

UAB

Universitat Autònoma de Barcelona



Germans Trias i Pujol
Hospital

Noves aproximacions als estudis d'epidemiologia molecular i al diagnòstic de les infeccions causades per *Staphylococcus aureus*. Aportacions al coneixement dels factors de virulència i patogenicitat.

Sònia Molinos Abós

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
Departament de Genètica i Microbiologia
Facultat de Biociències

Memòria presentada per Sònia Molinos Abós
per optar al grau de Doctora en Medicina per
la Universitat Autònoma de Barcelona.

Vist-i-plau de les directores de la tesi

Dra. Montserrat Giménez Pérez
Facultativa Especialista Microbiologia
Professora associada UAB
Departament de Genètica i Microbiologia

Dra. Cristina Prat Aymerich
Facultativa Especialista Microbiologia
Professora Associada UAB
Departament de Genètica i Microbiologia

ÍNDEX

Abreviatures	1
Resum	0
Introducció	0
1. Característiques microbiològiques de <i>Staphylococcus aureus</i>	1
1.1. Estructura bacteriana i factors de virulència	1
1.1.1 Components de la paret bacteriana	2
1.1.2 Factors extracel·lulars produïts per <i>S. aureus</i>	5
1.1.2.1 Enzims estafilocòccics	6
1.1.2.2 Proteïnes extracel·lulars.....	6
1.1.2.3 Toxines estafilocòcciques.....	7
1.1.2.4 Citotoxines.....	7
1.1.2.5 Toxines exfoliatives	11
1.1.2.6 Toxines EDIN (epidermal cell differentiation inhibitor)	12
1.1.2.7 La toxina de la síndrome del shock tòxic (TSST-1)	12
1.1.2.8 Enterotoxines	12
1.1.2.9 Proteïnes implicades en l'evasió del sistema immunitari	13
1.2. Sistemes de regulació de l'expressió de factors de virulència.....	14
2. Epidemiologia molecular de <i>S. aureus</i>	16
2.1. Mètodes de tipificació genotípica i molecular	17
2.1.1 Anàlisi plasmídic.....	17
2.1.2 Tècniques de tipificació basades en la PCR.....	17
2.1.2.1 Amplificació a l'atzar del DNA polimòrfic. (RAPD)	17
2.1.2.2 Ribotípia	18
2.1.2.3 RLFP (polimorfisme de longitud dels fragments de restricció)	18
2.1.2.4 REP (anàlisi de seqüències repetides)	18
2.1.2.5 AFLP (polimorfismes en la longitud de fragments amplificats)	18
2.1.2.6 MLVA (Multiple-Locus Variable-number tandem repeat Assay)	18
2.1.2.7 MLST (Multilocus sequence typing)	19
2.1.2.8 Anàlisi de les seqüències repetides de la proteïna A (spa typing)	20
2.1.2.9 Tipificació del Cassette Cromosòmic SCCmec.....	20
2.1.3 Anàlisi del DNA cromosòmic.....	21
2.1.3.1 Polimorfisme de la longitud dels fragments de restricció (RFLP)	22

