



TESIS DOCTORAL

Epidemiología Molecular de los aislamientos de  
*Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina  
en el seno de un Programa de Vigilancia Activa.

Miriam Hernández Porto

LA LAGUNA · 2014

DIRECTOR

Dra. María Lecuona Fernández

CODIRECTORES

Dra. María Ángeles Arias Rodríguez

Dra. María Beatriz Castro Hernández



DOÑA MARÍA LECUONA FERNÁNDEZ,  
DOCTORA EN MEDICINA POR LA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA  
Y JEFA DEL SERVICIO DE MICROBIOLOGÍA Y MEDICINA PREVENTIVA DEL  
HOSPITAL UNIVERSITARIO DE CANARIAS

CERTIFICA QUE:

Dña. Miriam Hernández Porto ha realizado bajo mi  
dirección y supervisión el Trabajo de Investigación titulado  
*“Epidemiología Molecular de los aislamientos de Staphylococcus aureus resistentes  
a meticilina en el seno de un Programa de Vigilancia Activa”*.

Dicho trabajo reúne las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, se expide el presente certificado.

Firmo en La Laguna a 24 de Octubre de 2014.

DOÑA ÁNGELES ARIAS RODRÍGUEZ,  
CATEDRÁTICA DE MEDICINA PREVENTIVA Y SALUD PÚBLICA  
DE LA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

CERTIFICA QUE:

Dña. Miriam Hernández Porto ha realizado bajo mi  
dirección y supervisión el Trabajo de Investigación titulado  
*“Epidemiología Molecular de los aislamientos de Staphylococcus aureus resistentes  
a meticilina en el seno de un Programa de Vigilancia Activa”*.

Dicho trabajo reúne las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, se expide el presente certificado.

Firmo en La Laguna a 24 de Octubre de 2014.

DOÑA MARÍA BEATRIZ CASTRO HERNÁNDEZ,  
DOCTORA EN FARMACIA POR LA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA  
Y FACULTATIVO ADJUNTO DEL SERVICIO DE MICROBIOLOGÍA Y MEDICINA  
PREVENTIVA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE CANARIAS

CERTIFICA QUE:

Dña. Miriam Hernández Porto ha realizado bajo mi  
dirección y supervisión el Trabajo de Investigación titulado  
*“Epidemiología Molecular de los aislamientos de Staphylococcus aureus resistentes  
a meticilina en el seno de un Programa de Vigilancia Activa”*.

Dicho trabajo reúne las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, se expide el presente certificado.

Firmo en La Laguna a 24 de Octubre de 2014.

*“Hay una fuerza motriz más  
poderosa que el vapor, la  
electricidad y la energía  
atómica: la voluntad”.*

Albert Einstein

A mis abuelos, por ser todos  
ellos ejemplo de esfuerzo y  
trabajo, pero sobre todo porque  
nunca olvidaré todo el cariño  
que recibí a su lado.

## Agradecimientos

Son muchas las personas con las que he compartido parte de mi vida y han enriquecido mi mundo, a las que ya no estáis deciros que os quiero y a las que continuáis aquí que no os vayáis. Hoy solo tengo palabras de agradecimiento para todas ellas.

A la Dra. María Lecuona, a la Dra. Ángeles Arias, Dra. Beatriz Castro, por su entusiasmo por la investigación, por compartir de forma generosa sus conocimientos, por la oportunidad y la confianza depositada en mí, de otra manera esto no habría sido posible.

Al Dr. Armando Aguirre-Jaime, por su ayuda e interés puesto en este trabajo desde que le conocí. Su dedicación y satisfacción por el trabajo bien hecho le caracterizan.

A mis compañeras del Servicio de Microbiología y Medicina Preventiva del Hospital Universitario de Canarias, por transmitirme su implicación y preocupación por el paciente, por su amistad y cariño.

A las profesoras del Área de Medicina Preventiva de la Universidad de la Laguna por vuestro apoyo e interés en mi trabajo.

A la Fundación Canaria Rafael Clavijo, para la investigación Biomédica, en especial al Dr. Eduardo Salido, por su valiosa contribución en la realización de esta tesis.

Y a la parte primordial de mi vida: Nacho y mi familia, porque me alientan a seguir siempre adelante, por su apoyo incondicional.



# Índice

I. Abreviaturas	14
II. Revisión y antecedentes	17
1. <i>Staphylococcus aureus</i>	18
2. Factores de virulencia de <i>Staphylococcus aureus</i>	19
3. Mecanismos de Resistencia antibiótica de <i>Staphylococcus aureus</i>	21
4. Evolución temporal de la resistencia de <i>Staphylococcus aureus</i>	29
5. Epidemiología de SARM	30
5.1. Cadena Epidemiológica	30
5.1.1. Reservorio	30
5.1.2. Mecanismo de transmisión	31
5.1.3. Huésped Susceptible	32
5.2. Factores de riesgo para la infección por SARM	32
6. Importancia de SARM	33
7. Prevención y control de SARM	34
7.1. Metodología de la vigilancia de SARM	34
7.2. Medidas para el control de la infección	36
7.2.1. Lavado de manos	36
7.2.2. Aislamiento de contacto	36
7.2.3. Precauciones de contacto	36
7.2.4. Estrategias de descolonización	37
7.2.5. Limpieza y desinfección del equipamiento y entorno del paciente	38
8. Evolución clonal de SARM e importancia del Cassette Cromosómico Estafilocócico	38
8.1. Evolución del Complejo Clonal 8	39

---

8.2. Evolución del Complejo Clonal 5 .....	40
8.3. Evolución del Complejo Clonal 22, 30 y 45 .....	41
8.4. Cassette SCCmec .....	42
9. Clasificación del SARM .....	44
9.1. SARM asociado a cuidados sanitarios (HA-MRSA) .....	45
9.2. SARM asociado a la comunidad (CA-MRSA) .....	45
9.3. SARM asociado al ganado (LA-MRSA) .....	46
9.4. SARM esporádico .....	47
10. Epidemiología molecular de SARM a nivel mundial .....	47
10.1. Epidemiología molecular en el Sudeste del Pacífico (Australia, Nueva Zelanda y Polinesia) .....	47
10.2. Epidemiología molecular en África Subsahariana .....	48
10.3. Epidemiología molecular en América Latina .....	48
10.4. Epidemiología molecular en Oriente Próximo .....	49
10.5. Epidemiología molecular en Asia .....	49
10.6. Epidemiología molecular en EE.UU. ....	50
10.7. Epidemiología molecular en Canadá .....	51
10.8. Epidemiología molecular en Europa .....	51
10.9. Epidemiología molecular en España .....	52
10.10. Epidemiología molecular en el HUC .....	53
<b>III. Justificación y Objetivos</b> .....	<b>55</b>
<b>IV. Material y Método</b> .....	<b>59</b>
1. Contexto del estudio .....	60
1.1. Centro Hospitalario .....	60
1.2. Programa de Vigilancia Activa del HUC .....	60

1.3. Cepario del Servicio de Microbiología y Medicina Preventiva .....	61
1.4. Fuentes de datos .....	62
2. Diseño del estudio .....	63
2.1. Pacientes, periodo de estudio, episodios de SARM y aislamientos SARM ..	63
2.2. Descripción de la recogida de datos .....	64
2.2.1. Estudio descriptivo .....	64
2.2.2. Estudio de casos y controles .....	64
2.3. Cálculo de Indicadores .....	65
2.4. Metodología para la identificación clonal de SARM .....	67
2.4.1. Recuperación de cepario .....	67
2.4.2. Técnicas moleculares de tipificación .....	67
2.4.2.1. Electroforesis en corriente alterna o electroforesis de campo pulsante (PFGE) .....	67
2.4.2.2. Análisis del ADN por secuenciación: Multilocus Sequence Typing (MLST) .....	71
2.4.2.3. Tipo de Cassette Cromosómico Estafilocócico <i>mec</i> (SCC <i>mec</i> typing) ..	73
3. Análisis estadístico .....	77
<b>V. Resultados</b> .....	<b>79</b>
1. Descripción de episodios SARM diagnosticados en el HUC durante el perio- do 2009–2010 .....	80
1.1. Distribución de los episodios de SARM según procedencia diagnóstica ...	81
1.1.1. Episodios con aislamientos SARM en fosa nasal .....	82
1.1.2. Episodios con aislamientos SARM en muestras clínicas .....	82
1.2. Distribución de los episodios SARM por Servicios .....	83
1.3. Relevancia clínica de los aislamientos SARM en muestra clínica	84
1.4. Resolución de los episodios SARM .....	86
2. Descripción de la Epidemiología Clonal de los aislamientos SARM ....	87

2.1. Distribución clonal de los aislamientos SARM .....	87
2.2. Emergencia de nuevos clones SARM en el Hospital Universitario de Canarias	89
2.3. Distribución clonal de SARM por años de estudio .....	91
2.4. Distribución clonal de SARM por tipo de muestra .....	92
2.5. Relación entre clon y posterior desarrollo de infección .....	94
3. Estudio de la resistencia antibiótica en los aislamientos SARM .....	95
3.1. Resistencia de los aislamientos SARM en fosa nasal a mupirocina ..	95
3.2. Resistencias de los aislamientos SARM obtenidos en fosa nasal y mues- tra clínica a otros antibióticos .....	97
3.3. Asociación entre antibiotipos y clones SARM .....	98
4. Estudio de la relación clonal entre los aislamientos SARM en fosa nasal y muestra clínica .....	101
5. Análisis de los factores de riesgo entre portadores nasales para el poste- rior desarrollo de infección/colonización por SARM en localización clínica ...	103
<b>VI. Discusión</b> .....	<b>107</b>
1. Descripción de episodios SARM diagnosticados en el HUC du- rante el periodo 2009–2010 .....	108
1.1. Distribución de los episodios SARM según su procedencia diagnóstica ....	108
1.1.1. Episodios con aislamiento SARM en fosa nasal .....	109
1.2. Distribución de los episodios de SARM por Servicios . . . .	110
1.3. Relevancia clínica de los aislamientos SARM en muestra clínica . . . .	110
1.4. Resolución de los episodios SARM .....	111
2. Descripción de la Epidemiología Clonal de los aislamientos SARM . . . .	112
3. Estudio de la resistencia antibiótica en los aislamientos SARM .....	117
3.1. Resistencia de los aislamientos SARM en fosa nasal a mupirocina .....	117
3.2. Asociación entre antibiotipo y clones SARM .....	120
4. Estudio de la relación clonal entre los aislamientos SARM en fosa na- sal y muestra clínica .....	122

5. Análisis de los factores de riesgo entre portadores nasales para el posterior desarrollo de infección/colonización por SARM en localización clínica ..	123
VII. Conclusiones	126
VIII. Bibliografía	129
IX. Anexos	139

---

# I. Abreviaturas

---

<b>ADN:</b>	Ácido desoxirribonucleico.
<b>ARN:</b>	Ácido ribonucleico.
<b>AAC:</b>	Aminoglucósido acetil <i>transferasas</i> (AAC)
<b>ANT:</b>	Aminoglucósido nucleotidil <i>transferasas</i> (ANT)
<b>APH:</b>	Aminoglucósido O–fosfotransferasas (APH)
<b>BORSA:</b>	Cepas borderline <i>S. aureus</i> .
<b>CA–MRSA:</b>	SARM asociado a la comunidad.
<b>CANWARD:</b>	Canadian Hospital Ward Antibiotic Resistance Surveillance.
<b>CC:</b>	Complejo clonal.
<b>CDC:</b>	Center for Disease Control and Prevention.
<b>CLSI:</b>	Clinical and Laboratory Standards Institute.
<b>CMI:</b>	Concentración Mínima Inhibitoria.
<b>COT.:</b>	Cirugía ortopédica y traumatología.
<b>EARSS:</b>	European Antimicrobial Resistance Surveillance System.
<b>EPINE:</b>	Estudio de prevalencia de las infecciones nosocomiales en España.
<b>GISA:</b>	Cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> con resistencia intermedia a glucopéptidos.
<b>HA–MRSA:</b>	SARM asociado a cuidados sanitarios.
<b>HLR:</b>	Resistencia de alto nivel.
<b>HUC:</b>	Hospital Universitario de Canarias.
<b>ILQ:</b>	Infección de localización quirúrgica.
<b>LA–MRSA:</b>	SARM asociado al ganado.
<b>LLR:</b>	Resistencia de bajo nivel.
<b>MLSB:</b>	Macrólido–Lincosamida–Estreptogramina B.
<b>MLST:</b>	Multilocus Sequence Typing.

---

<b>NHSN:</b>	National Healthcare Safety Network.
<b>ORL:</b>	Otorrinolaringología.
<b>PBPs:</b>	Proteínas fijadoras de penicilina.
<b>PCR:</b>	Reacción en cadena de la polimerasa.
<b>PFGE:</b>	Electroforesis en campo pulsante.
<b>PVL:</b>	Panton Valentine Leucocidina.
<b>QS:</b>	Quorum Sensing.
<b>QRDR:</b>	(Quinolone Resistance–Determining Region).
<b>SARM:</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina.
<b>SASM:</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> sensible a la meticilina.
<b>SCCmec:</b>	Cassette cromosómico mec estafilocócico.
<b>SCN:</b>	Staphylococcus coagulasa negativo.
<b>SXT:</b>	Trimetropim–sulfametoxazol.
<b>TSST-1:</b>	Toxina 1 del síndrome del shock tóxico.
<b>UCI:</b>	Unidad de cuidados intensivos.
<b>UCIC:</b>	Unidad de cuidados intensivos de coronaria.
<b>UCIN:</b>	Unidad de cuidados intensivos neonatales.
<b>UCIP:</b>	Unidad de cuidados intensivos pediátricos.
<b>UCSI:</b>	Unidad de cuidados semi intensivos.
<b>URPA:</b>	Unidad de reanimación post anestesia.
<b>VISA:</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> con resistencia intermedia a la Vancomicina.
<b>VRSA:</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la Vancomicina.
<b>VinCat:</b>	Programa de Vigilancia de las Infecciones Nosocomiales en los Hospitales de Cataluña



## II. Revisión y antecedentes

## 1. *Staphylococcus aureus*

Los miembros del género *Staphylococcus* son cocos gram positivos (0,5 a 1,5  $\mu\text{m}$  de diámetro) que aparecen de manera aislada o bien formando parejas, tétradas, cadenas cortas y grupos a modo de racimos de uvas. Son bacterias inmóviles, generalmente catalasa positivos, no formadoras de esporas que a menudo no poseen cápsula o esta es incompleta y salvo raras excepciones son anaerobias facultativas<sup>[1]</sup>.

El género *Staphylococcus* está compuesto por 36 especies, de las cuales 16 se pueden aislar en el ser humano<sup>[1]</sup>. Son bacterias ubicuas, que colonizan a un amplio rango de mamíferos, incluyendo animales de compañía (perros, gatos y caballos) y animales de ganado (bóvidos, cerdos y cabras), también colonizan a aves (pollos y pavos). Estos animales pueden actuar como importantes reservorios para la colonización en humanos<sup>[2]</sup>.

Solo unas pocas especies de estafilococos son patógenas en ausencia de circunstancias predisponentes por parte del huésped, como inmunosupresión o presencia de un cuerpo extraño. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) es la especie más importante de todo el género en patología infecciosa, ya que puede producir una amplia variedad de enfermedades: desde infecciones cutáneas relativamente benignas (foliculitis y forunculosis) hasta enfermedades graves y con un gran riesgo para el paciente (osteomielitis, neumonía y endocarditis)<sup>[3]</sup>.

La principal característica que diferencia a *S. aureus* de las demás especies de estafilococos es la producción del enzima coagulasa, que permite a la bacteria coagular el plasma. Las demás especies que no producen este enzima son *Staphylococcus* coagulasa negativos (SCN) y de forma genérica se agrupan con esta denominación a todas las especies de *Staphylococcus* diferentes de *S. aureus* (coagulasa positivo).

Por otro lado, *S. aureus* presenta una capacidad única para desarrollar resistencias a casi cualquier nuevo antibiótico y produce enfermedades muy heterogéneas, lo que refleja la extraordinaria capacidad que presenta este microorganismo para adaptarse y sobrevivir en una gran diversidad de entornos. Este microorganismo contiene numerosos fragmentos móviles de ADN exógeno, como secuencias de inserción, transposones, bacteriófagos e islas de patogenicidad que contienen determinantes específicos responsables de la enfermedad y de la resistencia antibiótica<sup>[4]</sup>. Así pues *S. aureus* ha constituido siempre un obstáculo para la terapia an-

timicrobiana y ha desarrollado resistencia frente a todos los agentes terapéuticos que han sido introducidos en los últimos 50 años.

Finalmente, se trata de un microorganismo tanto colonizador como patógeno. La colonización proporciona un reservorio desde el cual *S. aureus* puede llegar a producir una infección. Las fosas nasales son el principal nicho ecológico, de forma que aproximadamente el 20% de los individuos están persistentemente colonizados y el 60% de forma intermitente<sup>[5]</sup>. Asimismo otras localizaciones pueden estar colonizadas, incluyendo axilas y periné. El hecho de ser portador nasal eleva el riesgo de infección en ciertas poblaciones, como en el caso de pacientes con forunculosis recurrentes y pacientes sometidos a procedimientos médicos, como hemodiálisis o diálisis peritoneal prolongada o cirugía<sup>[6-7]</sup>, ya que el estado de portador nasal de *S. aureus* constituye una forma de persistencia y diseminación de estafilococos multirresistentes<sup>[5]</sup>.

## 2. Factores de virulencia de *S. aureus*

El estudio genético y molecular de *S. aureus* ha revelado un gran número de adhesinas de superficie que intervienen en la adherencia y colonización de los tejidos diana, así como enzimas y toxinas secretadas responsables de la invasión y de la producción de enfermedades como el síndrome de la piel escaldada del lactante tras la colonización en piel y mucosas por una cepa toxigénica de *S. aureus*. Así pues esta bacteria presenta gran cantidad de factores virulencia que se pueden clasificar en tres categorías<sup>[1]</sup>:

- Los involucrados en la adherencia a la célula huésped: proteínas de unión al fibrinógeno, fibronectina, colágeno y coagulasa.
- Los involucrados en la evasión de las defensas del huésped: superantígenos, enterotoxinas estafilocócicas y TSST-1 (Toxina 1 del síndrome del shock tóxico), Leucocidina de Pantón-Valentine (PVL), Proteína A, lipasas y polisacáridos capsulares.
- Los involucrados en la invasión de la célula huésped y penetración de los tejidos: hemolisinas  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ .

Analizando los factores de virulencia más importantes encontramos<sup>[1]</sup>:

- **Coagulasa**, se trata de un enzima que se puede encontrar:
  1. En forma unida al peptidoglucano de la bacteria, uniéndose a su vez a la protrombina, transformando al fibrinógeno en fibrina insoluble, provocando así la aglomeración de los estafilococos.
  2. En forma libre, que reacciona con el factor reactivo de la coagulasa presente en el plasma dando lugar a un análogo a la trombina que reacciona con el fibrinógeno formando el coágulo de fibrina. La importancia de la fibrina es que este enzima forma una capa alrededor del absceso estafilocócico, protegiendo a la bacteria de la fagocitosis.
- **Superantígenos**, son proteínas que no activan el sistema inmunitario a través del contacto normal entre células presentadoras de antígeno y linfocitos. Si no que produce una liberación masiva de citoquinas que induce a una respuesta inmunitaria excesiva con aparición de shock endotóxico. Dentro de este grupo se encuentran: las enterotoxinas estafilocócicas y la TSST-1.
- **Leucocidina de Panton-Valentine**, se trata de una toxina citotóxica para monocitos, macrófagos y leucocitos polimorfonucleares del humano. Provoca un aumento en la permeabilidad y eventualmente produce la lisis de la célula. Fue descrita en 1932 por Panton y Valentine y es codificada por dos genes *luKS* y *luKF*. Su expresión es regulada por el sistema *agr* y es codificada por el fago móvil  $\Phi$ SLT, que puede transmitir la PVL a otras cepas. La lisis de los leucocitos produce la liberación de mediadores de la inflamación, con una consecuente respuesta inflamatoria grave. Su expresión se asocia con infecciones de piel y tejidos blandos y con neumonía necrotizante.
- **Hemolisina  $\alpha$** , se considera el prototipo de las citotoxinas formadoras de poros, es citolítica para un gran número de células entre las que se encuentran monocitos, linfocitos, eritrocitos, plaquetas y células endoteliales. Una vez es secretada por *S. aureus* se integra en la membrana de las células diana, formando heptámeros cilíndricos que son capaces de lisar las células eucariotas. Los poros que produce permiten la entrada y salida de iones y moléculas pequeñas que eventualmente producen la muerte de las células nucleadas y lisis osmótica de los eritrocitos. La formación de poros también produce eventos secundarios que promueven el desarrollo de secuelas patológicas. Estos eventos incluyen la activación de endonucleasas, exocitosis de plaquetas y liberación de citoquinas y mediadores inflamatorios. La producción de tromboxano y prostaciclina activa los mecanismos de vaso-

constricción. Además, al romper la integridad celular aumenta la permeabilidad vascular. El efecto final en el hospedador es el edema pulmonar o síndrome de dificultad respiratoria.

- **Hemolisina  $\gamma$** , afecta a neutrófilos, macrófagos y a una gran variedad de eritrocitos de mamíferos. Se desconoce si induce la liberación de mediadores de la inflamación.
- **Hemolisina  $\delta$** , es capaz de causar daño en la membrana de un gran número de células de mamíferos. El 97% de las cepas de *S. aureus* produce este tipo de toxina y es capaz de hidrolizar eritrocitos y otras células, así como estructuras subcelulares rodeadas por membrana como esferoplastos y protoplastos. Además presenta actividad dermonecrótica<sup>[1], [8]</sup>.

Para una adecuada supervivencia e invasión del huésped, todo este sistema complejo de factores de virulencia tiene que estar coordinado por un sistema de comunicación célula-célula que se conoce con el nombre de quorum sensing (QS). El QS está mediado por pequeñas proteínas producidas por las bacterias que se denominan autoinductores y que dependiendo de factores ambientales, pueden activar un gran número de genes incluyendo factores de virulencia. El sistema de QS más estudiado en *Staphylococcus aureus* se denomina regulador de genes accesorios o *agr*. El locus *agr* fue el primer sistema regulador de dos componentes con repercusión sobre los genes de virulencia descritos en *S. aureus*, funciona como un control sensor del quorum que reacciona a la densidad bacteriana, permitiendo la expresión diferencial de adhesinas de superficie durante la fase de crecimiento exponencial (densidad celular baja) y pasando a la expresión de exoproteínas durante las fases de crecimiento postexponencial y estacionaria (densidad celular alta). Así pues, las bacterias en fase de crecimiento producen principalmente adhesinas con el fin de conseguir una colonización tisular mientras que los microorganismos ya instalados que forman poblaciones densas pasan a producir enzimas y toxinas hidrolíticas con el objetivo de alimentarse y de evitar las defensas del huésped<sup>[1]</sup>.

### 3. Mecanismos de Resistencia antibiótica de *S. aureus*

*S. aureus* presenta una gran habilidad para adaptarse rápidamente a la presión antibiótica a través de la adquisición de diferentes mecanismos de resistencia, que se describen a continuación:

### 3.1. $\beta$ -lactámicos

#### CARACTERÍSTICAS DEL ANTIMICROBIANO

Los  $\beta$ -lactámicos son antibióticos bactericidas tiempo dependiente que intervienen durante la fase de crecimiento de la bacteria. Actúan como un sustrato suicida inhibiendo de manera irreversible las enzimas conocidas como proteínas de unión de la penicilina (PBP), ya que presentan una estructura análoga al precursor de peptidoglucano D-Ala-D-Ala produciendo una acetilación del sitio activo de las PBPs. Existen cuatro tipos de PBPs naturales: PBP1, PBP2, PBP3 y PBP4, siendo las tres primeras esenciales para el crecimiento y supervivencia de la bacteria, existiendo una relación directa entre la afinidad del  $\beta$ -lactámico por las tres primeras PBPs con la inhibición de la síntesis del peptidoglucano, el crecimiento de la bacteria y el desarrollo morfológico, resultando en la lisis bacteriana por inducción del sistema de autólisis<sup>[9]</sup>.

#### MECANISMOS DE RESISTENCIA A $\beta$ -LACTÁMICOS

##### a) Producción de $\beta$ -lactamasas

*S. aureus* tras la adquisición del gen *blaZ* a través de plásmidos o trasposones (Tn552)<sup>[8]</sup> produce enzimas  $\beta$ -lactamasas de clase A (según la clasificación de Ambler), capaces de inactivar  $\beta$ -lactámicos como penicilina, aminopenicilina, carboxypenicilinas y ureidopenicilinas a través de la unión reversible de estas con el anillo  $\beta$ -lactámico del antibiótico, gracias al centro activo del enzima rico en serina presentando una estructura similar al de las PBPs<sup>[9]</sup>.

Sin embargo cefotaxima, oxacilina e imipenem son relativamente resistentes. Las  $\beta$ -lactamasas pueden ser extracelulares o permanecer unidas a la membrana citoplasmática de la bacteria y la mayoría de las cepas sintetiza ambos tipos. Los inhibidores de las  $\beta$ -lactamasas son ácido clavulánico, tazobactam y sulbactam quienes restablecen la actividad de los  $\beta$ -lactámicos<sup>[9]</sup>.

Existen cepas de *S. aureus* que presentan una disminución de la sensibilidad a oxacilina (Concentración Mínima Inhibitoria=2) por hiperproducción de  $\beta$ -lactamasas debido a mutaciones del sistema regulador de expresión de  $\beta$ -lactamasas, recibiendo el nombre de cepas borderline *S. aureus* (BORSA)<sup>[9]</sup>.

## b) Modificación de la diana PBP.

- **Adquisición de la PBP<sub>2a</sub> o PBP<sub>2</sub>**

Se trata de un tipo adicional de PBP que presenta muy baja afinidad por las penicilinas M (oxacilina, cloxacilina, nafcilina) y otros  $\beta$ -lactámicos. Se encuentra tanto en *S. aureus* como SCN y es capaz de continuar la síntesis de peptidoglucano aun cuando las otras PBP están inhibidas por estos antibióticos<sup>[8]</sup>.

Esta proteína es codificada por el gen *mecA*, el cual forma parte de un elemento genético móvil llamado cassette cromosómico estafilocócico (SCC-*mec*) que se integra en el ADN cromosómico de la bacteria y su expresión es inducida por la presencia de antibióticos  $\beta$ -lactámicos: cuando estos antibióticos están presentes, la proteína MecR1 detecta su presencia por su dominio extracelular y a continuación el dominio intracitoplasmático actúa como proteasa degradando a la proteína MecI represora de la expresión del gen *mecA*, por lo que se produce la síntesis de la proteína PBP<sub>2a</sub><sup>[8]</sup>. Las cepas que presentan este tipo de resistencia reciben el nombre de *S. aureus* resistente a meticilina (SARM).

- **Modificaciones de las PBP**

Este tipo de resistencia resulta de la modificación de las PBPs endógenas. Las cepas que presentan este tipo de resistencia reciben el nombre de *S. aureus* con modificación de la PBP (MODSA). Esta disminución en la afinidad se observa principalmente en la PBP<sub>1</sub> y PBP<sub>2</sub> y se caracterizan por expresar bajo nivel de resistencia a la oxacilina (CMI de 1 a 4  $\mu\text{g/ml}$ )<sup>[9]</sup>.

### 3.2. Aminoglucósidos

#### CARACTERÍSTICAS DEL ANTIMICROBIANO

Se trata de antibióticos estables, hidrófilos, catiónicos y de rápida acción bactericida. Para ello atraviesan la capa de peptidoglucano de una manera pasiva, rápida y no específica. Después cruzan la membrana citoplasmática por transporte activo y se produce la consecuente acumulación del aminoglucósido en el interior del citoplasma y la unión a las proteínas ribosomales, dificultando el reconocimiento de los codones e inhibiendo la síntesis de proteica<sup>[10]</sup>.

## MECANISMOS DE RESISTENCIA A AMINOGLUCÓSIDOS

**Modificación enzimática:** modificación del aminoglucósido mediante enzimas intracelulares codificados por plásmidos o trasposones (Tn4001, Tn5404, Tn5405)<sub>[8]</sub> impidiendo su unión al ribosoma. Se han identificado tres tipos de enzimas inactivadores:

1. Aminoglucósido acetil *transferasas* (AAC): cataliza la acetilación del grupo amino.
2. Aminoglucósido nucleotidil *transferasas* (ANT): cataliza la nucleotidilación del grupo hidroxilo.
3. Aminoglucósido O-fosfo*transferasas* (APH): cataliza la fosforilación del grupo hidroxilo.

El nivel de resistencia difiere según el tipo de enzima (AAC y ANT confieren elevado nivel de resistencia) y de la afinidad del enzima por el aminoglucósido, por lo que la mera presencia del enzima puede no ser suficiente para producir resistencia, observando una alteración en la estructura del antibiótico, que conserva su capacidad bacteriostática pero pierde su capacidad bactericida.

En el género *Staphylococcus* se han distinguido cinco fenotipos:

1. Fenotipo sensible.
2. Fenotipo Sm (ANT(6)): confiere resistencia a estreptomicina y es debido a la presencia del enzima ANT(6) o bien a una mutación ribosómica.
3. Fenotipo KmNm (APH(3')) confiere resistencia de alto nivel a kanamicina y neomicina (es debido a la presencia del enzima APH(3')-III el cual modifica a estos antibióticos), así como a amikacina.
4. Fenotipo KmTm (ANT(4')): confiere resistencia de alto nivel a kanamicina y especialmente a tobramicina (es debido a la presencia del enzima ANT(4') el cual modifica a estos antibióticos), así como a amikacina y neomicina.
5. Fenotipo KmGmTm (AAC(6')-APH(2')): confiere resistencia de alto nivel a kanamicina, tobramicina y gentamicina (es debido a la presencia del enzima bifuncional AAC(6')-APH(2') y modifica a estos antibióticos), así como a amikacina y netilmicina.

Asimismo, debe considerarse la posibilidad de la combinación de diferentes fenotipos; por tanto cada aminoglucósido puede ser afectado por varios enzimas y a su vez un enzima puede modificar a más de un aminoglucósido<sub>[10]</sub>.



### 3.3. Fluorquinolonas

#### CARACTERÍSTICAS DEL ANTIMICROBIANO

En gram positivos las fluorquinolonas actúan principalmente inhibiendo la enzima topoisomerasa IV (sobre la subunidad *ParC*), responsable de la separación del ADN durante la replicación. También pueden inhibir la enzima topoisomerasa II, pero teniendo un efecto mucho menor que en los gram negativos<sup>[11]</sup>.

#### MECANISMOS DE RESISTENCIA A FLUORQUINOLONAS

Las bacterias gram positivas son resistentes a las quinolonas clásicas (ácido nalidíxico, ácido pipemidico), no siendo así en el caso de las fluorquinolonas, de hecho los estafilococos fueron los primeros gram positivos incluidos en el espectro de las fluorquinolonas.

El mecanismo más importante de resistencia en gram positivos es la modificación cromosómica del gen *ParC*, las mutaciones se originan en un área determinada que recibe el nombre de QRDR (Quinolone Resistance–Determining Region) causando una menor afinidad de las quinolonas por el enzima topoisomerasa IV.

Asimismo, otros mecanismos de resistencia son las mutaciones en los genes que codifican el enzima topoisomerasa II (subunidad *GyrA*) y las mutaciones en el gen *norA* responsable de la sobreexpresión de bombas de flujo de expulsión activa del antibiótico desde el interior de la bacteria<sup>[11]</sup>.

### 3.4. Glucopéptidos

#### CARACTERÍSTICAS DEL ANTIMICROBIANO

Inhibe la síntesis de peptidoglucano, concretamente evitando que el complejo disacárido pentapéptido se separe del fosfolípido de membrana, inhibiendo así la elongación del peptidoglicano. De esta forma los glucopéptidos no interactúan con los enzimas de biosíntesis de la pared celular<sup>[12]</sup>.

##### a) *S. aureus* Vancomicina resistentes (VRSA):

Se caracteriza por cepas de *S. aureus* que presentan resistencia de alto nivel tanto para vancomicina (CMI > 16 µg/ml) como para teicoplanina (CMI > 16 µg/ml), según normas CLSI. La resistencia se debe a la adquisición del operón *VanA* desde una cepa de *Enterococcus spp.* Este operón codifica un enzima deshidrogenasa que transforma el piruvato a lactato y otra enzima ligasa que permite la formación de un éster entre D–Alanina y D–Lactato reemplaza

zando así el dipéptido D-Ala-D-Ala por la molécula D-Ala-D-Lac, evitando así la unión entre el complejo disacárido pentapéptido con el glucopéptido y formando una capa de peptidoglucano alterada. Este tipo de resistencia es muy rara, se descubrió el primer aislamiento en EE.UU. en 2002<sup>[13]</sup>, donde se han declarado 11 casos desde su detección hasta 2012<sup>[14]</sup>. Recientes publicaciones han documentado el hallazgo de dos aislamientos en la India y en Irán<sup>[15-16]</sup>. En Europa, concretamente en Portugal ya se ha declarado el primer caso en este último año<sup>[17]</sup>.

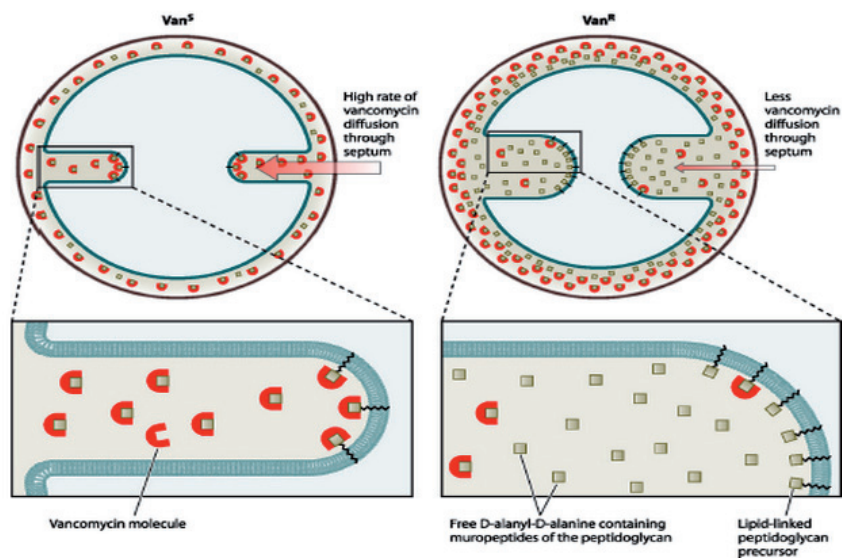
b) Cepas de *S. aureus* con reducida sensibilidad a glucopéptidos:

Inicialmente recibieron el nombre de cepas VISA, *S. aureus* Vancomicina intermedio (VISA), presentando una CMI frente vancomicina de 8 µg/ml, según normas CLSI. Posteriormente se observó que esta resistencia era cruzada con teicoplanina, por lo que se le denominó cepas GISA *S. aureus* glucopéptido intermedio. Finalmente, también se han descrito cepas Hetero-VISA (CMI 2-4 µg/ml) tratándose de cepas inicialmente sensibles a vancomicina pero que contienen poblaciones vancomicina intermedio (CMI 6-8 µg/ml). Inicialmente fueron detectadas en Europa en los años 90, más tarde se detectaron en Japón. Actualmente representan cerca del 30% de los aislamientos SARM en Turquía, 10% en Australia, 6% Israel y 0,7% Francia<sup>[18]</sup>.

Este tipo de cepas acumulan diferentes mecanismos de resistencia entre los que destacan<sup>[18]</sup>:

- Engrosamiento de la pared celular.
- Hiperproducción de precursores de peptidoglucano.

Figura 1. Hiperproducción de precursores de peptidoglucano.



Fuente: Howden *et al.*, 2010.

### 3.5. Lipopéptidos

#### CARACTERÍSTICAS DEL ANTIMICROBIANO

Daptomicina es un lipopéptido con actividad bactericida frente gram positivos incluyendo los estafilococos meticilina resistentes y la mayoría de las cepas resistentes a glucopéptidos. Actúa como una molécula anfipática, insertándose directamente dentro de la membrana citoplasmática de las bacterias gram positivas, mediante un proceso que es dependiente de la concentración de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), produciendo una alteración en la misma, posterior formación de micelios y distorsión de la citada membrana, ocasionando una despolarización de esta con la consiguiente lisis bacteriana<sup>[19]</sup>.

#### MECANISMOS DE RESISTENCIA A LIPOPÉPTIDOS.

Mutaciones en tres genes *mprF*, *yyfG* y *rpo RNA* polimerasa, produciéndose cambios en la fluidez y carga de la membrana y por tanto una menor unión de la daptomicina a la membrana<sup>[19]</sup>.

### 3.6. Macrólidos, Lincosamidas y Estreptograminas (MLS)

#### CARACTERÍSTICAS DEL ANTIMICROBIANO

Macrólidos, lincosamidas y estreptograminas son antibióticos químicamente diferentes pero se clasifican en el mismo grupo por presentar un mecanismo de acción similar y presentar resistencia cruzada entre ellos. Concretamente bloquean la subunidad 50S del ribosoma inhibiendo la síntesis de proteínas<sup>[20]</sup>.

#### MECANISMOS DE RESISTENCIA A MLS

1. Cambios estructurales en la diana de acción:  
La expresión del gen *erm* inducible o constitutiva causa la metilación de la adenina 2058 del RNAr 23S ribosomal, sitio de unión de MLS. La adquisición de estos genes es a través de plásmidos o trasposones (*Tn1545*, *Tn551*, *Tn554*, *Tn917*) y causa resistencia cruzada entre estos tres antibióticos.
2. Bombas de expulsión activa tipo ABC (ATP-binding cassette):  
Codificadas por el gen *msr* (A) transmitido por plásmidos.
3. Presencia de enzimas inactivantes de MLS como enzimas acetilasas codificadas por los genes *vat* y *vgb* transmitidos a través de plásmidos<sup>[20]</sup>.

### 3.7. Oxazolidinonas

#### CARACTERÍSTICAS DEL ANTIMICROBIANO

Actualmente, la oxazolidinona utilizada en la práctica clínica es el Linezolid. Actúa bloqueando la subunidad 50S del ribosoma inhibiendo la síntesis de proteínas<sup>[21]</sup>.

#### MECANISMOS DE RESISTENCIA A LINEZOLID

La resistencia permanece como un hecho esporádico sucedido principalmente en EE.UU. y menos frecuentemente en Europa (Reino Unido, Alemania y Austria). Destacando los siguientes mecanismos<sup>[21]</sup>:

1. Mutaciones ribosomales: concretamente en los nucleótidos G2447 y G2576 en el RNAr 23S.
2. Metilación ribosomal: por la expresión del gen *cfr* de localización plasmídica que codifica un RNA *metilasa* el cual metila al nucleótido de adenina 2503 de Adenina de RNAr23S y perturba la unión de cinco tipos de antibióticos: fenícoles, lincosamidas, linezolid, y estreptograminas.

### 3.8. Mupirocina

#### CARACTERÍSTICAS DEL ANTIMICROBIANO

Se trata de un antibiótico tópico derivado de la fermentación de productos derivados de *Pseudomonas fluorescens*. Actúa inhibiendo al enzima Isoleucyl-tRNA *sintetasa* y por tanto la síntesis de proteínas<sup>[22]</sup>.

#### MECANISMOS DE RESISTENCIA A MUPIROCINA

La resistencia de bajo nivel (CMI=4–246 µg/ml) (LLR) se debe a la alteración del enzima Isoleucyl-tRNA *sintetasa* debido a mutaciones en el gen cromosómico *ile*<sup>[22]</sup>. La resistencia de alto nivel (CMI≥512 µg/ml) (HLR) se debe a la transmisión mediante conjugación plasmídica del gen *mupA* desde otras especies como *Staphylococcus epidermidis*. Dicho gen codifica el enzima isoleucil-ARN-t *sintetasa* modificada<sup>[23–25]</sup>. Por otro lado, existen aislamientos que presentan resistencia de bajo nivel a mupirocina (LLR) y sin embargo presentan el gen *mupA*. La explicación a este fenómeno es que en estos aislamientos el gen *mupA* se localiza en el cromosoma y no en plásmidos. Otra posibilidad es la presencia de aislamientos que contiene el gen *mupA*, pero son sensibles a la mupirocina, estos se deben a

mutaciones en el gen *mupA*, por lo que se inactivan los productos de este gen. Finalmente existen aislamientos con resistencia de alto nivel a mupirocina (HLR) y sin embargo no presentan el gen *mupA*, sino el gen *mupB* que también se transmite vía plasmídica<sup>[23], [26]</sup>.

