<i>Collagen-Binding Adhesin</i>	24/47 (51,1%)	43/101 (42,6%)	0,334
<i>ebh-all</i>	<i>Cell Wall Associated Fibronectin-Binding Protein</i>	46 (95,8%)	95 (93,1%)	0,719
<i>eno</i>	<i>Enolase, Phosphopyruvate Hydratase</i>	48 (100%)	99 (97,1%)	0,552
<i>fib</i>	<i>Fibrinogen Binding Protein</i>	25 (52,1%)	77 (75,5%)	0,004
<i>ebpS</i>	<i>Cell Wall Associated Fibronectin-Binding Protein</i>	48 (100%)	102 (100%)	
<i>fnbA-all</i>	<i>Fibronectin-Binding Protein A</i>	47 (97,9%)	102 (100%)	0,320
<i>map</i>	<i>Major Histocompatibility Complex Class II Analog Protein</i>	48 (100%)	96 (94,1%)	0,177
<i>sdnC-all</i>	<i>Ser-Asp Rich Fibrinogen-Binding, Bone Sialoprotein-Binding Protein C</i>	48 (100%)	96 (94,1%)	0,177
<i>vwb-all</i>	<i>Willebrand Factor - Binding Protein</i>	34/40 (85,0%)	101 (99,0%)	0,002
<i>sasG</i>	<i>S. aureus Surface Protein G</i>	18/40 (45,0%)	69 (67,6%)	0,013
Immunevasión / Miscelánea				
<i>isaB</i>	<i>Immunodominant Antigen B</i>	40/40 (100%)	102 (100%)	
<i>mprF</i>	<i>Probable Lysylphosphatidylglycerol Synthetase (Defensin Resistance)</i>	31/39 (79,5%)	84/100(84,0%)	0,527
<i>isdA</i>	<i>Heme/Transferrin-Binding Protein</i>	40/40 (100%)	102 (100%)	
<i>ImrP</i>	<i>Pulative Transporter Protein</i>	40/40 (100%)	102 (100%)	

*Número de aislamientos positivos/ número de aislamientos interpretables

V-DISCUSIÓN

El objetivo principal del estudio fue determinar las características clínicas, microbiológicas y moleculares, de las infecciones causadas por *S.aureus* en la población pediátrica en nuestro país, con especial atención a las infecciones causadas por SARM-AC. Los primeros casos de SARM-AC se describieron en el año 2006 en el servicio de urgencias pediátricas del Hospital 12 de Octubre en Madrid [210]. Desde entonces, se han ido sucediendo en nuestro país una serie de publicaciones en la literatura científica que describen casos de infecciones causadas por SARM-AC, fundamentalmente en niños y adultos jóvenes, muchos de ellos procedentes de países de Sudamérica, sobre todo de Ecuador [185, 211, 212]. Estos trabajos describen series de casos o casos singulares de infección, y han contribuido a poner en evidencia la presencia de infecciones comunitarias por SARM en nuestro país. Sin embargo, no muestran la prevalencia real de este tipo de infecciones. El único estudio que hasta la fecha se había realizado de forma prospectiva para analizar la situación de las infecciones causadas por SARM-AC en nuestro país en la población pediátrica, fue realizado en nuestro hospital en el año 2007 por Daskalaki *et al.* [49]. El estudio se llevó a cabo en el servicio de urgencias pediátricas y analizaba las infecciones de piel y tejidos blandos. Los resultados mostraban un porcentaje relativamente elevado (13%) de SARM-AC como causa de este tipo de infecciones. Este estudio, aunque se centraba en un único síndrome clínico y en el servicio de urgencias, es importante ya que muestra un porcentaje elevado de infecciones por SARM-AC en la población pediátrica. Los autores de la investigación sugerían, que la frecuencia de este tipo de infecciones probablemente estaba infravalorada. Estos resultados, junto a la sucesión de publicaciones recientes de series de casos que se han ido describiendo por la geografía de nuestro país, sugieren que las infecciones por SARM-AC puede que no se limiten únicamente a casos aislados o se circunscriban a determinadas regiones geográficas, y justifica la necesidad de

estudiar la prevalencia real de las infecciones por SARM-AC en nuestro país. Para poder abordar este objetivo era indispensable llevar a cabo un estudio multicéntrico, que analizara la situación en distintas áreas geográficas, ya que solo de este modo, los resultados del estudio podrían ser más representativos de la situación en nuestro país. Además, nuestro estudio se llevó a cabo durante un periodo de tiempo de un año, con lo que también se evitaban posibles sesgos y que situaciones puntuales como brotes, pudieran alterar en exceso los resultados. El estudio se centra en los niños, que es un grupo poblacional muy afectado por las infecciones por *S. aureus*. Este punto también lo diferencia de algunos de los estudios publicados en nuestro país, que se refieren indistintamente a la población pediátrica y a la población adulta [185]. Por todo ello, este estudio responde a la necesidad de conocer la prevalencia de las infecciones por *S.aureus* en la población pediátrica, concretamente las infecciones por SARM-AC, y de profundizar en su conocimiento, estudiando además las características clínicas, microbiológicas y moleculares de las mismas

1. INFECCIONES POR S. AUREUS: RESISTENCIA A METICILINA Y A LOS ANTIBIÓTICOS NO β -LACTÁMICOS

Staphylococcus aureus es un microorganismo con una gran capacidad de adaptación y en constante evolución, que ha sido capaz de adquirir resistencias a los antibióticos en un corto periodo de tiempo. De este modo en 1961, 2 años después de la introducción de la meticilina en la práctica clínica, se describió la primera cepa resistente a este antibiótico [110]. El incremento de las cepas resistentes a meticilina supuso un importante cambio en el manejo de las infecciones por *S.aureus*. Hasta los años 1990 estas cepas estaban confinadas al medio hospitalario. Sin embargo, la

epidemiología de SARM cambió cuando en el año 1993 se describieron los primeros casos en Australia de infecciones causadas por SARM de adquisición comunitaria en pacientes sin factores de riesgo. Desde entonces, se ha producido una explosión en el número de casos de infección por SARM-AC publicados, sobre todo en determinados grupos de población entre los que se encuentra la población pediátrica.

Los resultados del estudio de resistencia a meticilina muestran una prevalencia global de infecciones causadas por SARM del 8,6%, siendo este porcentaje variable en función del hospital estudiado. De este modo, el hospital con un porcentaje de infecciones por SARM más elevado fue el Hospital Son Dureta con un 9,7%, seguido del Hospital Vall d'Hebron con un 9%, y del Hospital 12 de Octubre con un 7,8%. El hospital CHUAC presentó un porcentaje de SARM de 5,6%, inferior que el resto de los hospitales estudiados. Estos resultados no tienen mucha utilidad si no se analizan en función de la adquisición, ya que son muchas las características clínicas, demográficas y microbiológicas que diferencian las infecciones por *S.aureus* en función del ámbito de adquisición, como pudimos comprobar gracias a los resultados obtenidos de este estudio. El análisis de los datos de resistencia a meticilina en función de la adquisición mostró, que el porcentaje de infecciones por SARM-AC fue del 9% y el porcentaje de infecciones por SARM-ASS del 8%. Los datos de prevalencia de infección por SARM en población pediátrica en nuestro país se desconocían por completo, tanto en las infecciones asociadas a la comunidad como las asociadas al sistema sanitario, por ello este estudio es un gran avance en el conocimiento de este tipo de infecciones en nuestro país.

El análisis de las resistencias a los antibióticos no β -lactámicos es importante, en tanto en cuanto también son utilizados para el tratamiento de las infecciones por *S.aureus*, sobre todo en los casos en los que los β -lactámicos no son una opción de

tratamiento. Los datos de sensibilidad a los antibióticos no β -lactámicos de los aislamientos causantes de infección se analizaron en función de la resistencia a meticilina, objetivándose una mayor resistencia a todos los antibióticos excepto al ácido fusídico en los aislamientos de SARM, y de forma significativa a la eritromicina (35,1% vs. 13,2%, $p < 0,001$), a las fluoroquinolonas (29,7% vs. 1,5%, $p = 0,001$) y a la gentamicina (10,8% vs. 2,3%, $p = 0,018$).

Al analizar los datos de sensibilidad a los antibióticos no β -lactámicos de los aislamientos de SARM en función de la adquisición, se demostró como era esperable, que los aislamientos de SARM-AC presentaban un patrón más sensible a todos los antibióticos que los aislamientos de SARM-ASS, excepto a TM/ST, y de forma significativa a las fluoroquinolonas (57,1% vs. 13,0%, $p = 0,006$). Esta es una característica de las cepas de SARM-AC ya que la gran mayoría de estas cepas son portadoras los elementos *SCC_{mec}* de los tipos IV, V o VII [119, 120, 225-227] y al ser estos *cassettes* de pequeño tamaño, generalmente solo llevan el gen *mecA* y no otros genes de resistencia asociados como ocurre en las cepas hospitalarias. Un hecho a tener en cuenta, es que las cepas pueden adquirir resistencias a los antimicrobianos mediante la adquisición de plásmidos y cada vez es más frecuente, que los aislados comunitarios presenten resistencia a eritromicina y a clindamicina por la adquisición de los genes *erm* y *msrA*, o a las tetraciclinas por la adquisición de genes *tet* [184].

En nuestra serie nos parece importante resaltar el dato de la resistencia a la clindamicina. El porcentaje global de resistencia a la clindamicina en los aislamientos de SARM causantes de infección fue del 18,9%. Al analizar este dato en función de la adquisición, observamos que el porcentaje de resistencias a la clindamicina de los aislamientos de SARM-ASS era del 21,4% y el de los aislamientos de SARM-AC del 17,3%. Es importante tener en cuenta la tasa de resistencia a clindamicina en los

aislamientos de SARM, ya que es un antibiótico ampliamente utilizado como alternativa en el tratamiento de infecciones por SARM en pediatría, y además, al ser un antibiótico inhibidor de la síntesis de proteínas, inhibe la expresión de la LPV y por ello es un antibiótico muy utilizado para el tratamiento de las infecciones causadas por *S.aureus* de adquisición comunitaria [228, 229]. Los expertos recomiendan la clindamicina como tratamiento empírico siempre y cuando, la tasa de resistencia en el área geográfica de interés no sea mayor del 15% [230]. En nuestro país, según las recomendaciones y los datos aportados en nuestro estudio, la clindamicina no sería una buena opción para el tratamiento empírico de las infecciones por SARM ya que supera el porcentaje del 15% de resistencias. Sería conveniente vigilar cómo evolucionan las tasas de resistencia a la clindamicina en un futuro, para valorar si este antibiótico es una opción segura de tratamiento. Otro resultado de interés, es la elevada resistencia a la eritromicina que encontramos en los aislamientos de SARM, que es del 26,1% en SARM-AC y del 50% en SARM-ASS.

Una buena opción de tratamiento podría ser el trimetoprim-sulfametoxazol, ya que los porcentajes de resistencia encontrados son mínimos tanto en SARM (2,7%) como en SASM (1%). Este antibiótico aunque no está aprobado por la FDA para el tratamiento de infecciones por *S.aureus*, se considera un fármaco de elección para el tratamiento de IPTBs de forma ambulatoria sin embargo, su uso no se aconseja en el caso de infecciones invasivas ya que hay pocos estudios que hayan evaluado su eficacia en niños. En nuestro país dado que los porcentajes de resistencia a clindamicina son elevados, el trimetoprim-sulfametoxazol podría ser una opción para el tratamiento de las IPTBs causadas por *S.aureus*.

Un hallazgo que merece la pena puntualizar, es la presencia de un aislamiento que mediante los métodos fenotípicos fue resistente a meticilina, pero que no poseía el

gen *mecA*. Este aislamiento podría tener alguno de los mecanismos de resistencia a meticilina distintos al gen *mecA*, como la hiperproducción de penicilinas denominada BORSA, la producción de una meticilinas capaz de hidrolizar la meticilina [126-128], una modificación de las PBPs causada por mutaciones genéticas o la hiperproducción de éstas denominada MODSA [129]. Este aislamiento también podría ser portador de un gen homólogo del *mecA* (*mecA*_{LGA251}) que ha sido descrito recientemente, y que no se detecta por los métodos moleculares convencionales [130]. En nuestro caso, no conocemos el mecanismo exacto de resistencia, ya que este no era un objetivo en nuestro estudio, pero este hallazgo muestra que a la hora de detectar resistencias a meticilina son importantes no solo los métodos moleculares si no también los fenotípicos.

2. EMERGENCIA DE INFECCIONES PEDIÁTRICAS POR SARM EN LA COMUNIDAD

Los resultados de nuestro estudio reflejan que el 9% de los aislamientos de *S.aureus* que causaron infecciones asociadas a la comunidad en niños, fueron resistentes a meticilina. Este dato tiene relevancia, ya que demuestra claramente la existencia de un porcentaje nada despreciable de infecciones causadas por SARM-AC. Los porcentajes de SARM-AC varían ligeramente en función del hospital, de este modo, en el Hospital 12 Octubre este dato ascendió al 9,6%, en el Hospital Vall d'Hebron al 9,7%, en el Hospital Son Dureta el porcentaje fue del 6,8%, y en el CHUAC ascendió al 10,0%. Este último dato no es muy representativo, debido al escaso número de muestras recibidas procedentes del hospital CHUAC, con lo que parecen más representativos los datos obtenidos del resto de los hospitales, donde el número de casos estudiados fue

considerable. Como nos muestran los resultados del estudio, el porcentaje de infecciones causadas por SARM-AC, en función del área geográfica y del hospital estudiado varían de forma ligera, a pesar de que las regiones estudiadas son muy diferentes en cuanto a situación geográfica y densidad poblacional.

El dato aportado por el estudio del 9%, no lo podemos comparar con ningún dato de prevalencia previo ya que no existen estudios al respecto en nuestro país, con lo que no sabemos si este porcentaje ha aumentado o se ha mantenido a lo largo de los años. El único estudio que aporta un dato de porcentaje de SARM-AC en población pediátrica, es el publicado por Daskalaki *et al.* en el año 2010 [49], que detectó que el 13,2% de las IPTBs causadas por *S.aureus*, diagnosticadas en el servicio de urgencias pediátricas durante el año 2007, fueron causadas por SARM-AC. Este dato es más elevado que el detectado en nuestro estudio, pero solamente se refiere a un tipo de infección y a un servicio concreto, con lo que los datos aportados son parciales aunque muy útiles para los clínicos que atienden este tipo de infecciones. Otro estudio publicado recientemente en nuestro país, referido a población adulta, muestra que el 33,3% de las IPTBs causadas por *S.aureus* diagnosticadas en el servicio de urgencias fueron causadas por SARM-AC. En este caso el porcentaje de SARM-AC detectado es muy elevado, lo que nos ha de poner en alerta, pero al igual que en el estudio publicado por Daskalaki *et al.* los resultados son parciales ya que se refieren a un tipo de infección y un servicio concreto y además se refieren a población adulta, con lo que no son comparables con los datos de resistencia mostrados en nuestro estudio [231].

El porcentaje de SARM-AC detectado en nuestra serie no es elevado, si lo comparamos con estudios realizados en población pediátrica en otros países como Grecia, donde el porcentaje de SARM-AC asciende al 44% [205], o en algunas áreas geográficas de EEUU donde el porcentaje de infecciones por SARM en la comunidad

supera las infecciones causadas por cepas sensibles a meticilina, alcanzando el 70% [173]. El porcentaje de SARM-AC detectado en nuestro estudio también es menor al de un estudio llevado a cabo en Argentina, donde durante los años 2004 a 2007 el porcentaje SARM-AC causante de bacteriemias era del 47% [207]. Sin embargo, nuestro porcentaje de SARM-AC es superior al detectado en otros países de Europa como el Reino Unido, donde se estima que el porcentaje de SARM-AC es inferior a un 1% [206]. El porcentaje de SARM-AC en nuestro país se acerca más al de países como Australia, donde estudios de vigilancia de infecciones por SARM-AC llevados a cabo durante los años 2000, 2002 y 2004, mostraron que el porcentaje de SARM-AC pasó a ser de un 4,7% en el año 2000 a un 7,3% en el año 2004. Los datos de prevalencia fueron variables en función del área geográfica estudiada, de modo que en algunas regiones el porcentaje era del 2% mientras que en otras ascendía a un 10% [208].

Desde un punto de vista clínico, era importante determinar las características epidemiológicas, clínicas y microbiológicas de las infecciones por *S. aureus*, y más concretamente por SARM-AC. Un dato importante en nuestro estudio era que casi un 60% de las infecciones por *S. aureus* fueron comunitarias. Probablemente este dato pudiera estar incluso infravalorado, ya que no siempre se toman cultivos microbiológicos de determinadas infecciones que desde un punto de vista clínico se consideran leves.

En primer lugar, se analizaron las características de las infecciones comunitarias por *S. aureus* comparándolas con las de las infecciones asociadas al sistema sanitario. Las características que se asociaron de forma significativa a las infecciones comunitarias son que se diagnostican en niños mayores (media: 58,4 meses vs. 46,17, $p=0,025$), en el servicio de urgencias (67,6%), y que la mayoría de estas infecciones son IPTBs (76,2%), tanto infecciones profundas como abscesos y celulitis (38,3%) como

superficiales (37,9%). Este hallazgo concuerda con lo descrito en algunas publicaciones que han estudiado las infecciones por *S.aureus* asociadas a la comunidad en niños, como el estudio llevado a cabo por Kaplan *et al.* en el que más del 90% de las infecciones asociadas a la comunidad tanto las causadas por SARM como por SASM fueron IPTBs [173]. Las IPTBs son el síndrome clínico más representado y el único que se asocia significativamente a las infecciones comunitarias en nuestro estudio. Sin embargo, también encontramos otros síndromes clínicos causados por *S.aureus* AC, como otitis (9,8%), bacteriemia (7%), y en una pequeña proporción otros síndromes clínicos como infecciones oculares (4,7%), infecciones osteoarticulares (2,3%) o infecciones respiratorias (2%). Es importante resaltar que el porcentaje de resistencia a meticilina en infecciones comunitarias (9%) y asociadas al sistema sanitario (8%) fueron similares.

Por otra parte, con el objetivo de definir más concretamente las infecciones por SARM-AC, se compararon estas con las producidas por SASM-AC. Las características que diferenciaban ambos tipos de infecciones son que las infecciones por SARM-AC se produjeron más frecuentemente en niños de origen extranjero (60,9% vs. 29,2%, $p=0,001$), se asociaron más frecuentemente con IPTBs profundas (abscesos y celulitis) (73,9% vs. 34,8%, $p<0,001$), y que con más frecuencia las cepas de SARM-AC fueron portadoras de la toxina LPV (69,6% vs 18,5%, $p<0,001$). Por lo tanto, ante la presencia de una infección por *S.aureus* asociada a la comunidad, se podría sospechar de que se trata de una infección causada por SARM-AC cuando afecta a un niño de origen extranjero y se trata de una IPPB profunda, como abscesos o celulitis. El papel de la toxina LPV será discutido más adelante.

En cuanto a la sensibilidad a los antibióticos no β -lactámicos no existen diferencias significativas entre los aislamientos de SARM-AC y los de SASM-AC, a

excepción de las fluoroquinolonas (13% vs 0,9%, $p=0,005$). Probablemente la implicación clínica de este hecho es limitada, ya que las fluoroquinolonas no se utilizan en pacientes pediátricos.

Además, analizamos si las características de las infecciones por SARM-AC eran diferentes a las de las infecciones por SARM-ASS. Este análisis confirma que las cepas de SARM-AC causan con mayor frecuencia IPTBs (87% vs. 21,4%, $P<0,001$), principalmente infecciones profundas como los abscesos y celulitis (73,9% vs. 0%, $p=0,001$). En cuanto a las características microbiológicas, la toxina LPV se asoció a las cepas de SARM-AC de forma significativa, de modo que el 69,6% de los aislamientos de SARM-AC fueron portadores de la toxina frente al 28,6% de los aislamientos de SARM-ASS, este último dato merece la pena ser resaltado.

Este estudio nos aporta un conocimiento más profundo sobre las características de las infecciones por *S.aureus* comunitarias en población pediátrica sobre todo las causadas por SARM-AC, y nos aporta un dato de incidencia de SARM-AC desconocido hasta el momento en nuestro país. El aspecto más importante del análisis de la prevalencia de SARM-AC es qué actitud terapéutica tomar ante los tratamientos empíricos tras conocer el dato del 9%. Aunque este porcentaje no es para nada despreciable, no es lo suficientemente elevado como para que antibióticos como la cloxacilina, la amoxicilina/clavulánico o las cefalosporinas de primera generación, dejen de ser tratamientos empíricos adecuados para tratar las infecciones por *S.aureus* AC en niños en nuestro país. Una actitud que podría ser prudente conociendo estos resultados, sería llevar a cabo cultivos microbiológicos siempre que haya sospecha de infección por *S.aureus* y en caso de ser necesario cambiar el tratamiento si se tratase de un caso de infección por SARM, y cuando se trate de una infección grave, no tratar con antibióticos β -lactámicos hasta conocer el estudio de sensibilidad.

Los resultados presentados en este estudio marcan un punto de inflexión y crean la necesidad de llevar a cabo una vigilancia epidemiológica de este tipo de infecciones, pues en el caso de que el porcentaje de SARM-AC siguiese aumentando sería necesario cambiar los tratamientos empíricos empleados hasta ahora. También sería necesario definir estrategias de prevención de la transmisión de SARM-AC en la comunidad, para evitar en la medida de lo posible la propagación de estas cepas, ya que tenemos el antecedente de lo ocurrido en otros países como en EEUU, donde SARM-AC se ha diseminado con asombrosa rapidez.