2.1.3.2	Anàlisi dels fragments de restricció per hibridació després de transferència de Southern.....	22
2.1.3.3	Macrorestricció. Electroforesi en camp pulsant (PFGE)	23
2.1.4	Whole Genome Sequencing (WGS)	24
2.2.	Epidemiologia de les infeccions per <i>S. aureus</i> i evolució de la seva sensibilitat als antibiòtics.	25
2.2.1	Epidemiologia i característiques moleculars de <i>S. aureus</i> resistent a meticil·lina d'origen comunitari.....	27
3.	Manifestacions clíniques.....	29
3.1.	Infeccions cutànies.....	30
3.2.	Infecció respiratòria	31
3.3.	Infeccions osteoarticulars	31
3.3.1	Artritis sèptiques.....	31
3.3.2	Osteomielitis sèptica.....	32
3.3.3	Infeccions protèsiques.....	33
3.4.	Bacterièmia	34
3.4.1	Endocarditis infecciosa	36
3.5.	Malalties mediades per toxines	37
3.5.1	Síndrome de la pell escaldada	37
3.5.2	Infecció alimentària estafilocòccica.....	37
3.5.3	Síndrome del shock tòxic (STT).....	38
4.	Tractament antibiòtic de les infeccions per <i>S. aureus</i>	38
4.1.	Generalitats i principals grups d'antibiòtics amb activitat sobre <i>S. aureus</i>	38
4.2.	Tractament antibiòtic recomanat en les infeccions estafilocòcciques.....	40
4.2.1	Infeccions de pell i parts toves.....	40
4.2.2	Infeccions respiratòries.....	41
4.2.3	Infeccions osteoarticulars	41
4.2.4	Bacterièmia	42
4.3.	Efecte dels antimicrobians sobre els factors de virulència i els sistemes reguladors.....	44
4.3.1	Quorum sensing.....	44
4.3.2	Toxines estafilocòcciques	46
4.3.3	Sistema SOS	46
4.3.4	Adhesió bacteriana	47
4.3.5	Persistència intracel·lular.....	47
	Justificació	48
	Objectius.....	51

Material i Mètodes.....	53
Objectiu 1. Estudi de l'epidemiologia, diagnòstic i aspectes clínics de la bacterièmia per <i>Staphylococcus aureus</i>	54
Objectiu 2. Estudi de l'epidemiologia i aspectes clínics de la infecció de pell i parts toves per <i>Staphylococcus aureus</i> a la població pediàtrica	77
Resultats.....	80
Objectiu 1. Estudi de l'epidemiologia, diagnòstic i aspectes clínics de la bacterièmia per <i>Staphylococcus aureus</i>	81
Objectiu 2. Estudi de l'epidemiologia i aspectes clínics de la infecció de pell i parts toves per <i>S. aureus</i> a la població pediàtrica i adulta	106
Discussió.....	113
Objectiu 1. Estudi de l'epidemiologia, diagnòstic i aspectes clínics de la bacterièmia per <i>Staphylococcus aureus</i>	114
Objectiu 2. Estudi de l'epidemiologia i aspectes clínics de la infecció de pell i parts toves per <i>S. aureus</i> a la població pediàtrica	120
Conclusions.....	123
Objectiu 1. Estudi de l'epidemiologia, diagnòstic i aspectes clínics de la bacterièmia per <i>Staphylococcus aureus</i>	124
Objectiu 2. Estudi de l'epidemiologia i aspectes clínics de la infecció de pell i parts toves per <i>S. aureus</i> a la població pediàtrica	125
Referències Bibliogràfiques.....	126
Annexes	140