## 4. Evolución temporal de la resistencia de *S. aureus*

A lo largo de la historia hemos observado como las infecciones por *S. aureus* aumentan y disminuyen siguiendo un patrón de diferentes ondas epidémicas, donde se observa un aumento de casos en determinadas regiones y momentos<sup>[27]</sup>. La explicación a este fenómeno se desconoce, pero parece estar relacionado con la exposición a nuevos agentes antimicrobianos o cambios en algunos hábitos de vida.

- Primera onda epidémica: durante los años 50, un año después de la introducción de la penicilina como tratamiento para las infecciones causadas por *S. aureus*, aparecen las primeras cepas penicilina resistente, que posteriormente se distribuyeron mundialmente.
- Segunda onda epidémica: durante los años 60, tras la resistencia a la penicilina se introdujeron las cefalosporinas estables a penicilinasas y penicilinas semisintéticas. Entre estas estuvo la meticilina como antibiótico de elección en el tratamiento de *S. aureus*. Este antibiótico se introdujo en Europa en el año 1959 y dos años después se detectó en Reino Unido la primera cepa SARM, presentando posteriormente una diseminación mundial.
- Tercera onda epidémica: durante los años 80 aparecieron las cepas de *S. aureus* productoras de una exotoxina codificada por el gen *tst*, responsable del síndrome de Shock tóxico entre mujeres jóvenes usuarias de tampones durante el periodo menstrual.
- Cuarta onda epidémica: donde se observa un aumento de un nuevo linaje SARM llamado clon Ibérico (ST24–MRSA–I), llegando a presentar una distribución pandémica a nivel hospitalario. Otros clones ST22–MRSA–IV (EMRSA–15), USA 100, USA 200 y ST36–MRSA–II (EMRSA–16) también emergieron en el ambiente hospitalario causando un amplio número de infecciones nosocomiales.

- Quinta onda epidémica: durante los años 90, comenzando en el este de Australia tras el descubrimiento de los primeros casos de infección causada por clones comunitarios de SARM denominados CA-MRSA. Inicialmente fueron causadas por el clon USA 400, pero actualmente el clon ST8-MRSA-IV (USA 300) es el responsable de la mayoría de las infecciones, mientras el clon USA 400 queda relegado a determinadas zonas de Alaska.
- Sexta onda epidémica: durante los años 2000, por brotes causados por clones asociados al ganado denominados LA-MRSA, inicialmente identificados en Europa pero que actualmente presentan una amplia distribución mundial<sup>[27]</sup>.

## 5. Epidemiología de SARM

La epidemiología de SARM ha cambiado a lo largo de los últimos años. El primer aislamiento descrito en 1961 fue un clon SARM asociado a cuidados sanitarios (HA-MRSA). Las infecciones causadas por los clones de esta categoría afectan predominantemente a individuos con comorbilidades y otros factores de riesgo<sup>[28]</sup>. En los últimos 20 años se han notificado infecciones entre pacientes sanos causadas por otros clones pertenecientes a linajes genéticos diferentes a los anteriores, denominados clones SARM comunitarios (CA-MRSA). Según Klein *et al.*, 2013<sup>[29]</sup> existe un patrón estacional diferente en las tasas de infección causadas por ambos tipos de clones, predominando en invierno las infecciones por HA-MRSA y en verano las infecciones por CA-MRSA, siendo una posible explicación el incremento del uso antibiótico durante el invierno y la mayor sensibilidad de los clones CA-MRSA.

Desde 2003 se ha incrementado los casos de infección por nuevos clones SARM asociados al ganado (LA-MRSA); estos clones afectan principalmente a poblaciones que mantienen un estrecho contacto con los animales, veterinarios y granjeros<sup>[30]</sup>. Sin embargo la incidencia global de las infecciones por SARM ha comenzado a disminuir<sup>[31]</sup>.

### 5.1. Cadena Epidemiológica

#### 5.1.1. Reservorio

##### **Paciente y personal sanitario**

*S. aureus* es un colonizador frecuente en humanos y el 20% de los colonizados lo están de forma persistente mientras que el resto lo están intermitentemente<sup>[30]</sup>.

Se localiza principalmente en fosas nasales<sup>[32-33]</sup>, sin embargo otras localizaciones como faringe, perineo, piel y tracto gastrointestinal representan el 27% de las colonizaciones<sup>[33]</sup>.

### **Animales**

Asimismo, esta bacteria puede colonizar a otros mamíferos como terneros, caballos y cerdos e incluso aves. La emergencia de las infecciones por clones LA-MRSA en humanos es un claro ejemplo de la posible zoonosis<sup>[30-31]</sup>.

### **Ambiente**

El reservorio ambiental tanto a nivel hospitalario como comunitario ha sido documentado por diferentes estudios que han descrito la obtención de aislamientos SARM tanto en superficies y utensilios de hogares<sup>[31]</sup>, como en el ambiente hospitalario (teclados de ordenador, uniformes, termómetros, fonendoscopios, otoscopios, etc.), reflejando así la gran habilidad de la bacteria para sobrevivir a diferentes condiciones adversas<sup>[34]</sup>.

## 5.1.2. Mecanismo de transmisión

### **Ámbito hospitalario**

El principal mecanismo de transmisión es el contacto directo o indirecto a través de las manos del personal sanitario colonizado de forma transitoria tras entrar en contacto con un paciente colonizado y/o infectado, o con el entorno inmediato de dicho paciente y posteriormente asistir a otro que inicialmente no estaba ni colonizado ni infectado.

### **Ámbito de la comunidad**

En la comunidad esta transmisión tiene lugar tanto en el ámbito familiar como en cualquier otro en el que se produzcan contactos repetidos. Sin embargo las infecciones causadas por CA-MRSA a diferencia de las infecciones por HA-MRSA no suelen ser precedidas por una previa colonización nasal, sino con el contacto piel-piel o con fómites<sup>[35]</sup>. Lo mismo ocurre con la transmisión en el ámbito laboral donde la actividad profesional (granjeros y veterinarios) exige un estrecho contacto con animales.

## 5.1.3. Huésped Susceptible

Cualquier persona sana o enferma es susceptible de colonizarse por SARM. Aquellos pacientes que presentan edades avanzadas, comorbilidades, estancias hospi-

talarias prolongadas, reiteradas admisiones en el hospital y/o residen en centros de asistencia sanitaria de larga estancia, presentan mayor probabilidad de colonizarse por clones HA-MRSA<sup>[36]</sup>. Sin embargo, en la última década numerosas comunicaciones han descrito la existencia de infecciones por SARM cuyo origen no está relacionado con el hospital o con los cuidados sanitarios y son causadas por los denominados clones CA-MRSA. En estos casos la infección no está necesariamente precedida por la colonización y afecta principalmente a jóvenes adultos y niños produciéndose brotes en determinados grupos de población como aborígenes, reclusos, soldados, deportistas y guarderías<sup>[37]</sup>.

## 5.2 Factores de riesgo para la infección por SARM

Diferentes estudios han documentado cómo tanto las colonizaciones hospitalarias como extrahospitalarias por SARM pueden incrementar el riesgo de padecer infecciones posteriores por este microorganismo en diferentes localizaciones<sup>[38-40]</sup>. La colonización por SARM en fosa nasal es uno de los factores de riesgo más importantes para el posterior desarrollo de infección por este microorganismo<sup>[41]</sup>.

De hecho se estima que la tasa de infección posterior en diferentes localizaciones entre pacientes colonizados es del 30%<sup>[42]</sup>. Estudios previos han identificado factores de riesgo para el desarrollo de colonización por SARM como abuso de drogas vía parenteral, hemodiálisis, VIH, diabetes<sup>[5],[43]</sup> y antibioterapia previa con cefalosporinas y fluorquinolonas<sup>[44-45]</sup>, mientras que el desarrollo de infecciones por SARM se ha asociado a: prolongación de la estancia hospitalaria, tratamiento antibiótico, hospitalizaciones y cirugías previas<sup>[45]</sup>.

Sin embargo, los factores de riesgo para la adquisición de infecciones por SARM entre pacientes portadores nasales no han sido bien definidos. Diferentes autores han establecido los siguientes: estancia hospitalaria superior o igual a 3 semanas<sup>[42]</sup>, residencia en un centro de asistencia sanitaria de larga estancia<sup>[42]</sup>, tratamiento previo con corticoides<sup>[46]</sup>, desarrollo de úlceras de decúbito después del ingreso<sup>[46]</sup>, diabetes mellitus<sup>[47]</sup>, presencia de 3 o más comorbilidades<sup>[48]</sup>, ser portador de sonda urinaria<sup>[47-48]</sup>, hospitalizaciones previas<sup>[47-48]</sup>, presencia de vías centrales<sup>[48]</sup>, historia previa de colonización o infección por SARM<sup>[6], [47]</sup> y la presencia de tumores sólidos<sup>[43]</sup>.



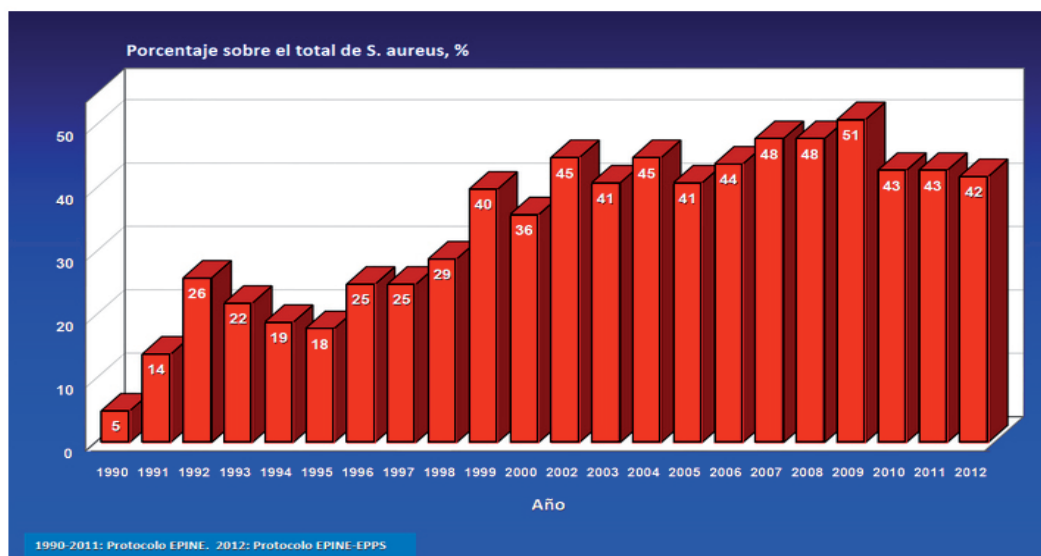
## 6. Importancia de SARM

El primer clon SARM fue aislado en Reino Unido en 1961, dos años después de la introducción de la meticilina en la práctica clínica, siendo conocido como el clon arcaico. Durante los años siguientes se diseminó a otros países europeos presentando finalmente una distribución mundial<sup>[49]</sup>. Este tipo de resistencia implica la resistencia intrínseca a todos los  $\beta$ -lactámicos, exceptuando a dos nuevas cefalosporinas ceftobiprol y ceftarolina<sup>[7],[50]</sup>, aunque ya existen aislamientos con reducida sensibilidad a ceftarolina<sup>[51]</sup>.

La emergencia de SARM en el mundo supuso una gran reducción en las alternativas terapéuticas para el tratamiento de infecciones frecuentes tanto a nivel hospitalario como comunitario<sup>[2]</sup>. Asimismo, su posterior propagación y distribución mundial junto con su capacidad de adaptación a las condiciones adversas, le han llevado a ser uno de los microorganismos multirresistentes más importantes causantes de infecciones invasivas, suponiendo un aumento en las tasas de mortalidad y un coste adicional en el sistema sanitario debido al incremento de estancia hospitalaria que supone la infección por este microorganismo. De hecho, en Europa se estima sobre 1 millón de días extras de hospitalización como consecuencia de las infecciones por SARM suponiendo un coste adicional de 570 millones de dólares<sup>[27]</sup>.

Sin embargo, los últimos informes recientes de programas de vigilancia de diferentes zonas geográficas sugieren que ha habido un reciente descenso de las tasas de incidencia de infecciones invasivas por SARM; por ejemplo, en EE.UU. las infecciones invasivas por SARM hospitalaria disminuyeron un 54% entre los años 2005 y 2011, mientras que las infecciones comunitarias lo hicieron en un 5%<sup>[52]</sup>.

En Europa, según los datos aportados por la red de vigilancia de resistencia antimicrobiana europea en el año 2012<sup>[53]</sup>, la media del porcentaje de aislamientos SARM causantes de infecciones invasivas disminuyó significativamente desde 23.2% en 2009 a 17.8% en 2012. Este último estudio estima que España se sitúa en el grupo de países Europeos EARSS, que presenta un porcentaje de SARM respecto al total de aislamientos invasivos de *S. aureus* en torno al 10–25. Por otro lado, el estudio de Prevalencia de la Infección nosocomial en España del año 2013 (EPINE)<sup>[54]</sup>, confirma la importancia de SARM en nuestro país, ya que *S. aureus* fue el segundo patógeno en frecuencia (8,71%) por detrás de *Escherichia coli* (17,8%). Asimismo, en el año 2012, el porcentaje de SARM sobre el total de *S. aureus* en infección nosocomial se situó cerca del 42%, observándose un ligero descenso en relación con el porcentaje de años previos.

Figura 2. Porcentaje de SARM sobre el total de *S. aureus* en infección nosocomial.

Fuente: EPINE, 2012

Por lo que, SARM continúa siendo un importante problema de salud pública ya que continúa tratándose del patógeno multirresistente dominante en las instituciones sanitarias y en la comunidad<sup>[31]</sup>.

## 7. Prevención y control de SARM

Por primera vez desde 1961 la incidencia de las infecciones por SARM ha comenzado a disminuir, reflejando la efectividad de las diferentes estrategias actualmente empleadas en la prevención y control de SARM<sup>[31]</sup>.

### 7.1. Metodología de la vigilancia del SARM

**Vigilancia pasiva:** es aquella que se basa en la detección de SARM a través de los cultivos positivos en pacientes hospitalizados, solicitados por sospecha clínica e informados por el laboratorio de Microbiología. Este hecho significa que probablemente el paciente ya esté presentando una infección. Salgado & Farr<sup>[55]</sup> analizaron el porcentaje de pacientes colonizados al ingreso que presentaron cultivo positivo en muestras clínicas durante su hospitalización, encontrando que solo el 15% de los pacientes colonizados serían identificados por vigilancia pasiva. Este estudio mostró que el 85% de pacientes colonizados no serían identificados mediante una vigilancia pasiva, concluyendo así que este tipo de vigilancia no es capaz de detectar un alto

porcentaje de pacientes colonizados y estos permanecen en el hospital, aumentando el riesgo de transmisión intrahospitalaria de estas cepas resistentes<sup>[56]</sup>.

**Vigilancia Activa:** es aquella que se basa en la detección precoz del reservorio de pacientes con colonización asintomática mediante la búsqueda activa a través de la realización de cultivos de cribado. Este cribado se centra principalmente en detectar pacientes portadores nasales de SARM, ya que de esta forma se identifican a la mayoría de los pacientes colonizados, aunque se puede aumentar la sensibilidad de detección si se añaden cultivos de exudados de faringe, aspirado traqueal (en pacientes intubados), piel perineal o perirectal. En algunos estudios las muestras se obtienen en el momento de ingreso o traslado desde o hacia unidades determinadas (p. ej., UCI) y otros realizan los cultivos de forma periódica, generalmente semanal en unidades de alto riesgo.

La realización de cultivos de cribado se recomienda en todas las guías de control de SARM, si bien la identificación de pacientes o situaciones en las que deben realizarse es motivo de debate<sup>[57]</sup>. Así pues la vigilancia activa puede realizarse de manera universal o selectiva.

En la primera se establece la búsqueda de portador de SARM para todos los pacientes en el momento de su ingreso en el hospital, sin embargo el apoyo logístico y financiero hacen que su implantación sea prohibitiva para muchos hospitales, e incluso en aquellos lugares donde la prevalencia es baja supone un aislamiento innecesario de pacientes y un incremento de costes hospitalario<sup>[33]</sup>, ya que la implantación de un programa de vigilancia activa requiere de recursos adicionales: personal para obtener y procesar las muestras, mecanismos para comunicar los resultados, toma de decisiones, etc. En general en las guías se recomienda la realización de la vigilancia activa en pacientes de alto riesgo de colonización (previamente colonizados, múltiples ingresos, procedentes de hospitales o centros de asistencia sanitaria de larga estancia con elevada prevalencia de SARM), así como el cribado universal al ingresar a unidades de alto riesgo (UCI), a los compañeros de habitación de pacientes colonizados o infectados y en situaciones de brote<sup>[57]</sup>.

Los métodos de cribado se han visto mejorados tras la introducción de métodos moleculares de screening como la PCR, ya que permiten una rápida detección de portadores. Sin embargo, su coste-eficacia limita su utilización en unidades de alto riesgo<sup>[33]</sup>.

## 7.2. Medidas para el control de la Infección

### 7.2.1. Higiene de manos

La higiene de manos es la piedra angular del control de la infección nosocomial y de los patógenos multirresistentes. La máxima recomendación es la utilización de soluciones alcohólicas, ya que éstas ofrecen con respecto al lavado con jabones antisépticos una mayor eficacia en la reducción de la flora bacteriana transitoria, mayor facilidad para su cumplimiento y mejor tolerancia. Debe recordarse que cuando las manos están visiblemente sucias debe realizarse el lavado de manos con una solución antiséptica<sup>[57]</sup>.

### 7.2.2. Aislamiento de contacto

Los resultados de diversos estudios apuntan a la necesidad de separar físicamente a los pacientes infectados/colonizados de los que no lo están. Las medidas de aislamiento de contacto deben mantenerse mientras persista el estado de portador. Puede realizarse un levantamiento de aislamiento tras obtener 3 tandas de cultivos de cribado negativas de todas las posibles localizaciones reservorio (fosas nasales, piel, úlceras, etc.), tras haber finalizado el tratamiento de descolonización<sup>[57]</sup>.

### 7.2.3. Precauciones de contacto

Son fundamentales para evitar la contaminación transitoria de las manos y ropa que pueden comportarse como un vehículo transmisor para pacientes y el propio trabajador.

- Uso de guantes desechables: se recomiendan en todo contacto con el paciente colonizado o infectado por SARM o con el entorno del mismo. Deben ser cambiados entre maniobras y retirados antes de salir de la habitación. No eximen del lavado de manos.
- Bata desechable de manga larga: para entrar en la habitación del paciente colonizado o infectado por SARM. Se desechará antes de salir de la habitación.
- Mascarilla y otras medidas de gotas: se recomiendan solo cuando existan riesgos de salpicaduras, de generación de aerosoles y en casos de infección respiratoria<sup>[57]</sup>.

#### 7.2.4. Estrategias de descolonización

Aunque la descolonización rutinaria de pacientes colonizados no está recomendada, las estrategias de descolonización están indicadas en determinadas poblaciones de pacientes:

- Pacientes involucrados en la continua transmisión en situaciones de brotes.
- Pacientes que van a ser sometidos a procedimientos quirúrgicos especialmente cirugía cardíaca y torácica.
- Pacientes sometidos a procesos de diálisis.
- Pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos.

Entre las numerosas pautas utilizadas, la mupirocina nasal ha sido la más eficaz.

Sin embargo, su utilización en el tratamiento de los pacientes colonizados por SARM se ha visto comprometida por:

- Su utilización indiscriminada, repetida y prolongada con el consiguiente aumento de las tasas de resistencia, por lo que se debe monitorizar la sensibilidad a la mupirocina y disponer de alternativas terapéuticas para las cepas resistentes.
- Los fracasos en pacientes con múltiples localizaciones cutáneas, ya que es únicamente eficaz en aquellos que presentan una colonización exclusivamente nasal.
- La aparición de recaídas y recolonizaciones.

Diferentes autores han utilizado la combinación de tratamiento tópico con mupirocina nasal e higiene corporal con clorhexidina conjuntamente con la administración sistémica de antibióticos como trimetoprim–sulfametoxazol o combinaciones que incluyen la rifampicina con doxiciclina. Los resultados de estos estudios sugieren que los pacientes con colonización en múltiples sitios pueden ser descolonizados con dichas combinaciones tópicas y sistémicas, sin embargo no existe suficiente evidencia científica.

La eficacia de la descolonización debe comprobarse mediante la negativización de los cultivos de cribado, porque se puede producir una recolonización con la misma cepa o la emergencia de la resistencia a mupirocina tras el tratamiento<sup>[57]</sup>.

### 7.2.5. Limpieza y desinfección del equipamiento y entorno del paciente

Como ya mencionamos anteriormente, *S. aureus* presenta una elevada capacidad de sobrevivir en diferentes superficies, por lo que tanto pacientes como personal sanitario pueden transmitir y adquirir SARM tras entrar en contacto con superficies o equipamiento contaminados. Una limpieza y desinfección adecuada pueden reducir el riesgo de transmisión de SARM<sup>[58]</sup>.

## 8. Evolución clonal de SARM e importancia del Cassette Cromosómico Estafilocócico

Para tratar de explicar el origen de SARM se han postulado dos teorías:

- Teoría de la evolución monoclonal: por la que los clones SARM derivan de un mismo clon antecesor *S. aureus* meticilina sensible (SAMS) que en un momento determinado adquirió un cassette *SCCmec*<sup>[59]</sup>.
- Teoría de la evolución multiclonal: por la que los clones SARM derivan de diferentes clones antecesores de *S. aureus* meticilina sensible (SASM) que un momento determinado adquirieron un cassette *SCCmec* por transmisión horizontal<sup>[60]</sup>.

Varios estudios apoyan la teoría policlonal, así como la introducción del cassette *SCCmec* al ADN cromosómico bacteriano en repetidas ocasiones a lo largo del tiempo a través de la transmisión horizontal entre especies bacterianas diferentes, explicando así la presencia de linajes de SARM muy distantes entre sí<sup>[49], [60–61]</sup>.

La aplicación de la técnica Multilocus Sequence Typing (MLST) y del tipado del cassette *SCCmec* a los aislamientos de SARM y de *S. aureus* meticilina sensibles de colecciones internacionales, han revelado que la resistencia a meticilina emergió principalmente de cinco complejos clonales (CC) o linajes filogenéticamente diferentes de *S. aureus*: CC5, CC8, CC22, CC30 y CC45<sup>[62]</sup>, sin embargo en los CC de SAMS CC12, CC25, CC51 y CC101 no se ha observado la aparición de clones SARM, por lo que existen linajes MSSA que presentan cierta resistencia a la integración de los cassettes *SCCmec*<sup>[49]</sup>. Por otro lado, diferentes estudios epidemiológicos han mostrado como la mayoría de las infecciones por SARM han sido causadas por determinados clones SARM que se han diseminado rápidamente en el ambiente hospitalario presentando una distribución pandémica. Otros clones predominan

en determinadas regiones geográficas y son clasificados como clones epidémicos, mientras que otro grupo de clones se han recuperado en escasos pacientes tratándose de aislamientos SARM esporádicos<sub>[63-64]</sub>. Este hecho muestra como los clones de amplia diseminación son excelentes colonizadores y altamente transmisibles<sub>[61]</sub> y su éxito epidemiológico probablemente se deba a la suma de factores extrínsecos (medioambientales y asociados al hospedador) y factores intrínsecos de la bacteria (genéticos)<sub>[64]</sub>.

El modelo de la emergencia de SARM de Robinson & Enright<sub>[62]</sub> propone que la mayoría de los aislamientos SARM proceden de los cinco complejos clonales; de hecho diferentes estudios apoyan que los aislamientos SARM esporádicos y comunitarios también derivan de estos CC mayoritarios<sub>[64]</sub>. Sin embargo, existe controversia al respecto<sub>[65-67]</sub>.

### 8.1. Evolución del Complejo Clonal 8

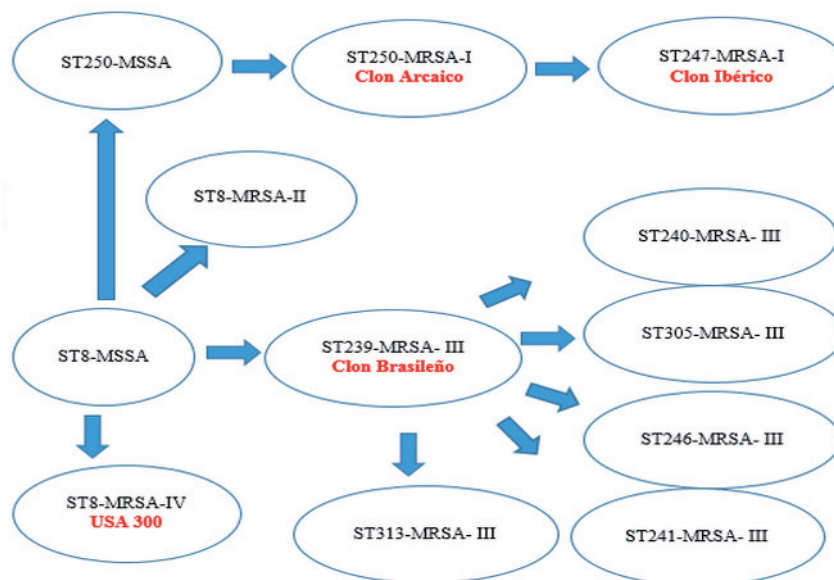
El Complejo Clonal 8 (CC8) es un linaje pandémico. Numerosos clones SARM se han originado desde este CC, incluyendo tanto SARM de origen comunitario como de origen asociado al cuidado sanitario<sub>[68]</sub>. Los ancestros de este CC fueron clones ST8–MSSA que adquirieron diferentes cassettes *SCCmec* en repetidas ocasiones. Los clones SARM más representativos en este complejo son los que presentan las secuencias tipo ST8, ST239, ST247 y ST250<sub>[60]</sub>, destacando el clon ST250–MRSA–I o clon Arcaico que fue el primer SARM descrito y que hoy día parece estar desaparecido aunque todavía se encuentra en Australia pero de una manera puntual. Algo muy similar ha ocurrido con el clon ST247–MRSA–I, conocido como clon Ibérico que emergió en 1971 y hoy en día su frecuencia de aislamiento se ha reducido considerablemente; sin embargo se ha observado un aumento de su presencia en lugares como Australia, Croacia, República Checa e Italia<sub>[68]</sub>.

Una serie de acontecimientos moleculares dieron lugar a la gran diversidad clonal dentro de este complejo (**Figura 3**):

1. La mutación puntual en un nucleótido en la secuencia del gen *housekeeping yqiL*, dio lugar a la aparición del clon ST250–MSSA. Este a su vez adquirió el cassette *SCCmec I* y así se originó el clon ST250–MRSA–I. Posteriormente este sufrió otra mutación puntual en un nucleótido en la secuencia del gen *housekeeping gmk* (Guanilato *kinasa*) dando origen al clon ST247–MRSA–I, conocido como clon Ibérico descrito por Sanches *et al.*<sub>[69]</sub>

2. La adquisición del cassette *SCCmec* II originó la síntesis del clon ST8–MRSA–II.
3. El proceso de recombinación en el gen *housekeeping arcC* por el cual sucedió un intercambio de >200 pb entre clones ST8 y ST 30<sub>[62]</sub> junto con la adquisición del cassette *SCCmec* III dio lugar a la aparición del clon ST239–MRSA–III, el cual corresponde con el clon Brasileño descrito por Aires de Sousa & de Lencastre<sub>[70]</sub>. Asimismo este linaje incluye numerosos clones como ST305–MRSA–III, ST246–MRSA–III, ST241–MRSA–III, ST240–MRSA–III y ST313–MRSA–III.
4. La adquisición del cassette *SCCmec* IV originó la síntesis del clon ST8–MRSA–IV.

Figura 3. Evolución clonal de CC8.



## 8.2. Evolución del Complejo Clonal 5

El Complejo Clonal 5 (CC5) es un linaje pandémico, numerosos clones SARM se han originado desde este CC, incluyendo tanto SARM de origen comunitario como de origen asociado al cuidado sanitario<sub>[68]</sub>. Los ancestros de este CC fueron clones ST5–MSSA que adquirieron los cassettes *SCCmec* I, II, III, IV en un mismo momento.

Una serie de acontecimientos moleculares dieron lugar a la gran diversidad clonal dentro de este complejo (**Figura 4**):

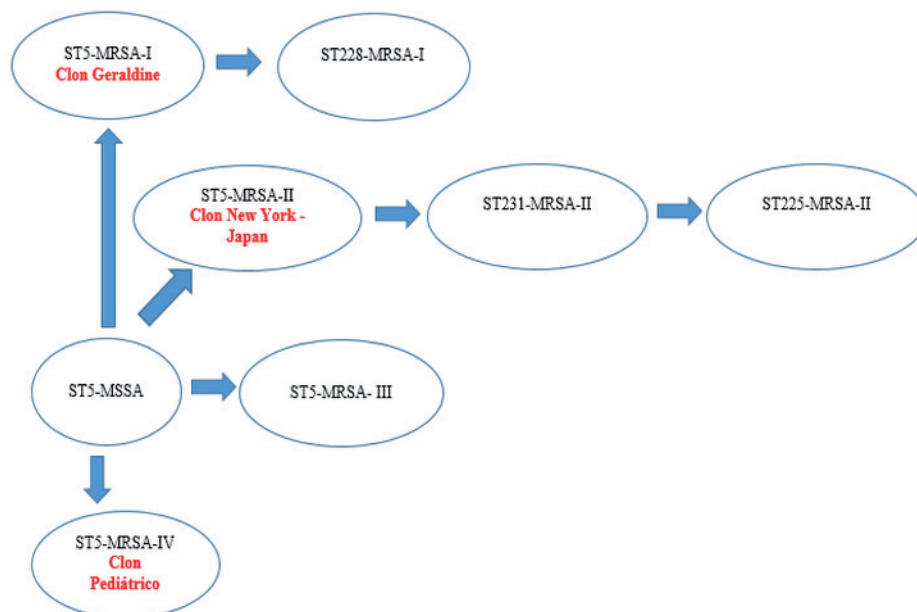
- La adquisición del cassette *SCCmec* I originó la síntesis del clon ST5–MRSA–I, conocido como clon Geraldine: se trata de un clon comunitario aislado prin-



principalmente en Francia. Asimismo este linaje incluye otros clones como son el clon ST228-MRSA-I que se ha considerado estrictamente como SARM asociado al cuidado sanitario.

- La adquisición del cassette *SCCmec* II originó la síntesis del clon ST5-MRSA-II o clon New York-Japan tratándose de un clon pandémico. Asimismo este linaje incluye otros clones como son el clon ST225-MRSA-II y ST231-MRSA-II y otros que posteriormente presentaron resistencia a glucopeptidos.
- La adquisición del cassette *SCCmec* III originó la síntesis del clon ST5-MRSA-III.
- La adquisición del cassette *SCCmec* IV originó la síntesis del clon ST5-MRSA-IV o clon Pediátrico, tratándose de un clon pandémico.

Figura 4. Evolución clonal de CC5.



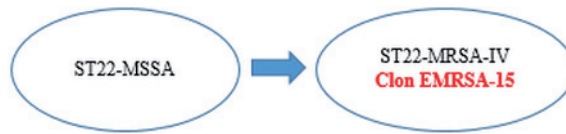
### 8.3. Evolución del Complejo Clonal 22, 30 y 45

Los **Complejo Clonales** 22(CC22), 30(CC30) y 45(CC45) representan linajes de SARM menos diversificados que los CC5 y CC8.

#### CC22.

Los ancestros de este CC fueron clones ST22 MSSA que adquirieron el cassette *SCCmec* IV. ST22-MRSA-IV es un clon pandémico y se le conoce como EMRSA-15.

Figura 5. Evolución clonal de CC22.

**CC30.**

Los ancestros de este CC fueron clones ST30–MSSA que adquirieron el cassette *SCCmec* IV y II sucesivamente. Desde este CC se han originado tanto SARM de origen comunitario como de origen asociado al cuidado sanitario<sup>[68]</sup>.

Figura 6. Evolución clonal de CC30

**CC45.**

Los ancestros de este CC fueron clones ST45 MSSA que adquirieron el cassette *SCCmec* IV y II sucesivamente. La adquisición del cassette *SCCmec* II originó la síntesis del clon ST45–MRSA–II, este clon se localiza en Norte América y algunas de sus variantes presentan resistencia a Glucopéptidos<sup>[68]</sup>.

Figura 7. Evolución clonal de CC45.

**8.4. Cassette *SCCmec***

La inserción del elemento de *SCCmec* en el cromosoma de las cepas susceptibles de *S. aureus* presenta un papel muy importante en la aparición de los linajes de estafilococos resistentes a la meticilina.

El *SCCmec* es un fragmento de ADN exógeno (una isla genómica de resistencia) que se integra en el cromosoma del estafilococo en un único lugar (*attB<sub>sc</sub>*) situado cerca del origen de replicación, al final del extremos 3´ del marco de lectura abierta *orfX*<sub>[1]</sub>.

Sus límites están marcados por repeticiones de pares de bases lo que permite su integración en el cromosoma bacteriano y se caracteriza por presentar los siguientes elementos<sup>[71]</sup>:

- Complejo *ccr*: compuesto por los genes *ccrA* (que presenta los halotipos: A1, A2, A3 y A4), B (que presenta los halotipos: B1, B2, B3 y B4) y C. Su fun-

ción es la de mediar la introducción del cassette en el cromosoma bacteriano<sup>[72]</sup>. En *S. aureus* se han identificado siete tipos de complejo *ccr*: tipo 1 (*ccrA1B1*), tipo 2 (*ccrA2B2*), tipo 3 (*ccrA3B3*), tipo 4 (*ccrA4B4*), tipo 5 (*ccrC*), tipo 6 (*ccrA1B6*) y tipo 7 (*ccrA1B3*).

- Complejo del gen *mec*: formado por el gen *mecA*, sus genes reguladores y las secuencias de inserción asociadas. Se distinguen cinco tipos que se diferencian en los genes reguladores y en las secuencias de inserción.
- *Regiones J*: formada por elementos no esenciales para el cassette. Estas regiones pueden llevar genes responsables de resistencias a antibióticos diferentes a los  $\beta$ -lactámicos que han sido transmitidos a través de plásmidos o trasposones.

Se postula que los estafilococos ancestrales presentaban el gen *mecA* ya que habitaban en un entorno ambiental con presencia habitual de *Penicillium spp.* Más tarde, los clones descendientes se convirtieron en colonizadores de mucosas y piel de mamíferos y perdieron dicho gen, probablemente por la protección que les ofrecía el sistema inmunitario de mamíferos<sup>[72]</sup>.

Hasta el momento se han descrito 11 tipos de SCC*mec* I, II, III, IV (según las diferencias en la región J se diferencian; IVa, IVb, IVc, IVd, IVg, IVh, IVi, IVj), V, VI VII, VIII, IX, X, XI. En la **Tabla 1** se muestra el año lugar y el autor que describió cada cassette<sup>[73]</sup>.

Tabla 1. Identificación de cada tipo de cassette

TIPO DE SCC <i>mec</i>	PAÍS DE ORIGEN	FECHA DE AISLAMIENTO	DESCRIPCIÓN
I	UK	1961	(Ito <i>et al.</i> , 2001) <sup>[74]</sup>
II	Japón	1982	(Ito <i>et al.</i> , 1999) <sup>[75]</sup>
III	Nueva Zelanda	1985	(Ito <i>et al.</i> , 2001) <sup>[74]</sup>
IVa	USA	1999	(Ma <i>et al.</i> , 2002) <sup>[76]</sup>
IVb	USA	1996	(Ma <i>et al.</i> , 2002) <sup>[74]</sup>
IVc	Japón	(No se dispone)	(Ito <i>et al.</i> , 2003) <sup>[77]</sup>
IVd	Japón	1982	(Ma <i>et al.</i> , 2006) <sup>[78]</sup>
IVg	Corea	2003	(Kwon <i>et al.</i> 2005) <sup>[79]</sup>
IVh	Finlandia	2002	(Milheirico <i>et al.</i> , 2007) <sup>[80]</sup>
IVi	Suecia	1999	(Berglund <i>et al.</i> , 2009) <sup>[81]</sup>
IVj	Suecia	1990	(Berglund <i>et al.</i> , 2009) <sup>[81]</sup>
V	Australia	1999	(Ito <i>et al.</i> , 2004) <sup>[82]</sup>

Los cassettes SCCmec I, II, III, se caracterizan por presentar un gran tamaño, por lo que se distribuyen solo en determinados linajes SARM<sub>[67]</sub>. Además del gen *mecA* presentan otros genes que codifican la resistencia a antimicrobianos no  $\beta$ -lactámicos y se asocian a clones HA-MRSA, explicando así el fenómeno de multirresistencia de las cepas nosocomiales<sub>[37], [88]</sub>.

Por otro lado los tipos de cassette SCCmec IV, V y VI se asocian a clones CA-MRSA y se caracterizan por presentar solo el gen *mecA* y un tamaño pequeño, por lo que presentan mayor sensibilidad antibiótica, movilidad y están asociados con mayor variedad de linajes<sub>[67], [70], [72]</sub>. Sin embargo, los cassette SCCmec IV y V también se encuentran en clones LA-MRSA<sub>[89]</sub> y HA-MRSA, como por ejemplo; EMRSA-15 (ST22-MRSA-IV), ST217-MRSA-IV y ST125-MRSA-IV. Los cassettes VII y VIII se encuentran en clones HA-MRSA y CA-MRSA<sub>[90-91]</sub>. Los tipos de cassette SCCmec IX y X se asocian a clones LA-MRSA y están estrechamente relacionados con las especies *S. epidermidis* y *S. haemolyticus* manifestando la posible transmisión horizontal del cassette entre especies y sugiriendo la probable emergencia de nuevos cassettes mediante este mecanismo de transmisión<sub>[86]</sub>. Finalmente el cassette SCCmec tipo XI ha sido asociado a clones LA-MRSA y presenta el gen *mecC*, el cual se caracteriza por presentar un nuevo alotipo de gen *mecA* y genes reguladores *mecI* y *mecR1*, que no es detectado por las PCR actuales del gen *mecA*. Asimismo, presenta regiones J muy diferentes a las descritas en otros cassettes SCCmec<sub>[87]</sub>. Por otro lado codifica una PBP<sub>2c</sub> que tiene la misma función que la PBP<sub>2a</sub>, pero no es detectada mediante los ensayos actuales de aglutinación frente PBP<sub>2a</sub><sub>[53]</sub> y presenta una mayor afinidad por oxacilina, por lo que se muestra como resistente a cefoxitina pero con una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) frente oxacilina dentro del rango de sensibilidad<sub>[92]</sub>. Por otro lado, los cassettes SCCmec no son exclusivos de SARM y están presentes en diferentes estafilococos coagulasa negativos; estos últimos pueden actuar como reservorios para la posterior transmisión horizontal y facilitar la aparición de nuevos clones SARM<sub>[87]</sub>. Finalmente, existen SCC con estructura muy similar a la del SCCmec que no contienen el gen *mecA*, pero sí otros genes característicos como genes capsulares de resistencia al ácido fusídico y operón de resistencia a mercurio.

## 9. Clasificación de SARM

Los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de Atlanta CDC del año 2008<sub>[93]</sub>, definen como Infección Asociada a Cuidados Sanitarios aquellas rela-

cionadas con la presencia de un agente infeccioso o sus productos en asociación con la exposición a centros sanitarios, procedimientos o tratamientos e Infección comunitaria como aquella que está presente o incubándose en el momento del ingreso, siempre y cuando no tenga relación con la asistencia sanitaria.

Independientemente de estas definiciones, existe otro tipo de clasificación que diferencia los aislamientos SARM según sus características genéticas como: aislamientos asociados a cuidados sanitarios (HA-MRSA), aislamientos asociados a la comunidad (CA-MRSA) y aislamientos asociados al ganado (LA-MRSA).