3. INFECCIONES POR S. AUREUS ASOCIADAS AL SISTEMA SANITARIO

Uno de los resultados más relevantes del estudio es el dato de la resistencia a meticilina en las infecciones asociadas al sistema sanitario. El estudio nos muestra una prevalencia de un 8% de SARM-ASS, este dato es importante en tanto en cuanto es el primer estudio que aporta un porcentaje de SARM-ASS en pediatría en nuestro país. Los estudios sobre la prevalencia de infecciones por SARM-ASS en pediatría son muy escasos no solo en nuestro país, sino en el resto del mundo. A excepción de algunas publicaciones que describen casos de brotes causados por SARM sobre todo en las UCIs pediátricas y neonatales, en algunos casos causados por cepas que tradicionalmente causan infecciones asociadas a la comunidad [232-234], se han llevado a cabo muy pocos estudios sobre la prevalencia de SARM-ASS en los servicios pediátricos. Esto probablemente se deba a que a excepción de determinados brotes, SARM-ASS no ha supuesto un problema en los hospitales y servicios pediátricos. El dato del 8% ha de ser puntualizado, ya que este dato varía en función del hospital analizado. De este modo, mientras que en el Hospital CHUAC no se detectó ningún

caso, en el Hospital 12 de Octubre el porcentaje fue del 5,6%, en el Hospital Vall d'Hebron del 7,7% y en el Hospital Son Dureta el porcentaje ascendió al 13,6%. Es importante aclarar los datos obtenidos de los hospitales Son Dureta y CHUAC. En primer lugar, el porcentaje tan elevado de infecciones por SARM-ASS del Hospital Son Dureta se debe a un brote de SARM que ocurrió en la UCI pediátrica durante el año en el que se llevó a cabo el estudio, y en segundo lugar el escaso número de casos enviados desde el CHUAC hace que este dato sea poco representativo. Estos dos resultados hacen que el porcentaje global estimado del 8% este sesgado, y parecen más representativos de la realidad los datos de los hospitales 12 de Octubre y Vall d'Hebron del 5,6 y 7,7% respectivamente. Estos porcentajes no son comparables con los datos de SARM-ASS en población adulta, que ascienden en nuestro país a un 25% según los datos proporcionados por el sistema de vigilancia EARSS y nos confirman que el porcentaje de infecciones por SARM asociadas al hospital permanece relativamente bajo si lo comparamos con los datos obtenidos en población adulta.

Los resultados del estudio de las características de las infecciones por *S.aureus* en función de la adquisición muestran, que las infecciones por *S.aureus* asociadas al sistema sanitario son muy diferentes a las infecciones asociadas a la comunidad. Los síndromes clínicos que se asociaron significativamente al sistema sanitario fueron las infecciones de herida quirúrgica (29% vs. 0%, $p < 0,001$), las bacteriemias (18,8% vs. 7%, $p < 0,001$) y las infecciones respiratorias (6,3% vs. 2%, $p = 0,020$). Estos resultados contrastan con los obtenidos de las infecciones asociadas a la comunidad en las que el único síndrome que se asoció significativamente a las mismas fueron las IPTBs, lo que nos muestra que el espectro de infecciones es totalmente distinto en función de la adquisición.

Además, si analizamos las infecciones ASS en función de la resistencia a meticilina, tanto las cepas SARM como las SASM eran responsables de los diferentes tipos de infección, con excepción de las infecciones respiratorias que fueron causadas más frecuentemente por las cepas de SARM-ASS (35,7% vs. 3,7%, $p < 0,001$). Probablemente esta asociación se deba a que este tipo de infecciones hospitalarias ocurren con más frecuencia en pacientes de UCI, y en uno de los centros participantes se detectó un brote de SARM. Es importante destacar, que las cepas de SARM-ASS son más resistentes a los antibióticos. La comparación con las cepas de SASM-ASS mostró que eran significativamente más resistentes a la eritromicina (50% vs. 13,6%, $p = 0,002$), gentamicina (21,4% vs. 0,6, $p = 0,001$), fluoroquinolonas (57,1% vs. 2,5%, $p < 0,001$), y mupirocina (14,3% vs 1,2%, $p = 0,032$). También es importante destacar la mayor presencia de la toxina LPV en los casos de infecciones por SARM-ASS en comparación con las causadas por cepas de SASM-ASS (28,6% vs. 4,9%, $p = 0,008$). En el estudio encontramos 4 casos de infección ASS causadas por cepas de SARM portadoras de la LPV, sobre este hallazgo discutiremos más adelante.

Este estudio aporta un conocimiento más profundo sobre las características clínicas y microbiológicas de las infecciones asociadas al sistema sanitario y nos aporta un dato de prevalencia de SARM-ASS en población pediátrica, que se desconocía hasta el momento. Los porcentajes de resistencia a meticilina encontrados, no sugieren cambiar la actitud terapéutica, pero si nos obligan a permanecer en alerta y a llevar un control de la transmisión de estas infecciones, realizando estudios de colonización en pacientes ingresados y llevando a cabo políticas de concienciación sobre la higiene y el lavado de manos entre el personal sanitario. En lo que a la resistencia a los antibióticos no β -lactámicos se refiere, los aislamientos causantes de infección asociados al sistema sanitario presentan más resistencias, que los asociados a la comunidad. A su vez, los

aislamientos de SARM-ASS eran más resistentes también a los antibióticos no β -lactámicos. Estos resultados tienen implicaciones clínicas a la hora de elegir tratamientos alternativos de infección por SARM, y también a la hora de utilizar mupirocina empíricamente para la descolonización de pacientes con SARM.

4. PAPEL DE LA TOXINA LPV EN LAS INFECCIONES POR *S. AUREUS*

Uno de los objetivos principales que nos planteamos en el estudio fue conocer qué porcentaje de los aislamientos de *S.aureus*, SARM y SASM, eran portadores de la toxina LPV, y la implicación de la toxina en las infecciones por *S.aureus*. Este es un tema que sigue siendo controvertido y sigue despertando un gran interés entre la comunidad científica. La toxina LPV produce la destrucción de los leucocitos mediante la formación de poros y necrosis tisular, y es uno de los determinantes de virulencia que se ha asociado como causa de la diferencia en el espectro de infecciones producidas por las cepas de SARM-AC y SARM-ASS, y de la elevada virulencia atribuida a las cepas comunitarias [186]. Sin embargo, esta asociación no está del todo clara, ya que existe cierta controversia entre la evidencia clínica y los resultados encontrados en los diferentes modelos experimentales de infección [63, 65, 67].

En primer lugar, estudiamos la presencia de la toxina LPV en las cepas causantes de infección en niños, y encontramos que el 16,4% (71/432) de las mismas fueron portadoras de la toxina. Los resultados del estudio muestran además, que un porcentaje bastante elevado (54,1%) de los aislamientos de SARM causantes de infección en niños eran portadores de la toxina, mientras que un porcentaje significativamente menor (12,9%) de los aislamientos de SASM fueron portadores de la misma. Estos resultados son bastante similares a los publicados por Chini *et al.* [235] en

un estudio realizado en Grecia, en el que estudiaron una colección de 1.058 cepas y encontraron que el 27% de las mismas fueron portadoras de la toxina LPV. Al igual que en nuestro estudio, las cepas de SARM fueron portadoras de la LPV en un porcentaje mucho mayor (45%) que las cepas de SASM (12%).

Al analizar la distribución de la toxina LPV en función de la adquisición y de la sensibilidad a meticilina, observamos que un porcentaje muy elevado (69,6%) de los aislamientos de SARM-AC fueron portadores de la LPV, mientras que los aislamientos de SARM-ASS fueron portadores de la toxina en un porcentaje significativamente menor aunque para nada despreciable (28,6%). Estos datos nos confirman que la LPV está relacionada epidemiológicamente con las cepas de SARM-AC. Sin embargo, también nos pone en alerta, ya que un porcentaje relativamente elevado de los aislamientos SARM-ASS también fueron portadores de la toxina. Este tipo de cepas al estar relacionadas con el ámbito sanitario, afectan a una población con una serie de comorbilidades que la hace más susceptible a las infecciones. Por ello, sería conveniente llevar a cabo una vigilancia y un control para evitar la diseminación de estas cepas en los servicios pediátricos de los hospitales, fundamentalmente en aquellos en los que se encuentran ingresados los pacientes con más riesgo de infección como UCIs, neonatología o unidades de pacientes inmunodeprimidos, ya que ya se han descrito en la literatura brotes causados por cepas SARM portadoras de la LPV sobre todo en las UCIs pediátricas y neonatales [232, 233, 236].

Por otro lado, cuando analizamos los aislamientos de SASM vemos que los aislamientos de SASM-AC fueron portadores de la toxina en un porcentaje significativamente mayor (18,5%) que los aislamientos de SASM-ASS (4,9%). Tradicionalmente, se ha asociado epidemiológicamente la toxina LPV a las cepas de SARM-AC, y es cierto que el porcentaje de aislamientos portadores de la toxina es muy

elevado (69,6%), pero también hay que tener en cuenta que un porcentaje nada despreciable (18,5%) de los aislamientos de SARM-AC son portadores de la toxina, luego la LPV no es para nada exclusiva de las cepas de SARM-AC.

En resumen, los resultados de nuestro estudio muestran que la toxina LPV se asocia fundamentalmente a infecciones comunitarias producidas por *S. aureus*, y en particular a las infecciones por SARM-AC. En este sentido, se podría considerar un marcador de infección comunitaria.

Tras conocer el porcentaje de cepas portadoras de la LPV, estudiamos las características de las infecciones causadas por las cepas LPV positivas. Para ello, se compararon las infecciones causadas por aislados productores y no productores de la toxina LPV. Las características asociadas a estas infecciones fueron: el origen extranjero de los niños (43,7% vs. 29,6%, $p=0,020$), que eran infecciones en su gran mayoría asociadas a la comunidad (83,1% vs. 54,6%, $p<0,001$) y diagnosticadas en el servicio de urgencias (64,8% vs. 45,7%, $p=0,003$), y que los cuadros clínicos que producían las cepas portadoras de la LPV eran fundamentalmente IPTBs (87,3% vs. 50,7, $p<0,001$), en su inmensa mayoría infecciones profundas (67,6% vs. 19,4%, $p<0,001$).

Aunque el síndrome clínico mayoritario causado por las cepas LPV positivas fueron las IPTBs, y dentro de las mismas las infecciones más profundas, también encontramos que las cepas portadoras de la LPV fueron causa de otros síndromes clínicos aunque muy minoritarios, como bacteriemias (4,2%), infecciones respiratorias (4,2%), infecciones osteoarticulares (4,2%), otitis (1,4%) e infecciones oculares (1,4%). Esta asociación entre las cepas portadoras de la LPV y las IPTBs ya se ha descrito en la literatura [48, 222]. También se ha asociado a las cepas portadoras de la LPV con la producción de neumonía necrosante [103] sobre todo a las cepas de SARM-AC [52,

237], aunque también se han descrito casos de neumonía necrosante causados por SASM-AC [51, 53, 54]. La toxina LPV también se ha encontrado en cepas causantes de otros síndromes clínicos como infecciones osteoarticulares, en las que la LPV se ha relacionado con una mayor proporción de complicaciones y gravedad [55-57], y de infecciones invasivas como la piomiositis o la fascitis necrosante [58-60]. A su vez también se han descrito casos de infecciones bacteriémicas graves causadas por cepas productoras de la LPV, tanto en aislamientos de SARM como de SASM [61, 238]. Estos datos nos muestran que las cepas de *S.aureus* portadoras de la LPV aunque están implicadas fundamentalmente en la producción de IPTBs, también son capaces de producir multitud de síndromes clínicos.

Los cuadros clínicos asociados a los aislamientos no productores de la LPV sin embargo, fueron totalmente distintos. Si bien estos aislamientos también produjeron un elevado porcentaje de IPTBs (50,7%) este porcentaje fue significativamente inferior al de los aislamientos productores de la toxina, y estas en su mayoría fueron infecciones superficiales (31,3% vs. 19,7%, $p=0,050$). Las entidades clínicas que encontramos asociadas de forma significativa a los aislamientos LPV negativos fueron, las bacteriemias (13,3% vs 4,2%, $p=0,030$), las infecciones de la herida quirúrgica (14,1% vs 0%, $p<0,001$), y las otitis (10,2% vs 1,4%, $p=0,016$).

De este análisis concluimos que el espectro de infecciones causadas por los aislamientos LPV positivos y negativos es totalmente distinto y que parece existir una relación entre las cepas productoras de la LPV y una mayor virulencia a la hora de causar IPTBs. Sin embargo, encontramos que puede existir un sesgo en este análisis, ya que los aislamientos resistentes a metilicina son portadores de la toxina LPV en un porcentaje significativamente mayor que los sensibles (54,1% vs. 12,9%, $p=0,001$). Para eliminar este sesgo, analizamos estos resultados estratificándolos por la resistencia a

meticilina, y los resultados del estudio mostraron, que independientemente de la sensibilidad a metilina los aislamientos portadores de la LPV, fueron causantes de IPTBs en un porcentaje significativamente mayor que los que no son portadores de la toxina (SARM: 85,0% vs. 35,3%, $p=0,002$) (SASM: 88,2% vs. 51,5%, $p<0,001$). Además, fueron las infecciones profundas y no las más superficiales, las que se asociaron a la toxina LPV (SARM: 70,0% vs. 17,6%, $p=0,001$) (SASM: 66,7% vs. 19,5%, $p<0,001$).

Los resultados de nuestra investigación demuestran claramente la asociación de la toxina LPV con una mayor gravedad de las IPTBs, independientemente de la resistencia a metilina. Este hallazgo concuerda con los datos que aportan algunos estudios como el publicado por Daskalaki *et al.* [49], en el que muestran que las cepas causantes de IPTBs productoras de la LPV se asociaron más frecuentemente con infecciones profundas como abscesos y celulitis (75% vs. 38%, $p=0,0028$) y estas, requerían más frecuentemente incisión y drenaje (75% vs. 21%, $p=0,001$) que las causadas por cepas LPV negativas. Estos resultados se mantenían cuando se analizaban únicamente los aislamientos de SASM, ya que las infecciones causadas por cepas de SASM portadoras de la LPV también requirieron intervención quirúrgica en un porcentaje significativamente mayor que las causadas por cepas de SASM no portadoras de la toxina (71% vs. 23%, $p=0,002$). Nuestros resultados concuerdan también con los publicados por Kaltsas *et al.* [50] que concluyeron que las IPTBs causadas por cepas productoras de LPV, independientemente de la sensibilidad a metilina, eran infecciones más graves y profundas, ya que estas presentaron un porcentaje mayor de incisión y drenaje, que las causadas por cepas LPV negativas. Además observaron que las infecciones causadas por cepas de SASM LPV positivas presentaron más

complicaciones como osteomielitis y bacteriemias y una mayor estancia hospitalaria que las causadas por cepas de SASM LPV negativas.

Aunque desde el punto de vista clínico es evidente la relación entre la toxina LPV y una mayor gravedad a la hora de producir IPTBs, una aparente contradicción es el por qué los modelos experimentales no son capaces de demostrar esta implicación y muestran unos resultados, en algunos casos opuestos. Los primeros estudios *in vivo* que evaluaron el papel de la toxina LPV en las IPTBs mostraron que la inyección intradérmica de la toxina provocaba eritema y necrosis en conejos [239]. Posteriormente, se llevaron a cabo estudios utilizando modelos murinos de neumonía e IPTBs que demostraban una cierta implicación de la LPV en la virulencia [67]. Por el contrario, estudios recientes llevados a cabo en modelos murinos de neumonía, IPTBs y sepsis mostraron, que no existen diferencias significativas en cuanto a la virulencia de las cepas USA 300, USA 400 y sus variantes isogénicas a las cuales se les había deleccionado los genes que codifican la toxina LPV [63, 64, 65]. Recientemente, se ha achacado como la razón de esta inconsistencia al modelo animal utilizado. Los resultados de algunos estudios demuestran, que los neutrófilos de los ratones son relativamente insensibles al efecto citotóxico de la toxina LPV. En cambio, los neutrófilos humanos y los de los conejos, son sensibles a dicho efecto [240, 241]. Por esta razón, el modelo animal de conejo parece ser el más adecuado para el estudio de la implicación de la LPV en la patogenia de la infección. De hecho, un estudio publicado en el año 2011 y llevado a cabo utilizando conejos como modelo animal de infección de piel, concluyó que la cepa USA 300 que expresa la LPV produce lesiones en la piel significativamente más grandes y con un mayor área necrótica que la misma cepa isogénica a la que se le había deleccionado la toxina LPV. Este estudio también mostró que las cepas portadoras de la LPV causaron infecciones más profundas, llegando a

causar necrosis en la capa muscular de los conejos, a diferencia de las cepas LPV negativas que no la causaron [242]. Pero para añadir más controversia, otro estudio reciente llevado a cabo también en un modelo experimental con conejos empleando al igual que en el estudio de Lipinska *et al* la cepa USA300, no detectó ninguna implicación de la LPV en la patogénesis de las IPTBs, aunque habría que estudiar detenidamente si el modelo animal y las condiciones empleadas fueron exactamente las mismas [243].

A pesar de la inconsistencia de los resultados que muestran los estudios experimentales, nuestro estudio al igual que otros estudios publicados [49, 50], aportan una evidencia clínica clara de que la toxina LPV está implicada en la patogenia de las IPTBs, y que las cepas portadoras de la toxina presentan una mayor virulencia a la hora de producir este tipo de infecciones.

5. DIVERSIDAD CLONAL DE LAS CEPAS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS RESISTENTES A METICILINA EN POBLACIÓN PEDIÁTRICA

Uno de los principales objetivos planteados en el estudio era conocer la epidemiología molecular de SARM en la población pediátrica en nuestro país, y determinar si las cepas que están emergiendo en la comunidad son distintas a las encontradas en el ámbito hospitalario. Para lo cual, se llevó a cabo el estudio mediante ECP y MLST de todos los aislamientos resistentes a meticilina. Globalmente, los resultados del estudio de los 46 aislamientos de SARM por ECP y el posterior análisis comparativo de los patrones de restricción de los mismos, mostraron 15 perfiles electroforéticos diferentes. Uno de los aislamientos no se pudo estudiar por ECP debido a que no se digería con la enzima *Sma*I. El estudio realizado mediante MLST mostró

que estos 15 perfiles electroforéticos correspondían a 8 tipos de STs distintos, de los cuales destaca el linaje ST8-SCC*mecIV-agr1* como el más prevalente, ya que comprende el 45,6% de los aislamientos de SARM. Los siguientes linajes más frecuentes entre los aislamientos de SARM fueron el ST125-SCC*mecIV-agr2* (13%) y el ST5-SCC*mecIV-agr2* (10,8%). En un porcentaje inferior encontramos los linajes ST22-SCC*mecIV-agr1* (8,6%), ST72-SCC*mecIV-agr1* (6,5%), ST30-SCC*mecIV-agr3* (4,3%), ST1-SCC*mecIV-agr3* (4,3%), ST80-SCC*mecIV-agr3* (2,1%) y ST121-*agr4* (2,1%) (*mecA* negativo). El aislamiento que no se pudo analizar por ECP se estudió por MLST y resultó ser el linaje ST398-SCC*mecV-agr1* (2,1%).

5.1. Epidemiología molecular de SARM asociado a la comunidad

La emergencia de infecciones por SARM en la comunidad en población pediátrica plantea la cuestión de determinar si la existencia de algún tipo particular de clon pudiera ser responsable de esta emergencia. Este estudio demuestra que el linaje de SARM que circula causando un mayor número de casos en la comunidad es ST8-SCC*mecIV-agr1*, que comprende el 72% de los casos de SARM-AC. Este linaje que se ha diseminado en la comunidad en nuestro país, comparte algunas características con la cepa USA300 que se encuentra ampliamente diseminada en EEUU. Por un lado, la gran mayoría de los aislamientos pertenecientes al linaje ST8, fueron portadores de los genes que codifican la LPV, toxina presente en la cepa USA300, y por otro lado, este linaje al igual que la cepa USA300 es portador del SCC*mec* tipo IV y del *agr-1*. Sin embargo, hay una serie de características que nos indican que no se trata exactamente del mismo clon sino de una variante. El patrón electroforético obtenido mediante ECP, difiere en una banda del patrón electroforético de la cepa USA300. Además, como hemos visto al

analizar los factores de virulencia, únicamente encontramos 2 aislamientos de SARM ST8-SCC*mecIV-agr1* portadores del elemento ACME, que caracteriza la cepa USA300. En nuestro país ya se habían descrito casos de infección causados por el linaje ST8 a lo largo de los últimos años [49, 185, 210, 244], luego ya se sabía de la presencia del mismo. Lo que llama poderosamente la atención, es que este clon se haya diseminado en España, ya que, aunque se han descrito casos causados por el linaje ST8 en algunos países europeos como Italia [245], Alemania [246], Austria, [247], o Dinamarca [248], el linaje de SARM-AC predominante en Europa es ST80, denominado “clon Europeo” [249]. Esta variante de la cepa USA300 que encontramos circulando en nuestro país, ha sido descrita en algunos países de Latinoamérica [250, 251]. El hecho de que muchos de los casos publicados en nuestro país, se hayan descrito en pacientes procedentes de Ecuador [185, 211] sugiere, que esta cepa podría haber sido introducida en nuestro país desde Sudamérica, ya que en los últimos años el flujo migratorio desde algunos países de Latinoamérica se ha incrementado de forma significativa.