Abreviatures

Aap *acumulation-associated-protein*

ABC *ATP-binding cassette*

ACME: *Arginine Catabolic Mobile Element*

AFLP: *Amplificació de fragments de longitud polimòrfica*

agr: *Accessory Gene Regulator*

AIP: *Auto Inducing Peptide*

Bbp *sialo-bonding protein*

BURP *based-upon-repeat-pattern*

CAMP test: *Test de Christie, Athkins i Muench-Petersen*

CC: *Complexe clonal*

CDC: *Center for Disease Control and Prevention*

CHIPS: *Chemotaxis Inhibitory Protein of Staphylococcus aureus*

Clf: *Clumping Factor*

CLSI: *Clinical Laboratoy Standards Institute*

CPH: *Complex Major d'Histocompatibilitat*

CMI: *Concentració Mínima Inhibitòria*

CNA: *Collagen-binding Adhesin*

DE: *Desviació Estàndar*

DM: *Diabetis mellitus*

DNasa: *Desoxirribonucleasa*

dNTPs: *Desoxirribonucleòtids Fosfat*

EDIN: *Epidermal cell Differentiation Inhibitor*

ET: *exfoliatives*

FLIPr: *Formyl peptide receptor-like 1 inhibitory protein*

fMLP: *N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine*

FnBP: *Fibronectin-Binding Protein*

FPR: *pèptids formilats*

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

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

Ica: *Intercellular Adhesion-protein*

Ig: *Immunoglobulines*

IL: *Interleucines*

IPP: *Infecció post-quirúrgica precoç*

IPPT: *Infecions de Pells i Parts Toves*

IPT *Infecció post-quirúrgica tardana*

IRC: Insuficiència renal crònica

Isd : *iron-regulated-surface*

LPV: *Leucocidina de Panton Valentine*

LukED: *Leucocidina ED*

MLST: *Multilocus Sequence Typing*

MLVA *Multiple-Locus Variable-number tandem repeat Assay*

MPOC: Malaltia pulmonar obstructiva crònica

MSCRAMMs: *Microbial Surface Components Recognising Adhesive Matrix Molecules*

NEAT motif famil: *Near iron transporter*

OM : Osteomielitis

Orf: *Open Reading frame*

PAMP: *Pathogen associated molecular patterns*

PBP: *Penicillin Binding Protein*

PCR: *Polimerase Chain Reaction*

PFGE: Electroforesi en Camp Polsant

PIA: *Polysaccharide Intercellular Adhesin*

PSM: *Phenol-Soluble Modulines*

RAPD : Amplificació amb encebadors a l'atzar de regions polimòrfiques de DNA

REP: Anàlisi de seqüències repetides

RLFP: Polimorfisme de longitud dels fragments de restricció

RNA: Àcid ribonuclèic

RTD: *Routine test dilution*

SAB: Bacterièmia per *Staphylococcus aureus*

Sae: *Staphylococcus aureus Exoproteins*

Sar: *Staphylococcal Accesory Regulator*

SARM: *Staphylococcus aureus Resistent a Meticil·lina*

SARM-CA: *Staphylococcus aureus Resistent a Meticil·lina Associat a la Comunitat*

SARM-HA: *Staphylococcus aureus Resistent a Meticil·lina Associat al Hospital*

SARM-ASS: *Staphylococcus aureus Resistent a Meticil·lina Associat al Sistema Sanitari*

SasG: *S.aureus surface protein G*

SASM: *Staphylococcus aureus Sensible a Meticil·lina*

SCCmec: *Staphylococcal Cassette Chromosome mec*

SCIN: *Staphylococcal Complement Inhibitor*

SCV: *Small Colony Variant*

Sdr : *Protein serin aspartat*

SPEE: *Síndrome de la pell escaldada estafilocòccica*

Ssls: *Staphylococcal superantigen-like proteins*

ST: *Sequence Type*

STT: *Síndrome del shock tòxic*

TSST-1: *Toxina del Síndrome del Shock Tòxic*

VRSA: *Vancomycin Resistant S.aureus*

WGS: *Whole Genome Sequencing*

En les últimes dècades *Staphylococcus aureus* s'ha consolidat com un dels microorganismes amb més capacitat de causar infeccions, donant lloc des de malalties lleus i localitzades, de curs benigne, fins a infeccions greus, disseminades, amb elevada mortalitat. En aquesta tesi, s'han abordat tant aspectes clínics i epidemiològics dels pacients amb infeccions documentades per *S.aureus*, en especial bacterièmia i infeccions de pell i parts toves, com aspectes relacionats amb el patogen. En aquest últim apartat, s'ha estudiat l'epidemiologia molecular de les soques, factors de virulència i alguns tests fenotípics que ens ajudaran a mesurar la seva expressió. Es van incloure un total de 293 bacterièmies per *S.aureus*. La fagotipia va permetre tipar el 37.5% de les soques SARM i el 43.3% dels SASM. La detecció del gen *mecA* va resultar positiva en 28 soques, en concordança amb les dades obtingudes de la sensibilitat antibiòtica per CMI. En l'anàlisi del tipus SCC*mec* de les soques SARM, 27 d'elles corresponien al SCC*mec*IVc i només una presentava el tipus SCC*mec* IVa i ACME negatiu. Mitjançant *spa* typing es va demostrar el predomini d'un grup clonal, CC002 (31%) englobant dos *spa* tipus predominants: t002, t067 en soques SASM i el predomini de CC067 (37.14%) incloent els *spa* tipus t0067 i t002 en SARM. Comparant els patrons d'electroforesi en camp polsant es van agrupar les soques SARM en les clones E7 i E8, també les més prevalents en el nostre medi. En l'estudi mitjançant microarrays de 102 d'aquestes soques es va observar un predomini del CC5 (38.2%), seguit del CC30 (21.6%). La distribució dels perfils al·lèlics del sistema regulador *agr* mostrava un predomini del *agr* II (46.1%). La mortalitat de la sèpsia per *S.aureus* es relaciona amb la susceptibilitat de l'hoste, característiques de la soca, característiques epidemiològiques i amb el temps transcorregut fins a l'inici d'un tractament antibiòtic adequat. Així, l'estudi de mètodes ràpids per la identificació i la detecció de sensibilitat a cloxacil·lina (*BinaxNow S.aureus / PBP 2a Test*, *GenomEra MRSA/SA Blood Culture*, *MicroPhage MRSA/MSSA Blood Culture Test*) ens ha permès adequar el tractament antibiòtic en un 79.25% dels casos. L'origen de la bacterièmia en el 58'4% dels casos era nosocomial i el 45.7% d'origen en el catèter. El 80% dels malalts presentaven comorbiditats associades: 35.5% neoplàsia, 30.4% DM, 14% IRC i 13.7% tractament previ amb immunosupressor. Una quarta part van presentar bacterièmia complicada, i un 8.5% bacterièmia persistent. .