### 9.1. SARM asociado a cuidados sanitarios (HA-MRSA)

Se trata de cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina causantes de las infecciones hospitalarias y de las asociadas a los cuidados sanitarios por SARM. Fueron los primeros clones detectados y los responsables del gran aumento de SARM en los hospitales durante los años ochenta y noventa. Derivan en su mayoría de los complejos clonales CC5, CC8, CC22, CC30 y CC45<sup>[94]</sup>. Se caracterizan por ser portadores de cassettes *SCCmec* de gran tamaño (frecuentemente los tipos I, II y III, aunque también destaca el tipo IV)<sup>[37], [90]</sup>, razón por la cual estos tipos de *SCCmec* presentan menor movilidad y diseminación y se restringen a unos determinados linajes de SARM<sup>[67]</sup>. Por otro lado los clones HA-MRSA al ser portadores de estos cassettes suelen presentar multirresistencia antibiótica. Las infecciones causadas suelen afectar a pacientes con factores de riesgo predisponentes tales como cirugía, sondas urinarias permanentes, etc.<sup>[66]</sup>

### 9.2. SARM asociado a la comunidad (CA-MRSA)

Se trata de cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina causantes de las infecciones en individuos jóvenes sin factores de riesgo, causando desde infecciones leves de tejido blando como forúnculos, hasta infecciones más graves como fascitis necrosante y neumonía necrotizante con una letalidad cercana al 75%<sup>[95]</sup>. Las infecciones causadas por estos aislamientos emergieron en los años 90 entre individuos sanos pertenecientes a comunidades aborígenes de Australia y posteriormente en 1997 comenzó a detectarse en EE.UU. presentando actualmente una gran importancia en esta región.

En cuanto a su origen difiere de los de HA-MRSA en que generalmente no pertenece a los mismos Complejos Clonales epidémicos, presentando un linaje diferente<sup>[65-67]</sup>, de hecho se postula que estos clones emergen cuando los clones preva-

lentes locales de SAMS adquieren el cassette *SCCmec* explicando de este modo la gran diversidad clonal de los CA-MRSA<sub>[95–96]</sub>.

Las infecciones por estos clones son causadas mayoritariamente por los linajes ST1-MRSA-IV (USA400), ST8-MRSA-IV (USA300), ST30-MRSA-IV, ST59-MRSA-IV y ST80-MRSA-IV<sub>[66]</sub>. Se caracterizan por ser portadores de cassettes *SCCmec* de tipo IV y V, los cuales presentan un tamaño pequeño y por tanto son más fácilmente transmisibles por lo que se encuentran en un gran número de linajes de SARM<sub>[67]</sub>. Asimismo presentan escasa resistencia antibiótica a grupos no  $\beta$ -lactámicos y suelen expresar la Leucocidina de Pantón-Valentine (PVL)<sub>[96]</sub>. Sin embargo esta característica no es exclusiva de ellos. En un estudio realizado en Grecia encontraron que el 72% de los aislamientos CA-MRSA y un 23% de los aislamientos HA-MRSA eran PVL positivos<sub>[97]</sub>.

Los factores de riesgo para el desarrollo de CA-MRSA incluyen aquellos en los que se produce un contacto estrecho con personas portadoras de CA-MRSA, por ejemplo tener un miembro de la familia perteneciente a un país con altas tasas de prevalencia de CA-MRSA, permanecer en lugares multitudinarios, escasa higiene, compartir objetos personales y realizar deportes de contacto, siendo el factor de riesgo más importante en muchos países Europeos viajar a países con altas tasas de prevalencia de CA-MRSA<sub>[95]</sub>. Estos clones suelen ser portadores de la PVL y suelen ser sensibles a clindamicina, trimetropim-sulfametoxazol y tetraciclinas<sub>[31]</sub>.

### 9.3. SARM asociado al ganado (LA-MRSA)

Se trata de cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina presentes en animales que colonizan o infectan al ser humano mediante el contacto estrecho por la actividad profesional. Aunque los animales se encuentran principalmente colonizados por SARM, se han descrito infecciones por estas cepas en caballos y cerdos. El impacto del reservorio de SARM en el ganado está actualmente en estudio; se estima que cerca del 23–38% de las personas que trabajan en contacto con cerdos y terneros SARM positivos están colonizados por este microorganismo, tratándose de una transmisión zoonótica. En áreas donde existe una alta prevalencia de este tipo de clones se observa un continuo aporte desde el reservorio animal a los hospitales. De hecho la transmisión nosocomial ya ha sido documentada, causando infecciones severas tales como endocarditis, infección del tejido blando y neumonías asociadas a ventilación<sub>[95]</sub>. Otra posible fuente es el consumo de carne contaminada<sub>[95]</sub>.

La mayoría de estos clones pertenecen al CC398, aunque también se han detectado en otros CC: CC5, CC9, CC30, y CC97<sub>[98]</sub> y suelen ser resistentes a tetraciclina, ya que es un antibiótico ampliamente utilizado en ganadería<sub>[99]</sub>.

#### 9.4. SARM esporádico

La evolución de los aislamientos SARM esporádicos, tal y como citamos anteriormente probablemente deriven de los cinco CC mayoritarios. Sin embargo su evolución, se puede clasificar dentro de cuatro grupos:

- Aislamientos que filogenéticamente están muy distantes de los aislamientos epidémicos, presentando una mayor similitud a los aislamientos comunitarios como la presencia de cassette *SCCmec* IV o V, producción de la toxina PVL, perfil de resistencia limitado..., proponiendo su origen a partir de clones comunitarios y su traslado al hospital sin conseguir una adaptación suficiente al medio hospitalario<sup>[64]</sup>.
- Aislamientos que filogenéticamente están muy cercanos a los aislamientos epidémicos pero que poseen distinto tipo de cassette *SCCmec*, siendo esta la posible causa de su menor diseminación.
- Aislamientos descendientes de una única generación de los aislamientos epidémicos pero que presentan diferente contenido en genes de resistencia por ejemplo la ausencia de genes de resistencia frente a iones cuaternarios que se usan como desinfectante en el ambiente hospitalario.
- Aislamientos que representan el paso intermedio entre el ancestro y la cepa epidémica.

## 10. Epidemiología molecular de SARM a nivel mundial

La vigilancia de SARM en instituciones sanitarias se ha realizado de forma extensa en Norte América y Europa, permitiendo la identificación de nuevos clones CA-MRSA y más recientemente de clones LA-MRSA. Sin embargo, estas regiones cuentan con menos de un tercio de la población mundial por lo que no se conoce claramente la epidemiología de SARM<sup>[100]</sup>. Además, en solo dos décadas se han encontrado grandes cambios en estas regiones<sup>[101]</sup>, siendo la inmigración una posible causa<sup>[100]</sup>.

### 10.1. Epidemiología molecular en el Sudeste del Pacífico (Australia, Nueva Zelanda y Polinesia)

Según los datos aportados por el grupo Australiano de resistencia antimicrobiana<sup>[102, 103]</sup> y el Instituto de la Ciencia Ambiental y de Investigación de Nueva Zelan-

da<sup>[104]</sup>, los patrones de resistencia de *S. aureus* han cambiado en la última década principalmente debido a la emergencia a nivel hospitalario de los clones CA-MRSA. La proporción de los aislamientos SARM entre los aislamientos de *S. aureus* a nivel hospitalario se ha mantenido estable entre los años 2005 (31.9%) y 2011 (30.3%). Sin embargo, a pesar del predominio de los clones HA-MRSA destacando el clon ST22-MRSA-IV (EMRSA-15), que se introdujo en los años 2000 por la incorporación de sanitarios de otros países al sistema de salud y el clon ST239-MRSA-III que había sido endémico en Australia desde 1970, hoy día se observa la creciente incorporación al ámbito hospitalario de clones CA-MRSA, que se caracterizan por su gran diversidad debido al aislamiento geográfico y a la presencia de diferentes comunidades indígenas.

Destacan como clones CA-MRSA predominantes: ST93-MRSA-IV, ST30-MRSA-IV, ST1-MRSA-IV, ST45-MRSA-IV, ST8-MRSA-IV (USA300) y ST5-MRSA-IV en Australia y ST5-MRSA-IV, ST30-MRSA-IV, ST8-MRSA-IV (USA300), ST93-MRSA-IV y ST1-MRSA-IV en Nueva Zelanda.

Varios de los clones CA-MRSA encontrados se caracterizan por la expresión de la toxina de Pantón-Valentine, hecho que no extraña si se tiene en cuenta que el 56% de los aislamientos SAMS de esta región presentan esta característica<sup>[101]</sup>.

## 10.2. Epidemiología molecular en África Subsahariana

Debido a la falta de programas de Vigilancia de control de la infección y de infraestructuras para la realización de estudios microbiológicos en esta región, se desconoce la verdadera epidemiología de SARM. Encontramos diferentes tasas de prevalencia de SARM entre los aislamientos clínicos de *S. aureus* en función del país analizado: 3% Ghana, 20% Nigeria, 45% Algeria, destacando la alta frecuencia (>55%) de SAMS codificadores de la toxina de Pantón-Valentine pertenecientes a los complejos clonales CC1, CC15, CC30, CC121 and CC152<sup>[105]</sup>, postulando que probablemente sean estos los ancestros de los actuales clones CA-MRSA<sup>[106]</sup> o bien actúen como posibles reservorios para la emergencia de clones PVL positivos<sup>[100]</sup>.

## 10.3. Epidemiología molecular en América Latina

Según el Informe Anual 2008 de la Red de Monitorización/Vigilancia de la Resistencia a los Antibióticos de la Organización Panamericana de Salud<sup>[107]</sup>, la prevalencia de SARM entre los aislamientos clínicos de *S. aureus* difiere de unos países a otros: Argentina 45%, Panamá 30%, Bolivia 61%, Guatemala 66%, Paraguay 40%, Ecuador



33%, El Salvador 51%, Venezuela 29%, Honduras 27%, Nicaragua 52%, Uruguay 37%, Perú 72%, Republica Dominicana 29% y Cuba 53%.

Los clones HA-MRSA predominantes son ST5-MRSA-I (Clon Chileno/Cordobés) y el clon ST239-MRSA-III (Clon Brasileño); sin embargo se observa un incremento en la prevalencia de infecciones nosocomiales causadas por clones CA-MRSA destacando el clon ST8-MRSA-IV (USA300), ST30-MRSA-IV y ST5-MRSA-IV<sub>[108-109]</sub>.

#### 10.4. Epidemiología molecular en Oriente Próximo

La proporción de aislamientos SARM entre los aislamientos clínicos de *S. aureus* difiere de unos países a otros: Israel 35%<sub>[110]</sub>, Gaza 45%<sub>[66]</sub>, Egipto y Chipre >50%<sub>[111]</sub> y lo mismo ocurre en su distribución clonal. En Israel los clones más comunes a nivel hospitalario son ST228-MRSA-I (clon del sur de Alemania), ST5-MRSA-II (New York-Japan), ST45-MRSA-IV (Berlín), EMRSA-2/-6 y ST247-MRSA-I (Ibérico), no destacando la presencia de clones CA-MRSA. Sin embargo en Jordania, Líbano, Egipto y Algeria destaca la alta prevalencia de clones CA-MRSA tipo ST80-MRSA-IV, tanto en la comunidad como a nivel hospitalario<sub>[66]</sub>.

#### 10.5. Epidemiología molecular en Asia

##### **Asia del Este: Taiwán, Corea y Japón**

Antes de 1980 los aislamientos SARM eran muy infrecuentes en esta región. Su incidencia se incrementó notablemente en los siguientes 20 años. Sin embargo, tanto en Japón como en Taiwán se ha observado una disminución en los aislamientos SARM con respecto a los aislamientos clínicos de *S. aureus*, representando el 68.8% de los aislamientos en el año 2000 a 55.9% en 2010 en Taiwán y el 71.6% en el año 2001 al 41% en 2011 en Japón.

Por otro lado, Corea presenta la tasa más elevada de aislamientos SARM, no mostrando una gran disminución entre los aislamientos SARM con respecto a los aislamientos clínicos de *S. aureus* obtenidos en los periodos 2006 (77.6%) a 2011 (73%).

Los clones predominantes en Taiwán y Corea fueron ST239-MRSA-III, ST241-MRSA-III, ST5-MRSA-II, destacando la emergencia de los clones CA-MRSA ST59 y ST72-MRSA-IV en cada país como emergentes de causa de infección nosocomial.

En Japón destaca el clon ST5-MRSA-II<sub>[112]</sub>.

## Hong Kong y China

En China durante los años 90 hasta principios de los años 2000 la tasa de los aislamientos SARM entre los aislamientos clínicos de *S. aureus*, era relativamente baja 13–27,8%. Sin embargo a mediados de los 2000 se incrementó notablemente 50–62%, para finalmente disminuir a una tasa del 45.8% en el año 2011<sup>[112]</sup>.

En Hong Kong durante los años 90 hasta principios de los años 2000 la tasa de los aislamientos SARM entre los aislamientos de *S. aureus* fue del 73.8%. Posteriormente a mediados de los años 2000 disminuyó al 56.8% para alcanzar finalmente una tasa del 28% en el año 2011. Los clones predominantes en Hong Kong fueron: ST239–MRSA–III (77,1%), ST5–MRSA–II (15,5%) destacando la emergencia del clon CA–MRSA ST45–MRSA–IV como causa de infección nosocomial. Mientras que en China continúa destacando el clon ST239–MRSA–III *S. aureus*<sup>[112]–113]</sup>.

## Sureste Asiático

La tasa de aislamientos SARM entre los aislamientos clínicos de *S. aureus* en Filipinas, Tailandia y Vietnam fue de 38.1%, 57% y 74.1% respectivamente durante el periodo 2004–2006. Los clones predominantes difieren de unos países a otros destacando el clon ST239–MRSA–III en Singapur y el predominio de los clones CA–MRSA ST22–MRSA–IV y ST45–MRSA–IV en el este de Asia<sup>[112]</sup>.

## Sur de Asia

La tasa de aislamientos SARM entre los aislamientos clínicos de *S. aureus* en la India en el año 2009 y 2011 se estableció de 41% y 45% respectivamente mediante dos estudios multicéntricos y en Pakistán del 41.9% durante el periodo 2006–2008. En ambos países predomina el clon ST239–MRSA–III<sup>[112]</sup>.

## 10.6. Epidemiología molecular en EE.UU.

La tasa de aislamientos SARM en EE.UU. entre los aislamientos clínicos de *S. aureus* durante 2011 se estima del 51%, presentando un valor mínimo de 39% en la región del pacífico y un valor máximo del 60% en las regiones del sur este y centro de EE.UU.. La distribución clonal actual se caracteriza por un claro predominio (61%) del clon USA 300, seguido por el (18%) clon USA100<sup>[114]</sup>.

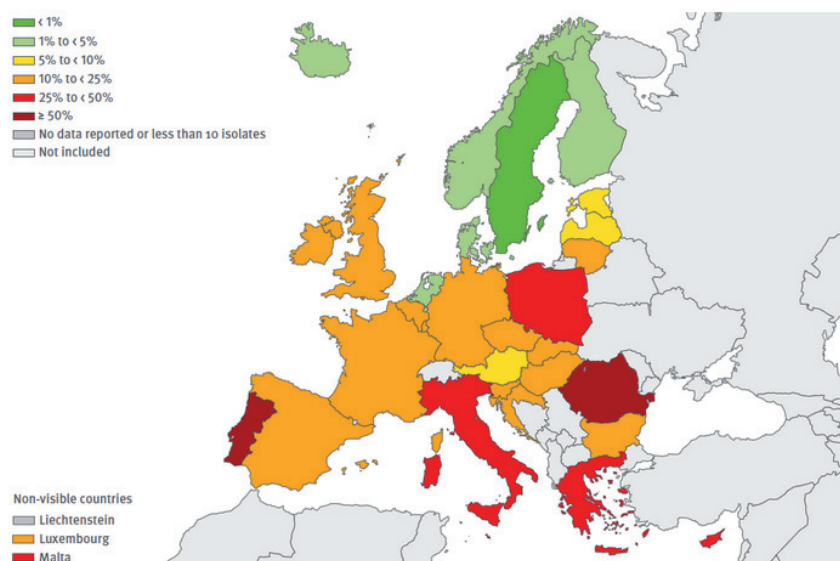
### 10.7. Epidemiología molecular en Canadá

Según el estudio CANWARD la proporción de aislamientos SARM entre los aislamientos clínicos de *S. aureus* en el periodo 2007 a 2011 fue del 23.3%, siendo el 68.9% clones HA-MRSA y el 28.9% clones CA-MRSA. La distribución clonal se caracterizó por un predominio (58,1%) del clon USA100/800 seguido del clon (22.1%) USA300. Aunque las cepas HA-MRSA continúan siendo las más predominantes en el ambiente hospitalario, se observa un incremento en la prevalencia de infecciones nosocomiales causadas por clones CA-MRSA destacando el clon ST8-MRSA-IV (USA300)<sup>[115]</sup>.

### 10.8. Epidemiología molecular en Europa

En Europa según los datos aportados por la red de vigilancia de resistencia antimicrobiana europea (EARSS) en el año 2012<sup>[53]</sup>, la media del porcentaje de aislamientos SARM entre los aislamientos clínicos de *S. aureus*, disminuyó significativamente desde 23.2% en 2009 a 17.8% en 2012. El rango observado en los porcentajes de aislamientos SARM en el año 2012 fue de 0.7% al 53.9%. La distribución de países europeos por porcentajes de resistencia fue: < 1% Suecia, 1–5% Dinamarca, Finlandia, Islandia, Países Bajos y Noruega, 5–10% Austria, Letonia y Estonia, 10–25% Eslovenia, Bélgica, Bulgaria, Croacia, Republica Checa, Francia, Alemania, Hungría, Irlanda, Luxemburgo, Reino Unido, Eslovaquia y España, 25–50% Grecia, Italia, Malta y Polonia y >50% Portugal y Rumania<sup>[53]</sup>.

Figura 8. Distribución de países europeos por porcentajes de resistencia.



Fuente: European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net), 2012.

En Europa la prevalencia de CA-MRSA es baja comparado con EE.UU. Sin embargo ésta incrementándose sobre todo en países donde la incidencia de HA-MRSA es baja como Dinamarca y Suecia donde se estima que representan sobre el 29–56% de los aislamientos SARM<sub>[95], [97]</sub>. En Polonia se observa un predominio del clon ST239-MRSA-III y ST247-MRSA-I<sub>[116]</sub>. En Croacia se observa un predominio (78%) del clon ST111-MRSA-I<sub>[117]</sub>. En Grecia se observa un predominio (60.8%) del clon ST239-MRSA-III, seguido (11.2%) del clon CA-MRSA ST80-MRSA-IV<sub>[97]</sub>. En Italia predominan (57%) el clon ST228-MRSA-I, seguido por los clones ST22-MRSA-IV (EMRSA-15) y ST8-MRSA-IV<sub>[118]</sub>. En Portugal se observa un predominio del clon EMRSA-15, mientras la prevalencia de aislamientos CA-MRSA permanece baja (<3%)<sub>[65]</sub>.

### 10.9. Epidemiología molecular en España

En España SARM no fue un problema epidemiológico hasta 1980. En 1981 Trallero *et al.*<sub>[119]</sub>, informaron del primer brote de infecciones por SARM en el norte de la Península y posteriormente se diseminó ampliamente.

Durante el periodo 1986–2002, se observó un aumento de los aislamientos SARM entre los aislamientos clínicos de *S. aureus* desde el 1,5% hasta el 31,2%. En 2006 este valor se situó en el 29,2%, marcando así un punto de inflexión y rompiendo la tendencia creciente observada desde 1986<sub>[120]</sub>.

Durante 1989 el clon Ibérico ST247-MRSA-I fue predominante. En el año 2002, según el estudio de prevalencia multicéntrico de Cuevas *et al.*, en el año 2002<sub>[121]</sub> el 43,3% de los aislamientos SARM pertenecieron al clon ST125-MRSA-IV, el 5,2% al EMRSA-16, el 1,5% al clon ST247-MRSA-I (Ibérico), el 0,7% al clon ST-239-MRSA-III (Brasileño); no se hallaron aislamientos del clon EMRSA-15. El SCCmec más frecuentemente encontrado fue el tipo IV representando el 68,7% de los aislamientos. En el año 2003 Vindel *et al.*<sub>[122]</sub> encontraron que el 50,3% de las infecciones nosocomiales eran causadas por el clon ST125, mientras el SCCmec tipo IV representaba el 86,7% de los aislamientos. Rodríguez-Baño *et al.*<sub>[123]</sub> mediante un estudio multicéntrico prospectivo realizado el mismo año obtuvieron que el 71% de los aislamientos SARM de adquisición nosocomial y asociados a cuidados sanitarios pertenecía al CC5. Otros clones detectados fueron EMRSA-16 (encontrado en las Islas Canarias y Galicia) y EMRSA-15 (encontrado en Mallorca).

Los clones de SARM comunitarios detectados estaban relacionados con el clon USA300.

En el año 2009 otro estudio realizado en el norte de España en 16 hospitales durante el periodo de Febrero a Mayo de 2009, obtuvieron que el CC más frecuente fue el CC5 (81,8%), seguido de CC8 (9,8%), CC22 (2,6%) y CC30 (1,5%). El clon predominante fue el ST125 (44,6%), seguido por ST8 (9,7%)<sup>[124]</sup>.

En cuanto a la distribución clonal actualmente en España destaca el clon ST125-MRSA-IV<sup>[124-125]</sup>, mientras que la prevalencia de aislamientos CA-MRSA permanece baja sobre el 5%<sup>[126-127]</sup>, destacando el clon ST8-MRSA-IVc y ST8-MRSA-IVa (USA300)<sup>[37]</sup>.

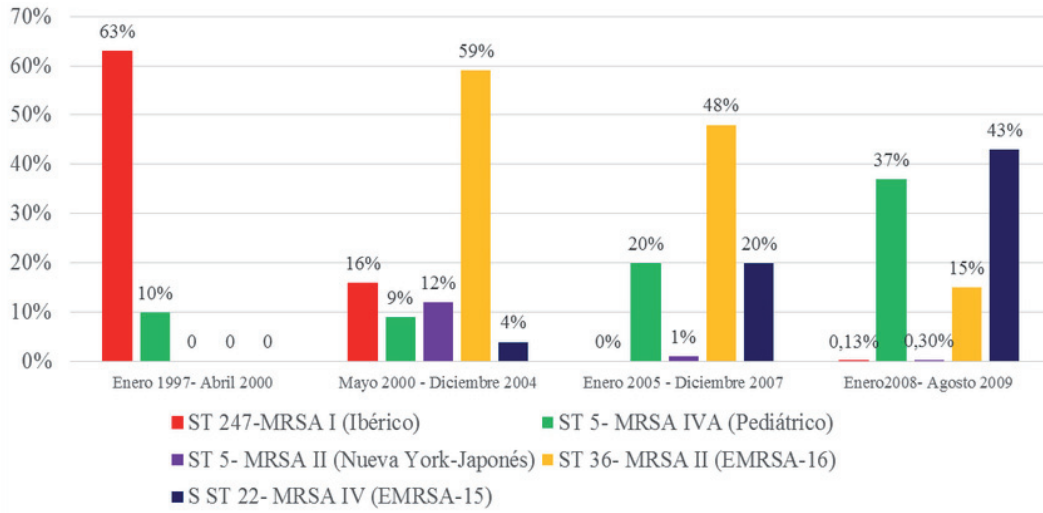
#### 10.10. Epidemiología molecular de SARM en el HUC

En el Hospital Universitario de Canarias la presencia de SARM ha sido endémica desde principios de los años 90, alcanzando cifras de incidencia de infección por SARM cercanas al 32%<sup>[128]</sup>. Paulatinamente se han ido introduciendo las precauciones de contacto para aquellos pacientes portadores de SARM y medidas de control de la infección nosocomial. Fruto de esta situación y en colaboración con la Universidad de la Laguna, se elaboraron dos Tesis Doctorales que estudiaron la epidemiología de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina en el Hospital Universitario de Canarias. Durante el periodo Enero 1997-Abril 2000 destacó el clon Ibérico representando el 63% de los aislamientos, seguido del clon Pediátrico (10%)<sup>[129]</sup>. Posteriormente desde Mayo 2000 hasta Diciembre 2004 se observó un cambio en el clon predominante; EMRSA-16 (65.21%) seguido de ST5-MRSA-II (Nueva York-Japonés) (10.72%), ST247-MRSA-I (Ibérico) (9.19%), ST5-MRSA-IVA (Pediátrico) (8.32%) y EMRSA-15 (6.56%)<sup>[130]</sup>.

En el año 2005 de 196 aislamientos de SARM se identificaron 54 clones, correspondiendo 38 (70%) al clon EMRSA-16, 10 (19%) al clon EMRSA-15, 5 (9%) al clon Pediátrico y 1 (2%) al clon New York-Japan. Por otro lado, en el año 2006 de 152 aislamientos de SARM se identificaron 116 correspondiendo 45 (38%) al clon EMRSA-16, 38 (33%) al clon Pediátrico, 30 (26%) al clon EMRSA-15, 2 (2%) al clon New York-Japan y 1 (1%) al clon Ibérico. En 2007 de 182 aislamientos de SARM se identificaron 94, correspondiendo 37 (39%) al clon EMRSA-15, 34 (36%) al clon EMRSA-16, 23 (24%) al clon Pediátrico. Finalmente en 2008 se introdujo en nuestro hospital un Sistema de Vigilancia Activa frente SARM lo que condujo a su vez a la elaboración de otra tesis Doctoral que estudió el impacto clínico y epidemiológico de la implantación de este sistema durante el periodo Febrero 2008-Agosto 2009<sup>[128]</sup>, donde se observó como el clon EMRSA-15 seguido por el clon Pediátrico se convertían en los predominantes desplazando al clon

EMRSA-16. La aparición de estos cambios clonales hacen necesario continuar el estudio epidemiológico clonal y su repercusión clínica.

Figura 9. Representación de la distribución clonal en el HUC en los periodos comprendidos entre Enero 1997 y Agosto 2009.



### III. Justificación y Objetivos

*Staphylococcus aureus* meticilin resistente, es un microorganismo que por su propagación y distribución mundial, junto con su capacidad de adaptación a las condiciones adversas, le han llevado a ser uno de los microorganismos multirresistentes más importantes causante de infecciones invasivas, suponiendo un aumento en las tasas de mortalidad y un coste adicional en el sistema sanitario debido al incremento de estancia hospitalaria que supone la infección por este microorganismo. De hecho, en Europa se estima sobre 1 millón de días extras de hospitalización como consecuencia de las infecciones por SARM suponiendo un coste adicional de 570 millones de dólares<sup>[27]</sup>.

La epidemiología de SARM ha cambiado a lo largo de los últimos años. El primer aislamiento descrito en 1961 fue un clon SARM asociado a cuidados sanitarios (HA-MRSA). Las infecciones causadas por los clones de esta categoría afectan predominantemente a individuos con comorbilidades y otros factores de riesgo<sup>[28]</sup>.

En los últimos 20 años se han notificado infecciones causadas por otros clones pertenecientes a linajes genéticos diferentes a los anteriores denominados clones SARM comunitarios (CA-MRSA) y asociados al ganado (LA-MRSA) entre pacientes sanos<sup>[95]</sup>, además en el panorama actual de la epidemiología molecular de SARM se observa una extensa diversidad genética entre los aislamientos esporádicos<sup>[160]</sup> y la emergencia de clones que contienen el cassette *SCCmec XI*<sup>[92]</sup>.

Diferentes estudios han documentado como tanto las colonizaciones hospitalarias como extrahospitalarias por SARM pueden incrementar el riesgo de padecer infecciones posteriores por este microorganismo en diferentes localizaciones<sup>[38-40]</sup>. La colonización por SARM en fosa nasal es uno de los factores de riesgo más importantes para el posterior desarrollo de infección por este microorganismo<sup>[41]</sup>. De hecho se estima que la tasa de infección posterior en diferentes localizaciones entre pacientes colonizados es del 30%.

La Vigilancia Activa se basa en la detección precoz del reservorio de pacientes con colonización asintomática mediante la búsqueda activa a través de la realización de cultivos de cribado. Este cribado se centra principalmente en detectar pacientes portadores nasales de SARM, ya que de esta forma se identifican a la mayoría de los pacientes colonizados, aunque se puede aumentar la sensibilidad de detección si se añaden cultivos de exudados de faringe, aspirado traqueal (en pacientes intubados), piel perineal o perirectal. En algunos estudios las muestras se obtienen



en el momento de ingreso o traslado desde o hacia unidades determinadas (p. ej., UCI) y otros realizan los cultivos de forma periódica, generalmente semanal en unidades de alto riesgo. La realización de cultivos de cribado se recomienda en todas las guías de control de SARM, si bien la identificación de pacientes o situaciones en las que deben realizarse es motivo de debate<sup>[57]</sup>.

En el Hospital Universitario de Canarias la presencia de SARM ha sido endémica desde principios de los años 90, alcanzando cifras de incidencia de infección por SARM cercanas al 32%<sup>[128]</sup>. Paulatinamente se han ido introduciendo las precauciones de contacto para aquellos pacientes portadores de SARM y medidas de control de la infección nosocomial.

En la actualidad, aunque la prevalencia de estas cepas ha ido disminuyendo por las medidas de vigilancia y control aplicadas en los centros sanitarios, sin embargo sus características de elevada multirresistencia a los antibióticos, variabilidad genética, hacen que el estudio de estas cepas multirresistentes sea de gran interés en salud pública y en el ámbito hospitalario.

Así pues los objetivos de nuestro trabajo han sido:

1. Describir las características demográficas de los pacientes colonizados y/o infectados por SARM y las características epidemiológicas y clínicas de los episodios SARM durante el periodo de estudio 2009–2010.
2. Identificar los aislamientos de SARM obtenidos mediante marcadores genéticos y la aplicación de técnicas moleculares de secuenciación, para determinar los clones circulantes en el HUC durante el periodo de estudio y analizar el posible reemplazamiento clonal respecto a periodos anteriores.
3. Caracterizar aquellos clones en los que se detecta posterior desarrollo de infección.
4. Valorar la aparición y frecuencia de la infección comunitaria por CA-MRSA durante el periodo de estudio y la presencia de cepas LA-MRSA en el ambiente hospitalario.
5. Analizar la resistencia a mupirocina en los aislamientos SARM del HUC y su evolución.

6. Analizar los diferentes patrones de resistencia antibiótica encontrados y establecer una relación entre ellos y los principales clones SARM obtenidos.
7. Explorar la relación clonal entre los aislamientos de SARM en aquellos pacientes que sean portadores nasales y presenten aislamientos en muestra clínica.
8. Identificar posibles factores de riesgo entre portadores nasales para el posterior desarrollo de Infección/colonización por SARM.

## IV. Material y métodos

## 1. Contexto del estudio

### 1.1. Centro Hospitalario

El estudio ha sido realizado en el Hospital Universitario de Canarias (HUC), un hospital terciario que cuenta con 761 camas y sirve como centro de referencia para el área norte de las islas de Tenerife y La Palma, atendiendo a una población de 425.814 habitantes.

Dispone de catorce Servicios dentro del Área Médica, once Servicios dentro del Área Quirúrgica, un Área de Ginecología y Obstétrica, un Área Pediátrica y Neonatal, así como seis Unidades de Cuidados Intensivos (UCIs) en función de las características de los pacientes a los que atienden:

- UCI: Unidad de Cuidados Intensivos con 24 camas.
- UCIC: Unidad de Cuidados Intensivos Coronarios con 12 camas.
- URPA: Unidad de Reanimación post Anestesia con 4 camas.
- UCSI: Unidad de Cuidados Semi-Intensivos de adultos con 4 camas.
- UCIN: Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales con 8 camas.
- UCIP: Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos con 4 camas.

### 1.2. Programa de Vigilancia Activa del HUC

El Hospital Universitario de Canarias desde Febrero de 2008 lleva a cabo un programa de Vigilancia Activa frente a SARM, según el cual se realizan tomas de fosas nasales para el cribado de SARM a todos los pacientes a su ingreso (exceptuando aquellos ingresados en las plantas de hospitalización de Psiquiatría, Obstetricia o Unidades Pediátricas) y en caso de obtener un resultado negativo se repite a la semana en las Unidades de Cuidados Intensivos y al mes en las plantas de hospitalización si permanece ingresado. La metodología que se sigue se puede resumir en tres fases; inicialmente se realiza la toma de muestras de exudados nasales, posteriormente estas muestras son cultivadas en el medio de cultivo cromogénico específico ChromID MRSA (bioMerieux, La Balme Les Grottes, France). Las colonias sospechosas son analizadas por el sistema Vitek2 (bioMerieux, Vitek Systems, Ha-

zelwood, Mo, USA), para obtener su identificación bioquímica y resistencia antibiótica. Finalmente se comprueba la sensibilidad a Mupirocina empleando el método de difusión en disco, tal y como describe Fuchs *et al.*, 1990<sup>[131]</sup> utilizando un disco de mupirocina de 5 µg. Considerando sensibles los aislamientos con un halo superior a 14 mm y resistentes a valores inferiores. En caso de mostrar resistencia se analiza el tipo mediante la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por E-test, tal y como describe Patel *et al.*<sup>[23]</sup>, considerando como aislamientos de bajo nivel de resistencia a mupirocina (LLR) a aquellos que presentan CMI de 8 a 64 µg/ml y alto nivel a aquellos que presentan CMI  $\geq 512$  µg/ml.

Además, en las muestras de exudado nasal procedentes de pacientes ingresados en las UCIs (UCI, UCSI, URPA y UVI) se realiza la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) a tiempo real como método molecular para el screening de SARM.

Tanto a los portadores nasales de SARM como a aquellos pacientes con muestras clínicas positivas a SARM, se les pauta un aislamiento de contacto y se instauran diferentes medidas de control de la infección:

- a) Tratamiento descolonizador con pomada mupirocina al 2% aplicada tópicamente en las fosas nasales cada ocho horas durante 5 días.
- b) Baños con jabón antiséptico de Clorhexidina 4% durante 5 días.
- c) Aislamiento de contacto mediante uso de guantes, batas desechables, habitaciones individuales o en cohortes y rigurosa higiene de manos, al tiempo que se realiza un seguimiento estrecho de la evolución del paciente hasta la negativización de tres muestras semanales consecutivas o su alta hospitalaria.

Por otro lado, en caso de que los aislamientos en fosa nasal presenten resistencia a mupirocina se realiza un cambio de tratamiento descolonizador por ácido fusídico, cada 8 horas durante 5 días. Si una vez finalizado el tratamiento descolonizador persiste o se detecta una nueva colonización nasal de SARM, se estudia de nuevo la resistencia a mupirocina, con la finalidad de detectar la emergencia de resistencia a mupirocina en clones inicialmente sensibles.

### 1.3. Cepario del Servicio de Microbiología y Medicina Preventiva

Para la conservación de cepas microbianas es necesario partir de un cultivo puro (para evitar las contaminaciones), siendo la supervivencia del 80% de las bacterias durante el tiempo de conservación. Para ello empleamos el método de conservación por congelación, por el que desde un cultivo puro de SARM se recogen varias

colonias y se introducen en un criotubo, (tubo de plástico estéril resistente a la congelación de cierre hermético) que contiene una suspensión al 15% de glicerol (agente crioprotector no iónico). Posteriormente estos se introducen en un congelador que alcanza una temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ .

De este modo, todos los aislamientos de SARM (uno por localización y paciente) procedentes de muestra clínica y exudado de fosa nasal se conservan en un cepario a  $-80^{\circ}\text{C}$ , para estudios posteriores de epidemiología molecular.

#### 1.4. Fuentes de datos

**Registros del Control de la Infección de SARM.** En el área de Medicina Preventiva, existe una base de datos Excel, en la cual se recogen diferentes datos:

- Nombre y apellidos.
- Sexo.
- Edad.
- Número de historia.
- Número de episodio.
- Muestra de aislamiento de SARM: muestra de exudado nasal y/o muestra clínica.
- Catalogación del episodio SARM en colonización/infección según los criterios de los Centers for Disease Control and Prevention (CDC 2008)<sup>[93]</sup>.
- Servicio en el que el paciente está ingresado en el momento del diagnóstico.
- Fecha de aislamiento de contacto.
- Fecha de ingreso.
- Fecha de alta.
- Fallecimiento.
- Resistencia a mupirocina en los aislamientos en fosa nasal.

**Registro de resistencias de los aislamientos SARM.** En el área de Medicina Preventiva, existe una base de datos Excel donde se recogen los antibiogramas de cada aislamiento SARM obtenidos mediante el sistema automatizado Vitek 2 (bioMérieux, Vitek Systems, Hazelwood, Mo, USA).

**Registro de cepario de SARM.** En el área de Biología Molecular existe una base de datos Excel donde se registran e identifican los aislamientos SARM de exudados nasales y muestras clínicas que son conservados en el cepario del Servicio de Microbiología y Medicina Preventiva.

**Registro de la Historia clínica.** Proporcionado por el sistema administrativo informático SAP, del Hospital Universitario de Canarias.

## 2. Diseño del estudio

Se ha realizado un estudio descriptivo retrospectivo de los factores asociados a los pacientes infectados o colonizados por SARM diagnosticados en el servicio de Microbiología y Medicina Preventiva del HUC en un periodo de dos años, así como de los antibiogramas y características moleculares de las cepas de SARM aisladas.

Asimismo se ha realizado un estudio observacional de tipo casos y control para intentar identificar factores de riesgo relacionados con el desarrollo de una infección por SARM tras tratamiento nasal descolonizador.

### 2.1. Pacientes, periodo de estudio, episodios de SARM y aislamientos SARM

En el estudio se incluyeron a todos los aislamientos de SARM obtenidos de pacientes hospitalizados en el HUC desde el 1 de Enero de 2009 hasta 31 de Diciembre de 2010, obtenidos tanto a partir de las muestras clínicas como de los exudados de fosa nasal realizados para el cribado del Sistema de Vigilancia Activa, en el Servicio de Microbiología y Medicina Preventiva.

Se definió episodio de SARM a toda colonización y/o infección detectada en un paciente durante su hospitalización, considerando como episodios diferentes a todas aquellas colonizaciones o infecciones que ocurren en distintos pacientes o en un mismo paciente siempre y cuando suceda:

- En ingresos diferentes, cuando en el primer ingreso se realizó levantamiento de aislamiento o bien el tiempo transcurrido entre el primer y segundo ingreso fue superior a treinta días.

- En el mismo ingreso cuando previamente se levantó el aislamiento.

Se recuperó un aislamiento de SARM por cada episodio, excepto en los casos que pertenecieran a localizaciones diferentes a la nasal, en cuyo caso se analizó el correspondiente a la primera muestra clínica.

## 2.2. Descripción de la recogida de datos

### 2.2.1. Estudio descriptivo

De las bases de datos descritas anteriormente se recogió la información correspondiente para obtener las características demográficas y clínicas de los pacientes, que se agruparon en las categorías siguientes:

- Datos demográficos de paciente: nombre y apellidos, sexo y edad y número de historia clínica.
- Datos administrativos: servicio al que pertenecía el paciente en el momento de la detección de SARM, fecha de ingreso, fecha de alta o óbitos.
- Clasificación de las infecciones y colonizaciones por SARM según criterios de los CDC 2008<sup>[93]</sup>.
- Datos en relación con el aislamiento de SARM: fecha de aislamiento, tipo de muestra en la que se obtiene el primer aislamiento, tipo de muestra diferente a fosa nasal en la que se obtiene un primer o segundo aislamiento. En caso de tratarse de muestras de cribado nasal, se recogió la sensibilidad a mupirocina. En todos los aislamientos (tanto de fosa nasal como muestra clínica) se analizó su perfil de sensibilidad antibiótica o antibiotipo a clindamicina, eritromicina, rifampicina, tobramicina, gentamicina, clotrimazol, teicoplanina, vancomicina y además se recogió la identificación clonal de cada aislamiento.

### 2.2.2. Estudio de casos y controles

Para la selección de los casos y controles a partir del total de la muestra se siguieron los siguientes criterios de inclusión:

**Caso:** paciente portador de SARM en fosa nasal ingresado durante al menos 5 días, que desarrolla infección o colonización por SARM en otra localización diferente a la fosa nasal tras el inicio del tratamiento de descolonización.



**Control:** paciente colonizado por SARM en fosa nasal durante un ingreso de al menos 5 días de duración y que tras el inicio del tratamiento de descolonización no desarrolla ni infección ni colonización por SARM en otra localización diferente a la fosa nasal, habiéndolo comprobado mediante la existencia de cultivos de muestras clínicas negativos a SARM.