La diseminación del linaje ST8 en nuestro país es preocupante, ya que aunque no es exactamente igual a la cepa USA300, comparte muchas características genéticas con esta. A la cepa USA300 se le ha atribuido una elevada capacidad de transmisión y virulencia y se ha diseminado con asombrosa rapidez en un país tan extenso y diverso como EEUU [48], donde en algunas áreas geográficas la cepa USA300 es la principal causa de infecciones por *S.aureus* en la comunidad [173]. Si la cepa ST8 que está emergiendo en la comunidad en nuestro país presentara la misma capacidad de diseminación que la cepa USA300 en EEUU, esto podría tener consecuencias graves causando un problema de salud pública en nuestro país. Por ello, parece imprescindible mantener una vigilancia epidemiológica de esta cepa en la comunidad, así como también es necesario definir estrategias de prevención de la transmisión de SARM-AC,

para evitar en la medida de lo posible la expansión de este clon en la comunidad en nuestro país.

También encontramos otros linajes de SARM-AC pero causando un pequeño número de casos. El 8% de los aislamientos de SARM-AC pertenecieron al linaje ST1-SCC*mecIV-agr3* y eran portadores de la toxina LPV. El tipo de secuencia ST1 pertenece al complejo clonal CC1 que comprende varios linajes de SARM-AC entre los que se incluye la cepa USA400, que fue la primera cepa conocida de SARM portadora de la LPV [172]. La cepa USA400 predominó en la comunidad en EEUU y en algunas regiones de Canadá hasta finales de los años 1990 [252, 253], cuando fue desplazada por la cepa USA300 [254, 255]. Los linajes que pertenecen al CC1 se diferencian en cuanto al elemento SCC*mec* que puede ser IV o V y la presencia o no de la toxina LPV [256]. Los aislamientos detectados en el estudio son portadores del elemento SCC*mecIV* y no son portadores de la LPV, al igual que las cepas que se han descrito en la comunidad en la zona sur y oeste de Australia [257], en Inglaterra [258] y en Canadá [189].

Otro linaje de SARM-AC que encontramos en 1 caso es ST5-SCC*mecIV-agr1* LPV negativo. A este linaje se le denomina “clon pediátrico” y se asocia fundamentalmente a infecciones hospitalarias. El “clon pediátrico” se encuentra ampliamente diseminado en multitud de países de Europa, Asia y América [178].

También encontramos entre los aislamientos de SARM-AC un caso causado por el linaje ST30-SCC*mecIV-agr3* portador de la LPV. El linaje ST30 pertenece al CC30 que desciende del clon 80/81 que fue un clon nosocomial muy prevalente en los hospitales durante los años 1950 y 1960. Estas cepas eran sensibles a meticilina, y a menudo eran portadoras de la LPV [259]. Al linaje ST30-SCC*mecIV* portador de la LPV se le conoce como “clon del sudoeste del Pacífico” y aunque en un principio su

presencia se confinaba a Australia [260], desde mediados de los años 90 se ha descrito este clon con distintos patrones de campo pulsado, y características genéticas, en multitud de países de todos los continentes [188, 226, 261-264].

Otros linajes de SARM que encontramos en una pequeña proporción (1 caso) en la comunidad son ST22-SCC*mecIV-agr1* y ST72-SCC*mecIV-agr1*, ambos LPV negativos. El tipo de secuencia ST22-SCC*mecIV-agr1* pertenece al CC22 y es una de las cepas pandémicas de este complejo clonal que se asocia tanto al ámbito hospitalario como a la comunidad. A este linaje se le denomina EMRSA-15 y emergió a principios de los años 1990, convirtiéndose en un clon endémico en los hospitales del Reino Unido, donde actualmente sigue siendo una cepa bastante prevalente [265, 266]. ST22 también se ha detectado en otros países como Italia [267], Irlanda [188], Alemania [268, 269], Australia [270], Finlandia [271], Austria [272], Kuwait [273], e India [274].

El linaje ST72-SCC*mecIV-agr1* LPV negativo, lo encontramos en un caso en el estudio. Este linaje pertenece al CC8 y se le ha denominado USA700. La presencia de este linaje se ha detectado en países como Alemania y Abu Dhabi [256].

Otro linaje de SARM que encontramos en un caso en la comunidad fue el ST398-SCC*mecV-agr1*. A este linaje se le denomina “clon porcino” y se ha descrito recientemente como causa de infección en cerdos y granjeros que trabajan en granjas con estos animales. ST398 se caracteriza porque no se digiere con la enzima *SmaI* y es portador en la mayor parte de los casos descritos de los elementos SCC*mecIV* o V. El linaje ST398 fue descrito por primera vez en los Países Bajos y en Dinamarca [200, 275, 276] y está cambiando la epidemiología en estos países, de modo que en el año 2006 el 25% de los aislamientos de SARM de los hospitales holandeses pertenecían a este linaje [198]. En los últimos años se han descrito numerosos casos de infección por este linaje en diversos países de Europa y del mundo [199], lo que es indicativo de la gran

capacidad de transmisión y diseminación de este clon. Este hecho, unido a que se han descrito aislamientos pertenecientes a este clon portadores del elemento *SCCmecIII*, de la toxina LPV, y multirresistentes [201, 202], alertan sobre las graves consecuencias que la diseminación de este linaje podría tener en la comunidad. En nuestro caso el aislamiento perteneciente a este linaje fue obtenido de un aspirado traqueal y fue considerado como una colonización, únicamente era resistente a la gentamicina y a la tobramicina, y no era portador de la LPV (datos no mostrados). Este no es el primer caso en nuestro país, ya que recientemente se han descrito en la literatura varios casos de infecciones por ST398 en España [277, 278], lo que indica que este clon está circulando en nuestro país. La presencia de este linaje nos ha de poner en alerta ya que la emergencia y diseminación del mismo en la comunidad, podría causar un problema salud pública, al igual que lo ha hecho en otros países del norte de Europa. Por ello, la detección y control de la transmisión de este clon, sobre todo en granjas porcinas, puede ser de gran importancia para prevenir la diseminación de esta cepa en la comunidad.

5.2. Epidemiología molecular de SARM asociado al sistema sanitario

En lo que se refiere a la epidemiología de SARM-ASS encontramos una realidad bien distinta a la que observamos en la comunidad. El linaje que con más frecuencia encontramos asociado al sistema sanitario fue el tipo de secuencia ST125-*SCCmecIV-agr2*, que causó el 28,6% de los casos. Es importante puntualizar que de los 6 aislamientos encontrados 5 de ellos los encontramos en el Hospital Son Dureta de Mallorca, en el que un brote en la UVI pediátrica hace que exista un sesgo en los datos referentes a las infecciones por SARM-ASS. El otro aislamiento perteneciente a este linaje, lo encontramos en el hospital Vall d'Hebron de Barcelona, lo que indica que este

linaje no se encuentra únicamente confinado al servicio pediátrico donde se produjo el brote (datos no mostrados). El linaje ST125-SCC*mecIV-agr1* se describió por primera vez en España en un artículo publicado en el año 2004 [279] y hoy en día es el clon de SARM predominante en los hospitales españoles [280, 281, 282]. Este estudio demuestra, que aunque en un porcentaje inferior y no comparable con las infecciones por SARM-ASS en adultos, ST125-SCC*mecIV-agr1* también está presente en los servicios pediátricos de los hospitales y es causa de infecciones en niños. Es importante resaltar la elevada resistencia a los antimicrobianos de los aislamientos pertenecientes a este linaje. La presencia en estas cepas de multirresistencia y la gran capacidad de diseminación y transmisión que posee este linaje en el ámbito nosocomial, que en pocos años se ha convertido en endémico en los hospitales españoles, hace que sea necesaria una vigilancia, así como extremar las medidas de higiene y control de la transmisión de la infección en los servicios pediátricos de los hospitales.

Otro linaje de SARM-ASS muy prevalente fue ST5-SCC*mecIV-agr2* (19,0%). A este linaje se le denomina “clon pediátrico” y pertenece al complejo clonal CC5 al igual que ST125-SCC*mecIV*. Estos dos linajes se diferencian únicamente en un alelo, y concretamente en un nucleótido de la región amplificada del gen *yqiL*. ST5-SCC*mecIV-agr2* es un linaje ampliamente distribuido en multitud de países y ha sido descrito con anterioridad en los hospitales de nuestro país [280].

ST22-SCC*mecIV-agr1* es otro de los linajes que encontramos en un porcentaje considerable entre los aislados de SARM-ASS (14,3%), aunque únicamente encontramos este clon en Mallorca en el Hospital Son Dureta (dato no mostrado). Como ya se ha comentado anteriormente, este clon es el denominado EMRSA-15 que tras emerger en 1991 en el Reino Unido, desplazó rápidamente a otros clones de SARM y actualmente es endémico en cientos de hospitales de este país. En España este linaje

también ha sido descrito en un hospital y en centros asistenciales de larga estancia [279, 283]. El hecho de que este linaje solo lo encontremos en el Hospital Son Dureta de Mallorca podría deberse a la gran afluencia de turismo de origen británico que reciben las Islas Baleares. Tampoco es de extrañar que este clon también haya sido descrito en Tenerife [279, 284], ya que las Islas Canarias también son un destino turístico para la población británica, por lo tanto no sorprende que este linaje tan prevalente en el Reino Unido se haya detectado en los hospitales de las Islas Baleares y Canarias. Este hecho sugiere, que los intercambios poblacionales son la causa de la gran diseminación y globalización que en los últimos años se ha observado en linajes que previamente se confinaban a ciertos países y que hoy día se encuentran circulando en multitud de países del mundo.

El linaje ST8-SCC*mecIV-agr1* prevalente en la comunidad, también lo encontramos asociado al sistema sanitario en un 14,3% de los casos, y además los 3 aislamientos encontrados eran portadores de la toxina LPV. Es de gran importancia evitar que este clon se disemine en los hospitales como ya ha ocurrido en EEUU con la cepa USA300 donde esta cepa está empezando a suplantar en los hospitales a otras cepas tradicionalmente nosocomiales [285].

Otros linajes de SARM-ASS que encontramos en un pequeño porcentaje de los casos fueron ST80-SCC*mecIV-agr3*, ST72-SCC*mecIV-agr1* y ST30-SCC*mecIV-agr3*. Estos dos últimos también los encontramos asociados a la comunidad.

De estos datos de distribución de los linajes de SARM se pueden destacar dos hallazgos. Primero, en lo referente a la distribución geográfica de los linajes de SARM-AC LPV positivos. Hasta hace unos años, los linajes de SARM-AC se encontraban confinados a determinados países, de modo que por ejemplo el “clon del sudoeste del Pacífico” se encontraba en Australia, el linaje ST8 se encontraba confinado en EEUU, y

ST80 en Europa. Estos linajes actualmente se encuentran diseminados en multitud de regiones geográficas de todos los continentes, y nuestro estudio demuestra que estos linajes también se encuentran circulando en nuestro país. El gran flujo migratorio ocurrido en estos últimos años en España, así como el gran intercambio de población que existe entre los países por motivos turísticos o de otra índole, hace que exista también una globalización en lo que a las cepas se refiere, y que clones confinados en su inicio a unos determinados países se hayan diseminado por todo el mundo. De hecho se ha demostrado, que los países con un mayor intercambio poblacional, son los que más variedad de clones presentan circulando en la comunidad [178].

Un segundo hallazgo, es la introducción en el hospital de clones de SARM tradicionalmente asociados a la comunidad y portadores de la toxina LPV. En nuestra serie, se encontraron 5 casos (4 infecciones y una colonización) asociados al sistema sanitario, 3 causados por el linaje ST8-SCC*mecIV*, 1 por ST80-SCC*mecIV*, y otro por ST30-SCC*mecIV*, todos ellos linajes que tradicionalmente se han asociado a la comunidad. Desde el año 2003 se han publicado en distintos países brotes intrahospitalarios causados por SARM-AC sobre todo en servicios pediátricos y obstétricos, donde la prevalencia de SARM-AH suele ser baja. [233, 286-290]. Pero además, publicaciones recientes sugieren que ciertos clones de SARM-AC LPV positivos están empezando a suplantar a los clones hospitalarios como causa de infecciones nosocomiales. La mayor parte de las publicaciones que sugieren este hecho se refieren a EEUU, donde la elevada prevalencia de la cepa USA300 en la comunidad parece conllevar paralelamente un incremento de las infecciones nosocomiales por esta cepa [291-293]. Pero este hecho no es exclusivo de EEUU ya que también se empieza a detectar en otros países como Grecia o Uruguay [235, 261]. La ruptura de barreras entre la comunidad y el hospital es un hecho preocupante, en lo que concierne a que las cepas

de SARM-AC portadoras de la LPV puedan introducirse y diseminarse en el hospital. La introducción de clones de SARM-AC portadores de la LPV en el hospital podría tener implicaciones graves ya que pondría en riesgo a los pacientes hospitalizados, más susceptibles al desarrollo de infecciones. Además, eventualmente, se podría producir un incremento de las tasas de resistencia a los antibióticos de las cepas de SARM-AC, al estar estas sometidas a la presión antibiótica del medio hospitalario. Por ello, es importante llevar a cabo una vigilancia epidemiológica de las cepas de SARM no solo en la comunidad sino también en el hospital, ya que a pesar de que el porcentaje de cepas de SARM-ASS en los servicios pediátricos es relativamente bajo, es importante conocer qué clones se encuentran circulando en los hospitales y centros sanitarios.

Un aspecto de la epidemiología molecular que merece la pena señalar es la utilidad de conocer el tipo de elemento *SCCmec* para discriminar las cepas AC de las cepas ASS. Clásicamente, las cepas de SARM-AC se han caracterizado por presentar en su gran mayoría el elemento *SCCmec* de los tipos IV, V o VII [119, 120, 225-227]. Los *SCCmec* de los tipos IV (20,9-24,3kb), V (28kb) y VII (35,9kb), son *cassettes* de pequeño tamaño, por lo que generalmente sólo presentan el gen *mecA* y no otros genes de resistencia asociados. Por el contrario, las cepas hospitalarias suelen ser portadoras de elementos *SCCmec* del tipo I (34,3kb), II (53,0kb) o III (66,9kb), los tipos II y III son *cassettes* de mayor tamaño y se caracterizan por llevar genes de resistencia a otros antibióticos integrados dentro de plásmidos, como pUB110, pI258, pT181 o de transposones como Tn554 y Ψ Tn554 [178, 294]. En nuestro estudio, con la única excepción del aislamiento perteneciente al clon porcino ST398-*SCCmecV*, tanto las cepas de SARM-AC como las de SARM-ASS eran portadoras del elemento *SCCmecIV*. Este resultado confirma que el tipo de *SCCmec* no es un criterio válido para la diferenciación entre cepas AC y ASS en nuestro país [183].

6. DIVERSIDAD CLONAL DE *S.AUREUS* PORTADOR DE LA TOXINA LPV

Otro de los principales objetivos planteados en el estudio fue conocer la epidemiología molecular de las cepas portadoras de la toxina LPV. Hasta ahora, la mayoría de los estudios se habían focalizado en describir la epidemiología molecular de las cepas de SARM LPV positivas, y poco se conocía de las cepas de SASM LPV positivas, cuando estas últimas son probablemente mayoritarias respecto al número de casos que causan. En el estudio, 75 aislamientos fueron portadores de la toxina, 22 SARM y 53 SASM, y el análisis genotípico mediante ECP y MLST mostró que una gran variedad de linajes eran portadores de la toxina LPV. El análisis comparativo de los perfiles de ADN proporcionó 27 patrones electroforéticos, que correspondían a 14 tipos de secuencias distintos. El tipo de secuencia ST8-*agr1* fue el mayoritario (34,6%). Otros linajes muy representados entre los aislamientos LPV positivos fueron ST121-*agr4* (16%) y ST30-*agr3* (13,3%). En menor proporción se detectaron otros linajes como ST1021-*agr3* (6,6%), ST22-*agr1*, ST1153-*agr2* y ST6-*agr1* (4%), ST5-*agr2*, ST1-*agr3*, ST45-*agr1*, ST15-*agr2*, ST152-*agr1* y ST573-*agr2* (2,6%) y ST80-*agr3* (1,3%). La diversidad clonal observada se debe fundamentalmente, a la gran variedad de linajes de SASM portadores de la toxina, ya que se encontraron 13 linajes distintos. Sin embargo, la diversidad clonal en las cepas de SARM fue mucho menor, encontrándose únicamente tres linajes portadores de la toxina, que fueron ST8 (86,4%), ST30 (9%) y ST80 (4,5%). La gran diversidad clonal observada entre los aislamientos portadores de LPV podría indicar que los bacteriófagos en los que se insertan los genes que codifican la LPV, se transmitan horizontalmente con facilidad entre cepas distintas genéticamente [14]. Si esta hipótesis fuera cierta, la transmisión horizontal de estos

bacteriófagos a nuevas cepas, conllevaría el que estas adquirieran la capacidad de producir la toxina lo que aportaría más virulencia a la cepa.

El linaje de SASM portador de la LPV mayoritario fue ST121 (22,6%). Este es un linaje muy prevalente en la comunidad en algunos países [295, 296] y se ha descrito como el linaje de SASM LPV positivo más prevalente en países como Latvia [297]. Es importante resaltar que este linaje es muy frecuente entre los linajes de SASM causantes de infección pediátrica en nuestro estudio, sin embargo solo encontramos un aislamiento de SARM perteneciente a este linaje y no era portador del gen *mecA*. Parece que a pesar de que CC121 es un linaje de SASM que se ha descrito con frecuencia como causa de IPTBs [296, 298, 299] solo en raras ocasiones se han descrito aislamientos de SARM pertenecientes a este complejo clonal [191, 258, 300, 301]. Por otro lado, el linaje ST121 parece ser bastante virulento ya que se han descrito casos graves y fatales de neumonía necrosante causados por cepas pertenecientes a este linaje. [299, 302]. En España también se ha descrito la presencia de este linaje en la comunidad como causa de neumonía necrosante [244]. En nuestra serie, no encontramos ningún caso de neumonía necrosante asociado a este linaje, de los 12 casos de infección causados por el linaje ST121 LPV positivo, 10 fueron casos de IPTBs, 9 de ellas infecciones profundas, un caso de bacteriemia y un caso de osteomielitis (datos no mostrados). A pesar de que en el estudio no encontramos casos de neumonía, este linaje parece ser bastante virulento, por lo que convendría mantener cierta vigilancia epidemiológica sobre la posible diseminación de este tipo clonal.

Otros linajes de SASM LPV positivos que encontramos en un elevado porcentaje fueron ST30 (15,1%), ST8 (13,2%) y ST1021 (9,4%). De estos linajes, ST8 y ST30 se encontraron también entre los aislamientos de SARM portadores de la LPV. Esto podría indicar que la adquisición de la toxina LPV podría haber sido previa a la

adquisición del gen *mecA*. Los linajes que se hallaron en una proporción menor fueron ST22, ST1153, ST6, ST5, ST1, ST45, ST15, ST152 y ST573.

La gran diversidad clonal que presentan los aislados de SASM LPV positivos en contraste con los aislamientos de SARM portadores de la toxina, ha sido descrita también por otros autores. En un estudio publicado por Kaltsas *et al.* en el que se estudió la epidemiología de las cepas LPV positivas, se objetivó también una gran homogeneidad entre los aislamientos de SARM LPV positivos encontrando únicamente 2 linajes y siendo ST8 el linaje mayoritario (90%). En cambio, entre los aislamientos de SASM LPV positivos había una mayor diversidad clonal, ya que encontraron 6 linajes diferentes [50]. En otro estudio llevado a cabo en Grecia, también se describe una mayor diversidad clonal entre los aislamientos de SASM portadores de la toxina que entre los aislamientos de SARM, de modo que al analizar los aislamientos LPV positivos por ECP, todos los aislamientos de SARM pertenecían a un solo clon mientras que los de SASM pertenecían a 9 clones distintos [235, 298].

7. ESTUDIO DEL CONTENIDO GENÉTICO DE LOS LINAJES MÁS PREVALENTES EN LA POBLACIÓN PEDIÁTRICA.

La razón por la que unos linajes se diseminan desplazando a otros se desconoce, probablemente el contenido genético de los linajes influya de manera determinante en la patogénesis y en la capacidad de supervivencia y diseminación de las cepas, y es probable que sea la razón por la que unos grupos clonales predominan sobre otros. Por ello, el conocimiento del contenido genético de las distintas cepas de *S.aureus* puede ser importante para dilucidar qué genes están asociados a una mayor virulencia, a un tipo de infección o a un tipo de cepa [17]. Por esta razón y con el objetivo de adquirir más

conocimientos acerca del contenido genético de las cepas más prevalentes en la población pediátrica, se llevó a cabo el estudio mediante una técnica de microarrays de ADN, de algunos factores de virulencia y de resistencia en las cepas que se encuentran más diseminadas en la población pediátrica en la comunidad y en el hospital en nuestro país.