D'altra banda, les infeccions de pell i parts toves per *S.aureus* resistents a meticil·lina d'origen comunitari (CA-SARM) representen al voltant del 20% en el nostre medi. La tipificació molecular d'aquestes soques va permetre demostrar que la majoria pertanyien a la soca USA300-ST8-SCC*mec* IVc i ACME negativa, variant de la clona USA300 (USA300-ST8-SCC*mec* IVa). No es va trobar cap associació entre la soca productora i la nacionalitat dels pacients. Les manifestacions clíniques dels pacients eren lleus i sense presència de complicacions, tant en els SASM com SARM. L'elevada prevalença de la Leucocidina de Pantone Valentine (PVL) en soques SASM o SARM i la bona evolució, tot i el tractament antibiòtic inadequat, es correlaciona amb la hipòtesi que independentment de la sensibilitat antibiòtica, el drenatge de la lesió és necessari per la resolució de la infecció i posa de manifest la difícil valoració del paper de factors de virulència com la PVL en la patogènia d'aquestes infeccions.

Introducció

1. Característiques microbiològiques de *Staphylococcus aureus*

El gènere *Staphylococcus* s'ha inclòs tradicionalment dins la família *Micrococcaceae*, juntament amb els gèneres *Micrococcus*, *Planococcus* i *Stomatococcus*.

El gènere *Staphylococcus* inclou més de 40 espècies. Algunes d'elles formen part de la flora habitual de la pell i mucoses dels humans i altres es troben només entre la flora d'animals mamífers i aus. Cada espècie ocupa un lloc anatòmic a l'hostatger que colonitza. Entre les espècies que colonitzen l'humà, les de major importància són *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus* i *Staphylococcus aureus*. Sense cap dubte *S. aureus* representa l'espècie amb major importància en patologia infecciosa.

Els microorganismes que pertanyen al gènere *Staphylococcus* són cocs grampositius, amb un diàmetre de 0.5-1.5 µm. La seva agrupació en forma de raïm, staphylé en grec, va ser proposada pel cirurgià escocès Alexander Ogdson al 1880 com a nom del gènere.

Els estafilococs són bacteries immòbils, que generalment no tenen càpsula i excepte en algunes ocasions són anaeròbies facultatives. No requereixen en general de medis enriquits per créixer.

La majoria d'espècies produeixen un enzim denominat catalasa que permet desdoblar el peròxid d'hidrogen (H₂O₂) en H₂O i oxigen lliure. Aquesta propietat s'utilitza per diferenciar el gènere *Staphylococcus* dels gèneres *Streptococcus* i *Enterococcus* que són catalasa negatius.