De los pacientes que cumplieron los criterios de inclusión se recogieron además de los anteriormente descritos, los siguientes datos:

- Datos administrativos: procedencia de un centro de atención sanitaria de larga estancia.
- Datos clínicos de interés: motivo de ingreso, empleo de catéter venoso central, ventilación mecánica, sonda vesical, cirugía durante el ingreso, lesión en la piel (úlceras por presión, úlceras vasculares, quemaduras y psoriasis), enfermedad de base (diabetes, enfermedad respiratoria, enfermedad renal crónica, enfermedad hepatobiliar), morbilidades (más o menos de dos incluyendo el motivo de ingreso) hospitalizaciones y cirugía durante el año previo y aislamiento de SARM en fosa nasal durante un ingreso en el año previo.
- Datos correspondientes a las medidas de control adoptadas tras el aislamiento del SARM: tiempo de seguimiento (días), tipo de tratamiento descolonizador, demora en el tratamiento descolonizador.
- Datos en relación con el aislamiento de SARM: emergencia de resistencia a mupirocina en aquellos aislamientos inicialmente sensibles.

### 2.3. Cálculo de Indicadores

Para la obtención de los días de estancia por año y servicios se utilizaron las bases de datos proporcionadas por el departamento de Auditoría Interna del HUC.

Para conocer las tasas de colonización nasal al ingreso y durante el mismo utilizamos los siguientes indicadores:

- Prevalencia de colonización nasal total al ingreso:

$$\frac{\text{N.º de colonizaciones extrahospitalarias en fosa nasal} * 100}{\text{N.º de pacientes ingresados}}$$

- Incidencia acumulada de colonización nasal total durante el ingreso:

$$\frac{\text{N.º de colonizaciones extrahospitalarias en fosa nasal} * 100}{\text{N.º de pacientes ingresados}}$$

Para conocer la distribución de los episodios de SARM en los diferentes Servicios hospitalarios se utilizó el indicador de:

- Incidencia acumulada de SARM en los diferentes Servicios hospitalarios:

$$\frac{\text{N.º de episodios SARM en cada Servicio} * 100}{\text{N.º de pacientes en cada Servicio}}$$

Para conocer la relevancia clínica de los aislamientos SARM en muestra clínica utilizamos los siguientes indicadores:

- Prevalencia de colonización en muestra clínica total al ingreso:

$$\frac{\text{N.º de colonizaciones extrahosp. en localización diferente a la fosa nasal} * 100}{\text{N.º de pacientes ingresados}}$$

- Incidencia acumulada de colonización en muestra clínica total durante el ingreso:

$$\frac{\text{N.º de colonizaciones extrahosp. en localización diferente a la fosa nasal} * 100}{\text{N.º de pacientes ingresados}}$$

- Densidad de Incidencia total de infección nosocomial durante el periodo de estudio:

$$\frac{\text{N.º de episodios de infección por SARM nosocomial o relacionada con la asistencia sanitaria} * 1000}{\Sigma \text{ de estancias hospitalarias}}$$

- Densidad de Incidencia total de infección nosocomial durante el periodo 2009

$$\frac{\text{N.º de episodios de infección por SARM nosocomial o relacionada con la asistencia sanitaria en 2009} * 1000}{\Sigma \text{ de estancias hospitalarias en 2009}}$$

- Densidad de Incidencia total de infección nosocomial durante el periodo 2010:

$$\frac{\text{N.º de episodios de infección por SARM nosocomial o relacionada con la asistencia sanitaria en 2010} * 1000}{\Sigma \text{ de estancias hospitalarias en 2010}}$$

- Densidad de Incidencia de infección nosocomial durante el periodo de estudio por Servicios:

$$\frac{\text{N.º de episodios de infección por SARM nosocomial o relacionada con la asistencia sanitaria de cada servicio} * 1000}{\Sigma \text{ de estancias hospitalarias en cada servicio}}$$

- Densidad de Incidencia de bacteriemias hospitalarias por SARM:

$$\frac{\text{N.º de bacteriemias nosocomiales} * 10000}{\Sigma \text{ de estancias hospitalarias}}$$

## 2.4. Metodología para la identificación clonal de SARM

### 2.4.1. Recuperación de cepario

Tras el acceso al registro del cepario de SARM se descongelaron por orden numérico una serie de 22 cepas dos veces por semana. Para ello las cepas seleccionadas se mantenían a temperatura ambiente durante 5 minutos y se cultivaban en medio Agar Sangre durante 24 horas a  $37 \pm 2^\circ\text{C}$ .

### 2.4.2. Técnicas moleculares de tipificación

Para definir el nivel de relación genética entre los aislamientos SARM obtenidos y su posterior identificación clonal realizamos las siguientes técnicas.

#### 2.4.2.1. Electroforesis en corriente alterna o electroforesis de campo pulsante (PFGE)

Esta técnica se divide en tres etapas:

#### **Etapas 1ª: Lisis y Macrorrestricción**

1. A partir de cultivos puros en medios sólidos no selectivos, de no más de 18–24 horas de incubación, inocular de una a tres colonias en caldo LB (Luria Bertani) e incubar a  $37^\circ\text{C}$  durante 18–24 horas.
2. Determinar el inóculo del microorganismo mediante espectrofotometría: medir la absorbancia a 540 nm de los tubos de caldo LB, para conocer la cantidad de caldo con inóculo que hay que transferir a tubos de pico de 15 ml según la densidad óptica (D.O.) obtenida:
  - 10 ml para una D.O. de 0.6 a 0.7.

- 7 ml para una D.O. de 1.3.
  - 5 ml para una D.O. mayor de 1.5.
3. Centrifugar a 3.000 rpm durante 10 minutos.
  4. Decantar el sobrenadante.
  5. Resuspender el sedimento en 4–5ml de PET IV (10mM Tris base; 1 M NaCl)
  6. Vortear.
  7. Centrifugar 10 minutos a 3.000 rpm.
  8. Decantar el sobrenadante y resuspenderlo en 1 ml de PET IV.
  9. Preparar moldes de agarosa:
    - Limpiar los moldes de los insertos con agua y etanol y dejar secar.
    - Sellar los moldes por la parte inferior con cinta adhesiva.
    - Preparar agarosa de bajo punto de fusión (InCert agarose FMC Bioproducts; EE.UU.) al 1,6%.
    - Dispensar en tubos eppendorfs 300  $\mu$ l y mantener la solución de agarosa en un bloque térmico a 55°C.
    - Mezclar 300  $\mu$ l del inóculo con el mismo volumen de agarosa de bajo punto de fusión.
    - Rellenar los moldes para la solidificación de la mezcla.
    - Dejar solidificar en la nevera durante 40–50 minutos
  10. Lisis:
    - Una vez solidificados, los insertos se sumergieron en el tampón de lisis I (6 mM Tris HCl pH 7,6, 1 M NaCl, 100 mM EDTA pH 7.5, 0.2% deoxicolato de sodio, 0.5% sarcosilato, 0.5% brij 58, lisozima 100 mg/ml, lisostafina 15 mg/ml, RNAsa 10 mg/ml)
    - Incubar durante 24 horas a 37 $\pm$ 2°C.
    - Descantar la lisis I y añadir la solución de lisis II ( EDTA 0.5 M (pH 9–9.5); sarcosilato 1%, proteinasa K 10 mg/ml).
    - Incubar a 50°C durante 48h.
  11. Lavado de los bloques con una solución TE (10 mM Tris–HCl pH 8.0, 0.1 mM EDTA). Los lavados consisten en introducir los insertos en TE durante una hora, esta operación se repite tres veces.

12. Macrorrestricción del ADN genómico, mediante la digestión del ADN con enzimas de restricción:

- Numerar los eppendorfs que se van a utilizar.
- Depositar en su interior una porción de un tamaño similar de cada uno de los insertos.
- Preparar la solución de restricción: Por unidad hay que dispensar:
  - 143  $\mu$ l de agua estéril.
  - 20  $\mu$ l del tampón específico del enzima *Sma*I o *Apa*I (Promega™, Madison, USA).
  - 2  $\mu$ l de BSA a una concentración de 10mg/ml.
  - Menos de un cuarto del inserto.
  - 30U de *Sma*I o *Apa*I (Promega™, Madison, USA), según proceda.

13 Añadir 168  $\mu$ l de la solución de restricción a cada uno de los tubos eppendorfs que contienen el inserto correspondiente.

14. Incubar durante 16–18 horas a 30°C (*Sma*I) o a 37°C (*Apa*I).

En resumen, en esta etapa se consigue insertar una suspensión de bacterias en bloques de agarosa con el fin de proteger el ADN bacteriano. Posteriormente estos bloques son sometidos a soluciones de lisis que se encargan de fluir a través del gel de agarosa y producir la lisis bacteriana. Seguidamente se realizan lavados con el fin de arrastrar fuera del bloque de agarosa restos celulares procedentes de la lisis. Finalmente, se realiza la macrorrestricción: para ello se selecciona el enzima de restricción más adecuado en función del contenido de Guanina (G) Citosina (C) de la bacteria a analizar, eligiendo un enzima de restricción rica en Adenina y Timina en el caso de que la bacteria sea rica en G y C ya que se trata de generar pocos fragmentos de ADN y que estos sean de gran tamaño. De este modo se explora todo el cromosoma bacteriano detectando la variabilidad existente tanto en los lugares de restricción, como los lugares situados entre los diferentes lugares de restricción (**Figura 10**).

## **Etapa 2: Electroforesis en campo pulsante (PFGE)**

15. Preparación del gel de agarosa al 1% en 0.5x TBE:

- Añadir a 100 ml de TBE 0,5%, 1 g de agarosa y someter a temperatura de ebullición.
- Dejar enfriar la solución en agitación durante 30 minutos.
- Preparar el molde encajando la bandeja en el soporte.

- Seleccionar el peine correspondiente a 15 pocillos y colocar consecutivamente en cada uno de los dientes el inserto correspondiente.
  - Verter cuidadosamente la agarosa y esperar 30 minutos.
  - Colocar en los extremos y en el centro los controles de peso molecular adecuados que facilitan la comparación entre patrones y la identificación de determinados fragmentos de ADN. El peso molecular utilizado es el ADN de concatámeros del fago lambda (Lambda ladder PFGE marker, Promega) que genera fragmentos entre 50 y 500kb en incrementos progresivos de 50KB.
16. Colocación en el sistema CHEFII (Clamped Homogeneous Electric Field Electrophoresis).
- Preparar 3L de tampón de electroforesis 0.5x TBE y verter en la cubeta de electroforesis 2L aproximadamente.
  - Poner en marcha el sistema de acuerdo con los siguientes parámetros:
    - Bloque 1: 5–15 pulsos (segundos) en 12 horas.
    - Bloque 2: 15–40 pulsos (segundos) en 12 horas.
    - Voltaje: 6V/cm.
    - Temperatura: 14°C.
  - Desmontar el molde que contiene el gel y depositarlo en la cubeta de PFGE.
  - Conectar los electrodos y poner en marcha el sistema.
17. Extracción del gel y tinción.
- Desprender el gel de la cubeta y sumergirlo en 500 ml de TBE 0.5x y 2.5 µl de bromuro de etidio durante 20 minutos en agitación a temperatura ambiente.
  - Visualizar el gel en el transiluminador de luz ultravioleta y fotografiarlo.

### **Etapa 3ª: Interpretación de los patrones de bandas obtenidos**

A la hora de interpretar los patrones de PFGE, se examina la colección completa de cepas a estudiar en busca de un patrón más común entre los aislamientos. A continuación todos los otros patrones se compararan con éste y a la vez entre sí.

Para ello se utilizan los criterios de Tenover de 1995<sup>[132]</sup> quien estableció que los aislamientos con idénticos patrones de PFGE debían ser considerados como el mismo clon, mientras que los que presentaban una o dos diferencias cromosómicas por 2 eventos genéticos probablemente representaban el mismo subtipo clonal. Sin embargo los aislamientos que se diferenciaban en tres o más diferen-

cias cromosómicas causadas por 3 o más eventos genéticos presentan una alta probabilidad de pertenecer a clones diferentes. Así pues es necesario contabilizar el número de fragmentos distintos de cada cepa con todas las demás, fragmento a fragmento. En función del número de diferencias entre dos patrones clasificaremos a los aislamientos en:

- **Idénticos.** Cuando los dos aislamientos presentan el mismo número de bandas y éstas tienen aparentemente el mismo tamaño. En este caso ambos aislamientos representan la misma cepa.
- **Genéticamente relacionados.** Cuando los cambios entre los dos patrones pueden ser atribuidos a un evento genético independiente. Esto es debido a que una diferencia cromosómica, en el más desfavorable de los casos se traduce en un máximo de tres diferencias entre los patrones de bandas de un aislamiento y su ancestro.
- **Posiblemente relacionados.** Cuando los cambios entre los dos patrones pueden ser atribuidos a dos eventos genéticos independientes y se puede observar un máximo de seis diferencias entre los patrones de bandas (inserciones o deleciones de ADN; o ganancia o pérdida de lugares de restricción). Aunque estos aislamientos puedan también corresponder a una línea evolutiva común, su relación genética no es tan cercana y por tanto, es menos probable su relación epidemiológica.
- **No relacionados.** Cuando los cambios entre los dos patrones son atribuibles a tres o más eventos genéticos independientes, lo cual se traduce en un número de diferencias entre los patrones de bandas superior a 6. En este caso interpretaremos que las dos cepas pertenecen a clones distintos, sin relación epidemiológica.

#### 2.4.2.2. Análisis del ADN por secuenciación: Multilocus Sequence Typing (MLST)

Cada uno de los patrones de PFGE encontrados fue analizado por la técnica de “*Multilocus Sequence Typing*” (MLST) siguiendo el protocolo de Enright *et al.*, 2002<sup>[60]</sup>. Esta técnica se basa en la secuenciación del ADN de fragmentos internos de genes considerados “*housekeeping*” que codifican enzimas metabólicas no sometidos a presión selectiva. Se analizan solo determinadas regiones específicas de esos genes ya que el resto del locus presenta un alto grado de conservación.

Para ello es necesario que previamente se realice la extracción automática del ADN mediante el equipo Maxwell® 16 (Promega Corporation Madison, USA).

Posteriormente debemos amplificar mediante la técnica PCR los fragmentos específicos de los siete genes *housekeeping*: Carbamato Kinasa (*arcC*), Shikimate dehidrogenasa (*aroE*), Glicerol kinasa (*glpF*), Guanilato kinasa (*gmk*), Fosfato acetiltransferasa (*pta*), Trioseofosfato isomerasa (*tpi*), Acetil coenzima A acetiltransferasa (*yqjL*). Utilizando los siguientes primers (**Tabla 2**).

Tabla 2. Secuencia de primers utilizados en la PCR

GEN	PRIMER	SECUENCIA (5´- 3´)
Carbamato Kinasa ( <i>arcC</i> )	<i>arcC-Up</i> <i>arcC-Dn</i>	TTGATTCACCAGCGCGTATTGTC AGGTATCTGCTTCAATCAGCG
Shikimate dehidrogenasa ( <i>aroE</i> )	<i>aroE-Up</i> <i>aroE-Dn</i>	ATCGGAAATCCTATTTACATTC GGTGTGTATTAATAACGATATC
Glicerol kinasa ( <i>glpF</i> )	<i>glpF-Up</i> <i>glpF-Dn</i>	CTAGGAACTGCAATCTTAATCC TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC
Guanilato kinasa ( <i>gmk</i> )	<i>gmk-Up</i> <i>gmk-Dn</i>	ATCGTTTTATCGGGACCATC TCATTA ACTACAACGTAATCGTA
Fosfato acetiltransferasa ( <i>pta</i> )	<i>pta-Up</i> <i>pta-Dn</i>	GTAAAAATCGTATTACCTGAAGG GACCCTTTTGTTGAAAAGCTTAA
Trioseofosfato isomerasa ( <i>tpi</i> )	<i>tpi-Up</i> <i>tpi-Dn</i>	TCGTTTATTCTGAACGTCGTGAA TTTGCACCTTCTAACAATTGTAC
Acetil coenzima A acetiltransferasa ( <i>yqjL</i> )	<i>yqjL-Up</i> <i>yqjL-Dn</i>	CAGCATA CAGGACACCTATTGGC CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC

La PCR se realiza sobre 50 µl de volumen de reacción constituido por:

- 0.5 µl de ADN cromosómico.
- 0.5 µl de cada primer.
- 1 U de *Taq* DNA polimerasa (Qiagen , Crawley, United Kingdom)
- 5µl de 10x buffer.
- 0.2mM deoxynucleotidos trifosfatos (Perkin-Elmer Applied Biosystems; Foster City, Calif.).



La PCR fue realizada en un termociclador partiendo de un proceso de desnaturalización a 95°C, seguido de 30 ciclos de hibridación a 55°C durante 1 minuto, extensión a 72°C durante 1 minuto, nueva desnaturalización a 95°C durante 1 minuto seguido de un paso de extensión final a 72°C durante 5 minutos. Los fragmentos amplificados fueron purificados mediante electroforesis en agarosa y microcolumnas de afinidad, cuantificados y sometidos a secuenciación independiente de ambas hebras por la técnica de extensión cíclica de iniciador en presencia de deoxinucleótidos fluoresceinados. Los productos de la reacción de secuenciación fueron purificados y analizados mediante electroforesis capilar con excitación por láser y asignación automática de bases (CEQ 2000 XL, Beckman). Tras secuenciar los fragmentos internos de los genes esenciales, cada secuencia diferente de un determinado gen se considera un alelo. La identificación de cada uno de los 7 alelos genera un "perfil alélico" que consiste en una secuencia de 7 números. Cada perfil alélico define lo que se conoce como "tipo de secuencia" o "*sequence type*" (ST). La aplicación de un algoritmo matemático de agrupación, concretamente el método UPGMA, al conjunto de STs permite estimar las relaciones genéticas entre cepas. Las secuencias obtenidas se analizaron en la página web <http://www.mlst.ox.ac.uk> para la obtención de un perfil numérico que nos permitirá reconocer los clones con otros ya descritos internacionalmente y poder establecer un estudio poblacional. Observando como patrones de PFGE idénticos o que bien difieren de 2 a 5 bandas presentan idéntico MLST y otros patrones de PFGE con más de 6 bandas diferentes que presentaban el mismo MLST debido probablemente a un ancestro común entre ambos clones ya que las variaciones dentro de los genes de "*housekeeping*" son muy escasas.

#### 2.4.2.3. Tipo de Cassette Cromosómico Estafilocócico *mec* (SCC*mec* typing)

El análisis del entorno genético en el que se encuentra insertado el gen *mecA* proporciona una importante información para determinar las posibles relaciones epidemiológicas entre diferentes cepas. Tal y como anteriormente mencionamos los cassettes SCC*mec* presentan una estructura compuesta por los siguientes elementos<sup>[71]</sup>:

- Complejo del gen *mec*, formado por el gen *mecA* y sus reguladores, responsable de la resistencia a meticilina.
- Complejo del gen *ccr*, que codifica recombinasas responsables de la movilidad del cassette.

- Regiones J (J1, J2 y J3), componentes no esenciales responsables de la resistencia adicional a otros antibióticos

Por tanto, la estructura resumida del SCCmec sería J1-*ccr*-J2-*mec*-J3. Las diferentes combinaciones entre las cuatro clases del complejo del gen *mec* (A – D) y los tres alotipos del *ccr* (*ccrA*, *ccrB*, *ccrC*) definen los tipos de SCCmec. A cada uno de los tipos y subtipos de los clones encontrados mediante PFGE, se les determinó el tipo del SCCmec basándonos en el protocolo de PCR múltiple de Milheiriço C *et al.* 2007<sup>[133]</sup>, para la determinación de los cassettes SCCmec I, II, III, IV, V, VI y en el de Shore *et al.* 2011<sup>[87]</sup> para cassette XI.

- Determinación de los cassettes SCCmec I, II, III, IV, V, VI

Los primers que se utilizaron se muestran en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Primers utilizados en la PCR múltiple y región del SCCmec amplificada.

PRIMER	SECUENCIA (5´- 3´)	ESPECIFICIDAD DEL PRIMER (TIPO SCCmec, REGIÓN)
CIF2 F2 CIF2 R2	TTC GAG TTG CTG ATG AAG AAG G ATT TAC CAC AAG ACT ACC AGC	I, región J1
ccC F2 ccC R2	GTACTCGTTACAATGTTTGG ATAATGGCTTCATGCTTACC	V, <i>ccr</i> complex
RIF5 F10 RIF5 R13	TTC TTA AGT ACA CGC TGA ATC G GTC ACA GTA ATT CCA TCA ATG C	III, región J3
SCCmec V J1 F SCCmec V J1 R	TTCTCCATTCTTGTTTCATCC AGAGACTACTGACTTAAGTGG	V, región J1
dcs F2 dcs R1	CAT CCT ATG ATA GCT TGG TC CTA AAT CAT AGC CAT GAC CG	I, II, IV y VI, región J3
<i>ccrB2</i> F2 <i>ccrB2</i> R2	AGTTTCTCAGAATTCGAACG CCGATATAGAAWGGGTTAGC	II y IV, <i>ccr</i> complex
kdp F1 kdp R1	AAT CAT CTG CCA TTG GTG ATG C CGA ATG AAG TGA AAG AAA GTG G	II, región J1
SCCmec III J1 F SCCmec III J1 R	CATTTGTGAAACACAGTACG GTTATTGAGACTCCTAAAGC	III, región J1
<i>mecl</i> P2 <i>mecl</i> P3	ATC AAG ACT TGC ATT CAG GC GCG GTT TCA ATT CAC TTG TC	II y III, <i>mec</i> complex

### **Preparación de las muestras y extracción del ADN cromosómico**

1. Añadir 200 µl de suspensión de 4–5 colonias SARM en salino en un eppendorf de 1,5 ml (en campana de flujo).
2. Añadir 200 µl de Buffer de Lisis en el eppendorf y 20 µl de Proteinasa K.
3. Incubar 10 minutos a 56°C para completar la lisis celular.
4. Mientras se hace la lisis, se prepara el cartucho de extracción Maxwell® 16 viral Total Nucleic Acid purification Kit (Promega™, Madison, USA) y el eppendorf de eluido con 50 µl de Nuclease free water.
5. Pasados los 10 minutos de lisis, se pipetea todo el volumen (420 µl) en la primera posición del cartucho.
6. Programar el equipo de extracción y colocar la cubeta en el extractor e iniciar la extracción automática Maxwell® 16 (Promega™, Madison, USA).

### **Amplificación**

1. Colocar el número necesario de eppendorf para PCR en un bloque de enfriamiento.
2. Preparar el Master Mix para para 1 reacción:
  - a. 29,5 µl agua destilada.
  - b. 5 µl PCR buffer con Mg.
  - c. 0,5 µl 2,5 mM dNTPs.
  - d. 1 µl Taq.
  - e. 0,5 µl cada primer.

Añadir a cada eppendorf para PCR 45 µl del Master Mix

3. Añadir 5 µl del DNA correspondiente.
4. Amplificar en el termociclador: 94°C 5 minutos; (94°C 1 min/53°C 1 min/72°C 1 min) x 35 ciclos; 72°C 10 min; 4°C indefinido.

### **Electroforesis**

1. Llenar la cubeta de electroforesis con tampón TBE 1x (A partir de 100 mL TBE 5x en 400 mL agua).

2. Preparar gel de agarosa al 2% en TBE 1x (1 g agarosa en 50 ml TBE 1x y 0,5 µl bromuro etidio).
3. Colocar la agarosa en el soporte con el peine de pocillos anchos correspondiente para el número de muestras a estudiar y dejar solidificar.
4. Sacar el peine y colocar el gel dentro de la cubeta de electroforesis.
5. Añadir 10 µl de la muestra amplificada con colorante de carga en cada pocillo (8 µl amplificado más 2 µl colorante).
6. Añadir 6 µl de marcador molecular en el pocillo correspondiente.
7. Conectar los electrodos. El gradiente es del polo negativo al positivo.
8. Visualizar el gel en el transiluminador de luz ultravioleta y fotografiarlo.

### Obtención y expresión de los resultados

En la visualización del gel comparamos las bandas correspondiente a cada locus con las bandas del peso molecular, de esta forma identificamos cuantas bandas se observan, que peso molecular poseen y que secuencia amplificada del *SCCmec* representa. Gracias a la especificidad de estas secuencias, tal y como se explica en la **Tabla 4**, identificamos el tipo de *SCCmec* correspondiente.

Tabla 4. Identificación del cassette *SCCmec* en función del tipo de banda y su peso molecular que aparece en el gel.

PRIMER	Cif2	RIF5	ccrC	dcs	<i>SCCmecV</i>	kdp	ccrB2	Mecl	<i>SCCmec III</i>
<i>SCCmec I</i>	495			342					
<i>SCCmec II</i>				342		284	311	209	
<i>SCCmec III</i>		414						209	243
<i>SCCmec IV</i>				342			311		
<i>SCCmec V</i>			449		377				
<i>SCCmec VI</i>				342					

· Determinación del cassette SCCmec XI

La técnica PCR fue realizada en el Centro Nacional de Microbiología Instituto Carlos III, siguiendo el protocolo de Shore *et al.*[87], por el cual se realizó la amplificación de las secuencias que codifican al complejo *ccr* identificando a los alotipos *ccrA1* y *ccrB3* y al gen *mecA* modificado "*mecC*", utilizando los siguientes primers y la DNA polimeras GoTaq DNA polymerase (Promega Corporation, Madison, WI), utilizando el kit Expand Long Expand Template PCR System (Roche Diagnostics, Inc.) y siguiendo especificaciones del fabricante. Posteriormente se realizó la electroforesis de los productos de PCR en gel de agarosa y finalmente se visualizó el gel bajo luz ultravioleta.

Tabla 5. Secuencias de los Primers necesarios para la determinación del cassette SCCmec XI.

PRIMER	SECUENCIA (5´-3´)
<i>ccrB3</i> M10/0061 F1	CTACTTGAAGTTATCCAATC
<i>ccrA1</i> M10/0061 R1	CACATTACTCGCTGATTTAG
<i>mecA</i> M10/0061 F1	CCAGATATAGTAGCATTATA
<i>mecA</i> M10/0061 R1	AAAGATGACGATATTGAG

### 3. Análisis estadístico

La descripción de la muestra se realiza resumiendo las variables nominales con la frecuencia relativa de sus categorías componentes y las de escala con mediana (mínimo–máximo) debido a su alejamiento de una distribución normal de probabilidades comprobada con el test de normalidad de Kolmogorov–Smirnov.

Las comparaciones de variables nominales según la distribución conjunta observada entre sus diferentes categorías se realiza mediante la prueba  $\chi^2$  de Pearson o, de no poder ser empleada por no cumplir con el requisito necesario de valores esperados mayores a cinco por celda, la prueba exacta de Fisher cuando las tablas de contingencia son de 2x2. Las variables de escala se comparan empleando la prueba U de Mann–Whitney.

La relación clonal entre los aislamientos SARM en fosa nasal y muestra clínica se exploran mediante la estimación del coeficiente Kappa de Cohen que calcula la

concordancia libre de azar, interpretada con la escala de valoración de Landis & Koch<sup>134</sup>: <0 Sin acuerdo, 0,00–0,20 Insignificante, 0,21–0,40 Mediano, 0,41–0,60 Moderado, 0,61–0,80 Sustancial, 0,81–1 Casi perfecto. Este análisis de relación se refuerza con la obtención del dendograma.

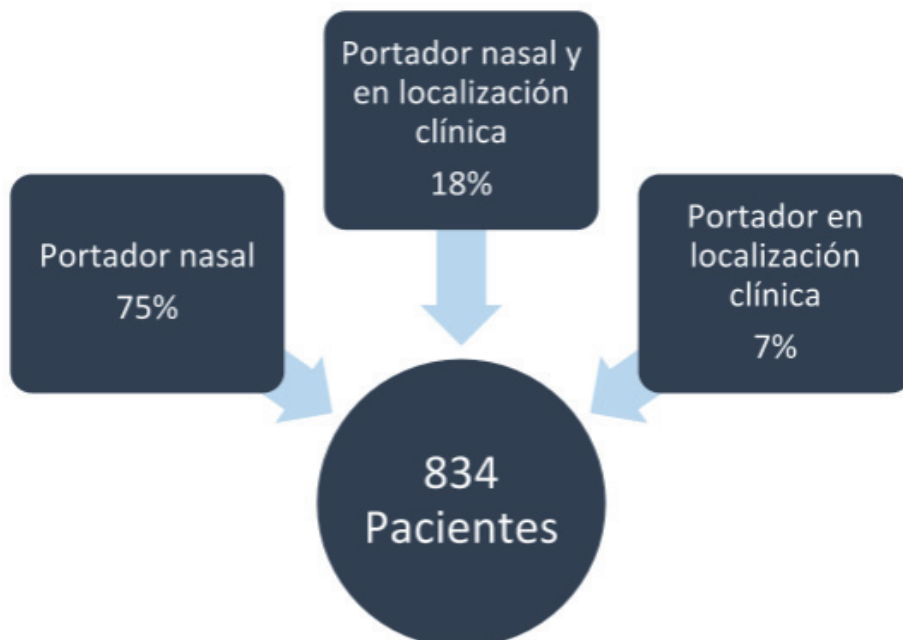
Para determinar la asociación entre posibles factores de riesgo y subsecuente infección o colonización por SARM, los casos y controles fueron comparados empleando los tests adecuados al tipo de variable que se compara:  $\chi^2$  de Pearson para variables nominales y prueba U de Mann–Whitney para las variables de escala. Para el análisis multivariable se eligieron aquellos factores que alcanzaron en el análisis inicial una significación estadística marginal  $p \leq 0,15$ , con el fin de encontrar interacciones potenciales entre estas variables. El modelo elegido para estos análisis multivariables fue el de regresión logística binario con infección/colonización como variable dependiente; estrategia de pasos hacia atrás y criterio de Wald. Todas estas pruebas de significación son bilaterales a un nivel de significación del 5% y los cálculos correspondientes se realizan con ayuda del paquete estadístico en entorno Windows SPSS de IBMCo®. Versión 21.0.

## V. Resultados

## 1. Descripción de episodios SARM diagnosticados en el HUC durante el periodo 2009–2010

En el periodo de estudio, desde Enero de 2009 hasta Diciembre de 2010, se diagnosticaron un total de 930 episodios de aislamientos SARM correspondientes a 834 pacientes hospitalizados en el HUC. De estos últimos, 624 (75%) fueron únicamente portadores nasales, 148 (18%) fueron portadores nasales y en localizaciones diferentes a la fosa nasal (111 con detección inicial de SARM en fosa nasal y posteriormente en muestra clínica y 37 con previa detección en muestra clínica y posterior en fosa nasal) y 62 (7%) portadores únicamente en otras localizaciones (**Figura 10**).

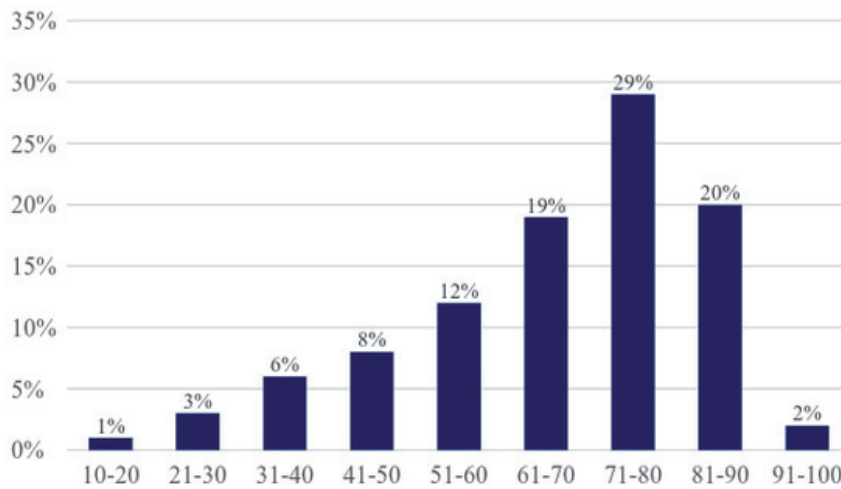
Figura 10. Distribución de los pacientes diagnosticados de SARM en función de la localización.



Los pacientes diagnosticados tenían un promedio de  $67 \pm 16,76$  con un rango de 18–97 años de edad y 335 (40%) fueron mujeres. La distribución de pacientes por grupos de edades se presenta en la **Figura 11**.



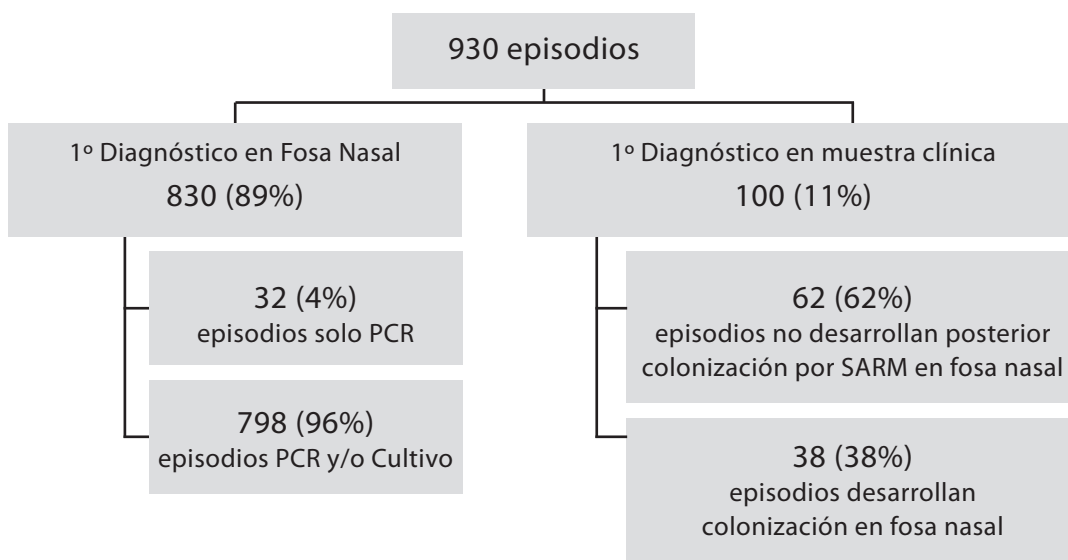
Figura 11. Distribución de los pacientes diagnosticados de SARM por grupos de edad en años.



### 1.1. Distribución de los episodios de SARM según procedencia diagnóstica

Del total de episodios, 830 (89%) fueron identificados como primer diagnóstico tras aislarse SARM en los cultivos de vigilancia epidemiológica (exudado nasal); de estos, 32 (4%) fueron identificados únicamente por PCR y 798 (96%) por PCR y/o cultivo en medio cromogénico. Del total de episodios 100 (11%) fueron diagnosticados como primer diagnóstico tras aislarse SARM en una muestra clínica obtenida con la intención de descartar o diagnosticar una infección, de los cuales en 38 (38%) se detectó posteriormente SARM en fosa nasal. De esta forma, definitivamente se obtuvo un total de 868 episodios de pacientes portadores nasales de SARM (Figura 12).

Figura 12. Esquema de la distribución de los episodios en función de la procedencia diagnóstica.



### 1.1.1. Episodios con aislamientos SARM en fosa nasal

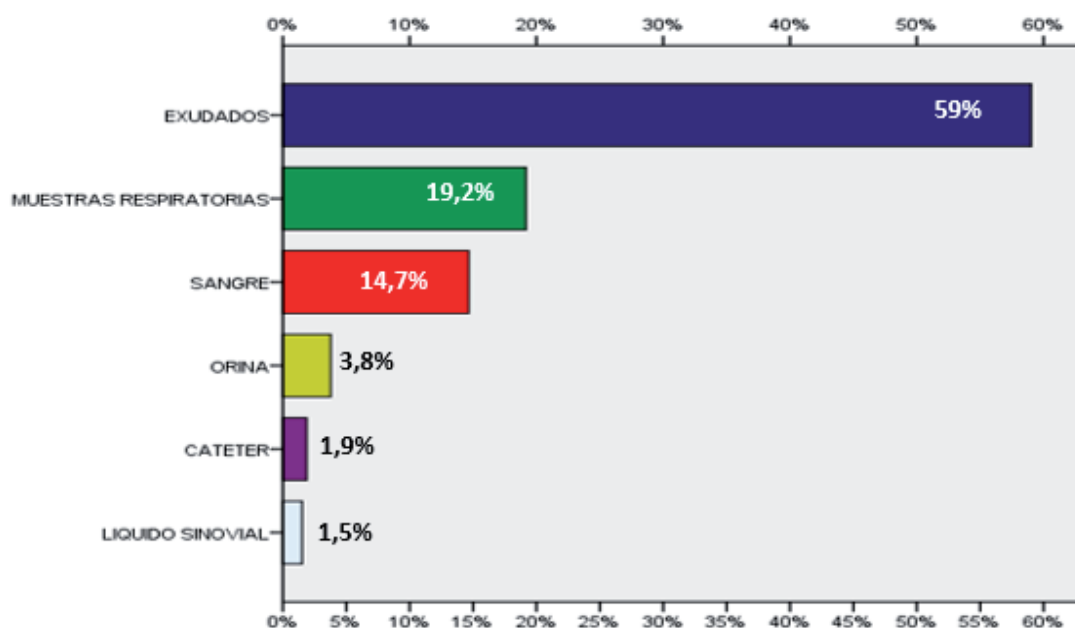
Los 830 episodios de SARM en fosa nasal que se identificaron en los cultivos de vigilancia activa (exudado nasal), fueron clasificados en colonización extrahospitalaria y colonización hospitalaria siguiendo los criterios de los CDC 2008<sup>[93]</sup>, resultando: 687 (83%) episodios de colonización extrahospitalaria y 143 (17%) colonización hospitalaria, siendo la Prevalencia de colonización nasal total al ingreso de 1,7% mientras que la Incidencia acumulada de colonización en fosa nasal total durante el ingreso fue 0,36%.

### 1.1.2. Episodios con aislamientos SARM en muestras clínicas

En el total del periodo se identificaron 264 aislamientos SARM en muestra clínica, correspondientes a 255 episodios y 210 pacientes, siendo la distribución la siguiente: 100 muestras clínicas como primer diagnóstico de SARM, 124 como segunda muestra clínica (procedentes de 110 episodios de colonización nasal previa y 14 como segunda muestra clínica), 28 como tercera muestra clínica, 7 como cuarta muestra clínica y 4 como quinta muestra clínica.

La distribución de las mismas según localización clínica fue la siguiente: exudados 155 (59%), muestras respiratorias 51 (19,2%), sangre 39 (14,7%), orina 10 (3,8%), catéter 5 (1,9%), líquido sinovial 4 (1,5%) (**Figura 13**).

Figura 13. Distribución de las muestras clínicas positivas a SARM.



## 1.2. Distribución de los episodios SARM por servicios

La distribución de los episodios SARM dentro de los diferentes servicios agrupados por áreas afines fue la siguiente: 477 (51,3%) Área Médica, 314 (33,7%) Área Quirúrgica y 139 (15%) Unidades de Cuidados Intensivos. En el desglose por Servicios hospitalarios mostrados en la **Tabla 6** observamos como los Servicios con mayor Incidencia acumulada fueron U.C.S.I. y Medicina Interna.