Hay una serie de genes que parecen conformar el genoma de muchos de los linajes de *S.aureus*, ya que observamos que se encontraban presentes en el genoma de todos o prácticamente todos los aislamientos estudiados independientemente del linaje al que pertenecieran. Entre estos genes destacan algunos que codifican factores de adhesión como *clfA*, *ClfB*, *ebh*, *eno*, *ebpS*, *fnbA*, *map*, *SdrC* y *vwb*. Otros genes que también se encontraron presentes en el genoma de la práctica totalidad de los aislamientos analizados son los genes que codifican la hemolisina gamma *lukF* y *lukS*, el gen *hld* que codifica la hemolisina delta y el gen *hla* que codifica la hemolisina alfa. También se detectó la presencia en prácticamente todos los aislamientos analizados del gen *aur*, que codifica la aureolisina, de los genes *icaA*, *icaC* e *icaD*, que codifican la formación de biofilm, de los genes *sspA*, *sspB*, *sspP*, y de los genes *isaB*, *isdA*, *imrP*, *mprF* que codifican factores cuya función es evadir el sistema inmune del huésped. Sin embargo, hay otros genes que parecen ser infrecuentes en las cepas que circulan en nuestro país en la población pediátrica ya que no se detectaron en ninguno de los linajes estudiados. Entre estos genes se encuentran el gen *etb*, que codifica una toxina exfoliativa, los genes *edinA*, *edinB*, que codifican toxinas inhibidoras de la diferenciación de células epidérmicas, y el gen *bap*, involucrado en la formación de biofilm.

Aunque existe una gran homogeneidad en el contenido genético de ciertos genes, encontramos que hay otros factores de virulencia que caracterizan cada linaje ya que

están presentes en la mayor parte de los aislamientos pertenecientes al mismo perfil alélico. Algunos de estos genes son los que codifican el antígeno capsular, el sistema regulador *agr* o los genes que codifican algunas enterotoxinas y adhesinas. Este hallazgo concuerda con lo descrito por Monecke *et al.* que establece que algunos de los genes que conforman el “core” y el “core variable” del genoma de *S.aureus*, proporcionan la misma información filogenética que los fragmentos de los 7 genes “housekeeping” que se secuencian en la técnica de MLST. De este modo, el complejo clonal al que pertenece un aislamiento puede ser determinado mediante la detección de ciertos genes con la técnica de microarrays [303]. La presencia o ausencia de los genes *sasG*, *cna*, *fosB*, *lukK+lukD*, el cluster de enterotoxinas *egc*, el gen *seh*, la identificación de las variantes alélicas de los genes *agr*, *ssl/set*, *hysA*, *hsdS* y los genes del antígeno capsular, así como algunas MSCRAMMS y algunas proteasas, se emplean en la técnica de microarrays para determinar el complejo clonal al que pertenecen los aislados.

En otro artículo, Monecke *et al.* describe los genes que caracterizan y definen los distintos complejos clonales, de modo que, el CC8 al que pertenece el linaje ST8 que es el linaje de SARM-AC más prevalente en el estudio, se caracteriza por poseer el *agr* tipo I, el antígeno capsular 5 y el factor de adhesión *sasG*. El CC5 al que pertenecen los tipos de secuencia ST5 y el ST125, que son los linajes de SARM-ASS más prevalentes en el estudio, se caracterizan por poseer el *agr* tipo II, el antígeno capsular 5, el cluster de enterotoxinas *egc* y el factor de adhesión *sasG*. En cuanto a las cepas de SASM, CC121 al que pertenece ST121, que es el linaje de SASM-AC más prevalente y el linaje portador de la LPV más frecuente en la población pediátrica en el estudio, Monecke *et al.* afirman que se caracteriza por poseer el *agr* tipo IV, el antígeno capsular 8, el cluster *egc* y el factor de adhesión *cna*. Mientras que el CC30 al que pertenece el perfil alélico ST30, linaje ampliamente diseminado en la población pediátrica, se caracteriza por

poseer el *agr tipo* II, el antígeno capsular 8, el cluster *egc* y el factor de adhesión *cna* [256]. Los resultados publicados por Monecke *et al.* concuerdan con nuestros resultados, de modo que los genes que definen de manera constante cada complejo clonal los encontramos presentes en todos los aislamientos estudiados de cada linaje. Pero además de estos genes, en nuestro estudio detectamos que hay otros genes que también definen y caracterizan a los distintos linajes.

El contenido genético de ST8, lo estudiamos por ser este el linaje de SARM-AC más prevalente en la población pediátrica. En el estudio encontramos que a pesar de ser un linaje resistente a la meticilina es muy sensible al resto de los antibióticos, lo cual es característico de las cepas de SARM-AC. Los genes de resistencia que detectamos en todos los aislamientos analizados son el *mecA*, el operon *bla* y el gen *tetEfflux*. Los genes de resistencia a macrólidos *mrsA* y *mpbBM* y el gen *aphA* que codifica la resistencia a aminoglicósidos, los encontramos en un 10% de los aislamientos, el gen *sat* en el 5%, el gen *tetK* en el 15%, y el locus de resistencia al mercurio en el 85% de los mismos. Del estudio del contenido en factores de virulencia destacamos los genes *entK* y *entQ*, que codifican las enterotoxinas K y Q, que los encontramos en el 80% de los aislamientos analizados, así como los genes que codifican la LPV que se encuentran en el 90% de los mismos. En un aislamiento encontramos un contenido en enterotoxinas diferente al resto, ya que este era portador de los genes *entA*, *entD*, y *entJ*. En cuanto al contenido en hemolisinas, el 95% de los aislamientos analizados eran portadores de los genes que codifican las hemolisinas alfa y beta (truncada), el 100% los genes *LukF* y *LukS*, y el 35% del gen *hlgA*, que codifican la hemolisina gamma. Al estar el gen de la *hly* truncado, los genes que llevan los bacteriófagos denominados *β -hemolysin-converting bacteriophages* que truncan el gen, estaban presentes en el genoma de ST8. Estos genes son *sak* y *scn* presentes en el 100% de los aislamientos estudiados y *chp*

presente en el 95% de los mismos. Otros factores de virulencia muy presentes en este linaje son los genes que codifican las serinproteasas A y B (*splA* y *splB*) detectados en el 100% de los aislamientos y el gen que codifica la serinproteasa E (*splE*) presente en el 90% de los mismos. El elemento ACME, característico de la cepa USA300, lo encontramos presente únicamente en 2 de los aislamientos estudiados (10%). En cuanto a los factores de adhesión, encontramos una elevada presencia de estos genes al igual que en el resto de los linajes estudiados. Los genes de adhesión que caracterizan a este linaje son *fib*, *fnbB*, *sasG* que los encontramos en todos los aislamientos estudiados y el gen *bbp* que lo encontramos en el 90% de los mismos

Al comparar el contenido genético del linaje de SARM ST8 que circula en nuestro país, con el de la cepa USA300 (ATCC 1556) que se encuentra ampliamente diseminada en EEUU, observamos un contenido genético prácticamente idéntico a excepción de una serie de genes que los diferencian. Estas diferencias que encontramos en cuanto a los genes de resistencia, son los genes *ermC* y *mupR* presentes en la cepa USA300 y ausentes en todos los aislamientos estudiados, y el gen *tetK* presente en el genoma de la cepa USA300 y que en cambio solo lo encontramos en el 15% de los aislamientos estudiados. El locus de resistencia a mercurio y el operon *bla* están en el 100% y 85% respectivamente de los aislamientos estudiados, sin embargo no los encontramos en la cepa USA300. También encontramos diferencias en algunos genes que codifican factores de virulencia, como los genes *hlgA* y *lukX* que están presentes en la cepa USA300 pero que solamente los detectamos en el 35% y 45% de los aislamientos estudiados. Lo mismo ocurre con el elemento ACME, que es un elemento que caracteriza la cepa USA300 pero que únicamente lo encontramos en 2 de los aislamientos estudiados (10%). El elemento ACME se ha implicado en la patogenicidad y la virulencia de la cepa USA 300, aunque esta implicación todavía no se ha aclarado

de manera irrefutable. A pesar de que algunos estudios relacionan el ACME con una mayor virulencia y lo implican en el mayor “*fitness*” de la cepa USA300 [193], hay otros estudios que no encuentran una implicación de este elemento en la virulencia [194]. Hay un estudio publicado en el que se especula que el elemento ACME podría aumentar la transmisibilidad de la bacteria por contacto directo, ya que se piensa que este elemento proporciona una mayor supervivencia de la bacteria cuando se encuentra colonizando la piel [8]. A pesar de que el elemento ACME se ha implicado en la virulencia y en la capacidad de transmisión, parece que no es imprescindible para la expansión del linaje ST8 ya que, no solo en nuestro estudio la gran mayoría de los aislamientos del linaje ST8 carecen del ACME, sino que también una elevada proporción de los aislamientos de SARM del linaje ST8 que circulan en Australia [304] y en Sudamérica [305] carecen de este elemento.

Las diferencias que hemos encontrado en el contenido genético y en el patrón de campo pulsado entre la cepa USA300 y el linaje de SARM ST8 que circula en la comunidad en nuestro país, corroboran el hecho de que parece que el clon que se ha diseminado en nuestro país no es exactamente el mismo que el que se encuentra diseminado en EEUU, sino una variante del mismo.

Un hallazgo que merece la pena puntualizar, es el hecho de que uno de los aislamientos de SARM perteneciente al linaje ST8 presenta algunas diferencias con respecto al resto de los aislamientos. Este aislamiento posee los genes que codifican las enterotoxinas A, D y J, y a su vez carece de la LPV. Este podría tratarse del denominado clon Lyon o UK-EMRSA-2 [256]. Este linaje se encuentra muy diseminado en Francia [306], y también se ha detectado esporádicamente en otros países como Alemania, Irlanda, Reino Unido, Noruega, Países Bajos y Australia [256], y nuestro estudio muestra que este linaje también se encuentra presente en nuestro país.

El contenido genético de los linajes de SARM ST5 y ST125, ambos pertenecientes al complejo clonal CC5, y ambos diseminados en el entorno hospitalario en la población pediátrica, es muy similar. Esta similitud es esperable, ya que estas dos cepas pertenecen al mismo complejo clonal y se diferencian en cuanto al MLST en un único nucleótido de uno de los alelos. Las mayores diferencias las encontramos en los genes que codifican resistencias a los antibióticos. En los aislamientos del linaje ST125 detectamos un mayor número de genes de resistencia, de modo que todos los aislamientos estudiados de este linaje fueron portadores del gen *tetEfflux*, de los genes de resistencia a macrólidos *msrA* y *mpbBM*, del gen de resistencia a aminoglucósidos *aphA* y del gen *sat*. Además, el 80% de los aislamientos fueron portadores de los genes *aacA-aphD* y *aadD*, y del gen *mupR*. Sin embargo, en los aislamientos pertenecientes al linaje ST5 no encontramos estos genes de resistencia a excepción del gen *tetEfflux* presente en todos los aislamientos analizados, el gen *aadD* que lo encontramos en el 20% de los aislamientos, y el gen *ermC* presente en el 40% de los mismos.

En cuanto al contenido en genes de virulencia estos dos linajes son muy homogéneos, y poseen los genes descritos por Monecke *et al.* [256], que caracterizan al CC5, a excepción del gen de adhesión *sasG* que lo encontramos en todos los aislamientos del linaje ST125 pero que solo lo encontramos en el 80% de los aislamientos del linaje ST5. También encontramos otros genes muy frecuentes en estos linajes como el gen *entA* (enterotoxina A) que estaba presente en el 60% de los aislamientos de ST5 y en el 20% de ST125. En cuanto a los genes que codifican las hemolisinas, los genes que codifican la hemolisina gamma se detectaron en el genoma de todos los aislamientos analizados, pero en cuanto a la hemolisina beta truncada hay más diversidad, este gen lo encontramos en el 60% de los aislamientos de ST5 pero no lo encontramos en ST125. Los genes que van en el fago que trunca la hemolisina beta

sak, *chp* y *scn* los encontramos en el 100%, 60% y 100% de los aislamientos de ST5 y en cambio solo los encontramos en el 20% de los aislamientos de ST125. Otros genes de virulencia que encontramos en todos los aislamientos analizados de ambos linajes son *splA*, *splB*. Sin embargo, no encontramos ningún aislamiento portador del gen que codifica la serinproteasa E (*splE*). En lo que a factores de adhesión se refiere, encontramos también una gran homogeneidad. Todos los aislamientos estudiados fueron portadores del gen *fib*, y el gen *sasG*, lo encontramos en todos los aislamientos pertenecientes al linaje ST5 y en el 80% de los del tipo de secuencia ST125.

ST121 es uno de los linajes de SASM que con muchísima frecuencia encontramos como causa de infección en la comunidad en la población pediátrica. Además, ST121 es el linaje portador de la LPV más frecuente, por ello se estudió su contenido genético. En lo que a genes de resistencia se refiere, este linaje fue portador de muy pocos genes que codifican resistencia a los antibióticos. De los 14 aislamientos estudiados el 100% eran portadores del gen *tetEfflux*, 13 (92,8%) eran portadores del operon *bla*, 2 (14,2%) llevaban en su genoma el gen de resistencia a macrólidos *ermC*, 1 (7,1%) fue portador del gen de resistencia a aminoglucósidos *aphD*, 1 (7,1%) del gen *sat*, 2 (14,2%) del gen *tetK* y 13 (92,8%) del gen *fosB*. En cuanto a los factores de virulencia, encontramos varios genes que codifican enterotoxinas, el gen *entB* estaba presente en el 42,8% de los aislamientos estudiados, el gen *entI* en el 57,1%, mientras que los genes que conforman el cluster de enterotoxinas *egc*, estaban presentes en todos los aislamientos estudiados. La LPV, toxina muy frecuente en este linaje, la encontramos en el 78,5% de los aislados estudiados. En cuanto a las hemolisinas, encontramos que los genes que codifican las hemolisinas alfa, beta (truncada) y gamma estaban presentes en todos los aislados estudiados. Los genes que van insertados en los fagos denominados *β-hemolysin-converting bacteriophages*, *sak* y *scn*, los encontramos

en todos los aislamientos analizados sin embargo, el gen *chp* no lo encontramos en ninguno. Es importante destacar que ST121 es el único linaje en el que encontramos presentes, aunque en una pequeña proporción de los aislamientos, genes que codifican toxinas exfoliativas e inhibidores de la diferenciación de células epidérmicas. El gen *etA* lo encontramos en el genoma de una cepa (7,1%) y el gen *etB* en 2 (14,2%), en cuanto a la familia de toxinas EDIN encontramos el gen *edinC* en el 14,2% de los aislamientos estudiados. En lo que se refiere a los genes que codifican serinproteasas, *splA* lo encontramos en el 64,2% de los aislamientos y el gen *splB* en el 92,8%; sin embargo el gen *splE* no lo detectamos en ninguno de los aislamientos analizados. Los genes implicados en la adhesión *fib* y *cna* los encontramos presentes en todos los aislamientos estudiados.

Otro linaje de SASM que con mucha frecuencia encontramos como causa de infección en niños es ST30. Este es un linaje ampliamente distribuido tanto en la comunidad como en el sistema sanitario. En cuanto a sus características genéticas, ST30 fue en general muy sensible a los antibióticos ya que, de los 24 aislamientos estudiados encontramos pocos aislamientos portadores de genes de resistencia en su genoma. El operon *bla*, el gen *tetEflux* y el gen *fosB* los encontramos en todos los aislados, el gen *ermA* en 3 (12,5%), el gen *linA* en 1 (4,1%), el gen *aadD* en 1 (4,1%), el gen *tetK* en 2 (8,3%) y el gen *tetM* y el gen *mupR* en 1 (4,1%). En cuanto a los genes que codifican factores de virulencia, cabe destacar el gen *tst-1* que codifica la toxina del síndrome del shock tóxico, que lo encontramos presente en el genoma del 50% de los aislamientos analizados y que no lo encontramos en ninguno de los otros linajes estudiados. En cuanto a los genes que codifican enterotoxinas el cluster *egc* estaba presente en todos los aislamientos, el gen *entA* en el 54,1%, el gen *entC* en el 8,3% y el gen *entL* en el 8,3% de los aislados estudiados. Los genes que codifican la LPV los encontramos en el

33,3% de los aislamientos. En cuanto a las hemolisinas, la hemolisina beta (truncada) la encontramos en el 41,6% de los aislamientos y de los genes que codifican la hemolisina gamma el 100% de los aislamientos fueron portadores de los genes *lukF* y *lukS* y el 65% del gen *hlgA*. Los genes implicados en la inmunoevasión, *sak* y *scn*, estaban presentes en el genoma de todos los aislamientos analizados, y el gen *chp* en el 95,8% de los mismos. El factor de adhesión *cna* se detectó en todos los aislados analizados.

Los resultados obtenidos en el estudio del contenido genético de los distintos linajes muestran, que los aislamientos pertenecientes al mismo linaje poseen un genoma marcadamente conservado, a excepción de algunos elementos genéticos móviles. Estos elementos genéticos móviles ya sean bacteriófagos, islas de patogenicidad, plásmidos o transposones, en algunas ocasiones son portadores de genes que codifican factores de virulencia y de resistencia y su pérdida o adquisición por la bacteria altera de forma significativa el potencial patógeno y de resistencia a los antibióticos de la misma [10]. En nuestro estudio se refleja, que algunos genes que se localizan en elementos genéticos móviles parecen estar muy diseminados y presentes en el genoma de los distintos linajes de *S.aureus*. Este es el caso de la enterotoxina A, que la encontramos en un porcentaje variable de los aislamientos de los linajes ST8, ST5, ST125 y ST30, lo que muestra que este gen no tiene restricciones a la hora de transmitirse e insertarse en los genomas de distintos linajes. También encontramos que otros genes que se encuentran localizados en bacteriófagos, como los genes *lukF-lukS*, que codifican la LPV y los genes *sea*, *sak*, *chips* y *scn*, se encuentran presentes con una frecuencia variable en todos los linajes estudiados, lo que indica que la transferencia horizontal de este tipo de elementos es bastante frecuente y no se encuentra restringida a un linaje determinado. Sin embargo, existen otros genes que se localizan en elementos móviles pero que a pesar de ello,

parece que se encuentran fuertemente relacionados con cada linaje y son bastante estables, pues al parecer, podrían tener ciertas restricciones a la hora de transmitirse de forma horizontal a otros linajes [9]. Este parece ser el caso de algunos genes como *tst-1* que aunque se encuentra insertado en una isla de patogenicidad, solo lo encontramos en el linaje ST30. También, los genes *eta* y *etb* que se localizan en un fago y en un plásmido, respectivamente, y que únicamente los encontramos en un pequeño porcentaje de los aislamientos del linaje ST121. Y lo mismo ocurre con la familia de toxinas EDIN, que aunque se localizan en elementos móviles (una isla de patogenicidad y un plásmido) únicamente hemos detectado el gen *edinC* en un pequeño porcentaje de los aislamientos del linaje ST121.

Del estudio del contenido genético se puede deducir que lo que define a un linaje es un conjunto de genes de resistencia, de virulencia y de genes reguladores. Probablemente el éxito evolutivo de algunos linajes a la hora de diseminarse y adaptarse a los distintos ambientes no sea la presencia o ausencia de un gen concreto sino la combinación de una serie de genes. De este modo, la combinación de ciertos alelos del sistema regulador *agr* que regulan de forma única la expresión de los genes de virulencia, de ciertos genes de virulencia que codifican ciertas proteínas y toxinas y un determinado contenido genético, podría activar y expresar los genes que codifican los factores de virulencia de una forma más eficiente. Esta teoría ya fue sugerida por otros autores que proponían que la unidad básica de la bacteria que es el clon o linaje debe su éxito a que posee una serie de combinaciones de genes únicas que le permiten la diseminación y la supervivencia [307].

8. ESTUDIO COMPARATIVO DEL CONTENIDO GENÉTICO DE LOS AISLAMIENTOS LPV POSITIVOS Y NEGATIVOS.

En nuestro estudio observamos una clara evidencia clínica de que las cepas portadoras de la LPV eran causa de IPTBs más profundas que las causadas por cepas no portadoras de la toxina. Esta evidencia, unida a la hipótesis de que quizá no es la LPV por sí sola, sino en combinación con otros genes, lo que contribuye a la mayor virulencia de las cepas comunitarias, nos llevó a estudiar esta posibilidad. Para ello, se comparó el contenido genético de los aislamientos portadores y no portadores de la LPV de los linajes ST8, ST30 y ST121. De dicha comparación observamos ciertos genes que se encontraron significativamente asociados a los aislamientos LPV positivos en cada linaje. Sin embargo, no encontramos un consenso en estos genes ya que estos variaban en función del linaje estudiado. En el linaje ST8, el gen de resistencia a meticilina *mecA*, el locus de resistencia al mercurio y los genes de virulencia *entK* y *entQ*, que codifican las enterotoxinas K y Q, y el gen *chp*, que codifica la proteína inhibidora de la quimiotaxis CHIPS, los encontramos significativamente asociados a los aislamientos LPV positivos. En el linaje ST30 encontramos también una serie de genes asociados a los aislamientos portadores de la LPV, como el gen *hlyB* que codifica la hemolisina beta truncada, y 2 alelos del gen implicado en la adhesión *fmb*, que codifica una proteína de unión a la fibronectina. En el linaje ST121 un alelo del gen implicado en la adhesión *sdrD*, que codifica una proteína de unión a la sialoproteína del hueso, se encontraba asociado de forma significativa a los aislamientos LPV positivos. Los resultados de este estudio no nos muestran un consenso de genes asociados a los aislamientos LPV positivos, ya que estos son distintos en función de cada linaje.