Staphylococcus aureus creix en medis de cultiu convencionals després de 18-24 hores d'incubació, formant unes colònies d'1 a 3 mm de diàmetre, llises, elevades i brillants, de consistència cremosa i d'un color daurat, degut a la producció d'un pigment carotenoide. Quasi totes les soques de *S. aureus* tenen un halo de beta-hemòlisi o hemòlisi complerta al voltant de la colònia, quan creixen en agar sang. La principal característica que diferencia *S. aureus* de les altres espècies de *Staphylococcus* és la producció d'un enzim denominat coagulasa. Aquest permet coagular al plasma i s'utilitza per la seva identificació, donant nom a la resta d'*Staphylococcus* que no tenen aquest enzim i que s'anomenen com a grup Estafilococs coagulasa negatius.

1.1. Estructura bacteriana i factors de virulència

Staphylococcus aureus és l'espècie d'*Staphylococcus* més virulenta per l'home. Es caracteritza per disposar de certs components estructurals i produir nombrosos enzims i toxines considerats factors de virulència. La forma i severitat de la infecció són el resultat d'una interacció complexa entre les defenses de l'hostatger i l'activitat dels factors de virulència que la bactèria produeix en les diferents fases de la infecció.

Clàssicament els factors de virulència s'han classificat en dos grans grups:

1. Components de la superfície bacteriana, com el polisacàrid capsular, certs components del peptidglicà, i proteïnes de superfície implicades en l'adhesió a les cèl·lules de l'hostatger (les més

freqüents denominades *Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecular* ó MSCRAMMs).

2. Toxines i enzims extracel·lulars, produïdes i excretades per la bactèria i que tenen diferents funcions i capacitats com l'activitat citotòxica, l'activitat superantigènica o la capacitat d'evadir el sistema immunitari de l'hostatger.

També s'han classificat en funció de la forma d'actuació:

1. Intervenint en la colonització, facilitant l'adhesió de la bactèria a les cèl·lules de l'hostatger
2. Intervenint en la disseminació i la penetració als teixits de l'hostatger
3. Facilitant l'evasió del sistema immunitari de l'hostatger

1.1.1 Components de la paret bacteriana

Càpsula polisacàrida és la capa més externa de la paret cel·lular estafilocòccica. S'han identificat onze serotips capsulars de *S. aureus*. Els serotips 1 i 2 s'associen a càpsules molt gruixudes i colònies d'aspecte mucoide, però és estrany que provoquin malaltia en humans. Pel contrari, els serotips 5 i 7 són els responsables de la major part de les infeccions a l'home.

La càpsula protegeix a les bactèries ja que inhibeix la fagocitosi d'aquests microorganismes pels polimorfonuclears. La major part dels estafilococs produeixen una biopel·lícula hidrosoluble (capa polisacàrida extracel·lular) formada per monosacàrids, proteïnes i petits pèptids en una quantitat que depèn dels factors genètics i de les condicions de creixement. Aquesta substància extracel·lular uneix a les bactèries a teixits i cossos estranys, com catèters, empelts i pròtesis vasculares o articulars. Com la majoria de bactèries grampositives, els components fonamentals de la paret cel·lular són els peptidoglicans i els àcids teicoics. (Figura 1).

El **Peptidglicà** representa al voltant de la meitat del pes molecular i proporciona estabilitat, degut a què està compost de diverses capes entreligades de glucans construïdes amb 10 o 12 subunitats alternants de àcid N-acetilmuràmic i N-acetilglucosamina.

El peptidglicà té activitat endotoxina, ja que estimula la producció de pirògens endògens, l'activació del complement, la formació de interleucina-1 per part dels monòcits i l'agregació dels leucòcits polimorfonuclears. (procés que origina la formació d'abscessos).

Els enzims que catalitzen la construcció de la capa de peptidglicà s'anomenen proteïnes lligadores de penicil·lina (*Penicillin-binding proteins* (PBPs) i són les dianes per les penicil·lines i altres antibiòtics betalactàmics.

Els **Àcids teicoics** representen aproximadament un 40% del pes de la paret cel·lular. Són polímers composts per ribitol i N-acetil-glucosamina (polisacàrid A), específics d'espècie i units al peptidglicà de la paret mitjançant la unió als residus d'àcid N-acetilmuràmic o als lípids de la membrana cel·lular

(àcids lipoteicoics). Aquests també faciliten la unió a la superfície de les mucoses mitjançant unions específiques a la fibronectina. Encara que són poc immunògens, tenen la capacitat d' estimular la resposta humoral específica quan es troben units al peptidglicà.