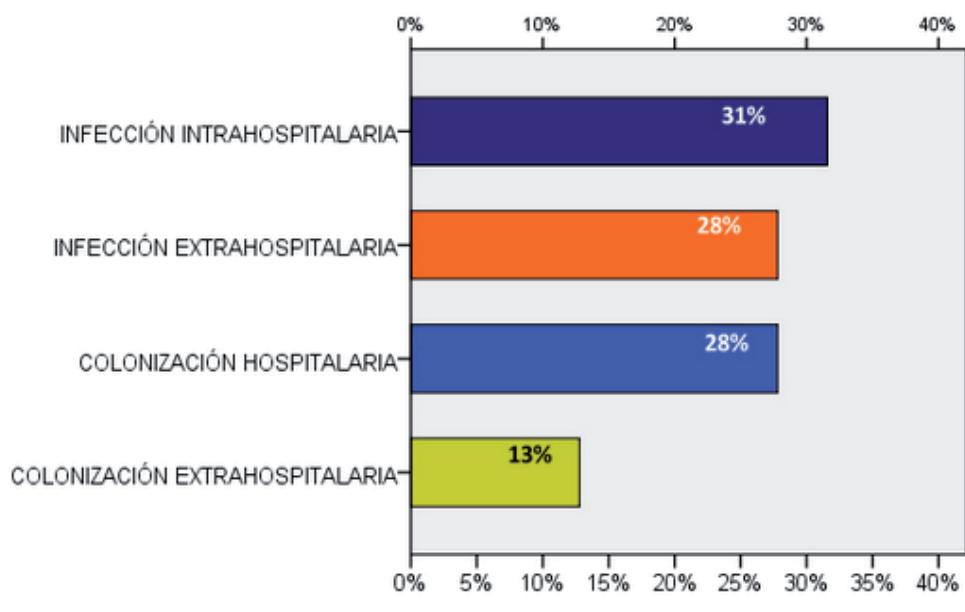
Tabla 6. Incidencia acumulada de episodios SARM en los diferentes Servicios hospitalarios

SERVICIOS	N.º EPISODIOS	N.º DE PACIENTES INGRESADOS	INCIDENCIA ACUMULADA (%)
UCSI	24	341	7,04
Medicina Interna	148	2342	6,32
Angiología y Cirugía Vasculat	45	872	5,16
Reumatología	12	268	4,48
UVI	65	1559	4,17
URPA	10	298	3,35
Cirugía Plástica	21	688	3,05
Hematología	28	1044	2,68
Oncología Medica	48	1880	2,55
Digestivo	58	2285	2,54
Urología	55	2426	2,27
Oftalmología	14	650	2,15
Neurocirugía	35	1654	2,12
COT	69	3322	2,08
UCI (Coronarias)	40	1962	2,04
Neurología	28	1435	1,95
Neumología	40	2270	1,76
Nefrología	23	1426	1,61
Cirugía Torácica	9	593	1,52
Endocrinología	4	342	1,17
Cirugía General y Digestiva	66	4854	1,36
Oncología Radioterápica	13	1010	1,29
Cardiología	29	2270	1,28
Cirugía Maxilofacial	5	471	1,06
Cirugía Cardiovascular	8	966	0,83
ORL	12	1582	0,76
Ginecología	16	2456	0,65
Rehabilitación	1	171	0,59
Urgencias	3	2191	0,01

### 1.3. Relevancia clínica de los aislamientos SARM en muestra clínica

Siguiendo las definiciones y criterios de las Infecciones Asociadas a Cuidados Sanitarios de los CDC 2008<sup>[93]</sup>, la significación clínica de los aislamientos SARM en las 264 muestras clínicas fue: 34 (13%) Colonizaciones extrahospitalarias, 73 (28%) Colonizaciones hospitalarias, 73 (28%) Infecciones extrahospitalarias, 84 (31%) Infecciones intrahospitalarias, como se observa en la **Figura 14**.

Figura 14. Clasificación de los episodios SARM en muestra clínica.



La Prevalencia de colonización en muestra clínica total al ingreso fue de 0,08% mientras que la Incidencia acumulada de colonización en muestra clínica total durante el ingreso fue de 0,18%

Las infecciones tanto extra como intrahospitalarias se distribuyeron tal y como se muestra en la Tabla 7, destacando la presencia de las infecciones de piel y partes blandas a nivel extrahospitalario, de bacteriemias tanto a nivel hospitalario (12 primarias, 1 secundaria y 11 asociadas a dispositivos) como extra hospitalario (5 primarias, 10 secundarias y 1 asociada a dispositivo) así como un alto porcentaje de infección de localización quirúrgica a nivel hospitalario (5 superficiales, 15 profundas y 3 órgano espacio).

Tabla 7. Distribución de las infecciones por SARM.

TIPO DE INFECCIÓN	INFECCIÓN HOSPITALARIA n(%)	INFECCIÓN EXTRAHOSPITALARIA n(%)
Bacteriemia	24 (29)	16 (22)
Infección de localización quirúrgica	23 (27)	1 (1)
Infección de piel y partes blandas	15 (18)	33 (45)
Infección respiratoria	8 (10)	7 (9)
Neumonía	6 (7)	3 (4)
Infección del tracto urinario	3 (4)	0 (0)
Otras	5 (5)	13 (19)
Total	84 (100)	73 (100)

La Densidad de Incidencia total de infección nosocomial durante el periodo de estudio fue de 0,24‰, siendo de 0,33‰ en el año 2009 y 0,14‰ en el año 2010 ( $p < 0,001$ ). Por otro lado cuando comparamos la distribución de las bacteriemias hospitalarias y extrahospitalarias no encontramos diferencia ( $p = 0,461$ ).

La distribución por Servicios se muestra en el **Figura 15**. La Densidad de Incidencia de bacteriemias hospitalarias por SARM fue de 0,67 por 10.000 estancias.

Figura 15. Distribución de la Densidad de Incidencia (‰) de infección nosocomial por Servicios.

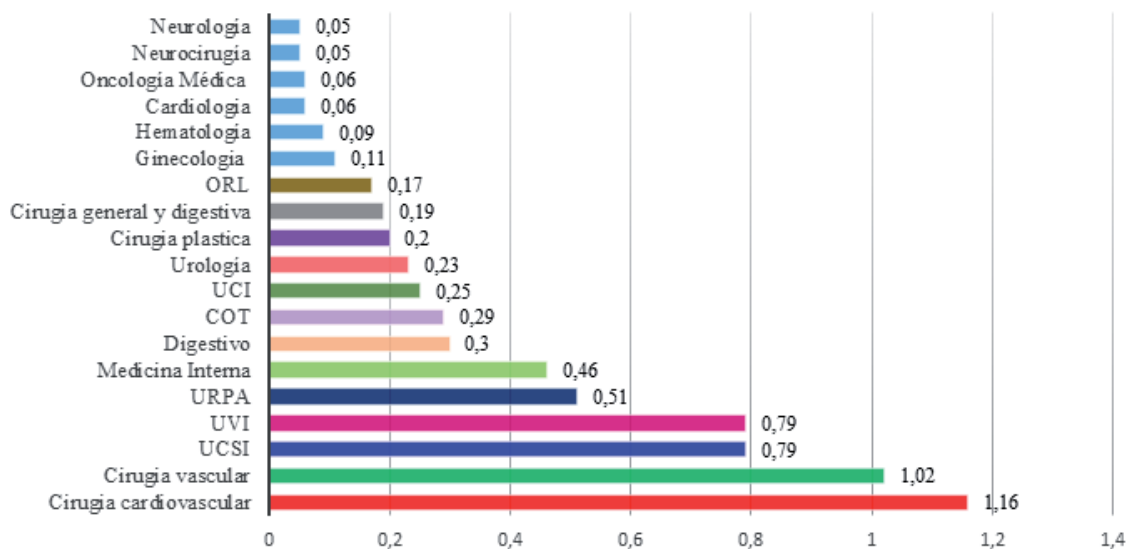


Tabla 8. Distribución de la densidad de Incidencia (‰) de infección nosocomial por Servicios

SERVICIOS	N.º EPISODIOS IH	N.º DE ESTANCIAS	DENSIDAD DE INCIDENCIA (‰)
Cirugía Cardiovascular	7	6.058	1,16
Angiología y Cirugía Vascular	9	8.835	1,02
U.C.S.I.	2	2.523	0,79
U.V.I.	11	13.926	0,79
U.R.P.A.	1	1.970	0,51
Medicina Interna	18	39.115	0,46
Digestivo	5	16.572	0,30
C.O.T.	9	31.848	0,29
UCI (Coronarias)	2	7.952	0,25
Urología	5	22.000	0,23
Cirugía Plástica	1	4.934	0,20
Cirugía General y Digestiva	7	36.023	0,19
O.R.L.	1	6.407	0,17
Ginecología	1	9.287	0,11
Hematología	1	11.470	0,09
Cardiología	1	16.254	0,06
Oncología Médica	1	16.010	0,06
Neurocirugía	1	19.949	0,05
Neurología	1	18.625	0,05
Oftalmología	0	-	-
Reumatología	0	-	-
Neumología	0	-	-
Nefrología	0	-	-
Cirugía Torácica	0	-	-
Endocrinología	0	-	-
Oncología Radioterápica	0	-	-
Cirugía Maxilofacial	0	-	-
Rehabilitación	0	-	-
Urgencias	0	-	-

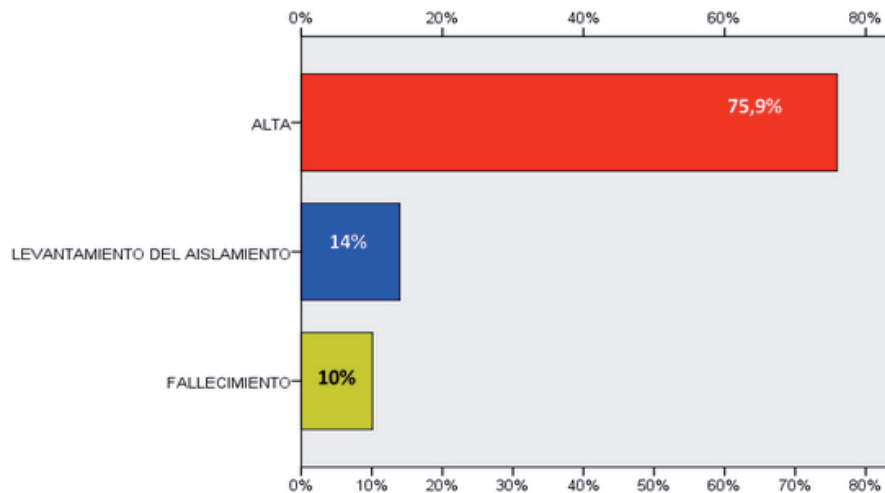
#### 1.4. Resolución de los episodios SARM

La resolución final de los episodios SARM fue la siguiente: 706 episodios (75,9%) recibieron el alta antes de la realización de los cultivos de control de descolonización nasal, 130 (14%) finalizaron el tratamiento descolonizador y se comprobó su descolonización realizándose el levantamiento del aislamiento por contacto tras

obtener tres cultivos negativos frente SARM de exudado nasal recogidos en tres semanas consecutivas y 94 (10%) fallecieron.

De un total de 157 infecciones, 40 (25%) fueron bacteriemias y en 8 (20%) de ellas el paciente falleció.

Figura 16. Resolución final de los episodios SARM.



## 2. Descripción de la Epidemiología Clonal de los aislamientos SARM

Con el fin de identificar los clones de SARM circulantes en el Hospital Universitario de Canarias combinamos diferentes métodos de biología molecular incluyendo PFGE, MLST y detección del cassette *SCCmec* mediante PCR.

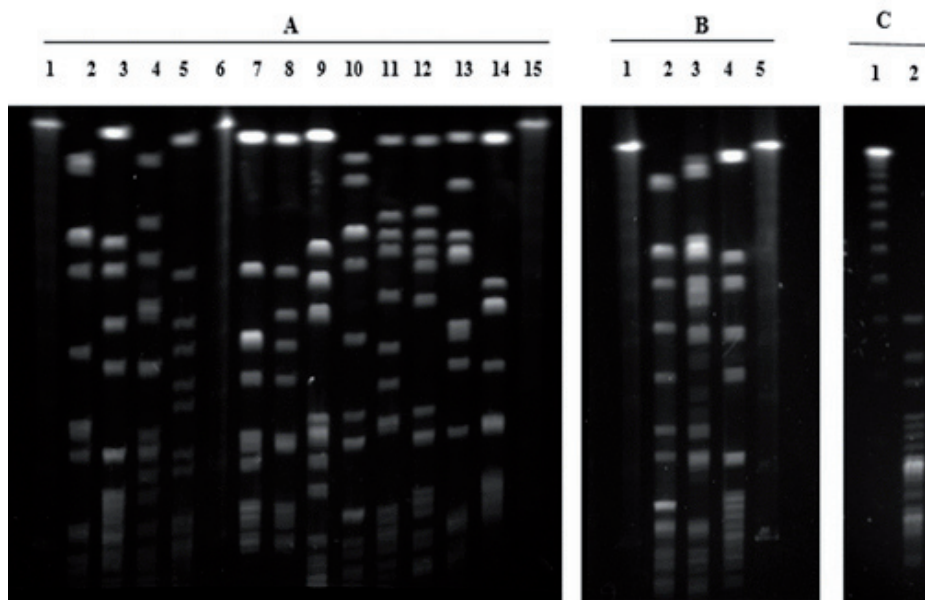
De un total de 1094 aislamientos de SARM (pertenecientes tanto a muestras de exudado de fosa nasal, como de muestra clínica) se recuperaron 938 (86%) aislamientos del cepario de diferente procedencia: 789 (95%) de 830 en fosa nasal obtenidos como primer aislamiento, 90 (90%) de los 100 en muestra clínica como primer aislamiento y 59 (34%) de los 164 obtenidos como segundo aislamiento en muestra clínica.

### 2.1. Distribución clonal de los aislamientos SARM

En el estudio de Electroforesis en Gel de Campos Pulsantes del total de aislados de SARM tras la digestión con el enzima *SmaI* o *Apal* y después de realizar un análisis

por Multi Locus Sequence Typing (MLST) se obtuvieron 16 patrones de bandas diferentes correspondientes a 16 clones distintos (ST5–MRSA–IV (clon Pediátrico), ST5–MRSA II (clon New York–Japan), ST146–MRSA–IV, ST125–MRSA–IV, EMRSA–15, ST896–MRSA–IV, EMRSA–16, ST30–MRSA–IV, ST72–MRSA–IV (USA700), ST8–MRSA–IV (clon USA 300), ST2574–MRSA–XI, ST217–MRSA–IV, ST461, ST247–MRSA–I (clon Ibérico), ST45–MRSA–IV (clon Berlín), ST398–MRSA–IV. En la **Figura 17** se muestran los patrones de PFGE de los clones SARM obtenidos durante el periodo de estudio, tras la digestión con el enzima *SmaI* (A y B) o *Apal* (C).

Figura 17. Macrorrestricción con *SmaI* y (Ay B) o *Apal* (C) y posterior PFGE.



Posiciones A, A6, A15, B1,B5 y C1 se encuentran los pesos moleculares. Las posiciones A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9, A10, A11, A12, A13, A14, B2, B3, B4, B5, C2; representan los clones Pediátrico, New York Japan, ST 146 SARMIV, ST125 SARM IV, Patrones de PFGE de los clones obtenidos en el Hospital Universitario de Canarias desde Enero 2009 hasta Diciembre 2010, tras la digestión con el enzima *SmaI* (A y B) y con el enzima *Apal* (C). En las posiciones A1, A6, A15, B1, B5 y C1 se encuentran los pesos moleculares. Las posiciones A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9, A10, A11, A12, A13, A 14, B2, B3, B4, B5, C2; representan los clones Pediátrico, New York–Japan, ST146–MRSA–IV, ST125–MRSA–IV, EMRSA–15, ST896–MRSA–IV, EMRSA–16, ST30–MRSA–IV, USA700, USA300, ST2574–MRSA–XI, ST217–MRSA–IV, ST461, Ibérico, Berlín y ST398–MRSA–IV.

Los clones predominantes resultaron: 402 (43%) ST5–MRSA–IV (Pediátrico), 363 (39%) ST22–MRSA–IV (EMRSA–15) y 130 (14%) ST36–MRSA–II (EMRSA–16). La distribución del resto de clones se observa en la **Tabla 9**.



Tabla 9. Distribución clonal y frecuencia total de los aislamientos SARM obtenidos.

CLON	AISLAMIENTOS n (%)
ST5-MRSA-IV (Pediátrico)	402 (43)
ST22-MRSA-IV (EMRSA - 15)	363 (39)
ST36-MRSA-II (EMRSA-16)	130 (14)
ST398-MRSA-IV	12 (1)
ST125-MRSA-IV (CC Pediátrico)	6 (0,6)
ST5-MRSA-II variant (New York-Japan)	5 (0,5)
ST72 -MRSA-IV (USA 700)	7 (0,7)
ST146-MRSA-IV (CC Pediátrico)	2 (0,2)
ST217-MRSA-IV	2 (0,2)
ST45-MRSA- IV (Berlín)	1 (0,1)
ST247-MRSA- I (Ibérica)	1 (0,1)
ST461	3 (0,3)
ST2574-MRSA-XI	1 (0,1)
ST896-MRSA-IV (cc EMRSA-15)	1 (0,1)
ST8-MRSA-IV (USA 300)	1 (0,1)
ST30-MRSA-IV (cc EMRSA-16)	1 (0,1)
Total	938 (100)

## 2.2. Emergencia de nuevos clones SARM en el Hospital Universitario de Canarias

Durante el periodo de estudio se detectó la presencia de clones que ya fueron identificados en el año 2008: ST398-MRSA-IV, ST72-MRSA-IV (USA700), ST8-MRSA-IV (USA300), que persisten en nuestra institución aunque en escasa proporción. Asimismo se identificaron tres clones que no habían sido identificados previamente en nuestro hospital: ST217-MRSA-I, ST461, ST2574-MRSA-XI.

- **ST398-MRSA-IV**

Durante el periodo de estudio se identificaron 12 aislamientos correspondientes al clon ST398-MRSA-IV, obtenidos a partir de exudados de fosa nasal de 12 pacientes diferentes de nacionalidad española sin referencia

de viajes previos, residentes en el área norte de Tenerife. Los aislamientos fueron clasificados en 3 colonizaciones hospitalarias y 9 colonizaciones extrahospitalarias, no pudiendo ser establecida ninguna relación tiempo espacial entre los pacientes a nivel hospitalario.

- **ST72–MRSA– IV (USA700)**

Durante el periodo de estudio se identificaron 7 aislamientos correspondientes al clon ST72–MRSA–IV, obtenidos a partir de exudados de fosa nasal de 7 pacientes diferentes.

Todos ellos eran de nacionalidad española residentes en el área norte de Tenerife, sin referencia de viajes a otros países. Los aislamientos fueron clasificados en 2 colonizaciones hospitalarias y 5 colonizaciones extrahospitalarias, no pudiendo ser establecida ninguna relación tiempo espacial entre los pacientes a nivel hospitalario.

- **ST8–MRSA– IV (USA300)**

Durante el periodo de estudio se identificó 1 aislamiento correspondiente al clon ST8–MRSA–IV, clasificado como infección extrahospitalaria, obtenido a partir de muestra clínica de sangre. El paciente era de nacionalidad española y residente en el área norte de Tenerife y sin referencia de viajes a otros países.

- **ST217–MRSA– IV**

Durante el periodo de estudio se identificaron 2 aislamientos correspondientes al clon ST217–MRSA–IV, obtenidos a partir de exudados de fosa nasal de 2 pacientes diferentes.

Ambos de nacionalidad española residentes en el área norte de Tenerife, sin referencia de viajes a otros países. Los aislamientos fueron clasificados en 2 colonizaciones extrahospitalarias, no pudiendo ser establecida ninguna relación tiempo espacial entre los pacientes a nivel hospitalario.

- **ST461**

Durante el periodo de estudio se identificaron 3 aislamientos correspondientes al clon ST461, obtenidos a partir de exudados de fosa nasal de 3 pacientes diferentes.

Todos ellos de nacionalidad española residentes en el área norte de Tenerife. Los aislamientos fueron clasificados en 3 colonizaciones extrahospitalarias, no pudiendo ser establecida ninguna relación tiempo espacial entre los pacientes a nivel hospitalario.

- **ST2574–MRSA– XI**

Durante el periodo de estudio se identificó 1 aislamiento correspondiente al clon ST2574–MRSA–XI obtenido a partir de exudados de fosa nasal de 1 paciente, de nacionalidad española residente en el área norte de Tenerife, siendo clasificado como colonización extrahospitalaria.

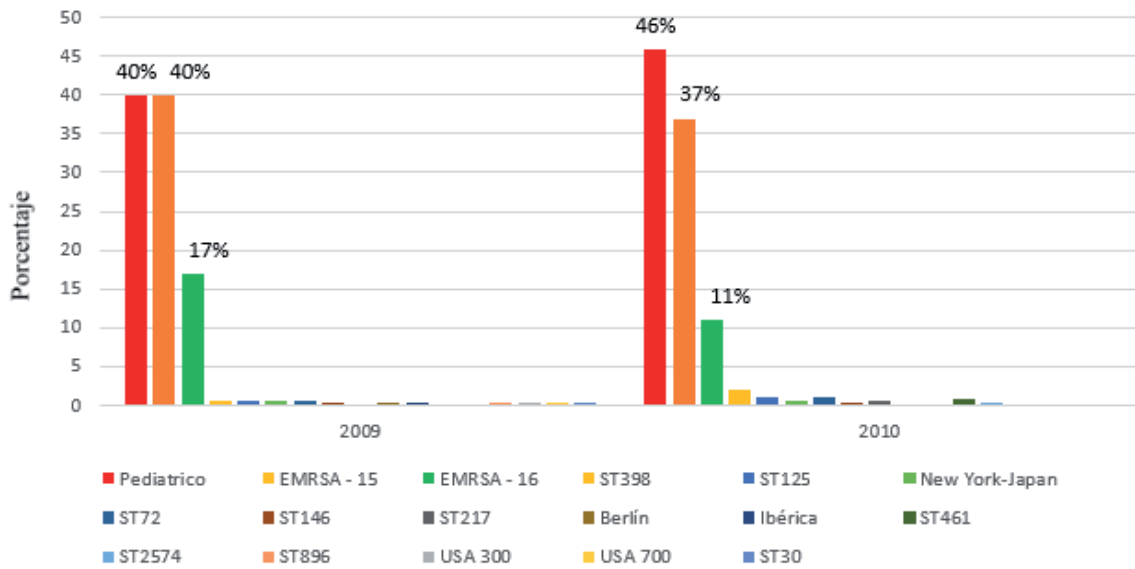
### 2.3. Distribución clonal de SARM por años de estudio

La distribución clonal fue muy similar en los dos años 2009 y 2010 que comprenden el periodo de estudio tal y como se observa en la **Figura 18** y la **Tabla 10**, destacando el gran predominio de los clones ST5–MRSA–IV (Pediátrico), ST22–MRSA– IV (EMRSA–15); sin embargo se observa una disminución significativa en el clon ST36–MRSA–II (EMRSA–16) ( $p=0,008$ ) y un aumento en la aparición del clon ST398–MRSA–IV relacionado con cerdos y ganado ( $p=0,05$ ).

Tabla 10. Distribución clonal de los aislamientos SARM obtenidos por año de estudio.

CLON	2009 n (%)	2010 n (%)	P- VALOR
ST5–MRSA–IV (Pediátrico)	201 (40)	201 (46)	0,100
ST22–MRSA–IV (EMRSA–15)	198 (40)	165 (37)	0,478
ST36–MRSA– II (EMRSA–16)	83 (17)	47 (11)	0,008
ST398–MRSA–IV	3 (0.6)	9 (2)	0,050
ST125–MRSA–IV (cc Pediátrico)	2 (0.4)	4 (0.9)	0,427
ST5–MRSA–II variant (New York–Japan)	3 (0.6)	2 (0.4)	0,907
ST72–MRSA–IV (USA700)	2 (0.4)	5 (1)	0,263
ST 146–MRSA–IV (cc Pediátrico)	1 (0.2)	1 (0,2)	0,915
ST217–MRSA–IV	0	2 (0.4)	0,220
ST45–MRSA–IV (Berlín)	1 (0.2)	0	0,923
ST247–MRSA–I (Ibérico)	1 (0.2)	0	0,984
ST461	0	3 (0.7)	0,103
ST2574–MRSA–XI	0	1 (0.2)	0,469
ST896–MRSA–IV (cc EMRSA–15)	1 (0.2)	0	0,972
ST8–MRSA–IV (USA 300)	1 (0.2)	0	0,901
ST30–MRSA–IV (cc EMRSA–16)	1 (0.2)	0	0,918
Total	498 (100)	440 (100)	–

Figura 18. Distribución clonal en porcentaje de los aislamientos SARM obtenidos.



#### 2.4. Distribución clonal de SARM por tipo de muestra

La distribución clonal en fosa nasal y en cada tipo de muestra clínica se muestra en la **Tabla 11**, destacando el predominio de los clones Pediátrico, EMRSA-15 y EMRSA-16 tanto en fosa nasal como en muestra clínica, a excepción de las muestras respiratorias donde el predominio del clon EMRSA-15 fue superior al del clon Pediátrico. Asimismo se observa como el resto de clones se localizaron en fosa nasal.

Con el fin de estudiar la relación entre clon y tipo de muestra, analizamos los tres clones mayoritarios (Pediátrico, EMRSA-15 y EMRSA-16) con las muestras más abundantes (exudado nasal, exudados, muestras respiratorias y sangre), tras aplicar la prueba de  $\chi^2$  no obtuvimos diferencias significativas ( $p=0.387$ ).

Tabla 11. Distribución clonal de los aislamientos SARM en fosa nasal y tipo de muestra clínica.

CLON	EXUDADO NASAL n (%)	EXUDADO n (%)	SANGRE n (%)	MUESTRA RESPIRATORIA n (%)	ORINA n (%)	LÍQUIDO SINOVIAL n (%)	CATÉTER n (%)
ST5-MRSA-IV (Pediátrico)	<b>338 (43)</b>	36 (47)	11 (46)	10 (28)	6 (67)	1 (33)	0
ST22-MRSA-IV (EMRSA-15)	<b>304 (39)</b>	29 (38)	8 (33)	17 (47)	2 (22)	2 (67)	1 (100)
ST36-MRSA-II (EMRSA-16)	<b>106 (13)</b>	10 (13)	4 (17)	9 (25)	1 (11)	0 (0)	0 (0)
ST398-MRSA-IV	12 (2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
ST125-MRSA-IV (cc Pediátrico)	5 (0.6)	1 (1.3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
ST5-MRSA-II variant (New York-Japan)	5 (0.6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
ST72-MRSA-IV (USA700)	7 (0.8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
ST146-MRSA-IV (cc Pediátrico)	2 (0.2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
ST217-MRSA-IV	2(0.2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
ST45-MRSA-IV (Berlín)	1 (0.1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
ST247-MRSA-I (Ibérico)	1 (0.1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
ST461	3 (0.3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
ST2574-MRSA-XI	1 (0.1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
ST896-MRSA-IV (cc EMRSA-15)	1 (0.1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
ST8-MRSA-IV (USA300)	0 (0)	0 (0)	1 (4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
ST30-MRSA-IV (cc EMRSA-16)	1 (0.1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Total	789	76	24	36	9	3	1

## 2.5. Relación entre clon y posterior desarrollo de infección

De los 157 aislamientos de SARM implicados en infección (uno por cada episodio: 73 Infecciones extrahospitalarias y 84 Infecciones hospitalarias), se analizaron 97 (62%) siendo su identificación y distribución la que se muestra en la **Tabla 12**. Intentamos identificar una posible relación entre los tres clones mayoritarios (Pediátrico, EMRSA-15 y EMRSA-16) y:

- Tipo de infección (intra o extrahospitalaria) mediante análisis estadístico, pero no se obtuvo diferencias significativas ( $p=0,692$ ).
- Preferencia de colonización sobre infección mediante análisis estadístico, pero no se obtuvo diferencias significativas ( $p=0,943$ ).
- Adquisición hospitalaria frente adquisición comunitaria mediante análisis estadístico ( $p=0,016$ ).

Tabla 12. Clones implicados en la infección por SARM.

CLONES SARM	SARM AISLAM. n (%)	COLONIZACIÓN n (%)		INFECCIÓN n (%)		P- VALOR*		
		IH	EX	IH	EX	Infección Intrahospitalaria vs Infección Extrahospitalaria	Colonización vs Infección	Adquisición hospitalaria vs Adquisición comunitaria **
ST5-MRSA-IV (Pediátrico) <sup>1</sup>	402 (43)	56 (33)	302 (45)	29 (46)	15 (42)	0,692	0,943	0,016
ST22-MRSA-IV (EMRSA-15) <sup>2</sup>	363 (39)	75 (44)	251 (37)	22 (36)	15 (42)			
ST36-MRSA-II (EMRSA-16) <sup>3</sup>	130 (14)	34 (20)	82 (12)	10 (16)	4 (11)			
ST125-MRSA-IV	6 (0.6)	0 (0)	5 (0.7)	0 (0)	1 (3)	-		-
ST8-MRSA-IV (USA 300)	1 (0.1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (3)	-		-
Total	938 (100)	171 (100)	670 (100)	61 (100)	36 (100)	-		-

IH= intrahospitalaria

EX= extrahospitalaria

\*Las comparaciones fueron realizadas entre los tres clones mayoritarios Pediátrico, EMRSA-15 y EMRSA-16, porque el tamaño muestral del resto de clones era muy pequeño.

\*\*Análisis estadístico comparando la adquisición hospitalaria frente Adquisición comunitaria:

<sup>1</sup>Pediátrico vs EMRSA-15 ( $p=0,07$ ), <sup>2</sup>EMRSA-15 vs EMRSA-16 ( $p=0.008$ ), <sup>3</sup>EMRSA-16 vs Pediátrico ( $p=0.108$ ).

### 3. Estudio de la resistencia antibiótica en los aislamientos SARM

#### 3.1. Resistencia de los aislamientos SARM en fosa nasal a mupirocina

Para el análisis de resistencias a mupirocina se estudiaron 798 aislamientos de SARM procedentes de exudados de fosa nasal: 670 (84%) aislamientos resultaron sensibles, mientras que 104 (13%) aislamientos presentaron resistencia tipo HLR y 24 (3%) resistencia tipo LLR. Tras comparar la tasa de resistencia HLR con el periodo anterior 2000–2004<sub>[130]</sub> donde de un total de 326 aislamientos de fosa nasal, 275 (84,36%) aislamientos resultaron sensibles, mientras que 37 (11,35%) aislamientos presentaron resistencia tipo HLR y 14 (4,29%) resistencia tipo LLR, no se obtuvo significación estadística (p=0,440).

En la **Tabla 13** y la **Figura 19** se representa la evolución de la resistencia a mupirocina obteniendo una significación estadística en la disminución de la resistencia LLR (p=0,022). En la **Tabla 14** se muestra el análisis de resistencia a mupirocina de los aislamientos SARM en función del tipo de adquisición según los criterios de los CDC 2008<sub>[93]</sub>.

Tabla 13. Distribución de la sensibilidad a mupirocina en función de los años.

	2009 N (%)	2010 N (%)	P-VALOR
HLR <sup>1, 3</sup>	46 (11)	58 (15)	0,022
LLR <sup>1, 2</sup>	18 (4)	6 (2)	
SENSIBLE <sup>2, 3</sup>	350 (85)	320 (83)	

HLR vs LLR (p=0,007), 2 LLR vs S (p= 0,028) y 3HLR vs S (p= 0,135).

Figura 19. Porcentaje de la resistencia a mupirocina de los aislamientos de SARM (HUC 2009 – 2010)

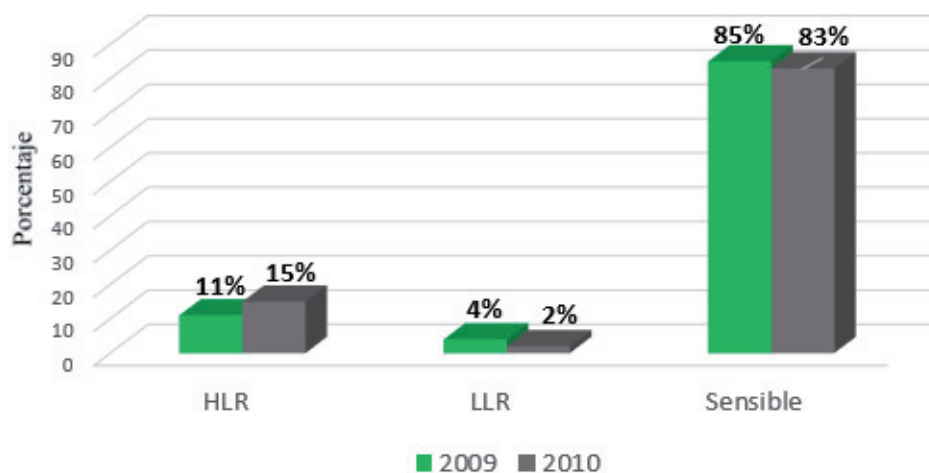


Tabla 14. Distribución de la sensibilidad a mupirocina en función de la clasificación de los aislamientos según los CDC 2008.

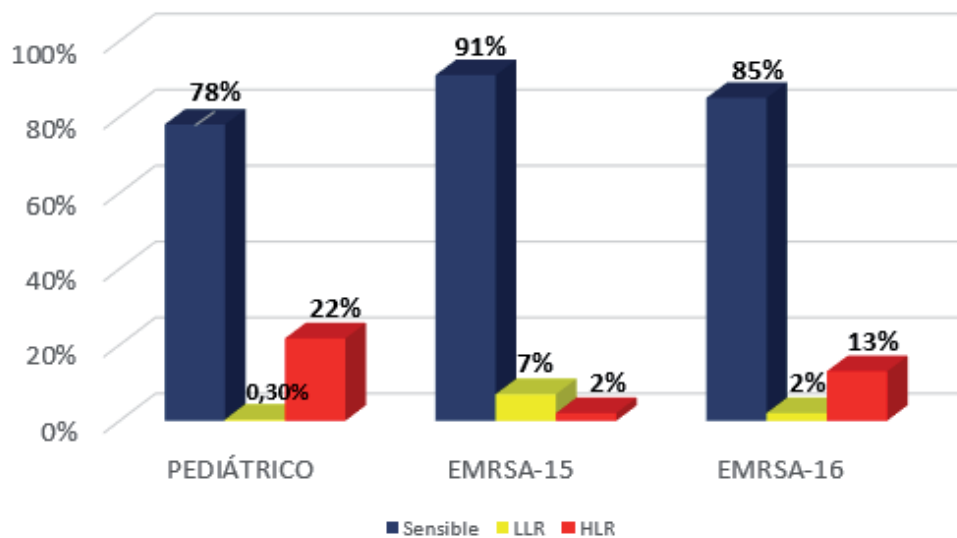
	CE n (%)	CH n (%)
HLR	86 (13)	18 (14)
LLR	18 (3)	6 (4)
SENSIBLE	562 (84)	108 (82)

CE= Colonización Extrahospitalaria · CH= Colonización Intrahospitalaria

De los **798** aislamientos se identificaron **789**, mostrando su distribución clonal y frecuencia en la **Tabla 11**. El 100% de los clones identificados como: Berlín, New York–Japan, ST146– MRSA–IV, ST398–MRSA–IV, ST896–MRSA–IV, ST30–MRSA–IV, ST2574–MRSA–XI, fueron sensibles a mupirocina.

El análisis de resistencia y sensibilidad a mupirocina en los tres clones mayoritarios se muestran en la **Figura 20**.

Figura 20. Porcentajes de sensibilidad y resistencia entre los tres clones mayoritarios.



El 91% de los aislamientos EMRSA–15 fueron sensibles a mupirocina frente al 78% del clon Pediátrico ( $p < 0,0001$ ) y al 85% del clon EMRSA–16 ( $p = 0,08$ ).

El 22% de los aislamientos del clon Pediátrico presentaron resistencia HLR frente al 2% del clon EMRSA–15 ( $p < 0,0001$ ) y al 13% del clon EMRSA–16 ( $p = 0,042$ ).

En la **Tabla 15** se representan los porcentajes de resistencia a mupirocina (bajo y alto nivel de resistencia) del resto de clones identificados durante el periodo de estudio.



Tabla 15. Porcentajes de resistencia de la mupirocina para cada uno de los clones.

CLON	AISLAMIENTOS TOTALES (n)	ALTO NIVEL DE RESISTENCIA (%)	BAJO NIVEL DE RESISTENCIA (%)
ST125-MRSA-IV (CC PEDIÁTRICO)	5	25	0
ST72-MRSA-IV (USA700 <sup>1</sup> )	7	14	0
ST217-MRSA-IV	2	50	0
ST247-MRSA- I (IBÉRICO)	1	100	0
ST461	3	67	0

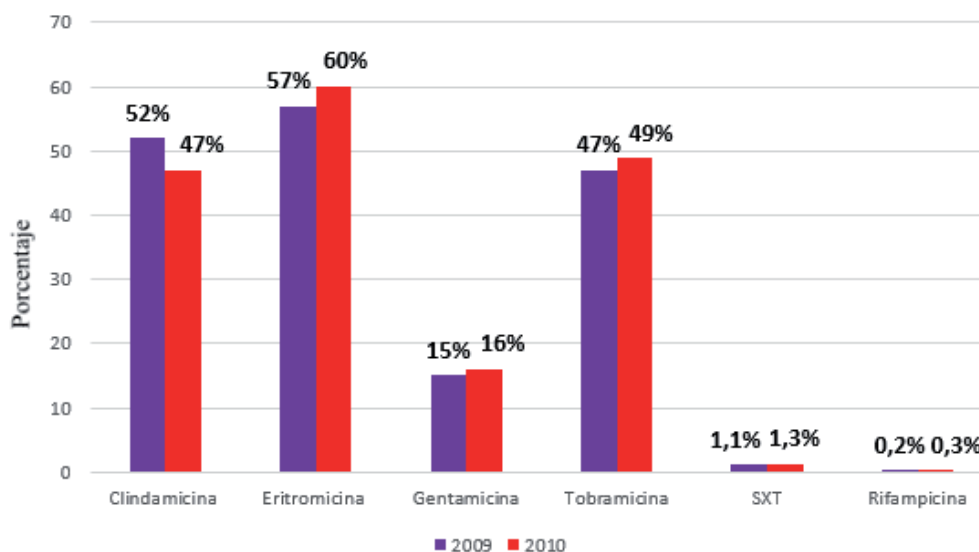
### 3.2. Resistencias de los aislamientos SARM obtenidos en fosa nasal y muestra clínica a otros antibióticos.

Para el análisis de resistencias a diferentes antibióticos, se estudiaron 850 aislamientos de SARM obtenidos en exudado de fosa nasal y muestra clínica.

El porcentaje de resistencias resultó: 50% clindamicina, 58% eritromicina, 15% gentamicina, 48% tobramicina, 1% trimetropim-sulfametoxazol (SXT), 0,2% rifampicina. Mientras que la sensibilidad fue del 100% para vancomicina, teicoplanina, quiniprustina/dalfopristina y linezolid.

En la **Figura 21** se representa la evolución de la resistencia a clindamicina, eritromicina, gentamicina, tobramicina, trimetropim-sulfametoxazol y rifampicina de los aislamientos de SARM obtenidos durante el periodo de estudio.

Figura 21. Porcentaje de la resistencia a diferentes antibióticos de los aislamientos de SARM (HUC 2009 – 2010).



No se encontró significación estadística cuando se compararon las resistencias a cada antibiótico en los dos años de estudio (**Tabla 16**).

Tabla 16. Número y porcentaje de resistencia a cada antibiótico (HUC 2009–2010).

ANTIBIÓTICO n (%)	2009 n (%)	2010 n (%)	P-VALOR
CLINDAMICINA	235 (52)	186 (47)	0,110
ERITROMICINA	259 (57)	237 (60)	0,561
GENTAMICINA	66 (15)	63 (16)	0,619
TOBRAMICINA	212 (47)	194 (49)	0,638
SXT	5 (1,1)	5 (1,3)	0,999
RIFAMPICINA	1 (0,2)	1 (0,3)	0,999

### 3.3. Asociación entre antibiotipos y clones SARM

Con el fin de encontrar antibiotipos asociados a los tres clones mayoritarios en nuestra institución se analizaron 751 aislamientos de SARM procedentes de exudado de fosa nasal y muestra clínica (344 del clon Pediátrico, 304 del clon EMRSA–15 y 103 del clon EMRSA–16). Se encontraron nueve antibiotipos diferentes (**Tabla 17**) todos sensibles a rifampicina y trimetropim–sulfametoxazol y vancomicina. Su distribución por clones se muestra en la **Tabla 18**.

Excluimos de las comparaciones los perfiles 6, 7 y 8 para poder aplicar de forma global la prueba estadística  $\chi^2$  de Pearson que exige frecuencias esperadas  $>5$  en las celdas, y se obtuvieron diferencias significativas para el resto de perfiles ( $p < 0,001$ ).