Nuestro estudio presentaba algunas limitaciones, como son el reducido número de linajes estudiados y un número de aislamientos estudiados de cada linaje no muy amplio, así como también que el análisis de los aislamientos no se estratificó en función

de la resistencia a meticilina. Por ello, se realizó un análisis más amplio, esta vez comparando el contenido genético de los aislamientos portadores de la toxina y los que no los son, independientemente del linaje y estratificando por la resistencia a la meticilina. Este estudio revela que los genes *hly* (truncado) y los genes *entK* y *entQ*, que codifican las enterotoxinas K y Q, se encuentran significativamente asociados a las cepas LPV positivas, independientemente de la sensibilidad a meticilina. Es importante destacar que el linaje ST8 está más representado entre los aislamientos de SARM LPV positivos que en los negativos, y como hemos comentado con anterioridad, los genes *entK* y *entQ* son parte constante del genoma de este linaje. Sin embargo, en el grupo de aislamientos de SASM no encontramos una mayor representación del linaje ST8 entre los aislamientos portadores de la toxina, y al analizar estas cepas observamos también una mayor frecuencia de los genes *hly*, *entK* y *entQ* en los aislamientos LPV positivos, lo que aporta más solidez al hallazgo. Estos resultados podrían indicar que la mayor virulencia atribuida a las cepas portadoras de la LPV no solo se deba a esta toxina de forma aislada, sino que quizás podría ser la combinación de varias toxinas las que intervengan en la patogenicidad. La producción por parte de la bacteria de enterotoxinas es la causa del síndrome de intoxicación alimentaria estafilocócico, pero también se atribuye a estas toxinas la capacidad de actuar como superantígenos. Esta capacidad superantigénica les confiere la habilidad de estimular inespecíficamente un gran número de linfocitos T CD4+ en el huésped, provocando la liberación masiva de citoquinas y también poseen actividad pirógena [68]. Puede que sea debido a estas habilidades o a otras no conocidas, o la sinergia entre ambas toxinas, lo que pueda tener un efecto a la hora de causar infecciones más graves. El otro gen que encontramos asociado a la LPV es el gen *hly* truncado, este gen se trunca por unos fagos denominados *β-hemolysin-converting bacteriophages*, que se insertan en el cromosoma de *S.aureus* en este gen

truncándolo e inhibiendo la expresión de la β -hemolisina y a su vez, introducen en el cromosoma de la bacteria los genes *scn*, *chp*, *sak* y *entA* en diferentes combinaciones en función del fago que se inserte [13]. A pesar de que encontramos el gen *hly* truncado en una proporción significativamente mayor en los aislamientos LPV positivos independientemente de la sensibilidad a meticilina, no encontramos los genes *scn*, *chp*, *sak* y *entA* en una mayor proporción en los aislamientos de SASM LPV positivos, únicamente los encontramos en los aislamientos de SARM portadores de la toxina. Esto indicaría que la presencia de los genes *scn*, *sak* y *entA* no estaría implicada en la mayor virulencia que observamos en los aislamientos LPV positivos. Quizá podría tener algo que ver en la patogénesis el hecho de que al truncarse el gen *hly*, la β -hemolisina no se exprese, pero esta es solamente una hipótesis.

Por otro lado, en nuestro estudio encontramos una serie de genes que se encontraron significativamente más representados en las cepas LPV negativas independientemente de la sensibilidad a meticilina. Estos genes son *entG*, *entI*, *entM*, *entN* y *entU*, que forman parte del cluster *egc*. Estos resultados presentan un sesgo, y es que el linaje ST5 se encuentra significativamente más representado en los aislamientos LPV negativos tanto en los aislamientos sensibles como resistentes a meticilina. Como ya publicó Monecke *et al.* [256], y como hemos observado en este estudio, el cluster de enterotoxinas *egc* es un elemento constante en el linaje ST5, así que probablemente esta sea la razón de que el cluster *egc* se encuentre más representado en este grupo. El gen *entA* también lo encontramos en una mayor proporción en los aislamientos LPV negativos tanto en las cepas sensibles como resistentes a meticilina, aunque el análisis estadístico solo es significativo para los aislados de SARM. La razón de que este gen esté presente en una mayor proporción entre los aislamientos LPV negativos también se puede deber a que el linaje ST5 esté más representado en este grupo, ya que el gen *entA*

es un componente frecuente del genoma del linaje ST5 ya que lo encontramos en el estudio en el 60% de los aislamientos estudiados. Un hecho que aporta mayor solidez a la asociación entre el gen *entA* y los aislamientos que carecen de la LPV es que este gen también lo encontrábamos asociado de forma significativa a los aislamientos LPV negativos de los linajes ST30 y ST8.

Nuestros resultados demuestran, aún con ciertas limitaciones, la mayor representación de algunos genes en las cepas portadoras de la LPV. Es posible que no solo sea la toxina LPV de forma individual si no de forma sinérgica o coordinada con otros factores de virulencia, los responsables de la mayor agresividad y virulencia que clínicamente se observa en las infecciones causadas por los aislamientos portadores de la LPV. Aunque este estudio muestra que los genes *entK*, *entQ* y *hly* (truncado) se encuentran asociados a la toxina LPV independientemente de la resistencia a meticilina, probablemente sean necesarios otro tipo de estudios en los que se pueda estudiar la expresión de estos genes, para poder ensayar la virulencia de los mismos en los distintos modelos de infección.

9. ESTUDIO DE LOS GENES DE VIRULENCIA ASOCIADOS A LOS AISLAMIENTOS CAUSANTES DE BACTERIEMIA

Cada vez existe más interés en relacionar determinados linajes de *S. aureus* o determinados perfiles genéticos con la capacidad de producir determinados síndromes clínicos. En nuestro estudio, la bacteriemia fue el segundo síndrome clínico en frecuencia, después de las IPTBs. La elevada frecuencia de este síndrome en la población pediátrica, unido a la gravedad del mismo, es lo que nos impulsó a estudiar el contenido genético de 48 de los 51 aislamientos causantes de bacteriemia y compararlo

con el de 102 aislamientos causantes de otros síndromes clínicos, en su mayoría IPTBs (70,5%) con el objetivo de conocer si existían genes asociados a los linajes causantes de bacteriemia.

El único linaje que encontramos asociado de manera estadísticamente significativa a las bacteriemias fue ST30 que causó el 27% de los casos. Este linaje se ha asociado a la producción de endocarditis en un estudio publicado recientemente, en el que se compararon los linajes y el contenido genético de una colección internacional de aislamientos de SASM causantes de IPTBs, con aislamientos de SASM causantes de endocarditis [308]. Los resultados del estudio muestran, que las adhesinas *cna*, *clfB* y *map/eap*, la toxina *tst-1*, y las enterotoxinas A, D, E e I se encontraban asociadas a la producción de endocarditis infecciosa. Otros estudios también han relacionado el CC30 con un mayor índice de complicaciones hematógenas [309] y con bacteriemia persistente [310].

En nuestro estudio, entre los genes de virulencia representados de forma significativa en los aislamientos causantes de bacteriemia destacan, *tst-1*, que codifica la toxina del síndrome del shock tóxico, y los genes que codifican enterotoxinas *entA* y el cluster *egc* (*entG*, *entI*, *entM*, *entN*, *entO* y *entU*), el gen *LuKY-var2*, y el antígeno capsular 8. Los genes *tst-1*, el cluster *egc* y el antígeno capsular 8, son genes que conforman de forma constante el genoma de ST30 como demuestran los estudios llevados a cabo sobre el contenido genético de este linaje [256], y los resultados obtenidos en nuestro estudio, luego es lógico que se encuentren más representados. Esta asociación encontrada entre el linaje ST30 y las bacteriemias, puede que se deba al contenido genético de este linaje, que posea una serie de genes de virulencia que favorezcan y estén involucrados en la patogénesis de este síndrome clínico, o también puede ser debido a que es el linaje de SASM más diseminado en los hospitales.

A algunos de los genes de virulencia que encontramos asociados a los aislamientos causantes de bacteriemia se les ha atribuido una serie de propiedades y funciones que podrían estar involucradas en la patogénesis de la bacteriemia de forma individual o coordinada. Uno de los genes que encontramos asociado a los aislamientos causantes de bacteriemia es *tst* que codifica la toxina TSST-1, que posee actividad superantigénica. Esta actividad también la poseen los genes que codifican las enterotoxinas *entA* y el cluster *egc*, y que también se asocian a la bacteriemia, por lo que podría ser que esta actividad favorezca de alguna manera la patogénesis de este síndrome clínico.

También encontramos que existen una serie de genes asociados con más frecuencia a los aislamientos causantes de otros síndromes clínicos, en su mayor parte IPTBs (70,5%). Estos genes son la LPV y los genes que codifican las enterotoxinas K y Q, los genes *sp1B* que codifica la serinproteasa B, *clfA* que codifica el factor de agregación A, *fib* que codifica una proteína de unión al fibrinógeno, *vwb* que codifica una proteína de unión al factor Von Willebrand, *sasG* que codifica una proteína de superficie y el antígeno capsular 5.

Los resultados del estudio muestran una serie de genes claramente asociados a uno y a otro síndrome. Observamos también, que hay una asociación de genes que se mantienen en este estudio y en el estudio comparativo del contenido genético de los aislamientos LPV positivos y negativos en función de la resistencia a meticilina, y es que los genes que codifican las enterotoxinas *entK* y *entQ* se asocian a los aislamientos LPV positivos y que los genes *egc* y *entA* se asocian a los aislamientos LPV negativos.

Estos resultados apoyan la hipótesis de que el contenido de ciertos genes en el genoma de *S.aureus* influye en la patogénesis, en la mayor virulencia de algunas cepas y en el tipo de infección, así como también podría influir en la capacidad de supervivencia

y diseminación de las cepas y pueda ser la razón por la que algunos grupos clonales predominen y desplacen a otros [17]. Sería importante llevar a cabo estudios que de manera más concreta estudiaran si estos genes pudieran estar involucrados en la mayor virulencia y en la patogénesis de los síndromes clínicos. Otro punto importante sería estudiar la expresión de estos genes en los linajes más virulentos o causantes de ciertos síndromes clínicos. El estudio del contenido genético nos proporciona un conocimiento limitado de lo que ocurre en la realidad de una infección por *S.aureus* por ello, es importante conocer como son regulados estos genes y si se expresan en una mayor o menor medida durante el proceso de infección. Únicamente mediante la investigación y el estudio genético de *S.aureus* lograremos vencer a este versátil y virulento patógeno, que ha sido capaz de adquirir con asombrosa rapidez resistencias a los antimicrobianos y que posee la capacidad de evolucionar constantemente adaptándose a todos los ámbitos.

10. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Es importante señalar que nuestro estudio tiene una serie de limitaciones. Aunque uno de los puntos fuertes de nuestro estudio es el hecho de que se trata de un estudio multicéntrico, es importante subrayar que no se incluyen datos de todas las áreas geográficas, si no únicamente de cuatro hospitales de distintas regiones de España. Probablemente, nuestro estudio no refleje de forma exacta lo que pueda estar ocurriendo en todo el país. Sin embargo, a pesar de esta limitación, creemos que al ser cuatro zonas geográficas muy distintas en cuanto a orientación geográfica y tipo de población, y a que el periodo del estudio fue un año, lo que elimina muchos sesgos que se puedan

introducir debido a situaciones puntuales, los resultados obtenidos pueden ser extrapolables al resto del país.

Otra de las limitaciones es el escaso número de casos recogidos en uno de los hospitales participantes (CHUAC, n=18), lo que hace que quizá sean más representativos los datos obtenidos del resto de los hospitales, en los que el número de casos recogido fue mucho más elevado. Además, durante el periodo del estudio ocurrió un brote por SARM en la UCI pediátrica del Hospital Son Dureta, esto se refleja en el elevado porcentaje de SARM-ASS (13,6%) detectado en este hospital. Este porcentaje ha sido tenido en cuenta a la hora de calcular la incidencia global de SARM-ASS pero para subsanar este sesgo, siempre se ha hecho hincapié en la existencia del mismo, y se ha recalcado que eran datos más fiables los obtenidos de los hospitales 12 de Octubre y Vall d'Hebron (5,6% y 7,7%).

El estudio de epidemiología molecular también presenta algunas limitaciones entre ellas, que no se han estudiado todos los aislamientos de SASM LPV negativos. El estudio molecular se llevo a cabo en una representación de 82 de los 426 aislamientos de SASM LPV negativos, con lo que no hemos podido conocer toda la diversidad clonal que presenta este grupo. Sin embargo, el estudio de 82 aislamientos nos permite hacernos una idea sobre la epidemiología molecular de este grupo y los linajes que circulan en nuestro país.

El estudio del contenido en genes de virulencia también presenta algunas limitaciones. Una de ellas es el limitado número de aislamientos estudiados mediante microarrays de cada linaje. Se ha estudiado el contenido genético de 20 aislamientos de SARM del linaje ST8, 10 de SARM del CC5 (5 de ST5 y 5 de ST125), 14 aislamientos de SASM pertenecientes al linaje ST121 y 24 aislamientos de SASM del linaje ST30. Aunque no es un número muy elevado de aislamientos, probablemente sean suficientes

para hacernos una idea muy certera del contenido genético de los linajes más prevalentes de SARM y SASM que causan infecciones pediátricas en España. Este estudio por tanto, nos ha permitido profundizar y conocer más acerca del contenido genético de estos linajes y sobre el genoma de *S.aureus* en general.

Otra limitación, es que únicamente hemos estudiado la presencia o ausencia de algunos genes de virulencia y no la expresión de los mismos durante el proceso de infección. El estudio del contenido genético es muy interesante en tanto en cuanto nos permite conocer más acerca del genoma de *S.aureus*, y de los linajes que predominan en nuestro país. Además, hemos encontrado una serie de genes asociados a la toxina LPV y también detectamos que hay una serie de genes que parecen asociarse a las cepas en función del síndrome clínico, de modo que algunos genes se asocian a las cepas causantes de bacteriemia y otros a las causantes de otros síndromes en su mayoría IPTBs. Sin embargo, si no se estudia la expresión de los genes no podemos conocer como se regulan y en qué modo participan en el proceso de infección.

El estudio presentado a pesar de sus limitaciones, aporta datos de interés que aumentan nuestro conocimiento sobre las infecciones por *S. aureus* en población pediátrica. Se aportan datos globales de prevalencia de SARM-AC y SARM-ASS, desconocidos hasta la fecha en nuestro país. Además, este estudio contribuye a tener un conocimiento más profundo sobre las características de las infecciones pediátricas por *S.aureus* en función de la adquisición de las mismas, de la resistencia a meticilina de las cepas, y de la presencia de la toxina LPV. Por otro lado, este trabajo aporta un conocimiento global sobre la epidemiología molecular de *S.aureus* en la población pediátrica. Este estudio también aporta una evidencia clínica sobre la participación de la toxina LPV en la producción de infecciones de piel y tejidos blandos, y en una mayor agresividad a la hora de causar este síndrome clínico. Por último, el estudio del

contenido genético contribuye a un mayor conocimiento acerca del genoma de los linajes más frecuentes en nuestro país y además nos revela que existen algunos genes que se asocian de forma significativa a las cepas portadoras de la LPV, y que por lo tanto podrían estar también implicados en la mayor virulencia atribuida a estas cepas. También encontramos que el contenido en algunos genes de resistencia y de virulencia es distinto en función del síndrome clínico, de modo que algunos genes se asocian a las cepas causantes de bacteriemia y otros a las cepas causantes de otros síndromes clínicos en su mayoría IPTBs. En este aspecto, este estudio es un primer paso en el conocimiento del genoma de *S.aureus* y su implicación en los distintos síndromes clínicos, aunque son necesarios estudios de expresión de genes que corroboren estos resultados.

VI-CONCLUSIONES

1-La prevalencia global de infecciones causadas por SARM en población pediátrica fue del 8,8%, siendo este porcentaje variable en función del hospital estudiado. Esta tasa fue del 9% para SARM-AC y del 8% para SARM-ASS.

2-El estudio de sensibilidad a los antibióticos no β -lactámicos, mostró una mayor resistencia de los aislamientos de SARM con respecto a los de SASM, en concreto a eritromicina, fluoroquinolonas y gentamicina.

3-El porcentaje de aislamientos de SARM resistentes a clindamicina fue relativamente elevado, del 18,9%. Sin embargo, el porcentaje de aislamientos resistentes al trimetoprim-sulfametoxazol fue del 2,7%, por lo que este antibiótico podría ser una buena alternativa para el tratamiento de las infecciones de piel y tejidos blandos

4-El 16,4% de los aislamientos de *Staphylococcus aureus* causantes de infección fueron portadores de la toxina LPV. Este porcentaje varía sustancialmente en función de la resistencia a meticilina, de modo que el 54,1% de los aislamientos de SARM fueron portadores de la toxina, en comparación con el 12,9% de los aislamientos de SASM.

5-Las infecciones pediátricas causadas por *S.aureus* presentaron características clínicas diferentes en función de la adquisición. Las IPTBs fueron el síndrome clínico mayoritario en las infecciones asociadas a la comunidad, mientras que las infecciones de la herida quirúrgica, las bacteriemias y las infecciones respiratorias fueron los síndromes clínicos asociados al sistema sanitario.

6- Los niños con infecciones causadas por SARM-AC fueron en su mayoría de origen extranjero, las IPTBs fueron en su mayoría abscesos y celulitis, y las cepas fueron más frecuentemente portadoras de la toxina LPV y resistentes a las fluoroquinolonas.

7-La toxina LPV se asoció fundamentalmente con las cepas de *S. aureus* causantes de infecciones comunitarias. En este sentido, se podría considerar como un marcador de infección comunitaria. Nuestro estudio también aporta una evidencia clínica de la implicación de esta toxina en la patogenia de las IPTBs.

8- El estudio de la epidemiología molecular de los aislamientos de SARM muestra importantes diferencias atendiendo al ámbito de adquisición. En la comunidad, el linaje mayoritario es ST8, mientras que en el ámbito hospitalario existe una mayor diversidad, destacando tres linajes más prevalentes: ST125, ST5, y ST22. Subrayar que tres linajes de SARM LPV positivos, tradicionalmente asociados a la comunidad (ST8, ST30 y ST80), fueron también responsables de infecciones asociadas al sistema sanitario.

9-Nuestro estudio revela una mayor diversidad clonal en los aislamientos de SARM LPV positivos que en los de SARM. La mayoría de los aislamientos de SARM pertenecían al linaje ST8, y una pequeña proporción a ST30 y ST80. Sin embargo, los aislamientos de SARM pertenecían a 13 linajes distintos, siendo los mayoritarios ST121, ST30 y ST8.

10-El estudio del contenido genético de los linajes más prevalentes, muestra que hay una parte del genoma bastante constante, conformada por genes que se encuentran presentes en prácticamente todos los aislamientos, destacando numerosos factores de adhesión, genes implicados en la formación de biofilm, genes que codifican hemolisinas y factores de inmunoevasión. Otra parte del genoma, está conformada por una serie de genes que caracterizan cada linaje, como son los genes que codifican el antígeno capsular, el sistema regulador *agr* o los que codifican algunas enterotoxinas y adhesinas. Por último, hay una serie de genes que se encuentran localizados en elementos genéticos móviles, que se distribuyen de una forma más variable en los distintos linajes.

11-El clon de SARM ST8 que circula en nuestro país no es exactamente el mismo que la cepa USA300. Además de algunas diferencias en cuanto al patrón de campo pulsado, también presenta diferencias en algunos genes de resistencia y de virulencia entre los que destaca el elemento ACME, que únicamente se detectó en el 10% de los aislamientos estudiados.

12-Los genes que codifican las enterotoxinas K y Q y el gen que codifica la hemolisina beta troncada, se asociaron con la presencia de la toxina LPV. Probablemente una combinación de determinados genes sea la responsable de la mayor virulencia atribuida a ciertas cepas de *Staphylococcus aureus*.

13-Nuestro estudio muestra que existen determinados linajes como ST30 que causan más frecuentemente bacteriemias, y que ciertos genes de virulencia como *tst-1*,

entA, el cluster *egc*, el gen *LuKY-var2*, y el antígeno capsular 8, se encuentran asociados de forma significativa a los aislamientos causantes de bacteriemia.

VII-BIBLIOGRAFÍA

1. Ogston A. *Micrococcus* poisoning. J Anat Physiol 1882 Oct;17 (Pt1):24-58.
2. Slifkin M, Merkow LP, Kreuzberger SA, Engwall C, Pardo M. Characterization of CO₂ dependent microcolony variants of *Staphylococcus aureus*. Am J Clin Pathol 1971 Nov;56(5):584-592.
3. Proctor RA, van Langevelde P, Kristjansson M, Maslow JN, Arbeit RD. Persistent and relapsing infections associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis 1995 Jan;20(1):95-102.
4. Bannerman TL. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and Other Catalase Positive Cocci That Grow Aerobically*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. Manual of Clinical Microbiology. 8th ed. Washington DC: ASM Press; 2003. p. 384-404.
5. Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, Baba T, Yuzawa H, Kobayashi I, et al. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet 2001 Apr 21;357(9264):1225-1240.
6. Baba T, Takeuchi F, Kuroda M, Yuzawa H, Aoki K, Oguchi A, et al. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. Lancet 2002 May 25;359(9320):1819-1827.
7. Holden MT, Feil EJ, Lindsay JA, Peacock SJ, Day NP, Enright MC, et al. Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. Proc Natl Acad Sci U S A 2004 Jun 29;101(26):9786-9791.
8. Diep BA, Gill SR, Chang RF, Phan TH, Chen JH, Davidson MG, et al. Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet 2006 Mar 4;367(9512):731-739.
9. Lindsay JA, Moore CE, Day NP, Peacock SJ, Witney AA, Stabler RA, et al. Microarrays reveal that each of the ten dominant lineages of *Staphylococcus aureus* has a unique combination of surface-associated and regulatory genes. J Bacteriol 2006 Jan;188(2):669-676.