Membrana citoplasmàtica composta per proteïnes, lípids i una petita quantitat de carbohidrats, actua de barrera osmòtica cel·lular i proporciona subjecció per a la biosíntesi cel·lular i els enzims respiratoris.

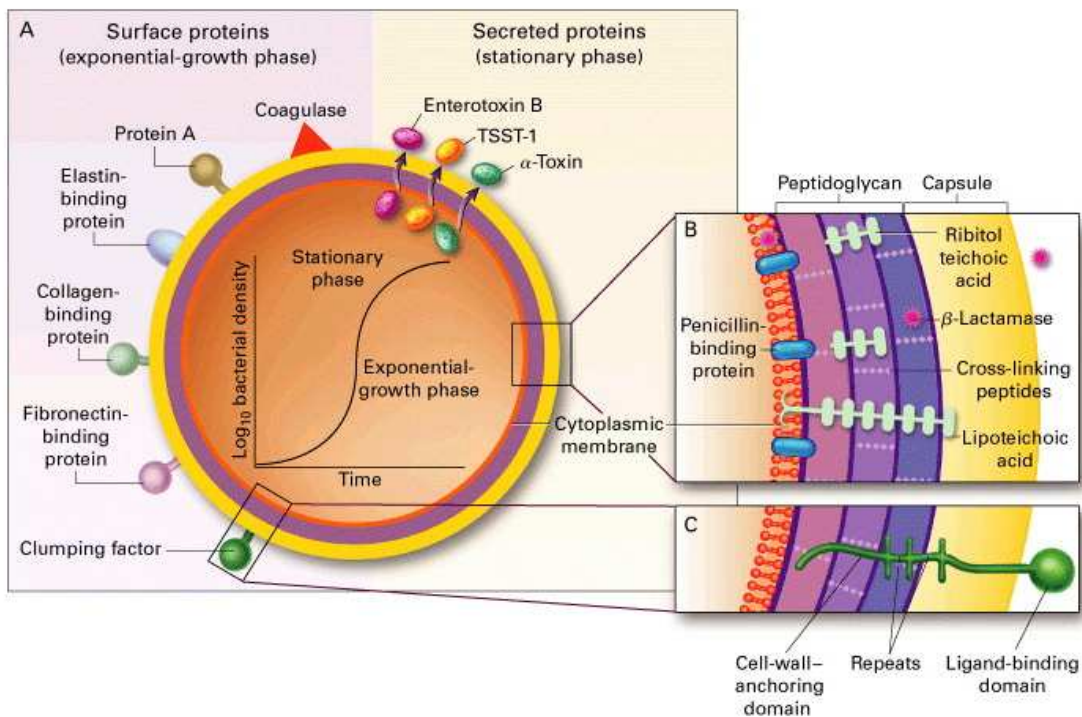
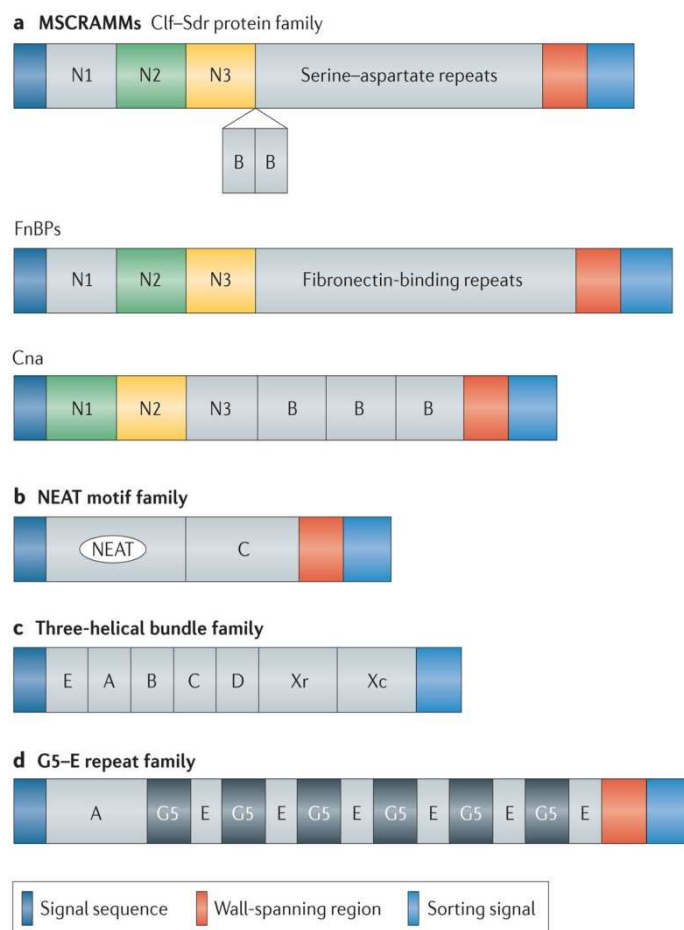