Tabla 17. Antibiotipos determinados para los tres clones mayoritarios de SARM (HUC 2009 – 2010)

ANTIBIOTIPO	ANTIBIÓTICOS								
	CL	E3	GM	TO	RF	SXT	V	Q/D	LZ
1	R	R	S	S	S	S	S	S	S
2	R	R	S	R	S	S	S	S	S
3	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4	S	S	S	R	S	S	S	S	S
5	R	R	R	R	S	S	S	S	S
6	S	R	R	R	S	S	S	S	S
7	S	S	R	R	S	S	S	S	S
8	S	R	S	S	S	S	S	S	S
9	S	R	S	R	S	S	S	S	S

CL= Clindamicina, E= Eritromicina, GM=Gentamicina, TO=Tobramicina, RF=Rifampicina, SXT=Trimetropim – Sulfametoxazol, V=Vancomicina, Q/D=Quinupristina/Dalfopristina, LZ=Linezolid

Tabla 18. Distribución de los clones mayoritarios de SARM por antibiotipo (HUC 2009–2010).

ANTIBIOTIPO	CLON n%			TOTAL	P- VALOR
	PEDIÁTRICO	EMRSA-15	EMRSA-16		
1	40 (12)	120 (40)	22 (21)	182	<0,001*
2	61(18)	3 (0.9)	57 (55)	121	
3	39(11)	167 (55)	4 (4)	210	
4	81(24)	2 (0.6)	1(0.9)	84	
5	38(11)	6 (2)	17 (16)	61	
6	24(7)	1 (0.3)	0	25	
7	17 (5)	2 (0.6)	0	19	
8	1(0.3)	2 (0.6)	1 (0.9)	4	
9	43(12)	1 (0.3)	1(0.9)	45	
TOTAL	344 (100)	304 (100)	103(100)	751	

\*Excluyendo los antibiotipos 6, 7 y 8 que no cumplen la condición necesaria para aplicar la prueba  $\chi^2$  de Pearson de frecuencia esperada  $>5$  en todas las celdas.

Para identificar a expensas de que antibiotipos y clones se alcanzaba esta significación estadística se procedió a un análisis pormenorizado de todas las combinaciones posibles de antibiotipo y clones cuyos resultados en número absoluto y porcentaje se resumen en la **Tabla 19**.

Tabla 19. Frecuencia de aparición de significación estadística en las comparaciones de asociación de antibiotipo para los tres clones SARM predominantes.

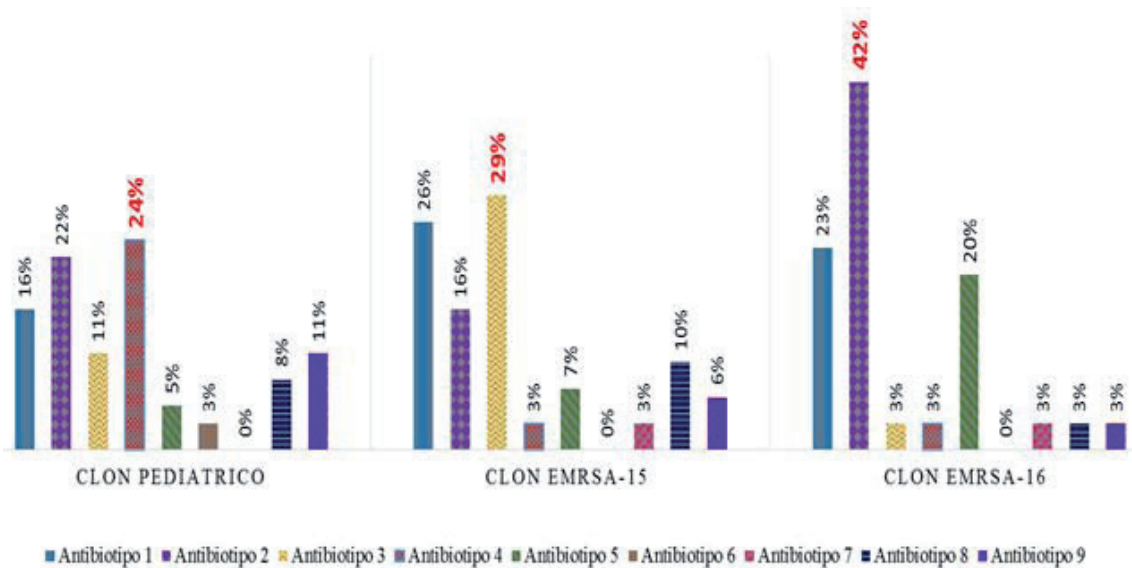
ANTIBIOTIPO	PEDIÁTRICO n (%) <sup>1</sup>	EMRSA-15 n (%) <sup>1</sup>	EMRSA-16 n (%) <sup>1</sup>
1	6 (16)	8 (26)	7 (23)
2	8 (22)	5 (16)	13 (42)
3	4 (11)	9 (29)	1 (3)
4	9 (24)	1 (3) <sup>2</sup>	1(3) <sup>2</sup>
5	2 (5)	2 (7)	6 (20)
6	1 (3)	0 (0)	0 (0)
7	0 (0)	1(3) <sup>2</sup>	1 (3) <sup>2</sup>
8	3 (8) <sup>2</sup>	3 (10)	1 (3) <sup>2</sup>
9	4 (11)	2 (6)	1 (3) <sup>2</sup>
TOTAL	37 (100)	31 (100)	31(100)

<sup>1</sup> % respecto al total de asociaciones significativas dentro del clon, de las 72 comparaciones realizadas.

<sup>2</sup> Significación marginal ( $p < 0.10$ ).

Se obtuvieron: 37 combinaciones con  $p < 0.001$  para el clon Pediátrico resultando la combinación más frecuente el antibiotipo 4 (9; 24%); 41 combinaciones para el clon EMRSA-15 resultando la combinación más frecuente el antibiotipo 3 (9; 29%) y EMRSA-16 resultando la combinación más frecuente el antibiotipo 2 (13; 42%). El resto de antibiotipos y sus porcentajes se muestran en la **Figura 22**.

Figura 22. Frecuencias de los diferentes antibiotipos con  $p < 0.001$  presentes en cada clon mayoritario de SARM (HUC 2009-2010).



#### 4.4. Comparación de la frecuencia de resistencia a Clindamicina, Eritromicina y Tobramicina entre los tres clones mayoritarios.

Tal y como hemos presentado los resultados de asociación entre antibiotipos y clones ha resultado que el clon Pediátrico es asociado al antibiotipo 4, el cual presenta resistencia a Tobramicina; el clon EMRSA-15 al antibiotipo 3 que presenta sensibilidad a todos los antibióticos testados y finalmente el clon EMRSA-16 al antibiotipo 2, que presenta resistencia a clindamicina, eritromicina y tobramicina. Con el fin de apoyar el resultado anterior comparamos la frecuencia de resistencia antibiótica totales a clindamicina, eritromicina, tobramicina de los tres clones mayoritarios.

Se analizaron 812 clones: 366 Pediátricos, 326 EMRSA-15 y 120 EMRSA-16. En la **Tabla 20**, se observa como el clon EMRSA-16 presenta un elevado porcentaje de aislados resistentes a clindamicina, a eritromicina y a tobramicina. Asimismo el clon Pediátrico presenta un elevado porcentaje de resistencia a tobramicina.

Tabla 20. Frecuencia de resistencia y sensibilidad a Clindamicina, Eritromicina y Tobramicina de los tres clones mayoritarios

CLON	RESISTENTE/ SENSIBLE	RESISTENCIA (%)	CLONES COMPARADOS	P-VALOR
<b>CLINDAMICINA</b>				
Pediátrico	151/215	41	Pediátrico vs EMRSA-15	0,349
EMRSA-15	146/180	45	EMRSA-16 vs Pediátrico	<0,001
EMRSA-16	112/8	<b>93</b>	EMRSA-16 vs EMRSA-15	<0,001
<b>ERITROMICINA</b>				
PEDIÁTRICO	220/146	60	Pediátrico vs EMRSA15	<0,001
EMRSA-15	148/178	45	EMRSA-16 vs Pediátrico	<0,001
EMRSA-16	113/7	<b>94</b>	EMRSA-16 vs EMRSA-15	<0,001
<b>TOBRAMICINA</b>				
PEDIÁTRICO	286/80	<b>78</b>	Pediátrico vs EMRSA-15	<0,001
EMRSA-15	20/306	6	EMRSA-16 vs Pediátrico	0,387
EMRSA-16	89/31	<b>74</b>	EMRSA-16 vs EMRSA-15	<0,001

#### 4. Estudio de la relación clonal entre los aislamientos SARM en fosa nasal y muestra clínica

Para determinar la auto-infección/auto-colonización estudiamos la relación genética de los aislamientos SARM nasales y los aislados en muestras clínicas con diagnóstico de infección o colonización en otras localizaciones diferentes a fosa nasal mediante técnicas moleculares.

Analizamos 59 episodios en los cuales el paciente era portador nasal de SARM y además presentaba alguna muestra clínica positiva a SARM, por tanto 59 clones pertenecientes a fosa nasal y 59 pertenecientes a muestra clínica (29 exudados, 8 sangre, 19 muestras respiratorias, 2 orinas, 1 líquido sinovial) fueron analizados.

La distribución de los clones SARM fue 51 (43%) aislamientos pertenecientes al clon EMRSA-15, 41 (35%) al clon Pediátrico, 25 (21%) al clon EMRSA-16 y 1 (1%) al clon ST398-MRSA-IV. Obtuvimos la presencia del mismo clon en fosa nasal y muestra clínica en 55 (93%) episodios mientras que en 4 (7%) episodios resultaron diferentes (**Tabla 21**).

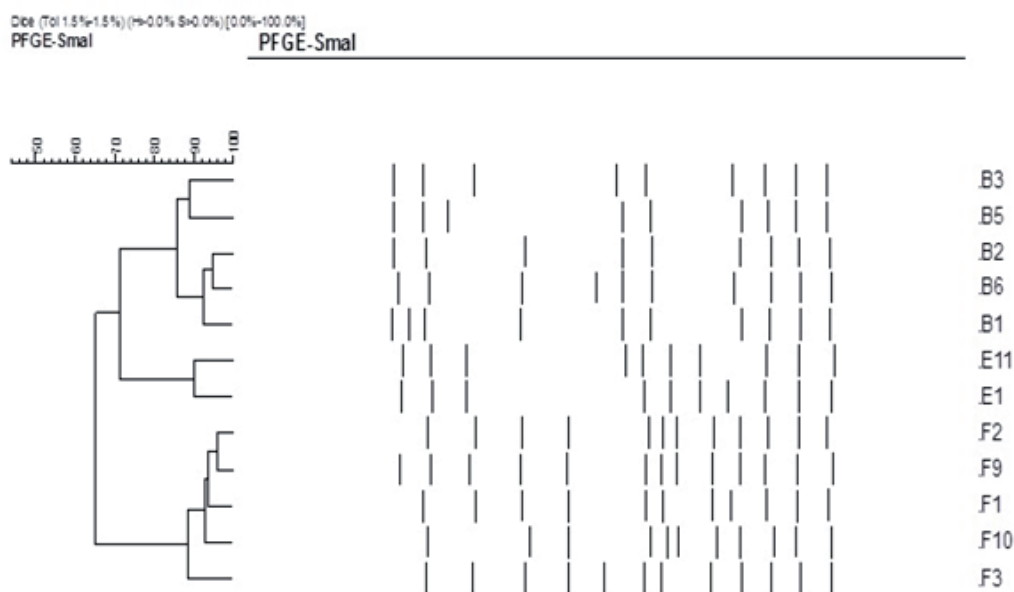
Tabla 21. Identificación de los aislamientos SARM discordantes entre fosa nasal y muestra clínica.

AISLAMIENTO SARM EN FOSA NASAL	AISLAMIENTO SARM EN MUESTRA CLÍNICA
Clon EMRSA-15	Clon EMRSA-16
Clon Pediátrico	Clon EMRSA-15
Clon EMRSA-15	Clon Pediátrico
Clon ST398-MRSA-IV	Clon Pediátrico

Asimismo la coincidencia entre los clones aislados en fosa nasal y en muestra clínica estimada fue de 0.895 ( $p < 0,001$ ) mostrando una concordancia casi perfecta. Por tanto la autoinfección/colonización fue más común que la adquisición extrínseca de SARM.

En la **Figura 23** se presenta el dendograma agrupando los pulsotipos con un grado de similitud del 80% o más. Los pulsotipos B3, B5, B6, B1 corresponden al clon Pediátrico. Los pulsotipos E11, E1 corresponden al clon EMRSA-16. Los pulsotipos F2, F9, F1, F10, F3 corresponden al clon EMRSA-15.

Figura 23. Dendograma realizado con el software InfoQuest™ FP para analizar la relación genética mediante el análisis de los patrones de PFGE.



## 5. Análisis de los factores de riesgo entre portadores nasales para el posterior desarrollo de infección/colonización por SARM en localización clínica

En el estudio de casos y controles realizado con el fin de identificar potenciales factores de riesgo para el posterior desarrollo de infección/colonización en otras localizaciones diferentes a la fosa nasal obtuvimos 43 pacientes que cumplieron los criterios de inclusión para el grupo de casos y 42 para el grupo control.

Ambos grupos resultaron comparables por factores que no son de riesgo independiente, pero que pueden marcar diferencias en la probabilidad de adquirir la infección o colonización por SARM en otra localización diferente a la fosa nasal (**Tabla 22**).

Tabla 22. Similitud de los grupos a comparar.

VARIABLE	CASOS (n=43)	CONTROLES (n=42)	P-VALOR
Estancia hospitalaria (días) <sup>1</sup>	43(5-362)	35(5-266)	0,320
Tiempo de seguimiento (días) <sup>1</sup>	10(2-49)	15(1-50)	0,385
Demora en tratamiento (días) <sup>1</sup>	0(0-1)	0(0-2)	0,424
Motivos de ingreso <sup>2</sup>			
Trauma	9(75)	3(25)	0,217
Cardiovascular	4(50)	4(50)	
Neoplasias	7(41)	10(59)	
Infecciones	8(36)	14(64)	
Otros	15(58)	11(42)	
Mortalidad <sup>2</sup>	9(21)	3(7)	0,068

<sup>1</sup>Mediana (rango) comparada con la prueba U de Mann-Whitney.

<sup>2</sup> n (%) comparada con la prueba chi<sup>2</sup> de Pearson.

En el grupo de casos, 23 pacientes desarrollaron posterior colonización por SARM en alguna localización y 20 desarrollaron una infección durante su ingreso: 6 (30%) infección de piel y partes blandas, 6 (30%) infección de localización quirúrgica (5 ILQ profundas y 1 ILQ superficial), 5 (25%) bacteriemia (2 bacteriemias primarias, 2 bacteriemias asociadas a dispositivos y 1 bacteriemia secundaria a infección respiratoria), 2 (10%) infección respiratoria, 1 (5%) neumonía. El tiempo entre la primera detección en fosa nasal y la posterior colonización o infección en otro lugar presentó una mediana de 10 días.

En la **Tabla 23** se presentan los resultados de las comparaciones de las variables estudiadas entre los dos grupos, encontrándose diferencia al nivel  $p \leq 0.15$  preestablecido para la emergencia de clones SARM con resistencia a mupirocina tras finalizar el tratamiento descolonizador y procedencia del paciente de un centro de atención sanitaria de larga estancia. Estos dos factores fueron incluidos en el modelo de regresión. Como resultado del ajuste de este modelo se obtuvo que la emergencia de resistencia a mupirocina en fosa nasal se hallaba asociada de forma independiente al desarrollo de infección/colonización por SARM (**Tabla 24**).

De los siete casos con emergencia de resistencia a mupirocina, 6 (86%) desarrollaron infección después de la detección de la resistencia en fosa nasal y uno previamente a la detección.

Para determinar la relación entre los aislamientos de SARM nasales sensibles a mupirocina iniciales y los aislamientos SARM emergentes con resistencia a mupirocina se analizó la relación genética entre ambos y se observó como en tres ocasiones el aislamiento inicial era idéntico al segundo, mientras que en dos ocasiones resultaron diferentes (**Tabla 25**).



Tabla 23. Comparación de los factores de riesgo estudiados entre casos y controles.

VARIABLE	TODOS LOS PARTICIPANTES	CASOS (n=43)	CONTROLES (n=42)	P-VALOR
Sexo (Hombre/Mujer) <sup>1</sup>	60 (71) / 25 (29)	31 (52) / 12	29 (48) / 13 (52)	0,758
Edad (años) <sup>2</sup>	75 (18–92)	72 (16–90)	72 (25–92)	0,909
Servicio de ingreso <sup>1</sup>				
Cirugía	43 (51)	22 (51)	21 (49)	0,819
Cuidados intensivos	18 (21)	10 (56)	8(44)	
Médico	24 (28)	11 (46)	13 (54)	
Cateterización venosa central <sup>1</sup>	16 (19)	10 (63)	6 (37)	0,290
Ventilación mecánica <sup>1</sup>	31 (37)	17 (55)	14 (45)	0,553
Sonda vesical <sup>1</sup>	52 (61)	28 (54)	24 (46)	0,451
Cirugía durante el ingreso actual <sup>1</sup>	48 (57)	23 (48)	25 (52)	0,575
Lesión en la piel <sup>1</sup>	30 (35)	18 (60)	12 (40)	0,200
Estancia hospitalaria mayor a 2 semanas <sup>1</sup>	70 (82)	36 (51)	34 (49)	0,738
Diabéticos <sup>1</sup>	46 (54)	20 (43)	26 (57)	0,160
Enfermedad respiratoria <sup>1</sup>	20 (24)	9 (45)	11 (55)	0,568
Enfermedad renal crónica <sup>1</sup>	9 (11)	7 (78)	2 (22)	0,160
Enfermedad hepatobiliar <sup>1</sup>	6 (7)	2 (33)	4 (67)	0,433
Más de 2 morbilidades <sup>2</sup>	36 (42)	17 (47)	19 (53)	0,595
Hospitalizaciones durante el año previo <sup>1</sup>	47 (55)	22 (47)	25 (53)	0,438
Cirugía durante el año previo <sup>1</sup>	24 (28)	11 (46)	13 (54)	0,582
SARM durante el año previo <sup>1</sup>	13 (15)	6 (46)	7 (54)	0,728
Centro de asistencia sanitaria de larga estancia <sup>1</sup>	11 (13)	8 (73)	3 (27)	0,115
Resistencia a mupirocina <sup>1,3</sup>	12 (14)	6 (50)	6 (50)	0,965
Emergencia de Resistencia a mupirocina <sup>1</sup>	8 (9)	7 (88)	1 (12)	0,058

<sup>1</sup> n (%) comparada con la prueba chi<sup>2</sup> de Pearson.

<sup>2</sup> Mediana (rango) comparada con la prueba U de Mann–Whitney.

<sup>3</sup> La resistencia a mupirocina encontrada tanto en casos como en controles resultó de alto nivel (HLR).

Tabla 24. Asociación de la emergencia de clones SARM resistentes a mupirocina y la permanencia previa en un centro de asistencia sanitaria de larga estancia con la infección/ colonización por SARM\*.

FACTOR	INCREMENTO DEL RIESGO A INFECCIÓN /COLONIZACIÓN POR SARM EN OTRAS LOCALIZACIONES (IC95%)	P-VALOR
Emergencia de cepa SARM resistente a mupirocina	8,35(1,968–61,93) veces	0,049
Permanencia previa en un centro de asistencia sanitaria de larga estancia	8,35(1,968–61,93) veces	0,116

\*Según los resultados del modelo de regresión logística binario multivariable.

Tabla 25. Relación genética entre los aislamientos de SARM nasales iniciales sensibles a mupirocina y los aislamientos SARM emergentes con resistencia a mupirocina.

GRUPO	n	AISLAMIENTO INICIAL SARM SENSIBLE A MUPIROCINA	AISLAMIENTO SARM EMERGENTE RESISTENTE A MUPIROCINA
CONTROL	1	Clon Pediátrico	Clon Pediátrico
CASOS	2 2 3 <sup>1</sup>	Clon Pediátrico Clon Pediátrico Clon Pediátrico	Clon Pediátrico EMRSA-15 -----

<sup>1</sup>En tres casos el aislamiento SARM emergentes con resistencia a mupirocina no pudo ser identificado por no disponer de la cepa.

## VI. Discusión

## 1. Descripción de episodios SARM diagnosticados en el HUC durante el periodo 2009–2010

Analizando las características demográficas de los pacientes diagnosticados de SARM encontramos que la media de edad de los 834 pacientes incluidos en este estudio fue de  $67 \pm 16,76$  años, mientras que la de los pacientes que ingresaron en el Hospital Universitario de Canarias durante el mismo periodo fue de 49,52 años (46,66 en mujeres y 52,62 en hombres).

Dentro del estudio, los grupos de edades que destacaron fueron: 61–70 años con el 19% de los pacientes, 71–80 con el 29% y 81–90 con el 20%, coincidiendo con lo publicado con anterioridad, donde las infecciones causadas por clones pertenecientes a linajes HA–MRSA se producen sobre todo en edades mayores de 60 años<sup>[135]</sup>. Sin embargo, en determinadas regiones geográficas tras la emergencia de los clones CA–MRSA se han incrementado las tasas de infección en la población pediátrica y adulta joven, como EE.UU. (de 6,7 casos por 1000 ingresos en 2002 a 21,1 casos por 1000 ingresos en 2007,  $p=0,02$ )<sup>[136]</sup> o en Taiwan (de 9,8% durante 1997–2000 a 56% 2004–2005  $p<0,005$ )<sup>[137]</sup>, en donde además coincidió con un aumento en la prevalencia de colonización nasal en niños sanos (de 8,1% de 2004–2006 a 15,1% en 2007–2009,  $p<0,0001$ )<sup>[138]</sup>. No obstante en nuestro estudio no hemos incluido la población pediátrica, ya que por el momento el aislamiento de clones CA–MRSA es puntual, aunque cuando existan incrementos significativos de estos aislamientos será necesario el estudio en esta población.

El 60% de los pacientes fueron hombres y el 40% mujeres, sin embargo esta distribución por sexos difiere de la presentada por los pacientes que ingresaron en el Hospital Universitario de Canarias durante el mismo periodo, donde el 48% fueron hombres y el 52% mujeres.

### 1.1. Distribución de los episodios SARM según su procedencia diagnóstica

De los 930 episodios encontrados, el 89% fue identificado por el Sistema de Vigilancia Activa (4% únicamente PCR y 96% cultivo o cultivo y PCR), mientras que

por cultivo de muestra clínica solo hemos identificado el 11%. Nuestros resultados muestran una vez más como la Vigilancia Pasiva es insuficiente para el control de la infección por SARM, ya que los cultivos de estas muestras se remiten por razones clínicas, por lo que un resultado positivo implica un diagnóstico tardío para la vigilancia, tal y como describen otros autores como Salgado *et al.*<sup>[55]</sup>, así como la no detección de un alto porcentaje de pacientes colonizados.

El Sistema de Vigilancia Activa frente SARM del HUC realiza una búsqueda activa de pacientes colonizados mediante la realización de cultivos de cribado de fosa nasal. Sin embargo, no realiza un cribado de zonas como perineo, recto y axilas, lugares que suelen ser reservorios silentes desde los cuales los pacientes pueden ser colonizados o infectados en otras localizaciones<sup>[139-140]</sup>. Esto se debe a que tal y como otros estudios han documentado, la realización de cribado en varias localizaciones consecutivamente no es coste-efectivo<sup>[141]</sup>; de hecho cuando el screening se centra únicamente en la búsqueda portadores nasales, el número de pacientes colonizados por este microorganismo que se pierde es pequeño, porque la colonización extra nasal es infrecuente y está fuertemente asociada con la colonización nasal<sup>[142]</sup>. Aunque algunos autores como Harbarth *et al.*<sup>[33]</sup> establecen que las colonizaciones en faringe, perineo, piel y tracto gastrointestinal representan el 27% del total<sup>[33]</sup>.

Finalmente, los métodos de cribado se han visto mejorados tras la introducción de métodos moleculares de screening como la PCR, ya que permiten una rápida detección de portadores. Sin embargo, su coste-eficacia la limita a ser utilizada en unidades de alto riesgo<sup>[33]</sup>, motivo por el cual en nuestro Hospital solo se realiza en pacientes ingresados en las UCIs (UCI, UCSI, URPA y UVI).

#### 1.1.1. Episodios con aislamiento SARM en fosa nasal

La prevalencia de colonización nasal al ingreso fue de 1,7% mientras que la incidencia acumulada de SARM en fosa nasal durante el ingreso fue de 0,36%.

Nuestra tasa de prevalencia en el ingreso está por debajo de las tasas publicadas en hospitales de otros Países Europeos y Norte América las cuales oscilan entre el 0,03% y el 9%<sup>[143-144], [152]</sup>. Harbarth *et al.*<sup>[33]</sup>, consideran razonable que hospitales con tasas de SARM <5% utilicen un sistema de Vigilancia Activa selectiva mejor que universal. En nuestro hospital se ha venido empleando esta estrategia desde el comienzo de la implantación del Sistema de Vigilancia Activa, ya que para ello se tuvo en cuenta los datos epidemiológicos previos, donde ya se excluyeron desde

un inicio las plantas y unidades pediátricas y las plantas de Psiquiatría y Obstetricia, por no haber registrado previos casos de SARM.

### 1.2. Distribución de los episodios de SARM por Servicios

Los Servicios que presentaron mayores tasas de Incidencia Acumulada de Episodios SARM fueron Unidades de Cuidados Intensivos, Medicina Interna, Angiología y Cirugía Vascul y Reumatología, presentando tasas desde 7–3%. Asimismo, todos ellos excepto el Servicio de Reumatología presentaron las mayores tasas de Densidad de Incidencia de Infección que oscilaron entre 1 y 0,46‰. Cirugía Cardiovascular fue el servicio con mayor tasa de Densidad de Incidencia de Infección (1,16‰), pero su Incidencia Acumulada de Episodios SARM (0,83%) no destacó.

En general las Unidades de Cuidados Intensivos se caracterizan por administrar terapias antibióticas prolongadas y de amplio espectro, Medicina Interna por ingresos, plurimorbilidad de los pacientes y largas estancias hospitalarias y los Servicios de Cirugía Cardiovascular y Angiología y Cirugía Vascul, por las maniobras invasivas tanto diagnósticas como terapéuticas, mostrando un entorno favorable para la transmisión de SARM y destacando así la importancia de la implantación y seguimiento de los programas de Vigilancia Activa y de las medidas de aislamiento, con el fin de conseguir reducir las infecciones causadas por este microorganismo.

### 1.3. Relevancia clínica de los aislamientos SARM en muestra clínica

La Prevalencia de colonización en muestra clínica total fue de 0,08%, es decir 1,62% menos que la tasa de Prevalencia obtenida en fosa nasal, mostrando así una vez más como el nicho ecológico por excelencia en *S. aureus* es la fosa nasal.

Los episodios de SARM en muestra clínica de acuerdo los criterios de los CDC 2008<sup>[93]</sup> obtenidos fueron: 13% Colonizaciones extrahospitalarias, 28% Colonizaciones hospitalarias, 28% Infecciones extrahospitalarias y 31% Infecciones intrahospitalarias. Sin embargo, en los episodios clasificados como extrahospitalarios no podemos descartar que fueran Infecciones relacionadas con la Asistencia Sanitaria ya que no en todas las historias clínicas se recogen los datos suficientes para obtener esta clasificación.

Últimamente en determinadas zonas geográficas como EE.UU.<sup>[114]</sup>, Canadá<sup>[115]</sup>, Dinamarca y Países Bajos<sup>[146]</sup> donde se describen cada vez más infecciones estrictamente comunitarias producidas por clones CA-MRSA pertenecientes a linajes

muy diferentes al de clones HA-MRSA. No obstante, como más adelante explicaremos, en nuestro estudio esta situación únicamente ha sido observada en un caso de infección extrahospitalaria.

La Densidad de Incidencia total de Infección nosocomial por SARM fue de 0,24‰ y la Densidad de Incidencia de Bacteriemias nosocomiales fue de 0,67 por 10.000 estancias, no resultando muy diferente a otras comunidades como Cataluña donde tras un estudio realizado por el programa VinCat se obtuvo una Densidad de Incidencia de Bacteriemias de 0,5 por 10.000 estancias, aunque en este estudio también contabilizaron las bacteriemias de origen comunitario<sup>[147]</sup>. Asimismo, la Densidad de Incidencia de Bacteriemia nosocomial fue similar a la encontrada en otros países como EE.UU. e Inglaterra (0,72 y 0,78 por 10.000 estancias respectivamente)<sup>[148]</sup>.

No obstante, se produjo una reducción que alcanza la significación estadística en la densidad de Incidencia de Infección nosocomial entre 2009 y 2010, hecho que probablemente se deba a la acción sinérgica de diferentes factores como: la búsqueda activa de portadores nasales, temprana instauración del tratamiento descolonizador y de las medidas de aislamiento de contacto. Mostrando una vez más la eficacia de los Sistemas de Vigilancia Activa en la reducción de las Infecciones Asociadas a los Cuidados Sanitarios<sup>[149-152]</sup>.

En la distribución de las infecciones por SARM observamos como las infecciones de piel y tejido blando predominan entre las infecciones comunitarias. Este hecho ya ha sido descrito previamente en Norte América, pero se ha asociado a clones CA-MRSA, no siendo el caso del presente estudio<sup>[153]</sup>. Por otro lado las bacteriemias se distribuyeron de manera similar entre ambos tipos de infección, mostrando un cambio en la epidemiología de las infecciones por SARM, coincidiendo con otros autores como Millan *et al.* 2010<sup>[154]</sup>, quienes encontraron que hasta un tercio de las infecciones bacteriémicas por este microorganismo no son de presentación nosocomial, siendo probable que los centros de asistencia sanitaria de larga estancia o los portadores de dispositivos intravasculares de larga duración sean los responsables de este escenario.

#### 1.4. Resolución de los episodios SARM

Solo un 14% de los pacientes estudiados finalizó el tratamiento descolonizador antes del alta, mientras que el 75,9% de los pacientes fueron dados de alta antes de poder comprobar la existencia de tres cultivos negativos como control después de finalizar el tratamiento descolonizador. Esto demuestra la importancia de disponer de un sistema de alerta informática al reingreso del paciente que informe sobre

su posible estado de portador con el fin de poder realizar un rápido aislamiento, hasta disponer de los resultados de los tests de screening.

El 25% de las infecciones fueron bacteriemias y se produjo fallecimiento en el 20% de los casos.

La bacteriemia por SARM se asocia a un peor pronóstico, de hecho la mortalidad entre pacientes con bacteriemia por SARM es cercana al 30%<sup>[155–157]</sup>. La gran mayoría de fallecimientos ocurren de una manera temprana dentro de los 30 días del comienzo del proceso<sup>[158]</sup>, produciéndose cerca del 50% de los fallecimientos entre los 4–9 días después del comienzo de la infección y la terapia antibiótica inadecuada es un factor de riesgo muy importante<sup>[159]</sup>. Sin embargo, la endocarditis y las infecciones del tracto respiratorio inferior suelen ser factores de riesgo de mortalidad tardía en los procesos de bacteriemia<sup>[159]</sup>. Es importante destacar que dentro de los factores de riesgo para el posterior desarrollo de bacteriemia por SARM se encuentra la colonización previa por SARM, destacando así la importancia del tratamiento descolonizador<sup>[135]</sup>.

## 2. Descripción de la Epidemiología Clonal de los aislamientos SARM

El genotipado mediante distintas técnicas de tipificación molecular (PFGE, MLST y SCC $mec$ ) de los aislamientos obtenidos detectó 16 clones distintos, siendo los predominantes 43% ST5–MRSA–IV (Pediátrico), 39% ST22–MRSA–IV (EMRSA–15) y 14% ST36–MRSA–II (EMRSA–16). El resto de clones presentaron una frecuencia menor o igual al 1% y fueron los siguientes: ST5–MRSA–II (clon New York–Japan), ST146 –MRSA–IV, ST125–MRSA–IV, ST896–MRSA–IV, ST30–MRSA–IV, ST72–MRSA–IV (USA700), ST8–MRSA–IV (clon USA300), ST2574–MRSA–XI, ST217–MRSA–IV, ST461, ST247–MRSA–I (clon Ibérico), ST45–MRSA–IV (clon Berlín), ST398–MRSA–IV.

Esta distribución muestra como mayoritarios a los clones Pediátrico, EMRSA–15 y EMRSA–16 que pertenecen a los Complejos Clonales 5, 22 y 30 y que han presentado una diseminación pandémica a lo largo de los años<sup>[68]</sup>. Actualmente el clon Pediátrico destaca por su considerable presencia a nivel comunitario en países de América Latina<sup>[108]</sup>, <sup>[109]</sup> y continúa presente en otros países como Francia, Suiza, España<sup>[124]</sup> y Reino Unido<sup>[68]</sup>. El clon EMRSA–15 muestra una amplia distribución representando cerca del 54% de los aislamientos en Portugal<sup>[65]</sup>, <sup>[68]</sup>, el 60% en



Malta e Irlanda<sup>[68], [160]</sup> y presentando junto con EMRSA-16 una amplia distribución tanto a nivel hospitalario como comunitario en el Reino Unido<sup>[91]</sup>. Este último clon también está presente en zonas como Sudáfrica y Malta<sup>[68]</sup>.

Nuestros resultados contrastan con el resto de España, donde el clon ST125-MRSA-IV es el predominante y responsable de más del 50% de las infecciones causadas por SARM161 y los clones EMRSA-15 y EMRSA-16 apenas son identificados a excepción de las comunidades de Galicia y Baleares<sup>[122-124]</sup>. Además la diversidad genética que encontramos en el resto de clones, merece ser comentada:

- **ST398-MRSA-IV**

Se trata de un clon cuyo linaje tiene un origen animal, pertenece al CC398<sup>[68]</sup> y fue descrito en 2008 por Nemati *et al.*<sup>[89]</sup> Coloniza principalmente a animales de ganado constituyendo estos su principal reservorio y posteriormente infecta o coloniza a humanos que mantienen un estrecho contacto con estos por su actividad laboral (granjeros y veterinarios)<sup>[95]</sup>. Fue aislado por primera vez en Bélgica y actualmente su presencia es mayoritaria en aquellos Países donde se han conseguido un mayor control de HA-MRSA como Países bajos, donde el clon ST398 representa el 41% de los aislamientos<sup>[95]</sup>. En nuestra institución los aislamientos procedían de las fosas nasales de 12 pacientes de nacionalidad española residentes en el área norte de Tenerife sin referencia a viajes, siendo clasificados estos aislamientos como colonizaciones hospitalarias y extrahospitalarias, sin poder asegurar su actividad profesional. En un estudio realizado en nuestro ámbito y en la misma fecha se demostró una colonización en fosa nasal de cerdos del 85,7% y de trabajadores del sector del 9,3%<sup>[162]</sup>. Por otro lado, se observa un incremento que alcanza la significación estadística en la frecuencia de aislamiento de este clon entre 2009 de 0,2% a 2010 de 2% en nuestro hospital, concordando con otro estudio alemán donde encontraron un incremento de 0,2% en 2004 a 5,4% en 2011<sup>[163]</sup>, siendo así evidente su mayor diseminación geográfica.

- **ST72-MRSA-IV (USA 700)**

Se trata de un clon de origen comunitario CA-MRSA que pertenece al CC8<sup>[68]</sup>, actualmente es el clon predominante entre los clones CA-MRSA en Corea<sup>[164]</sup> y destaca su emergencia como clon causante de infección nosocomial en Asia del Este<sup>[112]</sup>. En nuestra institución los aislamientos procedían de las fosas nasales de 7 pacientes de nacionalidad española residentes del área norte de Tenerife sin referencia a viajes, siendo clasificados estos aislamientos como colonizaciones extra e intrahospitalarias.

- **ST8–MRSA–IV (USA 300)**

Se trata de un clon considerado de origen comunitario CA–MRSA que pertenece al CC8. Fue aislado inicialmente en los años 90 en Australia<sup>[165]</sup> y posteriormente fue identificado como USA300 por McDougal *et al.* en 2003<sup>[166]</sup>. Actualmente es endémico en Canadá<sup>[115]</sup>, EE.UU.<sup>[114]</sup> y América Latina<sup>[108–109]</sup> y causa tanto infecciones nosocomiales como comunitarias<sup>[167]</sup>. En España se ha notificado su emergencia en los últimos años<sup>[126]</sup>. Inicialmente fue asociado a infecciones de origen comunitario entre pacientes jóvenes sin aparentes factores de riesgo, más tarde se relacionó con unos determinados grupos de población (atletas, reclusos, niños y militares) donde la aglomeración, el contacto piel–piel y el deficiente manejo de heridas eran comunes, facilitando así su diseminación y produciendo los primeros brotes de infecciones de tejido blando que más tarde podían evolucionar a infecciones más complicadas<sup>[168]</sup>. En un principio se especuló que no colonizaba las fosas nasales, pero tras diferentes estudios se ha demostrado que puede colonizar ésta y otras zonas del organismo<sup>[168]</sup>. El papel patógeno de este clon se le atribuye esencialmente a la presencia de genes de virulencia dentro de su genoma tales como la expresión de la toxina citotóxica PVL<sup>[168]</sup>. En nuestra institución únicamente se aisló en un paciente de nacionalidad española residente del área norte de Tenerife sin referencia a viajes, que sufrió una bacteriemia primaria clasificada como infección extrahospitalaria y que posteriormente falleció.

- **ST 217–MRSA–IV**

Se trata de un clon asociado a cuidados sanitarios (HA–MRSA) que pertenece al CC22 y deriva del clon EMRSA–15. Es uno de los clones predominantes en Suiza<sup>[67]</sup>. En nuestra institución los aislamientos procedían de las fosas nasales de 2 pacientes de nacionalidad española sin referencia a viajes, siendo clasificados estos aislamientos como colonizaciones extrahospitalarias.

- **ST 461**

Se trata de un clon de linaje comunitario CA–MRSA, que ha sido aislado previamente en Grecia<sup>[169]</sup> y Sudáfrica<sup>[170]</sup>, sin presentar una amplia distribución por el momento. En nuestra institución los aislamientos procedían de las fosas nasales de 3 pacientes de nacionalidad española sin referencia a viajes, siendo estos aislamientos clasificados como colonizaciones extrahospitalarias

- **ST 2574–MRSA–XI**

Se trata de un clon portador del cassette SCCmec XI, fue identificado por Paterson *et al.* 2014<sup>[92]</sup> en Reino Unido en 2013. Los clones portadores de

cassette *SCCmec XI* están asociados al ganado ya que predominan entre rumiantes y ratones<sup>[171]</sup> transmitiéndose posteriormente a humanos. Estos clones han sido identificados en diferentes países de Europa: Irlanda, Francia, Suiza, Países bajos, Alemania, Austria, Suiza, Finlandia, España, Suecia y Bélgica. Sin embargo poco se conoce de su epidemiología, destacando el incremento que se ha producido en su prevalencia en Dinamarca de 1.9% en 2010 a 2.8% en 2011<sup>[172]</sup>.

En España por el momento solo se ha publicado un artículo<sup>[173]</sup> en el que refieren 7 aislamientos de clones portadores de cassette *SCCmec XI*, siendo uno de ellos responsable de una bacteriemia que ocasionó el fallecimiento del paciente. En nuestra institución solo se obtuvo un aislamiento en fosa nasal clasificado como colonización extrahospitalaria de un paciente que no había viajado recientemente y que se dedicaba a la construcción. Es posible que la prevalencia de este clon se haya incrementado en los últimos años pero que no haya sido identificado por el diferente diagnóstico microbiológico que requiere, ya que presentan un gen *mecC* que es un nuevo alotipo de gen *mecA* y que no es detectado por las PCR actuales del gen *mecA*<sup>[87]</sup>. Por otro lado codifica una PBP<sub>2c</sub>, que tiene la misma función que la PBP<sub>2a</sub> pero no es detectada mediante los ensayos actuales de aglutinación frente PBP<sub>2a</sub><sup>[53]</sup> y finalmente presenta una mayor afinidad por oxacilina por lo que se muestra como resistente a cefoxitina pero con CMI frente oxacilina dentro del rango de sensibilidad<sup>[92]</sup>.

La diferente distribución con el resto de España y la emergencia de clones esporádicos predominantes en otros países podría explicarse porque Tenerife es una isla altamente turística que recibe miles de visitantes de otras nacionalidades cada año, posiblemente portadores de SARM, entre los que destacan británicos y sudamericanos. De hecho, el rol de los viajeros en la diseminación del SARM ya ha sido descrito por otros autores como Zhou *et al.*<sup>[174]</sup> y Harris *et al.*<sup>[175]</sup>.