10. Lindsay JA. Genomic variation and evolution of *Staphylococcus aureus*. Int J Med Microbiol 2010 Feb;300(2-3):98-103.
11. Rowland SJ, Dyke KG. Characterization of the staphylococcal beta-lactamase transposon Tn552. EMBO J 1989 Sep;8(9):2761-2773.
12. Betley MJ, Mekalanos JJ. Staphylococcal enterotoxin A is encoded by phage. Science 1985 Jul 12;229(4709):185-187.
13. Van Wamel WJ, Rooijackers SH, Ruyken M, van Kessel KP, van Strijp JA. The innate immune modulators staphylococcal complement inhibitor and chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* are located on beta-hemolysin-converting bacteriophages. J Bacteriol 2006 Feb;188(4):1310-1315.
14. Kaneko J, Kimura T, Narita S, Tomita T, Kamio Y. Complete nucleotide sequence and molecular characterization of the temperate staphylococcal bacteriophage phiPVL carrying Panton-Valentine leukocidin genes. Gene 1998 Jul 17;215(1):57-67.
15. Lindsay JA, Ruzin A, Ross HF, Kurepina N, Novick RP. The gene for toxic shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in *Staphylococcus aureus*. Mol Microbiol 1998 Jul;29(2):527-543.
16. Khan SA. Plasmid rolling-circle replication: highlights of two decades of research. Plasmid 2005 Mar;53(2):126-136.
17. Lindsay JA, Holden MT. *Staphylococcus aureus*: superbug, super genome? Trends Microbiol 2004 Aug;12(8):378-385.
18. Giesbrecht P, Kersten T, Maidhof H, Wecke J. Staphylococcal cell wall: morphogenesis and fatal variations in the presence of penicillin. Microbiol Mol Biol Rev 1998 Dec;62(4):1371-1414.
19. Labischinski H. Consequences of the interaction of beta-lactam antibiotics with penicillin binding proteins from sensitive and resistant *Staphylococcus aureus* strains. Med Microbiol Immunol 1992;181(5):241-265.

20. Waxman DJ, Strominger JL. Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of beta-lactam antibiotics. *Annu Rev Biochem* 1983;52:825-869.
21. Goffin C, Ghuysen JM. Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998 Dec;62(4):1079-1093.
22. Weidenmaier C, Kokai-Kun JF, Kristian SA, Chanturiya T, Kalbacher H, Gross M, et al. Role of teichoic acids in *Staphylococcus aureus* nasal colonization, a major risk factor in nosocomial infections. *Nat Med* 2004 Mar;10(3):243-245.
23. Que YA, Moreillon P. *Staphylococcus aureus* (including staphylococcal toxic shock). In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. *Principles and practice of infectious diseases*. 7th ed. Philadelphia: Elsevier. Churchill Livingstone; 2009. p. 2543.
24. Patti JM, Allen BL, McGavin MJ, Hook M. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu Rev Microbiol* 1994;48:585-617.
25. Menzies BE. The role of fibronectin binding proteins in the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infections. *Curr Opin Infect Dis* 2003 Jun;16(3):225-229.
26. Greene C, McDevitt D, Francois P, Vaudaux PE, Lew DP, Foster TJ. Adhesion properties of mutants of *Staphylococcus aureus* defective in fibronectin-binding proteins and studies on the expression of *fnb* genes. *Mol Microbiol* 1995 Sep;17(6):1143-1152.
27. Vaudaux P, Pittet D, Haeberli A, Lerch PG, Morgenthaler JJ, Proctor RA, et al. Fibronectin is more active than fibrin or fibrinogen in promoting *Staphylococcus aureus* adherence to inserted intravascular catheters. *J Infect Dis* 1993 Mar;167(3):633-641.
28. Vaudaux PE, Francois P, Proctor RA, McDevitt D, Foster TJ, Albrecht RM, et al. Use of adhesion-defective mutants of *Staphylococcus aureus* to define the role of specific plasma proteins in promoting bacterial adhesion to canine arteriovenous shunts. *Infect Immun* 1995 Feb;63(2):585-590.
29. Dziewanowska K, Patti JM, Deobald CF, Bayles KW, Trumble WR, Bohach GA. Fibronectin binding protein and host cell tyrosine kinase are required for internalization of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells. *Infect Immun* 1999 Sep;67(9):4673-4678.

30. Sinha B, Francois PP, Nusse O, Foti M, Hartford OM, Vaudaux P, et al. Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin alpha5beta1. *Cell Microbiol* 1999 Sep;1(2):101-117.
31. Mongodin E, Bajolet O, Cutrona J, Bonnet N, Dupuit F, Puchelle E, et al. Fibronectin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* are involved in adherence to human airway epithelium. *Infect Immun* 2002 Feb;70(2):620-630.
32. Que YA, Francois P, Haefliger JA, Entenza JM, Vaudaux P, Moreillon P. Reassessing the role of *Staphylococcus aureus* clumping factor and fibronectin-binding protein by expression in *Lactococcus lactis*. *Infect Immun* 2001 Oct;69(10):6296-6302.
33. Ryding U, Flock JI, Flock M, Soderquist B, Christensson B. Expression of collagen-binding protein and types 5 and 8 capsular polysaccharide in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 1997 Oct;176(4):1096-1099.
34. Gillaspay AF, Patti JM, Pratt FL, Jr, Iandolo JJ, Smeltzer MS. The *Staphylococcus aureus* collagen adhesin-encoding gene (*cna*) is within a discrete genetic element. *Gene* 1997 Sep 1;196(1-2):239-248.
35. Switalski LM, Patti JM, Butcher W, Gristina AG, Speziale P, Hook M. A collagen receptor on *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with septic arthritis mediates adhesion to cartilage. *Mol Microbiol* 1993 Jan;7(1):99-107.
36. Foster TJ, Hook M. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 1998 Dec;6(12):484-488.
37. Moreillon P, Entenza JM, Francioli P, McDevitt D, Foster TJ, Francois P, et al. Role of *Staphylococcus aureus* coagulase and clumping factor in pathogenesis of experimental endocarditis. *Infect Immun* 1995 Dec;63(12):4738-4743.
38. Ni Eidhin D, Perkins S, Francois P, Vaudaux P, Hook M, Foster TJ. Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen-binding adhesin of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 1998 Oct;30(2):245-257.
39. O'Riordan K, Lee JC. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *Clin Microbiol Rev* 2004 Jan;17(1):218-234.

40. Portoles M, Kiser KB, Bhasin N, Chan KH, Lee JC. *Staphylococcus aureus* Cap50 has UDP-ManNAc dehydrogenase activity and is essential for capsule expression. *Infect Immun* 2001 Feb;69(2):917-923.
41. Schaffer AC, Lee JC. Staphylococcal vaccines and immunotherapies. *Infect Dis Clin North Am* 2009 Mar;23(1):153-171.
42. Gerke C, Kraft A, Sussmuth R, Schweitzer O, Gotz F. Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. *J Biol Chem* 1998 Jul 17;273(29):18586-18593.
43. Gotz F. *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol* 2002 Mar;43(6):1367-1378.
44. Cramton SE, Gerke C, Schnell NF, Nichols WW, Gotz F. The intercellular adhesion (ica) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect Immun* 1999 Oct;67(10):5427-5433.
45. Bhakdi S, Trantum-Jensen J. Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Rev* 1991 Dec;55(4):733-751.
46. Huseby M, Shi K, Brown CK, Digre J, Mengistu F, Seo KS, et al. Structure and biological activities of beta toxin from *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 2007 Dec;189(23):8719-8726.
47. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev* 2000 Jan;13(1):16-34, table of contents.
48. Moran GJ, Krishnadasan A, Gorwitz RJ, Fosheim GE, McDougal LK, Carey RB, et al. Methicillin-resistant *S. aureus* infections among patients in the emergency department. *N Engl J Med* 2006 Aug 17;355(7):666-674.
49. Daskalaki M, Rojo P, Marin-Ferrer M, Barrios M, Otero JR, Chaves F. Pantone-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus* skin and soft tissue infections among children in an emergency department in Madrid, Spain. *Clin Microbiol Infect* 2010 Jan;16(1):74-77.

50. Kaltsas A, Guh A, Mediavilla JR, Varshney AK, Robiou N, Gialanellia P, et al. Frequency of panton-valentine leukocidin-producing methicillin-sensitive *Staphylococcus* strains in patients with complicated skin and soft tissue infection in bronx, new york. J Clin Microbiol 2011 Aug;49(8):2992-2995.
51. Roberts JC, Gulino SP, Peak KK, Luna VA, Sanderson R. Fatal necrotizing pneumonia due to a Panton-Valentine leukocidin positive community-associated methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* and Influenza co-infection: a case report. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2008 Feb 19;7:5.
52. Francis JS, Doherty MC, Lopatin U, Johnston CP, Sinha G, Ross T, et al. Severe community-onset pneumonia in healthy adults caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the Panton-Valentine leukocidin genes. Clin Infect Dis 2005 Jan 1;40(1):100-107.
53. Millet A, Desrumaux A, Gayot A, Tristan A, Emeriaud G, Debillon T, et al. Community-acquired *Staphylococcus aureus* necrotizing pneumonia secreting Panton-Valentine leukocidin in an infant. Arch Pediatr 2012 Jul;19(7):718-721.
54. Kreienbuehl L, Charbonney E, Eggimann P. Community-acquired necrotizing pneumonia due to methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* secreting Panton-Valentine leukocidin: a review of case reports. Ann Intensive Care 2011 Dec 22;1(1):52.
55. Martinez-Aguilar G, Avalos-Mishaan A, Hulten K, Hammerman W, Mason EO, Jr, Kaplan SL. Community-acquired, methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* musculoskeletal infections in children. Pediatr Infect Dis J 2004 Aug;23(8):701-706.
56. Dohin B, Gillet Y, Kohler R, Lina G, Vandenesch F, Vanhems P, et al. Pediatric bone and joint infections caused by Panton-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus*. Pediatr Infect Dis J 2007 Nov;26(11):1042-1048.
57. Bocchini CE, Hulten KG, Mason EO, Jr, Gonzalez BE, Hammerman WA, Kaplan SL. Panton-Valentine leukocidin genes are associated with enhanced inflammatory

response and local disease in acute hematogenous *Staphylococcus aureus* osteomyelitis in children. *Pediatrics* 2006 Feb;117(2):433-440.

58. Pannaraj PS, Hulten KG, Gonzalez BE, Mason EO,Jr, Kaplan SL. Infective pyomyositis and myositis in children in the era of community-acquired, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Infect Dis* 2006 Oct 15;43(8):953-960.

59. Tobeña Rue M, Coll Usandizaga F, Garcia Fontecha C, Bartolome Comas R, Moraga Llop FA. Necrotizing fasciitis due to community-acquired panton-valentine leukocidin methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *An Pediatr (Barc)* 2009 Apr;70(4):374-378.

60. Gerard D, Mariani-Kurkdjian P, Sachs P, Berrebi D, Van-Den-Abbeele T, Dauger S. Facial necrotizing fasciitis in an infant caused by a five toxin-secreting methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *Intensive Care Med* 2009 Jun;35(6):1145-1146.

61. Adem PV, Montgomery CP, Husain AN, Koogler TK, Arangelovich V, Humilier M, et al. *Staphylococcus aureus* sepsis and the Waterhouse-Friderichsen syndrome in children. *N Engl J Med* 2005 Sep 22;353(12):1245-1251.

62. Brook I. Recovery of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* from a child with acute otitis media. *Pediatr Infect Dis J* 2008 Apr;27(4):372-373.

63. Voyich JM, Otto M, Mathema B, Braughton KR, Whitney AR, Welty D, et al. Is Panton-Valentine leukocidin the major virulence determinant in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease? *J Infect Dis* 2006 Dec 15;194(12):1761-1770.

64. Bubeck Wardenburg J, Bae T, Otto M, Deleo FR, Schneewind O. Poring over pores: alpha-hemolysin and Panton-Valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Nat Med* 2007 Dec;13(12):1405-1406.

65. Bubeck Wardenburg J, Palazzolo-Ballance AM, Otto M, Schneewind O, DeLeo FR. Panton-Valentine leukocidin is not a virulence determinant in murine models of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease. *J Infect Dis* 2008 Oct 15;198(8):1166-1170.

66. Labandeira-Rey M, Couzon F, Boisset S, Brown EL, Bes M, Benito Y, et al. *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia. *Science* 2007 Feb 23;315(5815):1130-1133.
67. Brown EL, Dumitrescu O, Thomas D, Badiou C, Koers EM, Choudhury P, et al. The Panton-Valentine leukocidin vaccine protects mice against lung and skin infections caused by *Staphylococcus aureus* USA300. *Clin Microbiol Infect* 2009 Feb;15(2):156-164.
68. Torres BA, Kominsky S, Perrin GQ, Hobeika AC, Johnson HM. Superantigens: the good, the bad, and the ugly. *Exp Biol Med (Maywood)* 2001 Mar;226(3):164-176.
69. Alouf JE, Muller-Alouf H. Staphylococcal and streptococcal superantigens: molecular, biological and clinical aspects. *Int J Med Microbiol* 2003 Feb;292(7-8):429-440.
70. Schwab JH, Brown RR, Anderle SK, Schlievert PM. Superantigen can reactivate bacterial cell wall-induced arthritis. *J Immunol* 1993 May 1;150(9):4151-4159.
71. McCormick JK, Yarwood JM, Schlievert PM. Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. *Annu Rev Microbiol* 2001;55:77-104.
72. Marrack P, Kappler J. The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science* 1990 May 11;248(4956):705-711.
73. Ladhani S, Joannou CL, Lochrie DP, Evans RW, Poston SM. Clinical, microbial, and biochemical aspects of the exfoliative toxins causing staphylococcal scalded-skin syndrome. *Clin Microbiol Rev* 1999 Apr;12(2):224-242.
74. Sato H, Matsumori Y, Tanabe T, Saito H, Shimizu A, Kawano J. A new type of staphylococcal exfoliative toxin from a *Staphylococcus aureus* strain isolated from a horse with phlegmon. *Infect Immun* 1994 Sep;62(9):3780-3785.
75. Yamaguchi T, Nishifuji K, Sasaki M, Fudaba Y, Aepfelbacher M, Takata T, et al. Identification of the *Staphylococcus aureus* *etd* pathogenicity island which encodes a novel exfoliative toxin, ETD, and EDIN-B. *Infect Immun* 2002 Oct;70(10):5835-5845.

76. Prevost G, Couppie P, Monteil H. Staphylococcal epidermolysins. *Curr Opin Infect Dis* 2003 Apr;16(2):71-76.
77. Sugai M, Enomoto T, Hashimoto K, Matsumoto K, Matsuo Y, Ohgai H, et al. A novel epidermal cell differentiation inhibitor (EDIN): purification and characterization from *Staphylococcus aureus*. *Biochem Biophys Res Commun* 1990 Nov 30;173(1):92-98.
78. Sugai M, Hashimoto K, Kikuchi A, Inoue S, Okumura H, Matsumoto K, et al. Epidermal cell differentiation inhibitor ADP-ribosylates small GTP-binding proteins and induces hyperplasia of epidermis. *J Biol Chem* 1992 Feb 5;267(4):2600-2604.
79. Aktories K, Schmidt G, Just I. Rho GTPases as targets of bacterial protein toxins. *Biol Chem* 2000 May-Jun;381(5-6):421-426.
80. Wilde C, Chhatwal GS, Schmalzing G, Aktories K, Just I. A novel C3-like ADP-ribosyltransferase from *Staphylococcus aureus* modifying RhoE and Rnd3. *J Biol Chem* 2001 Mar 23;276(12):9537-9542.
81. Yamaguchi T, Hayashi T, Takami H, Ohnishi M, Murata T, Nakayama K, et al. Complete nucleotide sequence of a *Staphylococcus aureus* exfoliative toxin B plasmid and identification of a novel ADP-ribosyltransferase, EDIN-C. *Infect Immun* 2001 Dec;69(12):7760-7771.
82. Rooijackers SH, Ruyken M, Roos A, Daha MR, Presanis JS, Sim RB, et al. Immune evasion by a staphylococcal complement inhibitor that acts on C3 convertases. *Nat Immunol* 2005 Sep;6(9):920-927.
83. Postma B, Poppelier MJ, van Galen JC, Prossnitz ER, van Strijp JA, de Haas CJ, et al. Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* binds specifically to the C5a and formylated peptide receptor. *J Immunol* 2004 Jun 1;172(11):6994-7001.
84. de Haas CJ, Veldkamp KE, Peschel A, Weerkamp F, Van Wamel WJ, Heezius EC, et al. Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus*, a bacterial antiinflammatory agent. *J Exp Med* 2004 Mar 1;199(5):687-695.

85. Novick RP. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol Microbiol* 2003 Jun;48(6):1429-1449.
86. Gorwitz RJ, Kruszon-Moran D, McAllister SK, McQuillan G, McDougal LK, Fosheim GE, et al. Changes in the prevalence of nasal colonization with *Staphylococcus aureus* in the United States, 2001-2004. *J Infect Dis* 2008 May 1;197(9):1226-1234.
87. Armstrong-Esther CA. Carriage patterns of *Staphylococcus aureus* in a healthy non-hospital population of adults and children. *Ann Hum Biol* 1976 May;3(3):221-227.
88. Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev* 1997 Jul;10(3):505-520.
89. Calia FM, Wolinsky E, Mortimer EA, Jr, Abrams JS, Rammelkamp CH, Jr. Importance of the carrier state as a source of *Staphylococcus aureus* in wound sepsis. *J Hyg (Lond)* 1969 Mar;67(1):49-57.
90. Von Eiff C, Becker K, Machka K, Stammer H, Peters G. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Study Group. *N Engl J Med* 2001 Jan 4;344(1):11-16.
91. Ena J, Boelaert JR, Boyken LD, Van Landuyt HW, Godard CA, Herwaldt LA. Epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections in patients on hemodialysis. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1994 Feb;15(2):78-81.
92. Pujol M, Pena C, Pallares R, Ariza J, Ayats J, Dominguez MA, et al. Nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteremia among nasal carriers of methicillin-resistant and methicillin-susceptible strains. *Am J Med* 1996 May;100(5):509-516.
93. Luzar MA, Coles GA, Faller B, Slingeneyer A, Dah GD, Briat C, et al. *Staphylococcus aureus* nasal carriage and infection in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *N Engl J Med* 1990 Feb 22;322(8):505-509.
94. Lye WC, Leong SO, Lee EJ. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal carriage and infections in CAPD. *Kidney Int* 1993 Jun;43(6):1357-1362.

95. Muder RR, Brennen C, Wagener MM, Vickers RM, Rihs JD, Hancock GA, et al. Methicillin-resistant staphylococcal colonization and infection in a long-term care facility. *Ann Intern Med* 1991 Jan 15;114(2):107-112.
96. Weinstein MP, Towns ML, Quartey SM, Mirrett S, Reimer LG, Parmigiani G, et al. The clinical significance of positive blood cultures in the 1990s: a prospective comprehensive evaluation of the microbiology, epidemiology, and outcome of bacteremia and fungemia in adults. *Clin Infect Dis* 1997 Apr;24(4):584-602.
97. Moreillon P, Que YA. Infective endocarditis. *Lancet* 2004 Jan 10;363(9403):139-149.
98. Rojo P, Barrios M, Palacios A, Gomez C, Chaves F. Community-associated *Staphylococcus aureus* infections in children. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2010 May;8(5):541-554.
99. Aguilar J, Urday-Cornejo V, Donabedian S, Perri M, Tibbetts R, Zervos M. *Staphylococcus aureus* meningitis: case series and literature review. *Medicine (Baltimore)* 2010 Mar;89(2):117-125.
100. Osiyemi O, Dickinson G. Gram-Positive Pneumonia. *Curr Infect Dis Rep* 2000 Jun;2(3):207-214.
101. Hoban DJ, Biedenbach DJ, Mutnick AH, Jones RN. Pathogen of occurrence and susceptibility patterns associated with pneumonia in hospitalized patients in North America: results of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Study (2000). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003 Apr;45(4):279-285.
102. Rubinstein E, Kollef MH, Nathwani D. Pneumonia caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 2008 Jun 1;46 Suppl 5:S378-85.
103. Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, Fournet JC, Lina G, Bes M, et al. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Pantón-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet* 2002 Mar 2;359(9308):753-759.

104. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Severe methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* community-acquired pneumonia associated with influenza--Louisiana and Georgia, December 2006-January 2007. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2007 Apr 13;56(14):325-329.
105. Lew DP, Waldvogel FA. Osteomyelitis. N Engl J Med 1997 Apr 3;336(14):999-1007.
106. Blyth MJ, Kincaid R, Craigen MA, Bennet GC. The changing epidemiology of acute and subacute haematogenous osteomyelitis in children. J Bone Joint Surg Br 2001 Jan;83(1):99-102.
107. Zimmermann B,3rd, Mikolich DJ, Ho G,Jr. Septic bursitis. Semin Arthritis Rheum 1995 Jun;24(6):391-410.
108. Bickels J, Ben-Sira L, Kessler A, Wientroub S. Primary pyomyositis. J Bone Joint Surg Am 2002 Dec;84-A(12):2277-2286.
109. Barber M, Rozwadowska-Dowzenko M. Infection by penicillin-resistant staphylococci. Lancet 1948 Oct 23;2(6530):641-644.
110. Jevons.MP. "celbenin"-resistant staphylococci. br med j 1961;1:124-125.
111. Chambers HF, Hartman BJ, Tomasz A. Increased amounts of a novel penicillin-binding protein in a strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* exposed to nafcillin. J Clin Invest 1985 Jul;76(1):325-331.
112. Arias CA, Murray BE. Antibiotic-resistant bugs in the 21st century-a clinical super-challenge. N Engl J Med 2009 Jan 29;360(5):439-443.
113. Ito T, Katayama Y, Hiramatsu K. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. Antimicrob Agents Chemother 1999 Jun;43(6):1449-1458.
114. Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. Genetic organization of the chromosome region surrounding *mecA* in clinical staphylococcal strains: role of IS431-mediated *mecI* deletion in expression of resistance in *mecA*-carrying, low-level methicillin-resistant

Staphylococcus haemolyticus. Antimicrob Agents Chemother 2001 Jul;45(7):1955-1963.

115. Zhang K, McClure JA, Elsayed S, Louie T, Conly JM. Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome *mec* types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2005 Oct;43(10):5026-5033.

116. Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, Ito T. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Trends Microbiol 2001 Oct;9(10):486-493.

117. Oliveira DC, Milheirico C, de Lencastre H. Redefining a structural variant of staphylococcal cassette chromosome *mec*, SCC*mec* type VI. Antimicrob Agents Chemother 2006 Oct;50(10):3457-3459.

118. Oliveira DC, Tomasz A, de Lencastre H. The evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: identification of two ancestral genetic backgrounds and the associated *mec* elements. Microb Drug Resist 2001 Winter;7(4):349-361.

119. Daum RS, Ito T, Hiramatsu K, Hussain F, Mongkolrattanothai K, Jamklang M, et al. A novel methicillin-resistance cassette in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates of diverse genetic backgrounds. J Infect Dis 2002 Nov 1;186(9):1344-1347.

120. Ito T, Ma XX, Takeuchi F, Okuma K, Yuzawa H, Hiramatsu K. Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. Antimicrob Agents Chemother 2004 Jul;48(7):2637-2651.

121. Shore A, Rossney AS, Keane CT, Enright MC, Coleman DC. Seven novel variants of the staphylococcal chromosomal cassette *mec* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Ireland. Antimicrob Agents Chemother 2005 May;49(5):2070-2083.

122. Chongtrakool P, Ito T, Ma XX, Kondo Y, Trakulsomboon S, Tiensasitorn C, et al. Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) typing of methicillin-resistant

Staphylococcus aureus strains isolated in 11 Asian countries: a proposal for a new nomenclature for SCC*mec* elements. Antimicrob Agents Chemother 2006 Mar;50(3):1001-1012.

123. Ito T, Katayama Y, Asada K, Mori N, Tsutsumimoto K, Tiensasitorn C, et al. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2001 May;45(5):1323-1336.

124. Ma XX, Ito T, Tiensasitorn C, Jamklang M, Chongtrakool P, Boyle-Vavra S, et al. Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. Antimicrob Agents Chemother 2002 Apr;46(4):1147-1152.

125. International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC). Classification of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*): guidelines for reporting novel SCC*mec* elements. Antimicrob Agents Chemother 2009 Dec;53(12):4961-4967.

126. Massidda O, Montanari MP, Varaldo PE. Evidence for a methicillin-hydrolysing beta-lactamase in *Staphylococcus aureus* strains with borderline susceptibility to this drug. FEMS Microbiol Lett 1992 May 1;71(3):223-227.

127. Massidda O, Montanari MP, Mingoia M, Varaldo PE. Borderline methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains have more in common than reduced susceptibility to penicillinase-resistant penicillins. Antimicrob Agents Chemother 1996 Dec;40(12):2769-2774.

128. Montanari MP, Massidda O, Mingoia M, Varaldo PE. Borderline susceptibility to methicillin in *Staphylococcus aureus*: a new mechanism of resistance? Microb Drug Resist 1996 Summer;2(2):257-260.

129. Tomasz A, Drugeon HB, de Lencastre HM, Jabes D, McDougall L, Bille J. New mechanism for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: clinical isolates that lack the PBP2a gene and contain normal penicillin-binding proteins with modified

penicillin-binding capacity. *Antimicrob Agents Chemother* 1989 Nov;33(11):1869-1874.

130. Garcia-Alvarez L, Holden MT, Lindsay H, Webb CR, Brown DF, Curran MD, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *Lancet Infect Dis* 2011 Aug;11(8):595-603.

131. Leclercq R, Courvalin P. Bacterial resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics by target modification. *Antimicrob Agents Chemother* 1991 Jul;35(7):1267-1272.

132. Leclercq R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin Infect Dis* 2002 Feb 15;34(4):482-492.

133. Matsuoka M, Inoue M, Nakajima Y, Endo Y. New *erm* Gene in *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2002 Jan;46(1):211-215.

134. Weisblum B. Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob Agents Chemother* 1995 Mar;39(3):577-585.

135. Ross JI, Eady EA, Cove JH, Baumberg S. Identification of a chromosomally encoded ABC-transport system with which the staphylococcal erythromycin exporter MsrA may interact. *Gene* 1995 Feb 3;153(1):93-98.

136. Hooper DC. Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerg Infect Dis* 2001 Mar-Apr;7(2):337-341.

137. Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother* 1997 Jul;40(1):135-136.

138. Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, Kawasaki S, Hosoda Y, Hori S, et al. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet* 1997 Dec 6;350(9092):1670-1673.

139. Ariza J, Pujol M, Cabo J, Pena C, Fernandez N, Linares J, et al. Vancomycin in surgical infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with heterogeneous resistance to vancomycin. *Lancet* 1999 May 8;353(9164):1587-1588.
140. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin--Illinois, 1999. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2000 Jan 7;48(51-52):1165-1167.
141. Hageman JC, Pegues DA, Jepsen C, Bell RL, Guinan M, Ward KW, et al. Vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a home health-care patient. *Emerg Infect Dis* 2001 Nov-Dec;7(6):1023-1025.
142. Rotun SS, McMath V, Schoonmaker DJ, Maupin PS, Tenover FC, Hill BC, et al. *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin isolated from a patient with fatal bacteremia. *Emerg Infect Dis* 1999 Jan-Feb;5(1):147-149.
143. Smith TL, Pearson ML, Wilcox KR, Cruz C, Lancaster MV, Robinson-Dunn B, et al. Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. Glycopeptide-Intermediate *Staphylococcus aureus* Working Group. *N Engl J Med* 1999 Feb 18;340(7):493-501.
144. Hanaki H, Labischinski H, Inaba Y, Kondo N, Murakami H, Hiramatsu K. Increase in glutamine-non-amidated mucopeptides in the peptidoglycan of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strain Mu50. *J Antimicrob Chemother* 1998 Sep;42(3):315-320.
145. Arthur M, Courvalin P. Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1993 Aug;37(8):1563-1571.
146. Arthur M, Molinas C, Depardieu F, Courvalin P. Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. *J Bacteriol* 1993 Jan;175(1):117-127.

147. Noble WC, Virani Z, Cree RG. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol Lett 1992 Jun 1;72(2):195-198.
148. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin--United States, 2002. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2002 Jul 5;51(26):565-567.
149. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*--Pennsylvania, 2002. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2002 Oct 11;51(40):902.
150. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*--New York, 2004. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2004 Apr 23;53(15):322-323.
151. Tenover FC. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a perfect but geographically limited storm? Clin Infect Dis 2008 Mar 1;46(5):675-677.
152. Weigel LM, Donlan RM, Shin DH, Jensen B, Clark NC, McDougal LK, et al. High-level vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with a polymicrobial biofilm. Antimicrob Agents Chemother 2007 Jan;51(1):231-238.
153. Whitener CJ, Park SY, Browne FA, Parent LJ, Julian K, Bozdogan B, et al. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the absence of vancomycin exposure. Clin Infect Dis 2004 Apr 15;38(8):1049-1055.
154. Lodise TP, Graves J, Evans A, Graffunder E, Helmecke M, Lomaestro BM, et al. Relationship between vancomycin MIC and failure among patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia treated with vancomycin. Antimicrob Agents Chemother 2008 Sep;52(9):3315-3320.
155. Moise PA, Sakoulas G, Forrest A, Schentag JJ. Vancomycin in vitro bactericidal activity and its relationship to efficacy in clearance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. Antimicrob Agents Chemother 2007 Jul;51(7):2582-2586.

156. Sakoulas G, Moise-Broder PA, Schentag J, Forrest A, Moellering RC, Jr, Eliopoulos GM. Relationship of MIC and bactericidal activity to efficacy of vancomycin for treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *J Clin Microbiol* 2004 Jun;42(6):2398-2402.
157. Aguado JM, San-Juan R, Lalueza A, Sanz F, Rodriguez-Otero J, Gomez-Gonzalez C, et al. High vancomycin MIC and complicated methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Emerg Infect Dis* 2011 Jun;17(6):1099-1102.
158. Sakoulas G, Moellering RC, Jr. Increasing antibiotic resistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Clin Infect Dis* 2008 Jun 1;46 Suppl 5:S360-7.
159. Cookson BD. The emergence of mupirocin resistance: a challenge to infection control and antibiotic prescribing practice. *J Antimicrob Chemother* 1998 Jan;41(1):11-18.
160. Schmitz FJ, Lindenlauf E, Hofmann B, Fluit AC, Verhoef J, Heinz HP, et al. The prevalence of low- and high-level mupirocin resistance in staphylococci from 19 European hospitals. *J Antimicrob Chemother* 1998 Oct;42(4):489-495.
161. Daskalaki M, Otero JR, Chaves F. Molecular characterization of resistance to mupirocin in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in a tertiary hospital in Spain. *J Antimicrob Chemother* 2009 Apr;63(4):826-828.
162. Tsiodras S, Gold HS, Sakoulas G, Eliopoulos GM, Wennersten C, Venkataraman L, et al. Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 2001 Jul 21;358(9277):207-208.
163. Meka VG, Pillai SK, Sakoulas G, Wennersten C, Venkataraman L, DeGirolami PC, et al. Linezolid resistance in sequential *Staphylococcus aureus* isolates associated with a T2500A mutation in the 23S rRNA gene and loss of a single copy of rRNA. *J Infect Dis* 2004 Jul 15;190(2):311-317.
164. Meka VG, Gold HS. Antimicrobial resistance to linezolid. *Clin Infect Dis* 2004 Oct 1;39(7):1010-1015.

165. Long KS, Poehlsgaard J, Kehrenberg C, Schwarz S, Vester B. The Cfr rRNA methyltransferase confers resistance to Phenicol, Lincosamides, Oxazolidinones, Pleuromutilins, and Streptogramin A antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 2006 Jul;50(7):2500-2505.
166. Mangili A, Bica I, Snyderman DR, Hamer DH. Daptomycin-resistant, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Infect Dis* 2005 Apr 1;40(7):1058-1060.
167. Baltz RH. Daptomycin: mechanisms of action and resistance, and biosynthetic engineering. *Curr Opin Chem Biol* 2009 Apr;13(2):144-151.
168. Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 May 28;99(11):7687-7692.
169. Chang S, Sievert DM, Hageman JC, Boulton ML, Tenover FC, Downes FP, et al. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. *N Engl J Med* 2003 Apr 3;348(14):1342-1347.
170. Saravolatz LD, Pohlod DJ, Arking LM. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: a new source for nosocomial outbreaks. *Ann Intern Med* 1982 Sep;97(3):325-329.
171. Udo EE, Pearman JW, Grubb WB. Genetic analysis of community isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Western Australia. *J Hosp Infect* 1993 Oct;25(2):97-108.
172. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Four pediatric deaths from community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* - Minnesota and North Dakota, 1997-1999. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1999 Aug 20;48(32):707-710.
173. Kaplan SL, Hulten KG, Gonzalez BE, Hammerman WA, Lamberth L, Versalovic J, et al. Three-year surveillance of community-acquired *Staphylococcus aureus* infections in children. *Clin Infect Dis* 2005 Jun 15;40(12):1785-1791.

174. Murchan S, Kaufmann ME, Deplano A, de Ryck R, Struelens M, Zinn CE, et al. Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its application for tracing the spread of related strains. *J Clin Microbiol* 2003 Apr;41(4):1574-1585.
175. 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 Sep;33(9):2233-2239.
176. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Community-associated MRSA information for clinicians. Infection control topics. Available at: www.cdc.gov/nciod/dhqp/ar_mrsa_ca_clinicians.html, 2004.
177. Tiemersma EW, Bronzwaer SL, Lyytikäinen O, Degener JE, Schrijnemakers P, Bruinsma N, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe, 1999-2002. *Emerg Infect Dis* 2004 Sep;10(9):1627-1634.
178. Deurenberg RH, Stobberingh EE. The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol* 2008 Dec;8(6):747-763.
179. Kreiswirth B, Kornblum J, Arbeit RD, Eisner W, Maslow JN, McGeer A, et al. Evidence for a clonal origin of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Science* 1993 Jan 8;259(5092):227-230.
180. Gomes AR, Westh H, de Lencastre H. Origins and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonal lineages. *Antimicrob Agents Chemother* 2006 Oct;50(10):3237-3244.
181. Fitzgerald JR, Sturdevant DE, Mackie SM, Gill SR, Musser JM. Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus*: insights into the origin of methicillin-resistant strains and the toxic shock syndrome epidemic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 Jul 17;98(15):8821-8826.

182. Musser JM, Kapur V. Clonal analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from intercontinental sources: association of the mec gene with divergent phylogenetic lineages implies dissemination by horizontal transfer and recombination. *J Clin Microbiol* 1992 Aug;30(8):2058-2063.
183. Cercenado E, Ruiz de Gopegui E. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008 Nov;26 Suppl 13:19-24.
184. Tenover FC, McDougal LK, Goering RV, Killgore G, Projan SJ, Patel JB, et al. Characterization of a strain of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* widely disseminated in the United States. *J Clin Microbiol* 2006 Jan;44(1):108-118.
185. Cercenado E, Cuevas O, Marin M, Bouza E, Trincado P, Boquete T, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Madrid, Spain: transcontinental importation and polyclonal emergence of Panton-Valentine leukocidin-positive isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008 Jun;61(2):143-149.
186. Diep BA, Otto M. The role of virulence determinants in community-associated MRSA pathogenesis. *Trends Microbiol* 2008 Aug;16(8):361-369.
187. Chambers HF. Community-associated MRSA--resistance and virulence converge. *N Engl J Med* 2005 Apr 7;352(14):1485-1487.
188. Rossney AS, Shore AC, Morgan PM, Fitzgibbon MM, O'Connell B, Coleman DC. The emergence and importation of diverse genotypes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) harboring the Panton-Valentine leukocidin gene (pvl) reveal that pvl is a poor marker for community-acquired MRSA strains in Ireland. *J Clin Microbiol* 2007 Aug;45(8):2554-2563.
189. Zhang K, McClure JA, Elsayed S, Tan J, Conly JM. Coexistence of Panton-Valentine leukocidin-positive and -negative community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA400 sibling strains in a large Canadian health-care region. *J Infect Dis* 2008 Jan 15;197(2):195-204.

190. Diep BA, Carleton HA, Chang RF, Sensabaugh GF, Perdreau-Remington F. Roles of 34 virulence genes in the evolution of hospital- and community-associated strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Infect Dis 2006 Jun 1;193(11):1495-1503.
191. Pan ES, Diep BA, Charlebois ED, Auerswald C, Carleton HA, Sensabaugh GF, et al. Population dynamics of nasal strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*--and their relation to community-associated disease activity. J Infect Dis 2005 Sep 1;192(5):811-818.
192. Tang CT, Nguyen DT, Ngo TH, Nguyen TM, Le VT, To SD, et al. An outbreak of severe infections with community-acquired MRSA carrying the Panton-Valentine leukocidin following vaccination. PLoS One 2007 Sep 5;2(9):e822.
193. Diep BA, Stone GG, Basuino L, Graber CJ, Miller A, des Etages SA, et al. The arginine catabolic mobile element and staphylococcal chromosomal cassette *mec* linkage: convergence of virulence and resistance in the USA300 clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Infect Dis 2008 Jun 1;197(11):1523-1530.
194. Montgomery CP, Boyle-Vavra S, Daum RS. The arginine catabolic mobile element is not associated with enhanced virulence in experimental invasive disease caused by the community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 genetic background. Infect Immun 2009 Jul;77(7):2650-2656.
195. Wang R, Braughton KR, Kretschmer D, Bach TH, Queck SY, Li M, et al. Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. Nat Med 2007 Dec;13(12):1510-1514.
196. Bartlett AH, Foster TJ, Hayashida A, Park PW. Alpha-toxin facilitates the generation of CXC chemokine gradients and stimulates neutrophil homing in *Staphylococcus aureus* pneumonia. J Infect Dis 2008 Nov 15;198(10):1529-1535.
197. Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, Lina G, Nimmo GR, Heffernan H, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. Emerg Infect Dis 2003 Aug;9(8):978-984.

198. Van Loo I, Huijsdens X, Tiemersma E, de Neeling A, van de Sande-Bruinsma N, Beaujean D, et al. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of animal origin in humans. *Emerg Infect Dis* 2007 Dec;13(12):1834-1839.
199. Witte W, Strommenger B, Stanek C, Cuny C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in humans and animals, Central Europe. *Emerg Infect Dis* 2007 Feb;13(2):255-258.
200. Wulf MW, Sorum M, van Nes A, Skov R, Melchers WJ, Klaassen CH, et al. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among veterinarians: an international study. *Clin Microbiol Infect* 2008 Jan;14(1):29-34.
201. Van Belkum A, Melles DC, Peeters JK, van Leeuwen WB, van Duijkeren E, Huijsdens XW, et al. Methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* sequence type 398 in pigs and humans. *Emerg Infect Dis* 2008 Mar;14(3):479-483.
202. Yu F, Chen Z, Liu C, Zhang X, Lin X, Chi S, et al. Prevalence of *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes among isolates from hospitalised patients in China. *Clin Microbiol Infect* 2008 Apr;14(4):381-384.
203. Kowalski TJ, Berbari EF, Osmon DR. Epidemiology, treatment, and prevention of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Mayo Clin Proc* 2005 Sep;80(9):1201-7; quiz 1208.
204. Marcinak JF, Frank AL. Epidemiology and treatment of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2006 Feb;4(1):91-100.
205. Niniou I, Vourli S, Lebessi E, Foustoukou M, Vatopoulos A, Pasparakis DG, et al. Clinical and molecular epidemiology of community-acquired, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in children in central Greece. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008 Sep;27(9):831-837.
206. Elston JW, Barlow GD. Community-associated MRSA in the United Kingdom. *J Infect* 2009 Sep;59(3):149-155.

207. Paganini H, Della Latta MP, Muller Opet B, Ezcurra G, Uranga M, Aguirre C, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in children: multicenter trial. Arch Argent Pediatr 2008 Oct;106(5):397-403.
208. Nimmo GR, Coombs GW. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Australia. Int J Antimicrob Agents 2008 May;31(5):401-410.
209. Chen CJ, Huang YC, Chiu CH, Su LH, Lin TY. Clinical features and genotyping analysis of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in Taiwanese children. Pediatr Infect Dis J 2005 Jan;24(1):40-45.
210. Broseta A, Chaves F, Rojo P, Otero JR. Emergence of a single clone of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in southern Madrid children. Enferm Infecc Microbiol Clin 2006 Jan;24(1):31-35.
211. Barrios M, Alcolea A, Negreira S, Chaves F. Necrotizing pneumonia due to community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in a pediatric patient. Enferm Infecc Microbiol Clin 2008 Jun-Jul;26(6):398-399.
212. Frick MA, Moraga-Llop FA, Bartolome R, Larrosa N, Campins M, Roman Y, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in children. Enferm Infecc Microbiol Clin 2010 Dec;28(10):675-679.
213. Trallero EP, Arenzana JG, Castaneda AA, Grisolia LP. Unusual multiresistant *Staphylococcus aureus* in a newborn nursery. Am J Dis Child 1981 Aug;135(8):689-692.
214. Dominguez MA, de Lencastre H, Linares J, Tomasz A. Spread and maintenance of a dominant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone during an outbreak of MRSA disease in a Spanish hospital. J Clin Microbiol 1994 Sep;32(9):2081-2087.
215. Parras F, Rodriguez M, Bouza E, Munoz P, Cercenado E, Guerrero C, et al. Epidemic outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a general hospital. Preliminary report. Enferm Infecc Microbiol Clin 1991 Apr;9(4):200-207.

216. Trilla A, Marco F, Moreno A, Prat A, Soriano E, Jimenez de Anta MT. Clinical epidemiology of an outbreak of nosocomial infection caused by *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin and aminoglycosides: efficacy of control measures. Comité de Control de Infecciones. Med Clin (Barc) 1993 Feb 13;100(6):205-209.
217. Buckingham SC, McDougal LK, Cathey LD, Comeaux K, Craig AS, Fridkin SK, et al. Emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a Memphis, Tennessee Children's Hospital. Pediatr Infect Dis J 2004 Jul;23(7):619-624.
218. Canton R, Perez-Vazquez M, Oliver A, Sanchez Del Saz B, Gutierrez MO, Martinez-Ferrer M, et al. Evaluation of the Wider system, a new computer-assisted image-processing device for bacterial identification and susceptibility testing. J Clin Microbiol 2000 Apr;38(4):1339-1346.
219. Pottumarthy S, Fritsche TR, Jones RN. Evaluation of alternative disk diffusion methods for detecting *mecA*-mediated oxacillin resistance in an international collection of staphylococci: validation report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Diagn Microbiol Infect Dis 2005 Jan;51(1):57-62.
220. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Sixteenth informational supplement M100-S16. Wayne.PA; 2009.
221. Oliveira DC, de Lencastre H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2002 Jul;46(7):2155-2161.
222. Lina G, Piemont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, et al. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. Clin Infect Dis 1999 Nov;29(5):1128-1132.
223. Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2000 Mar;38(3):1008-1015.