Por otro lado, esta distribución contrasta con las de periodos analizados con anterioridad en nuestro hospital, donde entre Enero 1997 y Abril 2000 destacó el clon Ibérico representando el 63% de los aislamientos, seguido del clon Pediátrico (10%)<sup>[129]</sup>. Posteriormente desde Mayo 2000 hasta Diciembre 2004 se observó un cambio en el clon predominante; EMRSA-16 (65.21%) seguido de ST5-MRSA-II (New York-Japan) (10.72%), ST247-MRSA-I (Ibérico) (9.19%), ST5-MRSA-IVA (Pediátrico) (8.32%) y EMRSA-15 (6.56%)<sup>[130]</sup>. En 2008 se identificaron por primera vez en nuestra institución los clones ST398-MRSA-IV, ST72-MRSA-IV (USA700), ST8-MRSA-IV (USA300) que se encontraron en una en escasa proporción 0.8%<sup>[176]</sup>. Durante el periodo de estudio 2009-2010 continuaron detectándose estos últimos

y se identificaron tres clones nuevos para nuestro hospital: ST217–MRSA–I, ST461, ST2574–MRSA–XI, a la vez que se produjo de nuevo un reemplazamiento clonal, siendo los clones mayoritarios los clones Pediátrico, EMRSA–15 y EMRSA–16. De hecho, se observa una disminución que alcanza la significación estadística en la frecuencia de aislamiento del clon EMRSA–16 entre 2009 de 17% a 2010 de 11%, mostrando su continua disminución y posible reemplazamiento futuro.

Estos hechos muestran dos aspectos que deben ser tenidos en cuenta:

- Se observa un continuo reemplazamiento clonal, fenómeno que ya ha sido descrito anteriormente en diferentes países. Por ejemplo, en el resto de España la sustitución del clon Ibérico por el clon ST125–MRSA–IV<sup>[122]</sup>, en EE.UU. la sustitución del clon USA100 por el clon USA300<sup>[168]</sup>, en Portugal la sustitución del clon ST239–MRSA–III por EMRSA–15<sup>[177–178]</sup> etc. Este fenómeno no está claro por qué sucede: algunos autores abogan por la mayor capacidad de diseminación en el ambiente hospitalario de algunas cepas sobre otras<sup>[179]</sup>, otros por la capacidad de responder a específicas presiones selectivas en un área geográfica determinada por parte de algunas cepas por lo que consiguen ser predominantes en dichas áreas<sup>[180]</sup>. Sin embargo en nuestro caso como en otros, se ha producido un cambio sin conocerse la razón epidemiológica<sup>[181]</sup>.
- La diversidad genética que encontramos en los clones que no fueron predominantes con respecto al periodo 2000–2004, muestra la creciente introducción de clones esporádicos en nuestra institución. Esta situación también ha sido observada en Irlanda donde se ha registrado un incremento de clones esporádicos de 12,1% en 2005 al 23,1% en 2011<sup>[160]</sup>.

Tras analizar una posible relación entre clon y posterior desarrollo de infección entre los tres clones mayoritarios en nuestra institución por ser los clones que presentaron un tamaño muestral adecuado, no encontramos ninguna significación entre mayor riesgo a sufrir una infección sobre colonización, ni entre mayor riesgo a sufrir una infección intrahospitalaria que extrahospitalaria. Existe una gran controversia sobre la presencia de clones más patógenos que otros, ya que existen estudios como el de Melles *et al.*<sup>[182]</sup>, que abogan sobre la existencia de ciertos linajes SARM como los del CC5 que presentan un mayor potencial invasivo; sin embargo otros autores como Feil *et al.*<sup>[183]</sup>, sugieren que la virulencia no tiene por qué estar asociada al linaje clonal.

Por otro lado, se sugiere la presencia de cepas más resistentes que otras por el mayor contenido y expresión de genes de resistencia en los cassettes SCC*mec*. Es

difícil evaluar la verdadera patogenicidad de las mismas y la consiguiente infección. Autores como Sapri *et al.*<sup>[184]</sup> sugieren una relación inversa entre resistencia y virulencia, ya que las cepas más resistentes podrían ser menos virulentas por contener menos genes de virulencia.

Después de analizar el tipo de adquisición de SARM y su clasificación según los criterios de los CDC 2008<sup>[93]</sup> se observa que todas las infecciones adquiridas en el Hospital y la gran mayoría de las adquiridas en la comunidad fueron causadas por clones asociados a los cuidados sanitarios (HA-MRSA); sin embargo, también hemos podido observar como algunas colonizaciones en fosa nasal eran causadas por clones LA-MRSA y CA-MRSA. Estos hechos demuestran el comienzo de la diseminación a nivel hospitalario de clones LA-MRSA y CA-MRSA y la presencia de clones HA-MRSA a nivel comunitario, concordando con otros estudios<sup>[88], [90], [122], [185-186]</sup>.

### 3. Estudio de la resistencia antibiótica en los aislamientos SARM

#### 3.1. Resistencia de los aislamientos SARM en fosa nasal a mupirocina

Debido a que la colonización en fosa nasal por SARM ha mostrado ser un factor de riesgo para la transmisión nosocomial y para la posterior infección por este microorganismo<sup>[39], [187]</sup>, la descolonización nasal parece ser una estrategia eficaz para disminuir estos riesgos<sup>[39]</sup>. La efectividad de la utilización de mupirocina nasal ha sido estimada cerca del 94% una semana después del tratamiento y del 65% después de 14 días<sup>[188]</sup>. Sin embargo, es preciso su correcta utilización, ya que su eficacia como agente descolonizador se ha visto comprometida por su utilización indiscriminada, repetida y prolongada, generando problemas de resistencia, fracasos en pacientes con colonización cutánea en múltiples localizaciones, así como recaídas y recolonizaciones <sup>[57], [189], [190]</sup>. De hecho Koch *et al.*<sup>[188]</sup>, en una revisión de la literatura científica sobre las medidas preventivas para limitar las infecciones por SARM relacionadas con los cuidados sanitarios, concluyen que las terapias de descolonización con mupirocina deben restringirse a aquellos portadores de *S. aureus* con alto riesgo de desarrollar infecciones nosocomiales por este microorganismo. Asimismo, las guías APIC de 2010 no aconsejan la descolonización rutinaria de pacientes colonizados por SARM y la indica en las siguientes situaciones<sup>[58]</sup>:

- En aquellos pacientes portadores que son responsables de la transmisión continua o en situaciones de brotes.
- En pacientes portadores que van a ser sometidos a un proceso quirúrgico y que presentan factores de riesgo para una infección de localización quirúrgica por SARM.
- En ciertas poblaciones portadoras de SARM con el fin de reducir subsecuentes infecciones como: pacientes dializados, pacientes con infecciones recurrentes por *S. aureus* y pacientes ingresados en Unidades de Cuidados Intensivos.

Sin embargo, no debemos olvidar otros factores que probablemente estén relacionados con el fracaso del tratamiento descolonizador como son: las enfermedades de base del paciente, presencia de lesiones en la piel, dispositivos, el insuficiente cumplimiento de las medidas de aislamiento, aplicación incompleta del tratamiento descolonizador y la aplicación de mupirocina extra nasal<sup>[23], [39], [191]</sup>. En nuestro hospital la aplicación del tratamiento descolonizador con mupirocina al 2% administrada tópicamente en las fosas nasales 3 veces al día y baños con gel de clorhexidina al 4%, durante 5 días se realiza de manera universal a todos aquellos pacientes diagnosticados de SARM en fosa nasal siempre y cuando no presenten este microorganismo en otras localizaciones, en cuyo caso se espera a la negativización de SARM en los cultivos microbiológicos de dichas localizaciones.

La tasa de resistencia a mupirocina obtenida durante el periodo 2009–2010 fue del 16% (13% HLR y 3% LLR) y se ha mantenido estable respecto al periodo anterior de estudio 2000–2004<sup>[130]</sup> en el cual todavía no se había implantado la Vigilancia Activa en nuestro hospital y se obtuvo una tasa de resistencia a mupirocina de 15,6% (11,3% HLR y 4,3% LLR), no alcanzando significación estadística cuando se compararon ambos periodos. Este resultado contrasta con el que obtuvieron Patel *et al.*<sup>[192]</sup> donde tras realizar un sistema de vigilancia universal y aplicar tratamiento descolonizador con mupirocina observaron un incremento en la tasa de resistencia frente mupirocina desde el 4,1% al 7,2% ( $p \leq 0,05$ ).

Por otro lado, la tasa de resistencia del 16% que obtuvimos concuerda con la observada en el resto de España en otros estudios como Cuevas *et al.*, y Perez–Roth *et al.*, que la sitúan entre el 19,3% y 14,8% respectivamente<sup>[120], [193]</sup>, aunque también existen divergencias como el estudio de de Potel *et al.*<sup>[194]</sup>, realizado en un número limitado de hospitales donde encontraron una tasa de resistencia del 1,3%.

Asimismo, el resto de países presenta tasas diferentes; 14% en Corea<sup>[195]</sup>, 13,6% en EE.UU.<sup>[196]</sup>, 15% en Italia<sup>[197]</sup>, 3% en Austria, Alemania y Suiza<sup>[198]</sup>, 6% China<sup>[199]</sup> y 12% Canadá<sup>[200]</sup>.

Algo que llama la atención en nuestros resultados es la disminución significativa del tipo de resistencia de bajo nivel frente a mupirocina (LLR) entre los años 2009 y 2010, de forma que las cepas que presentan alto nivel de resistencia (HLR) son las responsables mayoritariamente de la resistencia a mupirocina. Este fenómeno es debido a:

- El propio mecanismo de resistencia, ya que las cepas LLR se producen por una modificación cromosómica del gen *ileS* que codifica al enzima Isoleucyl-RNA-sintetasa y por tanto solo se transmite de bacterias madres a hijas. Sin embargo la resistencia HLR se debe a la transmisión plasmídica del gen *mupA* o *mupB* sintetizándose una enzima Isoleucyl-RNA-sintetasa modificada, sobre la cual la mupirocina no puede actuar. Este último mecanismo de resistencia presenta una mayor facilidad de transmisión que el anterior ya que puede realizarse entre diferentes clones e incluso diferentes especies siendo los estafilococos coagulasa negativos importantes reservorios<sup>[201]</sup> y por otra parte estos plásmidos suelen albergar genes de resistencias a otros antibióticos<sup>[23], [26]</sup>.

Esto supone un incremento de las limitaciones del uso de la mupirocina. Según el estudio de Walker *et al.*<sup>[189]</sup>, cuando se utiliza mupirocina como tratamiento descolonizador de SARM sobre una cepa sensible se produce fallo de erradicación en el 20% de los casos, mientras que cuando se aplica sobre cepas LLR se descoloniza el 80% de los casos, aunque después de 1–4 semanas solo el 25% presenta una descolonización verdadera. Esta situación empeora cuando se aplica sobre aislamientos con alto nivel de resistencia frente a mupirocina ya que la descolonización inicial solo es del 27.7%. Sin embargo, algunos autores cuestionan el significado clínico de cualquier nivel de resistencia a mupirocina en SARM por la elevada concentración local que alcanza la mupirocina tópica en fosas nasales<sup>[202]</sup>.

La emergencia de aislamientos SARM con alto nivel de resistencia a mupirocina ya ha sido documentada en diferentes países como en Irlanda, donde se han registrado tasas de 1,4% en el periodo 1999–2005 hasta un 2,9% en el periodo 2006–2009<sup>[198]</sup>. Algo similar ha sucedido en Canadá, donde se han registrado tasas del 1,6% en el periodo 1995–1999 hasta un 7% en el periodo 2000–2004<sup>[200]</sup>. Asimismo las tasas de resistencia tipo HLR varían en función del país: Francia 0,8%, EE.UU. 0,62% y Canadá 7%<sup>[201]</sup>.

El clon Pediátrico ha mostrado una mayor habilidad para adquirir el gen *mupA* que EMRSA-15 y EMRSA-16 ya que presenta una diferencia de aislamientos con resistencia tipo HLR que alcanza significación estadística, sin embargo se requieren más estudios moleculares que analicen el tipo de plásmido responsable de la transmisión y su éxito de transmisión.

La tasa de resistencia a mupirocina se ha mantenido estable entre los aislamientos clasificados como colonizaciones extrahospitalarias (16%) y aquellos que fueron clasificados como colonizaciones hospitalarias (18%), contrastando con el aumento de resistencia que han encontrado otros autores como Upton *et al.*<sup>[203]</sup> en aislamientos extrahospitalarios en Nueva Zelanda probablemente debido al uso indebido de mupirocina ya que se dispensaba sin prescripción médica.

### 3.2. Asociación entre antibiotipos y clones SARM

Con el objetivo de poder establecer una correlación entre antibiotipo y los tres clones mayoritarios en nuestro hospital (Pediátrico, EMRSA-15, EMRSA-16) analizamos las sensibilidades a clindamicina, eritromicina, gentamicina, tobramicina, trimetropim sulfametoxazol, rifampicina, vancomicina, teicoplanina, quiniprustina/dalfopristina y linezolid y agrupamos a todos los aislamientos SARM en nueve antibiotipos.

Encontramos que ningún antibiotipo fue exclusivo para un determinado clon, pero los antibiotipos que mejor definieron a los tres clones fueron:

- El antibiotipo número 4 para el clon Pediátrico, mostrando resistencia a tobramicina y sensibilidad a clindamicina, eritromicina, gentamicina, rifampicina y trimetropim-sulfametoxazol, vancomicina, quiniprustina/dalfopristina y linezolid.
- El antibiotipo número 3 para el clon EMRSA-15, que fue sensible a todos estos antibióticos.
- El antibiotipo número 2 para el clon EMRSA-16, mostrando resistencia a: clindamicina, eritromicina, tobramicina y sensibilidad al resto.

Estos resultados coinciden con los descritos por otros autores tales como Pérez-Roth *et al.*<sup>[193]</sup>, quienes encontraron que el clon EMRSA-16 presentaba resistencia a clindamicina, eritromicina, pero era sensible a gentamicina. Teixeira *et al.*, 2012<sup>[177]</sup> quienes relacionaron el clon Pediátrico con un antibiotipo sensible a clindamicina, gentamicina, rifampicina, trimetropim sulfametoxazol, tetraciclinas, linezolid y vancomicina. Sin embargo, nuestros resultados no coinciden con los publicados por Amorim *et al.*, 2007<sup>[181]</sup> que asoció el EMRSA-15 a un antibiotipo definido por resistencia a clindamicina y eritromicina, pero sensible a gentamicina, tobramicina, tetraciclina, trimetropim sulfametoxazol y rifampicina.



Cuando analizamos las tasas globales de resistencia de todos los clones SARM identificados durante el periodo de estudio, encontramos que el 100% fue sensible a vancomicina por lo que de momento no encontramos cepas VRSA, ni VISA. La resistencia VRSA es muy rara; en EE.UU. desde 2002 hasta 2012 se han declarado 11 casos<sup>[14]</sup> y publicaciones recientes han documentado el hallazgo de dos aislamientos en la India y en Irán<sup>[15]</sup>. En Europa ya se ha declarado un primer caso en 2014, concretamente en Portugal<sup>[17]</sup>. Las cepas VISA actualmente representan cerca del 30% de los aislamientos de SARM en Turquía, 10% en Australia, 6% en Israel y 0,7% en Francia<sup>[18]</sup>. Varios estudios han identificado un cambio global de tasas de resistencia de SARM cuando se ha producido un reemplazamiento clonal dentro de una institución. Amorim *et al.*<sup>[181]</sup>, describieron el reemplazamiento del clon brasileño multirresistente por el clon EMRSA-15 en Portugal, con una disminución de la resistencia a gentamicina, tetraciclina y rifampicina; Schaumburg *et al.*<sup>[163]</sup>, observaron un incremento de la resistencia a trimetropim sulfametoxazol y tetraciclinas, asociado a un incremento en la proporción de aislamientos LA-MRSA en Alemania y Menegotto *et al.*<sup>[28]</sup>, observaron una disminución de la resistencia a clindamicina y gentamicina, pero un incremento de resistencia a ciprofloxacino cuando el clon ST228-MRSA-I fue reemplazado por el clon ST125-MRSA-IV/V.

Algo similar ha ocurrido en nuestra institución cuando comparamos las tasas globales de resistencia frente a clindamicina, eritromicina y rifampicina del periodo 2009-2010 con el periodo 2000-2004, en el cual la distribución clonal de SARM fue la siguiente: 298 (65%) EMRSA-16, 49 (11%) New York-Japan, 42 (9%) Ibérico; 38 (8%) Pediátrico y 30 (7%) EMRSA-15, observándose una disminución de la resistencia a estos antibióticos durante el periodo 2009-2010 que alcanza significación estadística ( $p < 0,001$ ).

Dicha reducción puede ser atribuida al reemplazamiento clonal EMRSA-16 portador del cassette SCCmec II, por el clon Pediátrico y EMRSA-15 portadores del cassette SCCmec IV. Debido a que los cassettes SCCmec I y II, se caracterizan por presentar un gran tamaño, una distribución limitada a determinados linajes de SARM, contener el gen *mecA* y otros genes de resistencia a antibióticos no  $\beta$ -lactámicos y estar presentes mayoritariamente sobre clones HA-MRSA, se puede explicar así el fenómeno de la multirresistencia en las cepas nosocomiales<sup>[67]</sup>. Sin embargo, el cassette SCCmec IV se caracteriza por presentar un tamaño pequeño y no presentar otros genes de resistencia diferentes al gen *mecA* y por tanto mayor sensibilidad, mayor movilidad, y estar presente en gran variedad de linajes SARM<sup>[37], [88]</sup>.

#### 4. Estudio de la relación clonal entre los aislamientos SARM en fosa nasal y en muestra clínica

El riesgo de infección entre pacientes colonizados por *S. aureus* se estima de 12 veces mayor a la de aquellos pacientes que no son portadores<sup>[39]</sup>.

La mayoría de los casos de infección son considerados infecciones endógenas causadas por la misma cepa que coloniza la fosa nasal<sup>[6], [39]</sup>. Autores como Koositra –Smid *et al.*, 2004<sup>[204]</sup> han documentado que cerca del 78% de los pacientes que presentan aislamientos de *S. aureus* en quemaduras están colonizados con la misma cepa que había sido aislada en sus fosas nasales a su ingreso. Asimismo, Reighard *et al.*, 2009<sup>[42]</sup> concluyeron que el 89,5% de los casos de pacientes tenían el mismo aislamiento en fosa nasal que en muestra clínica y que de estos el 47,4% presentaba un estado portador en fosa nasal previamente al desarrollo a la infección/colonización de otras zonas.

En nuestros resultados se observa la presencia del mismo clon en fosa nasal y muestra clínica en el 93% de los episodios estudiados. Asimismo, la coincidencia entre los clones aislados en fosa nasal y muestra clínica mostró un valor Kappa de 0.895 que alcanza significación estadística, mostrando una concordancia casi perfecta. Este resultado hace referencia a aislamientos SARM simultáneos y consecuentes, entre fosa nasal y muestra clínica. Los clones responsables fueron mayoritariamente EMRSA–15, EMRSA–16 y Pediátrico. Además, en el estudio de casos y controles que realizamos para el estudio de factores de riesgo entre portadores nasales para el posterior desarrollo de infección, también analizamos la relación existente entre los aislamientos de fosa nasal y los aislamientos posteriores en muestra clínica, obteniendo que el 98% de los casos la cepa de muestra era idéntica a la de fosa nasal.

Sin embargo, otros autores como Taylor *et al.*<sup>[205]</sup>, encontraron que en solo el 42% de los casos la cepa era idéntica en fosa nasal y muestra clínica. Con nuestros resultados no podemos afirmar rotundamente que la transmisión de SARM se haya producido mediante una transmisión paciente–paciente, ya que los clones involucrados pertenecen a linajes pandémicos de alta diseminación. Sin embargo, las precauciones de contacto instauradas y la falta de interacción entre pacientes hospitalizados pueden favorecer los procesos de autoinfección y autocolonización siendo esta una posible explicación de tal similitud entre clones, más que una adquisición exógena.

## 5. Análisis de los factores de riesgo entre portadores nasales para el posterior desarrollo de infección/colonización por SARM en localización clínica

La colonización asintomática por *S. aureus* es común, se calcula que sobre el 30% de adultos sanos se encuentra colonizado. Se estima que el 20% de la población general presenta una colonización permanente, mientras que el 30% un estado de colonización intermitente y 50% restante parece no colonizarse<sup>[39]</sup>.

Diferentes estudios han documentado que tanto colonizaciones comunitarias como nosocomiales por SARM pueden incrementar el riesgo de infecciones posteriores en diferentes localizaciones<sup>[38–39]</sup>. De hecho, el estado de portador es considerado como un predictor de infección y la tasa de infección en otras localizaciones clínicas entre pacientes colonizados es estimada sobre el 30%<sup>[40], [42]</sup>.

Las infecciones por SARM han sido asociadas con altas tasas de mortalidad <sup>[206–208]</sup>. En nuestro estudio dicha tasa no alcanza significación estadística entre el grupo de casos y control, pero es probable que con un mayor tamaño muestral hubiéramos obtenido mayores tasas de mortalidad en el grupo de casos, coincidiendo con lo publicado anteriormente.

Se han identificado diferentes factores de riesgo predisponentes para la colonización nasal por SARM (hospitalizaciones previas, procedencia de un centro de asistencia sanitaria de larga estancia e infección crónica de piel) <sup>[209–210]</sup> y la posterior infección<sup>[38]</sup>.

Sin embargo, no todos los pacientes portadores nasales desarrollan infección. Entre los diferentes factores de riesgo de infección por SARM entre portadores nasales descritos por otros autores se encuentran: estancia hospitalaria mayor de tres semanas<sup>[42]</sup>, procedencia de un centro de asistencia sanitaria de larga estancia<sup>[42]</sup>, tratamiento previo con corticoides<sup>[46]</sup>, desarrollo de úlceras por presión después del ingreso<sup>[46]</sup>, diabetes mellitus<sup>[47]</sup>, sondaje urinario<sup>[47–48]</sup>, hospitalizaciones previas<sup>[47–48]</sup>, uso de catéteres centrales<sup>[48]</sup>, historia previa de colonización o infección por SARM<sup>[47]</sup>, presencia de tumor maligno sólido<sup>[43]</sup> y  $\geq 3$  comorbilidades<sup>[48]</sup>.

El único factor que según el análisis de regresión logística se asoció a la aparición de una infección/colonización por SARM fue la emergencia de resistencia a mupirocina.

En contraste, no observamos diferencias entre aquellos portadores nasales que presentaron desde un inicio aislamientos resistentes a mupirocina, porque cuando la resistencia fue detectada, el tratamiento descolonizador con mupirocina fue suspendido y cambiado a ácido fusídico. A pesar del éxito de las estrategias de descolonización nasal con mupirocina para prevenir la posterior infección, algunos autores han observado una tasa de fallo en la erradicación del 20% entre aislamientos sensibles a mupirocina<sup>[189]</sup>. Aunque otros autores relacionan más este fallo de descolonización a factores de riesgo del paciente y al bajo cumplimiento con el tratamiento descolonizador, que con factores microbiológicos<sup>[39]</sup>.

La emergencia de clones de SARM resistentes a mupirocina, puede estar asociado con el uso de este antibiótico<sup>[189]</sup> y diferentes hipótesis han sido elaboradas para explicar esta asociación. En algunos pacientes, el aislamiento de SARM en fosa nasal obtenido después del tratamiento descolonizador, fue el mismo que el obtenido antes del tratamiento, con la única diferencia del cambio de sensibilidad a mupirocina a resistencia de alto nivel. Esta situación puede ser debida a la transmisión plasmídica del gen *mupA* sintetizándose un enzima Isoleucyl-RNA-sintetasa modificada sobre la cual la mupirocina no puede actuar. Este gen *mupA* puede ser transmitido a partir de otras especies diferentes a *S. aureus*, tales como *Staphylococcus epidermidis*<sup>[23–25], [211]</sup>.

Por otro lado, el aislamiento nasal obtenido tras el tratamiento descolonizador puede ser diferente al obtenido en fosa nasal inicialmente, pudiendo ser debido a una nueva colonización por transmisión a través del personal sanitario o por una colonización inicial policlonal en fosa nasal.

En este último caso, el clon mupirocina sensible podría ser el que más exitosamente habría colonizado las fosas nasales, mientras el clon resistente podría haber permanecido latente siendo dificultoso su recuperación en el cultivo. El subsecuente tratamiento descolonizador, podría eliminar el clon predominante y favorecer el desarrollo de clon resistente. Esta hipótesis es apoyada por la coexistencia de varios clones de *S. aureus* en fosa nasal, ya que aproximadamente, el 6.6% de los pacientes colonizados por *S. aureus* en fosa nasal presentan más de un clon<sup>[212]</sup>. Autores como Maslow *et al.*<sup>[213]</sup>, encontraron una colonización simultánea policlonal en diferentes localizaciones clínicas. Sin embargo, algunos estudios abogan por la presencia de una colonización monoclonal en fosa nasal como resultado de la competitividad existente para la colonización de un nicho ecológico<sup>[214]</sup>.

La emergencia de clones de mupirocina resistentes es muy importante ya que han sido asociados con el incremento de la mortalidad intrahospitalaria comparada

con los aislamientos sensibles a mupirocina después del tratamiento descolonizador con mupirocina<sup>[196]</sup> y con la transmisión del gen *mupA* vía plasmídica para la resistencia de alto nivel a mupirocina.

Nuestro estudio presenta algunas limitaciones, como:

La recogida de datos categórica de dispositivos invasivos, en vez de recoger el número de días de exposición. Asimismo en tres de ocho casos no pudimos recuperar la cepa emergente con resistencia a alto nivel mupirocina, por tanto no pudimos establecer la relación clonal entre el primer y segundo aislamiento en fosa nasal. En los casos restantes: el primer y segundo aislamiento fueron idénticos en tres casos, mientras que en dos fueron diferentes. Por tanto, no podemos establecer conclusiones respecto al origen clonal de recolonización nasal de nuestros pacientes. Otra limitación es que no realizamos un screening de zonas como perineo, recto y axilas, lugares que suelen ser reservorios silentes desde los cuales los pacientes podrían haber sido recolonizados<sup>[139], [140]</sup>. Sin embargo, otros estudios han demostrado que no es coste efectivo realizar screening en varias localizaciones consecutivamente<sup>[141]</sup>, de hecho cuando el screening se centra únicamente a la monitorización portadores nasales el número de pacientes colonizados por SARM que se pierden es pequeño, porque la colonización de SARM extra nasal es infrecuente y está fuertemente asociada con la colonización nasal de SARM<sup>[142]</sup>.

A pesar de estas limitaciones, nuestros resultados sugieren la posible influencia de la emergencia de clones SARM con alto nivel de resistencia a la mupirocina en fosa nasal con la subsecuente incidencia de colonización/infección en otras localizaciones. Para confirmar nuestros resultados son necesarios la elaboración de estudios prospectivos con diseños de seguimiento.

## VII. Conclusiones

1. La mayoría de los episodios de SARM de nuestro estudio fueron detectados mediante el Sistema de Vigilancia Activa, lo que indica que la Vigilancia Pasiva mediante cultivo de muestras clínicas es tardío e insuficiente para el control de la infección causada por SARM.
2. Solo el 14% de los pacientes estudiados finalizó el tratamiento descolonizador antes del alta, por lo que es de gran importancia disponer de un sistema de alerta informática al reingreso del paciente que informe sobre su posible estado de portador.
3. Las mayores cifras de Densidad de Incidencia de Infección nosocomial por SARM se registraron en los servicios de Cirugía Cardiovascular, donde las maniobras invasivas tanto para el diagnóstico como terapéuticas son frecuentes, en las Unidades de Cuidados Intensivos, donde se administran terapias antibióticas prolongadas y de amplio espectro y en Medicina Interna, donde los reingresos, pluricomorbilidades y largas estancias son frecuente, mostrando en su conjunto un entorno favorable para la transmisión del SARM.
4. La Densidad de Incidencia de Bacteriemias nosocomiales por SARM fue similar a la encontrada en otros países como EE.UU. e Inglaterra, produciéndose el fallecimiento en el 20% de los pacientes con bacteriemias por este microorganismo, por lo que es esencial la temprana detección del estado de portador nasal para comenzar de forma precoz el tratamiento descolonizador.
5. En relación a la distribución clonal de los aislamientos de SARM obtenidos, se observa un continuo reemplazamiento clonal con respecto a los periodos anteriores de estudio en el HUC, con un claro predominio de los clones Pediátrico, EMRSA-15 y EMRSA-16 y una gran diversidad clonal, que muestra la creciente introducción de clones esporádicos tipo LA-MRSA y CA-MRSA en nuestra institución.
6. En nuestro estudio encontramos una distribución clonal de SARM diferente al resto de España, así como la presencia de manera esporádica de clones predominantes en otros países, ésto podría ser explicado por el papel que desempeña el turismo en la transmisión de diferentes clones de este microorganismo.

7. No encontramos para ninguno de los clones mayoritarios un mayor riesgo de desarrollar infección en los pacientes previamente colonizados.
8. Todas las infecciones asociadas a cuidados sanitarios y la mayoría de las comunitarias fueron causadas por clones asociados a cuidados sanitarios (HA-MRSA); sin embargo, algunas colonizaciones tanto hospitalarias como comunitarias han sido originadas por clones CA-MRSA y LA-MRSA, mostrando el comienzo de la diseminación a nivel hospitalario de este tipo de clones y la presencia de clones HA-MRSA a nivel comunitario.
9. La tasa de resistencia a mupirocina entre los aislamientos SARM de fosa nasal se ha mantenido estable con respecto al periodo anterior del presente estudio y concuerda con las tasas de resistencia registradas en el resto de España. Sin embargo, se observa un aumento en el tipo de resistencia tipo HLR que presenta una gran facilidad de transmisión, lo que limita el uso de mupirocina en el futuro.
10. En el análisis de la resistencia antibiótica de los clones mayoritarios encontramos nueve antibiotipos diferentes, no siendo ninguno exclusivo para un determinado clon, si bien si existieron combinaciones mayoritarias entre antibiotipo y clon que alcanzaron significación estadística. Por lo tanto, el análisis de los perfiles de sensibilidad podrían ser utilizados como marcador fenotípico para una búsqueda preliminar de nuevos clones SARM en una institución determinada, mientras que el análisis molecular podría servir como una guía para el adecuado tratamiento y mejor control de la infección.
11. Obtuvimos una elevada concordancia entre los clones presentes en fosas nasales y en muestra clínica de un mismo paciente; sin embargo, no podemos afirmar rotundamente que la transmisión de SARM se haya producido mediante un proceso de autoinfección/colonización, ya que los clones involucrados pertenecen a linajes pandémicos ampliamente distribuidos.
12. El único factor independiente de riesgo entre portadores nasales para el desarrollo de una infección/colonización en otra localización fue la emergencia de resistencia de alto nivel a mupirocina entre aislamientos nasales inicialmente sensibles, si bien sería necesario la realización de otros estudios para su confirmación.



## VIII. Bibliografía

1. Que Y, Moreillon P. *Staphylococcus aureus*. En: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R, et al, editores. Enfermedades Infecciosas, Principios y Práctica. Ed.7.<sup>a</sup> Barcelona: Elsevier España, S.L; 2012. p. 2543–2582.
2. McCarthy AJ, Lindsay JA. Genetic variation in *Staphylococcus aureus* surface and immune evasion genes is lineage associated: implications for vaccine design and host–pathogen interactions. BMC Microbiol 2010; 10:173.
3. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. N Engl J Med 1998; 20: 339:520–532.
4. Baba T, Takeuchi F, Kuroda M, Yuzawa H, Aoki K, Oguchi A, Nagai Y, Iwama N, Asano K, Naimi T, Kuroda H, Cui L, Yamamoto K, Hiramatsu K. Genome and virulence determinants of high virulence community–acquired MRSA. Lancet 2002; 25:359:1819–1827.
5. Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. Clin Microbiol Rev 1997; 10:505–520.
6. von Eiff C, Becker K, Machka K, Stammer H, Peters GN. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Engl J Med 2001; 344:11–16.
7. Poon H, Chang MH, Fung HB. Ceftaroline Fosamil: a Cephalosporin with activity against Methicillin–resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Ther 2012; 34:743–765.
8. Bustos–Martínez J, Hamdan–Partida A, Gutiérrez–Cárdenas M. *Staphylococcus aureus* la reemergencia de un patógeno en la comunidad. Rev Biomed 2006; 17: 287–305.
9. Cattoir V, Leclercq R.  $\beta$ –Lactams and Staphylococci. En: Courvalin P, Leclercq R, Rice L. B. Antibioqram. Ed. 1.<sup>a</sup> Oregon (USA): ASM Press; 2010. p. 99–107.
10. Bismuth R, Courvalin P. Aminoglycosides and gram–positive bacteria. En: Courvalin P, Leclercq R, Rice L. B. Antibioqram. Ed. 1.<sup>a</sup> Oregon (USA): ASM Press; 2010. p. 213–223.
11. Varon E. Quinolones and gram positive bacteria En: Courvalin P, Leclercq R, Rice L. B. Antibioqram. Ed. 1.<sup>a</sup> Oregon (USA): ASM Press; 2010. p. 243–259.
12. Leclercq R. Glycopeptides and Staphylococci. En: Courvalin P, Leclercq R, Rice L. B. Antibioqram. Ed. 1.<sup>a</sup> Oregon (USA): ASM Press; 2010. p. 273–284.
13. Sievert DM, Boulton ML, Stoltman G, Johnson D, Stobierski MG, Downes FP, Somsel PA, Rudrik JT, Brown W, Hafeez W, Lundstrom T, Flanagan E, Johnson R, Mitchell J, Chang S. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin United States. Morb Mortal Wkly Rep 2002; 51:565–567.
14. Kos VN, Desjardins CA, Griggs A, Cerqueira G, Van Tonder A, Holden MT, Godfrey P, Palmer KL, Bodi K, Mongodin EF, Wortman J, Feldgarden M, Lawley T, Gill SR, Haas BJ, Birren B, Gilmore MS. Comparative genomics of vancomycin–resistant *Staphylococcus aureus* strains and their positions within the clade most commonly associated with Methicillin–resistant *S. aureus* hospital–acquired infection in the United States. MBio 2012; 22:3(3).
15. Aligholi M, Emaneini M, Jabalameli F, Shahsavan S, Dabiri H, Sedaght H. Emergence of high–level vancomycin–resistant *Staphylococcus aureus* in the Imam Khomeini Hospital in Tehran. Med Princ Pract. 2008; 17:432–434.

16. Saha B, Singh AK, Ghosh A, Bal M. Identification and characterization of a vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Kolkata (South Asia). *J Med Microbiol* 2008; 57:72–79.
17. Friães A, Resina C, Manuel V, Lito L, Ramirez M, Melo–Cristino J. Epidemiological survey of the first case of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in Europe. *Epidemiol Infect* 2014; 5:1–4.
18. Howden BP, Davies JK, Johnson PD, Stinear TP, Grayson ML. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* 2010; 23:99–139.
19. Fraimow H. Lipopeptides, lipoglycopeptides and glycolipodepsipeptides. En: Courvalin P, Leclercq R, Rice L. B. *Antibiogram*. Ed. 1.<sup>a</sup> Oregon (USA): ASM Press; 2010. p. 295–304.
20. Leclercq R. Macrolides, Lincosamides and Streptogramins. En: Courvalin P, Leclercq R, Rice L. B. *Antibiogram*. Ed. 1.<sup>a</sup> Oregon (USA): ASM Press; 2010. p. 305–326.
21. Leclercq R. Oxazolidinones. En: Courvalin P, Leclercq R, Rice L. B. *Antibiogram*. Ed. 1.<sup>a</sup> Oregon (USA): ASM Press; 2010. p. 339–345.
22. Turnidge J, Gerraro M, Jorgensen J. Antibacterial agents and susceptibility test methods. En: *Manual of Clinical Microbiology*. Ed. 9.<sup>a</sup> Washington (USA): ASM Press; 2007. p. 1077–1113.
23. Patel JB, Gorwitz RJ, Jernigan JA. Mupirocin resistance. *Clin Infect Dis* 2009;49:935–941.
24. Coates T, Bax R, Coates A. Nasal decolonization of *Staphylococcus aureus* with mupirocin: strengths, weaknesses and future prospects. *J Antimicrob Chemother* 2009;64:9–15.
25. Desroches M, Potier J, Laurent F, Bourrel AS, Doucet–Populaire F, Decousser JW; Microbs Study Group. Prevalence of mupirocin resistance among invasive coagulase-negative staphylococci and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in France: emergence of a mupirocin-resistant MRSA clone harbouring *mupA*. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68:1714–1717.
26. Seah C, Alexander DC, Louie L, Simor A, Low DE, Longtin J, Melano RG. MupB, a new high-level mupirocin resistance mechanism in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56:1916–1920.
27. Chatterjee SS, Otto M. Improved understanding of factors driving methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemic waves. *Clin Epidemiol* 2013; 5:205–217.
28. Menegotto F, González–Cabreró S, Lorenzo B, Cubero Á, Cuervo W, Gutiérrez MP, Simarro M, Orduña A, Bratos MÁ. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Spanish hospital over a 4-year period: clonal replacement, decreased antimicrobial resistance, and identification of community-acquired and livestock-associated clones. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012; 74:332–337.
29. Klein EY, Sun L, Smith DL, Laxminarayan R. The changing epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States: a national observational study. *Am J Epidemiol* 2013; 177:666–674.
30. Purrello SM, Daum RS, Edwards G, Lina G, Lindsay J, Peters G, Stefan S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) update: New insights into bacterial adaptation and therapeutic targets. *J Glob Antimicrob Resist* 2014; 2:61–69.

31. Chen LF. The changing epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: 50 years of a superbug. *Am J Infect Control* 2013; 41:448–451.
32. Gosbell IB, van Hal SJ. *Staphylococcus aureus* colonization: some questions answered. *Lancet Infect Dis* 2013; 13:380–381.
33. Harbarth S, Hawkey PM, Tenover F, Stefani S, Pantosti A, Struelens MJ. Update on screening and clinical diagnosis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Int J Antimicrob Agents* 2011; 37:110–117.
34. Dancer SJ. Importance of the environment in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* acquisition: the case for hospital cleaning. *Lancet Infect Dis* 2008; 8:101–113.
35. Skov R, Christiansen K, Dancer SJ, Daum RS, Dryden M, Huang YC, Lowy FD. Update on the prevention and control of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). *Int J Antimicrob Agents* 2012; 39:193–200.
36. Pan A, Lee A, Cooper B, Chalfine A, Daikos GL, Garilli S, Goossens H, Malhotra-Kumar S, Martínez JA, Patroni A, Harbarth S; SURF study group (MRSA colonisation on admission to surgical wards in Europe: identification of risk factors), in collaboration with the MO-SAR-04 Study Team. Risk factors for previously unknown methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage on admission to 13 surgical wards in Europe. *J Hosp Infect* 2013; 83:107–113.
37. Cercenado E, Ruiz E. *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina de origen comunitario. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008; 26: 19–24.
38. Huang SS, Platt R. Risk of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection after previous infection or colonization. *Clin Infect Dis* 2003; 36:281–285.
39. Simor AE. Staphylococcal decolonisation: an effective strategy for prevention of infection? *Lancet Infect Dis* 2011; 11:952–962.
40. Davis KA, Stewart JJ, Crouch HK, Florez CE, Hospenthal DR. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) nares colonization at hospital admission and its effect on subsequent MRSA infection. *Clin Infect Dis* 2004; 39:776–782.
41. Faria NA, Conceição T, Miragaia M, Bartels MD, de Lencastre H, Westh H. Nasal carriage of methicillin resistant staphylococci. *Microb Drug Resist* 2014; 20:108–117.
42. Reighard A, Diekema D, Wibbenmeyer L, Ward M, Herwaldt L. *Staphylococcus aureus* nasal colonization and colonization or infection at other body sites in patients on a burn trauma unit. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2009;8:721–726.
43. Keene A, Vavagiakis P, Lee MH, Finnerty K, Nicolls D, Cespedes C, Quagliarello B, Chiasson MA, Chong D, Lowy FD. *Staphylococcus aureus* colonization and the risk of infection in critically ill patients. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2005; 26:622–628.
44. Couderc C, Jolivet S, Thiébaud AC, Ligier C, Remy L, Alvarez AS, Lawrence C, Salomon J, Herrmann JL, Guillemot D; Antibiotic Use and *Staphylococcus aureus* Resistant to Antibiotics (ASAR) Study Group. Fluoroquinolone use is a risk factor for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* acquisition in long-term care facilities: a nested case–case–control study. *Clin Infect Dis* 2014; 59:206–215.
45. Graffunder EM, Venezia RA. Risk factors associated with nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection including previous use of antimicrobials. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49:999–1005.