224. Gilot P, Lina G, Cochard T, Poutrel B. Analysis of the genetic variability of genes encoding the RNA III-activating components Agr and TRAP in a population of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis. J Clin Microbiol 2002 Nov;40(11):4060-4067.
225. Ito T, Okuma K, Ma XX, Yuzawa H, Hiramatsu K. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. Drug Resist Updat 2003 Feb;6(1):41-52.
226. Tristan A, Bes M, Meugnier H, Lina G, Bozdogan B, Courvalin P, et al. Global distribution of Panton-Valentine leukocidin--positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, 2006. Emerg Infect Dis 2007 Apr;13(4):594-600.
227. Takano T, Higuchi W, Otsuka T, Baranovich T, Enany S, Saito K, et al. Novel characteristics of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains belonging to multilocus sequence type 59 in Taiwan. Antimicrob Agents Chemother 2008 Mar;52(3):837-845.
228. Dumitrescu O, Boisset S, Badiou C, Bes M, Benito Y, Reverdy ME, et al. Effect of antibiotics on *Staphylococcus aureus* producing Panton-Valentine leukocidin. Antimicrob Agents Chemother 2007 Apr;51(4):1515-1519.
229. Dumitrescu O, Badiou C, Bes M, Reverdy ME, Vandenesch F, Etienne J, et al. Effect of antibiotics, alone and in combination, on Panton-Valentine leukocidin production by a *Staphylococcus aureus* reference strain. Clin Microbiol Infect 2008 Apr;14(4):384-388.
230. Kaplan SL. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in children. Semin Pediatr Infect Dis 2006 Jul;17(3):113-119.
231. Casado-Verrier B, Gomez-Fernandez C, Pano-Pardo JR, Gomez-Gil R, Mingorance-Cruz J, Moreno-Alonso de Celada R, et al. Community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* skin and soft tissue infections in Madrid: prevalence study. Enferm Infecc Microbiol Clin 2012 Jun;30(6):300-306.

232. Ali H, Nash JQ, Kearns AM, Pichon B, Vasu V, Nixon Z, et al. Outbreak of a South West Pacific clone Panton-Valentine leucocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in a UK neonatal intensive care unit. *J Hosp Infect* 2012 Apr;80(4):293-298.
233. McAdams RM, Ellis MW, Trevino S, Rajnik M. Spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 in a neonatal intensive care unit. *Pediatr Int* 2008 Dec;50(6):810-815.
234. Giuffre M, Cipolla D, Bonura C, Geraci DM, Aleo A, Di Noto S, et al. Epidemic spread of ST1-MRSA-IVa in a neonatal intensive care unit, Italy. *BMC Pediatr* 2012 Jun 8;12:64-2431-12-64.
235. Chini V, Petinaki E, Foka A, Paratiras S, Dimitracopoulos G, Spiliopoulou I. Spread of *Staphylococcus aureus* clinical isolates carrying Panton-Valentine leukocidin genes during a 3-year period in Greece. *Clin Microbiol Infect* 2006 Jan;12(1):29-34.
236. Pinto AN, Seth R, Zhou F, Tallon J, Dempsey K, Tracy M, et al. Emergence and control of an outbreak of infections due to Panton-Valentine leukocidin positive, ST22 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a neonatal intensive care unit. *Clin Microbiol Infect* 2012 Jul 26.
237. Hageman JC, Uyeki TM, Francis JS, Jernigan DB, Wheeler JG, Bridges CB, et al. Severe community-acquired pneumonia due to *Staphylococcus aureus*, 2003-04 influenza season. *Emerg Infect Dis* 2006 Jun;12(6):894-899.
238. Kravitz GR, Dries DJ, Peterson ML, Schlievert PM. Purpura fulminans due to *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 2005 Apr 1;40(7):941-947.
239. Cribier B, Prevost G, Couppie P, Finck-Barbancon V, Grosshans E, Piemont Y. *Staphylococcus aureus* leukocidin: a new virulence factor in cutaneous infections? An epidemiological and experimental study. *Dermatology* 1992;185(3):175-180.
240. Hongo I, Baba T, Oishi K, Morimoto Y, Ito T, Hiramatsu K. Phenol-soluble modulins alpha 3 enhances the human neutrophil lysis mediated by Panton-Valentine leukocidin. *J Infect Dis* 2009 Sep 1;200(5):715-723.

- 241 Loffler B, Hussain M, Grundmeier M, Bruck M, Holzinger D, Varga G, et al. *Staphylococcus aureus* panton-valentine leukocidin is a very potent cytotoxic factor for human neutrophils. PLoS Pathog 2010 Jan 8;6(1):e1000715.
242. Lipinska U, Hermans K, Meulemans L, Dumitrescu O, Badiou C, Duchateau L, et al. Panton-Valentine leukocidin does play a role in the early stage of *Staphylococcus aureus* skin infections: a rabbit model. PLoS One 2011;6(8):e22864.
243. Kobayashi SD, Malachowa N, Whitney AR, Braughton KR, Gardner DJ, Long D, et al. Comparative analysis of USA300 virulence determinants in a rabbit model of skin and soft tissue infection. J Infect Dis 2011 Sep 15;204(6):937-941.
244. Blanco R, Tristan A, Ezpeleta G, Larsen AR, Bes M, Etienne J, et al. Molecular epidemiology of Panton-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus* in Spain: emergence of the USA300 clone in an autochthonous population. J Clin Microbiol 2011 Jan;49(1):433-436.
245. Marchese A, Gualco L, Maioli E, Debbia E. Molecular analysis and susceptibility patterns of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains circulating in the community in the Ligurian area, a northern region of Italy: emergence of USA300 and EMRSA-15 clones. Int J Antimicrob Agents 2009 Nov;34(5):424-428.
246. Witte W, Strommenger B, Cuny C, Heuck D, Nuebel U. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the Panton-Valentine leucocidin gene in Germany in 2005 and 2006. J Antimicrob Chemother 2007 Dec;60(6):1258-1263.
247. Ruppitsch W, Stoger A, Schmid D, Fretz R, Indra A, Allerberger F, et al. Occurrence of the USA300 community-acquired *Staphylococcus aureus* clone in Austria. Euro Surveill 2007 Oct 25;12(10):E071025.1.
248. Larsen A, Stegger M, Goering R, Sorum M, Skov R. Emergence and dissemination of the methicillin resistant *Staphylococcus aureus* USA300 clone in Denmark (2000-2005). Euro Surveill 2007 Feb 20;12(2).
249. Otter JA, French GL. Molecular epidemiology of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. Lancet Infect Dis 2010 Apr;10(4):227-239.

250. Reyes J, Rincon S, Diaz L, Panesso D, Contreras GA, Zurita J, et al. Dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 sequence type 8 lineage in Latin America. *Clin Infect Dis* 2009 Dec 15;49(12):1861-1867.
251. Jimenez JN, Ocampo AM, Vanegas JM, Rodriguez EA, Mediavilla JR, Chen L, et al. CC8 MRSA strains harboring SCCmec type IVc are predominant in Colombian hospitals. *PLoS One* 2012;7(6):e38576.
252. Mulvey MR, MacDougall L, Cholin B, Horsman G, Fidyk M, Woods S, et al. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Canada. *Emerg Infect Dis* 2005 Jun;11(6):844-850.
253. Wylie JL, Nowicki DL. Molecular epidemiology of community- and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Manitoba, Canada. *J Clin Microbiol* 2005 Jun;43(6):2830-2836.
254. Simor AE, Gilbert NL, Gravel D, Mulvey MR, Bryce E, Loeb M, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization or infection in Canada: National Surveillance and Changing Epidemiology, 1995-2007. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2010 Apr;31(4):348-356.
255. Kim J, Ferrato C, Golding GR, Mulvey MR, Simmonds KA, Svenson LW, et al. Changing epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Alberta, Canada: population-based surveillance, 2005-2008. *Epidemiol Infect* 2010 Sep 21:1-10.
256. 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 Apr 6;6(4):e17936.
257. Gubbay JB, Gosbell IB, Barbagiannakos T, Vickery AM, Mercer JL, Watson M. Clinical features, epidemiology, antimicrobial resistance, and exotoxin genes (including that of Panton-Valentine leukocidin) of gentamicin-susceptible methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (GS-MRSA) isolated at a paediatric teaching hospital in New South Wales, Australia. *Pathology* 2008 Jan;40(1):64-71.

258. Otter JA, French GL. The emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a London teaching hospital, 2000-2006. *Clin Microbiol Infect* 2008 Jul;14(7):670-676.
259. Robinson DA, Kearns AM, Holmes A, Morrison D, Grundmann H, Edwards G, et al. Re-emergence of early pandemic *Staphylococcus aureus* as a community-acquired methicillin-resistant clone. *Lancet* 2005 Apr 2-8;365(9466):1256-1258.
260. Tong SY, McDonald MI, Holt DC, Currie BJ. Global implications of the emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Indigenous populations. *Clin Infect Dis* 2008 Jun 15;46(12):1871-1878.
261. Benoit SR, Estivariz C, Mogdasy C, Pedreira W, Galiana A, Galiana A, et al. Community strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as potential cause of healthcare-associated infections, Uruguay, 2002-2004. *Emerg Infect Dis* 2008 Aug;14(8):1216-1223.
262. Enany S, Yaoita E, Yoshida Y, Enany M, Yamamoto T. Molecular characterization of Panton-Valentine leukocidin-positive community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in Egypt. *Microbiol Res* 2010 Feb 28;165(2):152-162.
263. Ito T, Iijima M, Fukushima T, Nonoyama M, Ishii M, Baranovich T, et al. Pediatric pneumonia death caused by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Japan. *Emerg Infect Dis* 2008 Aug;14(8):1312-1314.
264. Udo EE, O'Brien FG, Al-Sweih N, Noronha B, Matthew B, Grubb WB. Genetic lineages of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Kuwait hospitals. *J Clin Microbiol* 2008 Oct;46(10):3514-3516.
265. Johnson AP, Aucken HM, Cavendish S, Ganner M, Wale MC, Warner M, et al. Dominance of EMRSA-15 and -16 among MRSA causing nosocomial bacteraemia in the UK: analysis of isolates from the European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS). *J Antimicrob Chemother* 2001 Jul;48(1):143-144.

266. Ellington MJ, Hope R, Livermore DM, Kearns AM, Henderson K, Cookson BD, et al. Decline of EMRSA-16 amongst methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* causing bacteraemias in the UK between 2001 and 2007. *J Antimicrob Chemother* 2010 Mar;65(3):446-448.
267. Campanile F, Bongiorno D, Borbone S, Stefani S. Hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (HA-MRSA) in Italy. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2009 Jun 24;8:22.
268. Ghebremedhin B, Konig W, Konig B. Heterogeneity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains at a German university hospital during a 1-year period. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005 Jun;24(6):388-398.
269. Witte W, Enright M, Schmitz FJ, Cuny C, Braulke C, Heuck D. Characteristics of a new epidemic MRSA in Germany ancestral to United Kingdom EMRSA 15. *Int J Med Microbiol* 2001 Mar;290(8):677-682.
270. Gosbell IB, Barbagiannakos T, Neville SA, Mercer JL, Vickery AM, O'Brien FG, et al. Non-multiresistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia in Sydney, Australia: emergence of EMRSA-15, Oceania, Queensland and Western Australian MRSA strains. *Pathology* 2006 Jun;38(3):239-244.
271. Kerttula AM, Lyytikainen O, Karden-Lilja M, Ibrahim S, Salmenlinna S, Virolainen A, et al. Nationwide trends in molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Finland, 1997-2004. *BMC Infect Dis* 2007 Aug 14;7:94.
272. Krziwanek K, Luger C, Sammer B, Stumvoll S, Stammler M, Sagel U, et al. MRSA in Austria--an overview. *Clin Microbiol Infect* 2008 Mar;14(3):250-259.
273. Udo EE, Al-Sweih N, Noronha B. Characterisation of non-multiresistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (including EMRSA-15) in Kuwait Hospitals. *Clin Microbiol Infect* 2006 Mar;12(3):262-269.

274. D'Souza N, Rodrigues C, Mehta A. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with emergence of epidemic clones of sequence type (ST) 22 and ST 772 in Mumbai, India. *J Clin Microbiol* 2010 May;48(5):1806-1811.
275. Huijsdens XW, van Dijke BJ, Spalburg E, van Santen-Verheuvél MG, Heck ME, Pluister GN, et al. Community-acquired MRSA and pig-farming. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2006 Nov 10;5:26.
276. Lewis HC, Molbak K, Reese C, Aarestrup FM, Selchau M, Sorum M, et al. Pigs as source of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 infections in humans, Denmark. *Emerg Infect Dis* 2008 Sep;14(9):1383-1389.
277. Aspiroz C, Lozano C, Vindel A, Lasarte JJ, Zarazaga M, Torres C. Skin lesion caused by ST398 and ST1 MRSA, Spain. *Emerg Infect Dis* 2010 Jan;16(1):157-159.
278. Lozano C, Aspiroz C, Ezpeleta AI, Gomez-Sanz E, Zarazaga M, Torres C. Empyema caused by MRSA ST398 with atypical resistance profile, Spain. *Emerg Infect Dis* 2011 Jan;17(1):138-140.
279. Perez-Roth E, Lorenzo-Diaz F, Batista N, Moreno A, Mendez-Alvarez S. Tracking methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones during a 5-year period (1998 to 2002) in a Spanish hospital. *J Clin Microbiol* 2004 Oct;42(10):4649-4656.
280. Argudin MA, Mendoza MC, Mendez FJ, Martin MC, Guerra B, Rodicio MR. Clonal complexes and diversity of exotoxin gene profiles in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates from patients in a Spanish hospital. *J Clin Microbiol* 2009 Jul;47(7):2097-2105.
281. Perez-Vazquez M, Vindel A, Marcos C, Oteo J, Cuevas O, Trincado P, et al. Spread of invasive Spanish *Staphylococcus aureus* spa-type t067 associated with a high prevalence of the aminoglycoside-modifying enzyme gene *ant(4')-Ia* and the efflux pump genes *msrA/msrB*. *J Antimicrob Chemother* 2009 Jan;63(1):21-31.
282. Vindel A, Trincado P, Gomez E, Cabrera R, Boquete T, Sola C, et al. Prevalence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Spanish hospitals between 1996 and 2002. *J Clin Microbiol* 2006 Jan;44(1):266-270.

283. Manzur A, Dominguez MA, Ruiz de Gopegui E, Mariscal D, Gavalda L, Segura F, et al. Natural history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonisation among residents in community long term care facilities in Spain. *J Hosp Infect* 2010 Nov;76(3):215-219.
284. Rivero-Perez B, Alcoba-Florez J, Mendez-Alvarez S. Genetic diversity of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Tenerife Island, Spain. *Infect Genet Evol* 2012 Apr;12(3):586-590.
285. Otter JA, French GL. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains as a cause of healthcare-associated infection. *J Hosp Infect* 2011 Nov;79(3):189-193.
286. Healy CM, Hulten KG, Palazzi DL, Campbell JR, Baker CJ. Emergence of new strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a neonatal intensive care unit. *Clin Infect Dis* 2004 Nov 15;39(10):1460-1466.
287. Bratu S, Eramo A, Kopec R, Coughlin E, Ghitan M, Yost R, et al. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospital nursery and maternity units. *Emerg Infect Dis* 2005 Jun;11(6):808-813.
288. Gould IM, Girvan EK, Browning RA, MacKenzie FM, Edwards GF. Report of a hospital neonatal unit outbreak of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Epidemiol Infect* 2009 Sep;137(9):1242-1248.
289. David MD, Kearns AM, Gossain S, Ganner M, Holmes A. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: nosocomial transmission in a neonatal unit. *J Hosp Infect* 2006 Nov;64(3):244-250.
290. Sax H, Posfay-Barbe K, Harbarth S, Francois P, Touveneau S, Pessoa-Silva CL, et al. Control of a cluster of community-associated, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in neonatology. *J Hosp Infect* 2006 May;63(1):93-100.
291. Seybold U, Kourbatova EV, Johnson JG, Halvosa SJ, Wang YF, King MD, et al. Emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

USA300 genotype as a major cause of health care-associated blood stream infections. *Clin Infect Dis* 2006 Mar 1;42(5):647-656.

292. Gonzalez BE, Rueda AM, Shelburne SA, 3rd, Musher DM, Hamill RJ, Hulten KG. Community-associated strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as the cause of healthcare-associated infection. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2006 Oct;27(10):1051-1056.

293. Popovich KJ, Weinstein RA, Hota B. Are community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains replacing traditional nosocomial MRSA strains? *Clin Infect Dis* 2008 Mar 15;46(6):787-794.

294. David MZ, Daum RS. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clin Microbiol Rev* 2010 Jul;23(3):616-687.

295. Goering RV, Shawar RM, Scangarella NE, O'Hara FP, Amrine-Madsen H, West JM, et al. Molecular epidemiology of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates from global clinical trials. *J Clin Microbiol* 2008 Sep;46(9):2842-2847.

296. Conceicao T, Aires-de-Sousa M, Pona N, Brito MJ, Barradas C, Coelho R, et al. High prevalence of ST121 in community-associated methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* lineages responsible for skin and soft tissue infections in Portuguese children. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011 Feb;30(2):293-297.

297. Cupane L, Pugacova N, Berzina D, Cauce V, Gardovska D, Miklasevics E. Patients with Panton-Valentine leukocidin positive *Staphylococcus aureus* infections run an increased risk of longer hospitalisation. *Int J Mol Epidemiol Genet* 2012;3(1):48-55.

298. Monecke S, Slickers P, Ellington MJ, Kearns AM, Ehricht R. High diversity of Panton-Valentine leukocidin-positive, methicillin-susceptible isolates of *Staphylococcus aureus* and implications for the evolution of community-associated methicillin-resistant *S. aureus*. *Clin Microbiol Infect* 2007 Dec;13(12):1157-1164.

299. Schefold JC, Esposito F, Storm C, Heuck D, Kruger A, Jorres A, et al. Therapy-refractory Panton Valentine Leukocidin-positive community-acquired methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* sepsis with progressive metastatic soft tissue infection: a case report. J Med Case Rep 2007 Dec 3;1:165.
300. Amorim ML, Faria NA, Oliveira DC, Vasconcelos C, Cabeda JC, Mendes AC, et al. Changes in the clonal nature and antibiotic resistance profiles of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with spread of the EMRSA-15 clone in a tertiary care Portuguese hospital. J Clin Microbiol 2007 Sep;45(9):2881-2888.
301. Chheng K, Tarquinio S, Wuthiekanun V, Sin L, Thaipadungpanit J, Amornchai P, et al. Emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with pediatric infection in Cambodia. PLoS One 2009 Aug 13;4(8):e6630.
302. Baranovich T, Zaraket H, Shabana II, Nevzorova V, Turcutyucov V, Suzuki H. Molecular characterization and susceptibility of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates from hospitals and the community in Vladivostok, Russia. Clin Microbiol Infect 2010 Jun;16(6):575-582.
303. 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 Jul;53(2):237-251.
304. Monecke S, Ehricht R, Slickers P, Tan HL, Coombs G. The molecular epidemiology and evolution of the Panton-Valentine leukocidin-positive, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300 in Western Australia. Clin Microbiol Infect 2009 Aug;15(8):770-776.
305. Arias CA, Rincon S, Chowdhury S, Martinez E, Coronell W, Reyes J, et al. MRSA USA300 clone and VREF--a U.S.-Colombian connection? N Engl J Med 2008 Nov 13;359(20):2177-2179.
306. Dauwalder O, Lina G, Durand G, Bes M, Meugnier H, Jarlier V, et al. Epidemiology of invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones collected in France in 2006 and 2007. J Clin Microbiol 2008 Oct;46(10):3454-3458.

307. Jarraud S, Mougel C, Thioulouse J, Lina G, Meugnier H, Forey F, et al. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (alleles), and human disease. *Infect Immun* 2002 Feb;70(2):631-641.
308. Nienaber JJ, Sharma Kuinkel BK, Clarke-Pearson M, Lamlertthon S, Park L, Rude TH, et al. Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* endocarditis isolates are associated with clonal complex 30 genotype and a distinct repertoire of enterotoxins and adhesins. *J Infect Dis* 2011 Sep 1;204(5):704-713.
309. Fowler VG, Jr, Nelson CL, McIntyre LM, Kreiswirth BN, Monk A, Archer GL, et al. Potential associations between hematogenous complications and bacterial genotype in *Staphylococcus aureus* infection. *J Infect Dis* 2007 Sep 1;196(5):738-747.
310. Xiong YQ, Fowler VG, Yeaman MR, Perdreau-Remington F, Kreiswirth BN, Bayer AS. Phenotypic and genotypic characteristics of persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia in vitro and in an experimental endocarditis model. *J Infect Dis* 2009 Jan 15;199(2):201-208.