46. Ramarathnam V, De Marco B, Ortegon A, Kemp D, Luby J, Sreeramoju P. Risk factors for development of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection among colonized patients. *Am J Infect Control* 2013; 41:625–628.
47. Fukuta Y, Cunningham CA, Harris PL, Wagener MM, Muder RR. Identifying the risk factors for hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection among patients colonized with MRSA on admission. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2012; 33:1219–1225.
48. Harinstein L, Schafer J, D'amico F. Risk factor associated with the conversion of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization to healthcare-associated infection. *J Hosp Infect* 2011;79:194–197.
49. Deurenberg RH, Stobberingh EE. The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol* 2008; 8:747–763.
50. Bogdanovich T, Ednie LM, Shapiro S, Appelbaum PC. Antistaphylococcal activity of cef-tobiprole, a new broad-spectrum cephalosporin. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49:4210–4219.
51. Alm RA, McLaughlin RE, Kos VN, Sader HS, Iaconis JP, Lahiri SD. Analysis of *Staphylococcus aureus* clinical isolates with reduced susceptibility to ceftaroline: an epidemiological and structural perspective. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69:2065–2075.
52. Dantes R, Mu Y, Belflower R, Aragon D, Dumyati G, Harrison LH, Lessa FC, Lynfield R, Nadle J, Petit S, Ray SM, Schaffner W, Townes J, Fridkin S; Emerging Infections Program-Active Bacterial Core Surveillance MRSA Surveillance Investigators. National burden of invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections, United States, 2011. *JAMA Intern Med* 2013; 173:1970–1978.
53. European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net), Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2012 disponible en: <http://www.ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARS-Net/Pages/index.aspx> (último acceso 23 de Mayo de 2014).
54. EPINE. Salud Pública e Higiene Estudio de Prevalencia de las Infecciones Nosocomiales en España (EPINE). Sociedad Española de Medicina Preventiva; 2012 y 2013, disponible en: <http://hws.vhebron.net/epine/> (último acceso 23 de Mayo de 2014).
55. Salgado CD, Farr BM. What proportion of hospital patients colonized with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* are identified by clinical microbiological cultures? *Infect Control Hosp Epidemiol* 2006; 27:116–121.
56. Palavecino E. R. Biología Molecular aplicada al control de la infección intrahospitalaria. *Rev Med Clin Condes* 2007; 18:330–337.
57. Rodríguez-Baño J, Bischofberger C, Alvarez-Lerma F, Asensio A, Delgado T, García-Arcal D, García-Ortega L, Hernández MJ, Molina-Cabrillana J, Pérez-Canosa C, Pujol M; M. Pujol and Grupos de Estudio de Infección Hospitalaria (GEIH) and Infección en el Paciente Crítico (GEIPC) of Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) and Sociedad Española de Medicina Preventiva, Salud Pública e Higiene (SEMPSPH). Surveillance and control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Spanish hospitals. A GEIH-SEIMC and SEMPSPH consensus document. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008; 26:285–298
58. Aureden K, Arias K, Burns L, Creen C, Moody J, Oriola S, Kathleen R. APIC Guide, 2010. Guide to the elimination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Transmission in Hospital settings 2nd Edition.

59. Kreiswirth B, Kornblum J, Arbeit RD, Eisner W, Maslow JN, McGeer A, Low DE, Novick RP. Evidence for a clonal origin of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Science* 1993; 259:227–230.
60. 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 USA* 2002; 99:7687–7692.
61. Gomes AR, Westh H, de Lencastre H. Origins and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonal lineages. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:3237–3244.
62. Robinson DA, Enright MC. Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:3926–3934.
63. Kuhn G, Francioli P, Blanc DS. Evidence for clonal evolution among highly polymorphic genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 2006; 188(1):169–178.
64. Hallin M, Denis O, Deplano A, De Ryck R, Crèvecoeur S, Rottiers S, de Mendonça R, Struelens MJ. Evolutionary relationships between sporadic and epidemic strains of health-care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect.* 2008; 14:659–669.
65. Espadinha D, Faria NA, Miragaia M, Lito LM, Melo-Cristino J, de Lencastre H; Médicos Sentinela Network. Extensive dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) between the hospital and the community in a country with a high prevalence of nosocomial MRSA. *PLoS One* 2013; 8:e59960.
66. Tokajian S. New epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections in the Middle East. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20:624–628.
67. Qi W, Ender M, O'Brien F, Imhof A, Ruef C, McCallum N, Berger-Bächi B. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Zurich, Switzerland (2003): prevalence of type IV SCCmec and a new SCCmec element associated with isolates from intravenous drug users. *J Clin Microbiol* 2005; 43:5164–170.
68. Monecke S, Coombs G, Shore AC, Coleman DC, Akpaka P, Borg M, Chow H, Ip M, Jatzwauk L, Jonas D, Kadlec K, Kearns A, Laurent F, O'Brien FG, Pearson J, Ruppelt A, Schwarz S, Scicluna E, Slickers P, Tan HL, Weber S, Ehrlich R. A field guide to pandemic, epidemic and sporadic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* 2011; 6:e17936.
69. Sanches S, Ramirez IM, Troni H, Abecassis M, Padua M, Tomasz A, Lencastre H. Evidence for the geographic spread of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone between Portugal and Spain. *J. Clin. Microbiol* 1995; 33:1243–1246.
70. Aires de Sousa M, de Lencastre H. Bridges from hospitals to the laboratory: genetic portraits of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2004; 40:101–111.
71. International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC). Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53:4961–4967.
72. Hiramatsu K, Ito T, Tsubakishita S, Sasaki T, Takeuchi F, Morimoto Y, Katayama Y, Matsuo M, Kuwahara-Arai K, Hishinuma T, Baba T. Genomic Basis for Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Infect Chemother* 2013; 45:117–136.

73. Turlej A, Hryniewicz W, Empel J. Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) classification and typing methods: an overview. *Pol J Microbiol* 2011; 60:95–103.
74. Ito T, Katayama Y, Asada K, Mori N, Tsutsumimoto K, Tiensasitorn C, Hiramatsu K. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome mec integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(5):1323–1336.
75. 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; 43:1449–1458.
76. Ma XX, Ito T, Tiensasitorn C, Jamklang M, Chongtrakool P, Boyle-Vavra S, Daum RS, Hiramatsu K. Novel type of staphylococcal cassette chromosome mec identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:1147–1152.
77. 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; 6:41–52.
78. Ma XX, Ito T, Chongtrakool P, Hiramatsu K. Predominance of clones carrying Panton–Valentine leukocidin genes among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in Japanese hospitals from 1979 to 1985. *J Clin Microbiol* 2006; 44:4515–4527.
79. Kwon NH, Park KT, Moon JS, Jung WK, Kim SH, Kim JM, Hong SK, Koo HC, Joo YS, Park YH. Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) characterization and molecular analysis for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and novel SCCmec subtype IVg isolated from bovine milk in Korea. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56:624–632.
80. Milheiriço C, Oliveira DC, de Lencastre H. Multiplex PCR strategy for subtyping the staphylococcal cassette chromosome mec type IV in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: 'SCCmec IV multiplex'. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60:42–48.
81. Berglund C, Ito T, Ma XX, Ikeda M, Watanabe S, Söderquist B, Hiramatsu K. Genetic diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying type IV SCCmec in Örebro County and the western region of Sweden. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63:32–41.
82. 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;48(7):2637–2651.
83. Oliveira DC, Milheiriço C, de Lencastre H. Redefining a structural variant of staphylococcal cassette chromosome mec, SCCmec type VI. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:3457–3459
84. Berglund C, Ito T, Ikeda M, Ma XX, Söderquist B, Hiramatsu K. Novel type of staphylococcal cassette chromosome mec in a methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strain isolated in Sweden. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52:3512–3516.
85. Zhang K, McClure JA, Elsayed S, Conly JM. Novel staphylococcal cassette chromosome mec type, tentatively designated type VIII, harboring class A mec and type 4 ccr gene complexes in a Canadian epidemic strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53:531–540.

86. Li S, Skov RL, Han X, Larsen AR, Larsen J, Sørnum M, Wulf M, Voss A, Hiramatsu K, Ito T. Novel types of staphylococcal cassette chromosome mec elements identified in clonal complex 398 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55:3046–3050.
87. Shore AC, Deasy EC, Slickers P, Brennan G, O'Connell B, Monecke S, Ehricht R, Coleman DC. Detection of staphylococcal cassette chromosome mec type XI carrying highly divergent *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *blaZ*, and *ccr* genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55:3765–3773.
88. David MZ, Daum RS. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clin Microbiol Rev* 2010; 23:616–687.
89. Nemati M, Hermans K, Lipinska U, Denis O, Deplano A, Struelens M, Devriese LA, Pasmans F, Haesebrouck F. Antimicrobial resistance of old and recent *Staphylococcus aureus* isolates from poultry: first detection of livestock-associated methicillin-resistant strain ST398. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52:3817–3819.
90. González-Domínguez M, Seral C, Sáenz Y, Salvo S, Gude MJ, Porres-Osante N, Torres C, Castillo FJ. Epidemiological features, resistance genes, and clones among community-onset methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CO-MRSA) isolates detected in northern Spain. *Int J Med Microbiol* 2012; 302:320–326.
91. Chambers HF, Deleo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol* 2009; 7:629–641
92. Paterson GK, Morgan FJ, Harrison EM, Cartwright EJ, Török ME, Zadoks RN, Parkhill J, Peacock SJ, Holmes MA. Prevalence and characterization of human *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in England. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69:907–910.
93. Horan TC, M. Andrus and M.A. Dudeck. 2008. CDC/NHSN Surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *Am J Infect Control* 2008; 36:309–332.
94. Canton R, Ruiz-Garbajosa P. Infecciones causadas por bacterias grampositivas multirresistentes (*Staphylococcus aureus* y *Enterococcus* spp). *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2013; 31:543–551.
95. Köck R, Becker K, Cookson B, van Gemert-Pijnen JE, Harbarth S, Kluytmans J, Mielke M, Peters G, Skov RL, Struelens MJ, Tacconelli E, Navarro Torné A, Witte W, Friedrich AW. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe. *Euro Surveill* 2010; 15:19688.
96. Coombs GW, Monecke S, Pearson JC, Tan HL, Chew YK, Wilson L, Ehricht R, O'Brien FG, Christiansen KJ. Evolution and diversity of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a geographical region. *BMC Microbiol* 2011; 11:215.
97. Drougka E, Foka A, Liakopoulos A, Doudoulakakis A, Jelastopulu E, Chini V, Spiliopoulou A, Levidiotou S, Panagea T, Vogiatzi A, Lebessi E, Petinaki E, Spiliopoulou I. A 12-year survey of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infections in Greece: ST80–IV epidemic? *Clin Microbiol Infect* 2014. [Epub ahead of print].



98. Lulitanond A, Ito T, Li S, Han X, Ma XX, Engchanil C, Chanawong A, Wilailuckana C, Jiwakanon N, Hiramatsu K. ST9 MRSA strains carrying a variant of type IX SCCmec identified in the Thai community. *BMC Infect Dis* 2013; 13:214.
99. Camoez M, Sierra JM, Pujol M, Hornero A, Martin R, Domínguez MA. Prevalence and molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 resistant to tetracycline at a Spanish hospital over 12 years. *PLoS One* 2013; 8:e72828.
100. Rasigade JP, Dumitrescu O, Lina G. New epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20:587–588.
101. Williamson DA, Coombs GW, Nimmo GR. *Staphylococcus aureus* 'Down Under': contemporary epidemiology of *S. aureus* in Australia, New Zealand, and the South West Pacific. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20:597–604.
102. Australian Group on Antimicrobial Resistance. *Staphylococcus aureus* survey. 2011 Antimicrobial susceptibility report. Disponible en <http://www.agargroup.org/surveys>, (último acceso 29 de Marzo de 2014).
103. Australian Group on Antimicrobial Resistance. *Staphylococcus aureus* programa (SAP 2012). Community survey. Antimicrobial susceptibility report. 2012. Disponible en <http://www.agargroup.org/surveys>, (último acceso 29 de Marzo de 2014).
104. Heffernan H, Bakker S. Annual survey of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), 2011. Institute of Environmental Science and Research, Wellington, New Zealand. [https://surv.esr.cri.nz/antimicrobial/mrsa\\_annual.php](https://surv.esr.cri.nz/antimicrobial/mrsa_annual.php), (último acceso 23 de Marzo 2014)
105. Breurec S, Fall C, Pouillot R, Boisier P, Brisse S, Diene-Sarr F, Djibo S, Etienne J, Fonkoua MC, Perrier-Gros-Claude JD, Ramarokoto CE, Randrianirina F, Thiberge JM, Zriouil SB; Working Group on *Staphylococcus aureus* Infections, Garin B, Laurent F. Epidemiology of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* lineages in five major African towns: high prevalence of Panton-Valentine leukocidin genes. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17:633–639.
106. Egyir B, Guardabassi L, Sørum M, Nielsen SS, Kolekang A, Frimpong E, Addo KK, Newman MJ, Larsen AR. Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of clinical *Staphylococcus aureus* from healthcare institutions in Ghana. *PLoS One* 2014; 25; 9:89716.
107. Informe Anual 2008 de la Red de Monitorización/Vigilancia de la Resistencia a los Antibióticos de la Organización Panamericana de Salud [www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=doc](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc), (último acceso 29 de Marzo de 2014)
108. Medina G, Egea AL, Otth C, Otth L, Fernández H, Bocco JL, Wilson M, Sola C. Molecular epidemiology of hospital-onset methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in Southern Chile. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2013; 32:1533–1540.
109. Portillo BC, Moreno JE, Yomayusa N, Alvarez CA, Cardozo BE, Pérez JA, Díaz PL, Ibañez M, Mendez-Alvarez S, Leal AL, Gómez NV. Molecular epidemiology and characterization of virulence genes of community-acquired and hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in Colombia. *Int J Infect Dis* 2013; 17:744–749.
110. Adler A, Chmelnitsky I, Shitrit P, Sprecher H, Navon-Venezia S, Embon A, Khabra E, Paitan Y, Keren L, Halperin E, Carmeli Y, Schwaber MJ. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Israel: dissemination of global clones and unique features. *J Clin Microbiol* 2011; 50:134–137.

111. Borg MA, de Kraker M, Scicluna E, van de Sande–Bruinsma N, Tiemersma E, Monen J, Grundmann H; ARMed Project Members and Collaborators. Prevalence of methicillin–resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in invasive isolates from southern and eastern Mediterranean countries. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60:1310–1315
112. Chen CJ, Huang YC. New epidemiology of *Staphylococcus aureus* infection in Asia. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20:605–623.
113. Chen X, Wang WK, Han LZ, Liu Y, Zhang H, Tang J, Liu QZ, Huangfu YC, Ni YX. Epidemiological and genetic diversity of *Staphylococcus aureus* causing bloodstream infection in Shanghai, 2009–2011. *PLoS One* 2013; 8:72811.
114. Diekema DJ, Richter SS, Heilmann KP, Dohrn CL, Riahi F, Tendolkar S, McDanel JS, Doern GV. Continued emergence of USA300 methicillin–resistant *Staphylococcus aureus* in the United States: results from a nationwide surveillance study. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2014; 35:285–292.
115. Nichol KA, Adam HJ, Roscoe DL, Golding GR, Lagacé–Wiens PR, Hoban DJ, Zhanel GG; Canadian Antimicrobial Resistance Alliance. Changing epidemiology of methicillin–resistant *Staphylococcus aureus* in Canada. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68:i47–55.
116. Łuczak–Kadłubowska A, Sulikowska A, Empel J, Piasecka A, Orczykowska M, Kozinska A, Hryniewicz W. Countrywide molecular survey of methicillin–resistant *Staphylococcus aureus* strains in Poland. *J Clin Microbiol* 2008; 46:2930–2937.
117. Budimir A, Deurenberg RH, Bosnjak Z, Stobberingh EE, Cetkovic H, Kalenic S. A variant of the Southern German clone of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* is predominant in Croatia. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16:1077–1083.
118. Aschbacher R, Pichon B, Wootton M, Davies L, Binazzi R, Pike R, Ganner M, Hill R, Pagani E, Agreiter I, Mian P, Larcher C, Kearns A. Molecular epidemiology of methicillin–resistant *Staphylococcus aureus* from bacteraemia in northern Italy. *Infez Med* 2012; 20:256–264.
119. Trallero EP, Arenzana JG, Castaneda AA, Grisolia LP. Unusual multiresistant *Staphylococcus aureus* in a newbornnursery. *Am J Dis Child* 1981; 135:689–692
120. Cuevas O, Cercenado E, Goyanes MJ, Vindel A, Trincado P, Boquete T, Marín M, Bouza E; Grupo Español para el Estudio de Estafilococo. *Staphylococcus spp.* in Spain: present situation and evolution of antimicrobial resistance (1986–2006). *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008;26:269–277
121. Cuevas O, Cercenado E, Bouza E, Castellares C, Trincado P, Cabrera R, Vindel A; Spanish Group for the Study of Staphylococcus. Molecular epidemiology of methicillin–resistant *Staphylococcus aureus* in Spain: a multicentre prevalence study (2002). *Clin Microbiol Infect* 2007; 13:250–256
122. Vindel A, Cuevas O, Cercenado E, Marcos C, *et al.* Methicillin–resistant *Staphylococcus aureus* in Spain: molecular epidemiology and utility of different typing methods. *J Clin Microbiol.* 2009; 47:1620–1627.
123. Rodríguez–Baño J, Ángeles Domínguez M, Blas Millán A, Borraz C, *et al.* Clinical and molecular epidemiology of community–acquired, healthcare–associated and nosocomial methicillin–resistant *Staphylococcus aureus* in Spain. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15:1111–1118.

124. Torres–Sangiao E, Pérez–Castro S, Fernández–Natal MI, Cisterna–Cáncer R, Zapico–González M, Fernández–Pérez B, Ojeda–Fernández E, Nebreda T, Gozalo–Margüello M, Fuster–Foz C, Roiz–Mesones MP, Miguel–Martín MD, Torroba L, Coira–Nieto A, Vasallo–Vidal F, Méndez–Lage S, Prieto Rodríguez E, Eiros JM, Torres J, Bou G. Identification of international circulating lineages of methicillin–resistant *Staphylococcus aureus* in the north of Spain and their glycopeptide and linezolid susceptibility. *J Med Microbiol* 2012; 61:305–307.
125. Velasco C, López–Cortés LE, Caballero FJ, Lepe JA, de Cueto M, Molina J, Rodríguez F, Aller AI, García Tapia AM, Pachón J, Pascual A, Rodríguez–Baño J; SAEI/SAMPAC MRSA–BSI Group. Clinical and molecular epidemiology of methicillin–resistant *Staphylococcus aureus* causing bacteraemia in Southern Spain. *J Hosp Infect* 2012; 81:257–263.
126. Vindel A, Trincado P, Cuevas O, Ballesteros C, Bouza E, Cercenado E. Molecular epidemiology of community–associated methicillin–resistant *Staphylococcus aureus* in Spain: 2004–12. *J Antimicrob Chemother* 2014. [Epub ahead of print]
127. Otter JA, French GL. Molecular epidemiology of community–associated methicillin–resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *Lancet Infect Dis* 2010; 10:227–239.
128. Pedrosa Fernández Y. La Vigilancia Activa del *Staphylococcus aureus* Meticilin Resistente en el Hospital Universitario de Canarias: su Impacto Clínico y Epidemiológico. Servicio de Publicaciones de la Universidad de la Laguna, San Cristóbal de La Laguna, España. 2012.
129. Montesinos I, Salido E, Delgado T, Lecuona M, Sierra A. Epidemiology of methicillin–resistant *Staphylococcus aureus* at a university hospital in the Canary Islands. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2003; 24:667–672.
130. Delgado Melian, T. Estudio epidemiológico de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina aislados en el Hospital Universitario de Canarias (2000–2004). Servicio de Publicaciones de la Universidad de la Laguna, San Cristóbal de La Laguna, España. 2009.
131. Fuchs PC, Jones RN, Barry AL. Interpretive criteria for disk diffusion susceptibility testing of mupirocin, a topical antibiotic. *J Clin Microbiol* 1990; 28:608–609.
132. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed–field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33:2233–2239.
133. Milheiriço C, Oliveira DC, de Lencastre H. Update to the multiplex PCR strategy for assignment of mec element types in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51:3374–3377.
134. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977; 33:159–174.
135. Manzur A, Vidal M, Pujol M, Cissal M, Hornero A, Masuet C, Peña C, Gudiol F, Ariza J. Predictive factors of methicillin resistance among patients with *Staphylococcus aureus* bloodstream infections at hospital admission. *J Hosp Infect* 2007; 66:135–141.
136. Gerber JS, Coffin SE, Smathers SA, Zaoutis TE. Trends in the incidence of methicillin–resistant *Staphylococcus aureus* infection in children's hospitals in the United States. *Clin Infect Dis* 2009; 49:65–71.
137. Huang YC, Chen CJ. Community–associated methicillin–resistant *Staphylococcus aureus* in children in Taiwan, 2000s. *Int J Antimicrob Agents* 2011; 38:2–8.
138. Lo WT, Wang CC, Lin WJ, Wang SR, Teng CS, Huang CF, Chen SJ. Changes in the nasal co-

- lonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children: 2004–2009. PLoS One 2010; 29:e15791.
139. Mertz D, Frei R, Jaussi B, Tietz A, Stebler C, Flückiger U, Widmer A. Throat swabs are necessary to reliably detect carriers of *Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis 2007; 45:475–7.
  140. Acton DS, Plat-Sinnige MJ, van Wamel W, de Groot N, van Belkum A. Intestinal carriage of *Staphylococcus aureus*: how does its frequency compare with that of nasal carriage and what is its clinical impact? Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2009; 28:115–127.
  141. Forward KR. The value of multiple surveillance cultures for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Am J Infect Control 2010; 38:596–599.
  142. Baker SE, Brecher SM, Robillard E, Strymish J, Lawler E, Gupta K. Extra nasal methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization at admission to an acute care Veterans Affairs hospital. Infect Control Hosp Epidemiol 2010; 31:42–46.
  143. Herrmann M, Petit C, Dawson A, Biechele J, Halfmann A, von Müller L, Gräber S, Wagenpfeil S, Klein R, Gärtner B. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Saarland, Germany: a statewide admission prevalence screening study. PLoS One 2013; 11:8:e73876.
  144. Jeyaratnam D, Whitty CJ, Phillips K, Liu D, Orezzi C, Ajoku U, French GL. Impact of rapid screening tests on acquisition of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: cluster randomised crossover trial. BMJ 2008; 26; 336:927–930.
  145. Bode LG, Wertheim HF, Kluytmans JA, Bogaers-Hofman D, Vandenbroucke-Grauls CM, Roosendaal R, Troelstra A, Box AT, Voss A, van Belkum A, Verbrugh HA, Vos MC. Sustained low prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* upon admission to hospital in The Netherlands. J Hosp Infect 2011; 79:198–201.
  146. Witte W. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: what do we need to know? Clin Microbiol Infect 2009; 15:17–25.
  147. Freixas N, Sopena N, Limón E, Bella F, Matas L, Almirante B, Pujol M; VINCat Program. Surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in acute care hospitals. Results of the VINCat Program (2008–2010). Enferm Infecc Microbiol Clin 2012; 30:39–42.
  148. Lessa FC, Mu Y, Davies J, Murray M, Lillie M, Pearson A, Fridkin SK; Emerging Infections Program/Active Bacterial Core surveillance MRSA Investigators and the Health Protection Agency Team. Comparison of incidence of bloodstream infection with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between England and United States, 2006–2007. Clin Infect Dis 2010; 51:925–928.
  149. Ghazal SS, Hakawi AM, Demeter CV, Joseph MV, Mukahal MA. Intervention to reduce the incidence of healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in a Tertiary Care Hospital in Saudi Arabia. Infect Control Hosp Epidemiol 2011; 32:411–413.
  150. Huang SS, Yokoe DS, Hinrichsen VL, Spurchise LS, Datta R, Miroshnik I *et al.* Impact of routine intensive care unit surveillance cultures and resultant barrier precautions on hospital-wide methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. Clin Infect Dis 2006; 43:971–978.
  151. Harbarth S, Fankhauser C, Schrenzel J, Christenson J, Gervaz P, Bandiera-Clerc, Renzi G, Vernaz N, Sax H, Pittet D. Universal screening for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at hospital admission and nosocomial infection in surgical patients. JAMA 2008; 299:1149–1157.

152. Robicsek A, Beaumont JL, Paule SM, Hacek DM, Thomson RB Jr, Kaul KL, King P, Peterson L. Universal surveillance for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in 3 affiliated hospitals. *Ann Intern Med* 2008; 148:409–418.
153. Dryden MS. Skin and soft tissue infection: microbiology and epidemiology. *Int J Antimicrob Agents*. 2009; 34:S2–7.
154. Millan AB, Domínguez MA, Borraz C, González MP, Almirante B, Cercenado E, Padilla B, Pujol M, Rodríguez-Baño J; GEIH/GEMARA/REIPI. Community-onset and nosocomial bacteremia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Spanish hospitals. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2010; 28:336–341.
155. Benfield T, Espersen F, Frimodt-Møller N, Jensen AG, Larsen AR, Pallesen LV, Skov R, Westh H, Skinhøj P. Increasing incidence but decreasing in-hospital mortality of adult *Staphylococcus aureus* bacteraemia between 1981 and 2000. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13:257–263.
156. Kaech C, Elzi L, Sendi P, Frei R, Laifer G, Bassetti S, Fluckiger U. Course and outcome of *Staphylococcus aureus* bacteraemia: a retrospective analysis of 308 episodes in a Swiss tertiary-care centre. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12:345–352.
157. Lodise TP, McKinnon PS. Clinical and economic impact of methicillin resistance in patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; 52:113–122.
158. Lamagni TL, Potz N, Powell D, Pebody R, Wilson J, Duckworth G. Mortality in patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia, England 2004–2005. *J Hosp Infect* 2011; 77:16–20.
159. Gasch O, Camoez M, Domínguez MA, Padilla B, Pintado V, Almirante B, Lepe JA, Lagarde M, Ruiz de Gopegui E, Martínez JA, Montejo M, Torre-Cisneros J, Arnáiz A, Goenaga MA, Benito N, Rodríguez-Baño J, Pujol M; REIPI/GEIH Study Groups. Predictive factors for early mortality among patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68:1423–1430.
160. Kinnevey PM, Shore AC, Brennan GI, Sullivan DJ, Ehricht R, Monecke S, Coleman DC. Extensive genetic diversity identified among sporadic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates recovered in Irish hospitals between 2000 and 2012. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58:1907–1917.
161. Barrado L, Viedma E, Vindel A, Otero JR, Chaves F. Draft Genome Sequence of Strain SA\_ST125\_MupR of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ST125, a Major Clone in Spain. *Genome Announc* 2013; 1: e00588–13.
162. Morcillo A, Castro B, Rodríguez-Álvarez C, González JC, Sierra A, Montesinos MI, Abreu R, Arias Á. Prevalence and characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs and pig workers in Tenerife, Spain. *Foodborne Pathog Dis* 2012; 9:207–210.
163. Schaumburg F, Köck R, Mellmann A, Richter L, Hasenberg F, Kriegeskorte A, Friedrich AW, Gatermann S, Peters G, von Eiff C, Becker K; study group. Population dynamics among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in Germany during a 6-year period. *J Clin Microbiol* 2012; 50:3186–3192.
164. Kim ES, Song JS, Lee HJ, Choe PG, Park KH, Cho JH, Park WB, Kim SH, Bang JH, Kim DM, Park KU, Shin S, Lee MS, Choi HJ, Kim NJ, Kim EC, Oh MD, Kim HB, Choe KW. A survey of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Korea. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60:1108–1114.

165. Udo EE, Pearman JW, Grubb WB. Genetic analysis of community isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Western Australia. *J Hosp Infect* 1993; 25:97–108.
166. McDougal LK, Steward CD, Killgore GE, Chaitram JM, McAllister SK, Tenover FC. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. *J Clin Microbiol* 2003; 41:5113–5120.
167. Kourbatova EV, Halvosa JS, King MD, Ray SM, White N, Blumberg HM. Emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA 300 clone as a cause of health care-associated infections among patients with prosthetic joint infections. *Am J Infect Control* 2005; 33: 385–391.
168. Tenover FC, Goering RV. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300: origin and epidemiology. *J Antimicrob Chemother.* 2009; 64:441–446.
169. Drougka E, Foka A, Jelastopulu E, Lebessi E, Doudoulakakis A, Panagea TH, Voyiatzi A, Garatziotou D, Gartzonika C, Levidiotou S, Giormezis N, Kolonitsiou F, Spiliopoulou A, Anas E.D. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in Greece: spread of ST80 over nine years. [Abstract]. In: European Scientific Conference on Applied Infectious Disease Epidemiology Waterfront Congress Centre 6–8 November 2011, Stockholm. ESCAIDE reference number: 20110106.
170. Karayem K, Wasserman E, Whitelaw AC, Hoek K. Molecular characterization of blood and nasal *Staphylococcus aureus* Isolates obtained from patients with bacteremia admitted at tygerberg Hospital 57th Annual Academic Day 2013, 14–15 August 2013. Faculty of Medicine and Health Sciences, Stellenbosch University. Abstract number 227.
171. Gómez P, González-Barrío D, Benito D, García JT, Viñuela J, Zarazaga M, Ruiz-Fons F, Torres C. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carrying the *mecC* gene in wild small mammals in Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2014; 69:2061–2064.
172. Paterson GK, Harrison EM, Holmes MA. The emergence of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 2014; 22:42–47.
173. García-Garrote F, Cercenado E, Marín M, Bal M, Trincado P, Corredoira J, Ballesteros C, Pita J, Alonso P, Vindel A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the *mecC* gene: emergence in Spain and report of a fatal case of bacteraemia. *J. Antimicrob Chemother* 2014; 69:45–50.
174. Zhou, YP, Wilder-Smith A, Hsu LY. The Role of International Travel in the Spread of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J Travel Med* 2014; 21:272–281.
175. Harris SR, Feil EJ, Holden MT, Quail MA, Nickerson EK, Chantratita N, Gardete S, Tavares A, Day N, Lindsay JA, Edgeworth JD, de Lencastre H, Parkhill J, Peacock SJ, Bentley SD. Evolution of MRSA during hospital transmission and intercontinental spread. *Science* 2010; 327:469–474.
176. Montesinos I, Castro B, Lecuona M, Sierra A. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Spanish hospital: low prevalence of community and animal-associated clones. *J Hosp Infect* 2011; 77:362–363.
177. Teixeira MM, Araújo MC, Silva-Carvalho MC, Beltrame CO, Oliveira CC, Figueiredo AM, Oliveira AG. Emergence of clonal complex 5 (CC5) methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates susceptible to trimethoprim-sulfamethoxazole in a Brazilian hospital. *Braz. J Med Biol Res.* 2012; 45:637–643.

178. Aires-de-Sousa M, Correia B, de Lencastre H; Multilaboratory Project Collaborators. Changing patterns in frequency of recovery of five methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Portuguese hospitals: surveillance over a 16-year period. *J Clin Microbiol* 2008; 46:2912–2917.
179. Roman RS, Smith J, Walker M, Byrne S, Ramotar K, Dyck B, Kabani A, Nicolle LE. Rapid geographic spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain. *Clin Infect Dis* 1997; 25: 698–705.
180. Cury GG, Mobilon C, Stehling EG, Lancellotti M, Ramos Mde C, Martinez R, Brocchi M, Silveira WD. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains isolated in two metropolitan areas of São Paulo State, southeast Brazil. *Braz J Infect Dis* 2009; 13:165–169.
181. Amorim, ML, Faria NA, Oliveira DC, Vasconcelos C, Cabeda JC, Mendes AC, Calado E, Castro AP, Ramos MH, Amorim JM, de Lencastre H. 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; 45:2881–2888.
182. Melles DC, Gorkink RF, Boelens HA, Snijders SV, Peeters JK, Moorhouse MJ, van der Spek PJ, van Leeuwen WB, Simons G, Verbrugh HA, van Belkum A. Natural population dynamics and expansion of pathogenic clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest* 2004; 114:1732–1740.
183. Feil EJ, Cooper JE, Grundmann H, Robinson DA, Enright MC, Berendt T, Peacock SJ, Smith JM, Murphy M, Spratt BG, Moore CE, Day NP. How clonal is *Staphylococcus aureus*? *J Bacteriol* 2003; 185:3307–3316.
184. Sapri, HF, Sani NA, Neoh HM, Hussin S. Epidemiological Study on *Staphylococcus aureus* Isolates Reveals Inverse Relationship between Antibiotic Resistance and Virulence Repertoire. *Indian. J Microbiol* 2013; 53:321–322.
185. Rivero-Pérez B, Alcoba-Flórez J, Méndez-Álvarez S. Genetic diversity of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Tenerife Island, Spain. *Infect Genet Evol* 2012; 12:586–590.
186. Benito D, Lozano C, Rezusta A, Ferrer I, Vasquez M, Ceballos S, Zarazaga M, Revillo MJ, Torres C. Characterization of tetracycline and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains in a Spanish hospital: Is livestock-contact a risk factor in infections caused by MRSA CC398? *Int J Med Microbiol en prensa*
187. Babu T, Rekasius V, Parada JP, Schreckenberger P, Challapalli M. Mupirocin resistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-colonized patients at admission to a tertiary care medical center. *J Clin Microbiol* 2009; 47:2279–2280.
188. Köck R, Becker K, Cookson B, van Gemert-Pijnen J, Harbarth S, Kluytmans J, Mielke M, Peters G, Skov R, Struelens M, Tacconelli E, Witte W, Friedrich A. Systematic literature analysis and review of targeted preventive measures to limit healthcare-associated infections by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Euro Surveill* 2014; 24; 19:23–49.
189. Walker ES, Vasquez JE, Dula R, Bullock H, Sarubbi FA. Mupirocin-resistant, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: does mupirocin remain effective? *Infect Control Hosp Epidemiol* 2003; 24:342–346.

190. Lee AS, Gizard Y, Empel J, Bonetti EJ, Harbarth S, François P. Mupirocin-induced mutations in *ileS* in various genetic backgrounds of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 2014; 52:3749–3754.
191. Dailey L, Coombs GW, O'Brien FG, Pearman JW, Christiansen K, Grubb WB, Riley TV. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Western Australia. *Emerg Infect Dis* 2005; 11:1584–1590.
192. Paule S, Robicsek A, Suseno M, Kaul KL, Peterson LR. Incidence of mupirocin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) during universal surveillance and decolonization [Abstract]. In: Program and Abstracts of the 46th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 27–30 September 2006 San Francisco, California. Washington, DC: American Soc for Microbiology; 2006. Abstract C2–1149.
193. Pérez-Roth E, López-Aguilar C, Alcoba-Florez J, Méndez-Alvarez S. High-level mupirocin resistance within methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pandemic lineages. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:3207–3211.
194. Potel C, Alvarez P, Constenla L, Alvarez M. Activity of mupirocin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in Pontevedra province. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009; 27(1):59–60.
195. Park SY, Kim SM, Park SD. The Prevalence, Genotype and Antimicrobial Susceptibility of High- and Low-Level Mupirocin Resistant Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Ann Dermatol* 2012; 24:32–38.
196. Jones JC, Rogers TJ, Brookmeyer P, Dunne WM Jr, Storch GA, Coopersmith CM, Fraser VJ, Warren DK. Mupirocin resistance in patients colonized with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a surgical intensive care unit. *Clin Infect Dis* 2007;45(5):541–547.
197. Vivoni AM, Santos KR, de-Oliveira MP, Giambiagi-deMarval M, Ferreira AL, Riley LW, Moreira BM. Mupirocin for controlling methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: lessons from a decade of use at a university hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2005; 26:662–667.
198. Rossney A, O'Connell S. Emerging high-level mupirocin resistance among MRSA isolates in Ireland. *Euro Surveill* 2008; 13:1–2.
199. Liu QZ, Wu Q, Zhang YB, Liu MN, Hu FP, Xu XG, Zhu DM, Ni YX. Prevalence of clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) with high-level mupirocin resistance in Shanghai and Wenzhou, China. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 35:114–118.
200. Simor AE, Stuart TL, Louie L, Watt C, Ofner-Agostini M, Gravel D, Mulvey M, Loeb M, McGeer A, Bryce E, Matlow A; Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program. Mupirocin-resistant, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in Canadian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51:3880–3886.
201. Desroches M, Potier J, Laurent F, Bourrel AS, Doucet-Populaire F, Decousser JW; Microbs Study Group. Prevalence of mupirocin resistance among invasive coagulase-negative staphylococci and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in France: emergence of a mupirocin-resistant MRSA clone harbouring *mupA*. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68:1714–1717.
202. Semret M, Miller MA. Topical mupirocin for eradication of MRSA colonization with mupirocin-resistant strains. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2001; 22:578–80.
203. Upton A, Lang S, Heffernan H. Mupirocin and *Staphylococcus aureus*: a recent paradigm of emerging antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51:613–617.



204. Kooistra–Smid M, van Dijk S, Beerthuizen G, Vogels W, van Zwet T, van Belkum A, Verbrugh H. Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* colonization in a burn center. *Burns* 2004; 30:27–33.
205. Taylor GD, Kibsey P, Kirkland T, Burroughs E, Tredget E. Predominance of staphylococcal organisms in infections occurring in a burns intensive care unit. *Burns* 1992; 18:332–335.
206. Utzolino S, Baier P, Riediger H, Rösch S, Hopt UT. Relevance of MRSA on a Visceral Surgical Intensive Care Unit. *Zentralbl Chir* 2014. [Epub ahead of print]
207. Simşek Yavuz S, Sensoy A, Ceken S, Deniz D, Yekeler I. Methicillin–Resistant *Staphylococcus aureus* Infection: An Independent Risk Factor for Mortality in Patients with Poststernotomy Mediastinitis. *Med Princ Pract* 2014. [Epub ahead of print]
208. Cosgrove SE, Qi Y, Kaye KS, Harbarth S, Karchmer AW, Carmeli Y. The impact of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* bacteriemia on patients outcomes: mortality, length of stay and hospital charges. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2005; 26:166–174.
209. Torres K, Sampathkumar P. Predictors of methicillin–resistant *Staphylococcus aureus* colonization at hospital admission. *Am J Infect Control* 2013; 41:1043–1047.
210. Jernigan JA, Pullen AL, Flowers L, Bell M, Jarvis WR. Prevalence of and risk factors for colonization with methicillin–resistant *Staphylococcus aureus* at the time of hospital admission. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2003; 24:409–414.
211. Huang SS, Datta R, Rifas–Shiman S, Kleinman K, Placzek H, Lankiewicz J, Platt R. Colonization with antibiotic–susceptible strains protects against methicillin–resistant *Staphylococcus aureus* but not vancomycin–resistant enterococci acquisition: a nested case–control study. *Crit Care* 2011;15 R210.
212. Cespedes C, Said–Salim B, Miller M, Lo SH, Kreiswirth BN, Gordon RJ, Vavagiaskis P, Klein R, Lowy D. The clonality of *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *J Infect Dis* 2005; 191:444–452.
213. Maslow JN, Brecher S, Gunn J, Durbin A, Barlow MA, Arbeit RD. Variation and persistence of Methicillin–resistant *Staphylococcus aureus* strains among individual patients over extended periods of time. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995; 14:282–290.
214. Huang SS, Diekema DJ, Warren DK, Zuccotti G, Winokur PL, Tendolkar S, Boyken L, Datta R, Jones R, Ward M, Aubrey T, Ondedonk A, García C, Platt R. Strain–relatedness of methicillin–resistant *Staphylococcus aureus* isolates recovered from patients with repeated infection. *Clin Infect Dis* 2008; 46:1241–1247.

## IX. Anexos