Figura 1. *S. aureus*. Franklin D. Lowy, M.D. N Engl J Med 1998

Proteïnes de la membrana implicades en l'adhesió. *S. aureus* té nombroses proteïnes de superfície, que actuen com a receptors d'adhesió de molècules de la matriu extracel·lular de l'hostatger i de components del plasma, i freqüentment s'anomenen adhesines. A més participen en l'evasió de la resposta immunitària i la formació de biopel·lícules. Així, les proteïnes ancorades a la paret cel·lular són factors de virulència essencials per la supervivència de *S. aureus* i fins i tot, podrien ser una diana pel desenvolupament de vacunes (1).

Staphylococcus aureus pot expressar a la vegada varis tipus d'aquestes proteïnes ancorades a la paret cel·lular i a més a més la seva expressió es pot veure condicionada per diferents condicions del medi. D'altra banda aquestes poden mostrar certa redundància funcional, ja que varies poden actuar realitzant la mateixa funció.

L'anàlisi funcional i estructural ha identificat quatre classes (Figura2): el grup més prevalent d'aquestes proteïnes de superfície s'anomenen MSCRAMM (2).



Nature Reviews | Microbiology

Figura 2. Classificació proteïnes ancorades a la paret cel·lular en funció de la seva estructura. Timothy J. Foster.

Nature Reviews Microbiology. 2014.

Aquestes MSCRAMM uneixen molècules com col·lagen, fibronectina i fibrinogen. I alhora poden adherir-se al component tissular de l'hostatger. S'ha vist que poden estar implicats en la instauració d'infeccions intravasculars, òssies, articulars o dispositius protètics. Els dispositius externs ràpidament es revesteixen de components del sèrum com fibrinogen o fibronectina, que permeten que els estafilococs s'uneixin mitjançant mecanismes mitjançats per les MSCRAMM i elaborar superfícies glicolítiques que encara facilitarien més la colonització.

Les MSCRAMMs que més s'han estudiat i de les que es coneix la seva funció són la proteïna d'unió al col·làgen CNA (*Collagen-binding Adhesin*), les proteïnes d'unió a la fibronectina A i B denominades FnBPA i FnBPB (*Fibronectin-binding Protein*), les proteïnes d'unió al fibrinogen ClfA i B (*Clumping factor*), la SdrG (*protein serin aspartat*), SdrC D o E i la Bbp (*sialo-bonding protein*).

Les FnBPA i FnBPB contribueixen a l'adhesió a biomaterials i es troben implicades en la colonització i infecció de biomaterials i catèters. A la vegada hi ha estudis que demostren que també intervenen en el procés d'invasió cel·lular dels fagocits, en la colonització de l'epiteli respiratori i també podrien tenir una implicació directa en la infecció endovascular.

Les ClfA i B intervenen en l'adhesió dels bacteris al fibrinogen immobilitzat, a coàguls de sang i s'han descrit com a promotors de la formació de trombus en vàlvules cardíques danyades en models animals d'endocarditis. A més s'ha descrit la implicació de la ClfA en l'evasió del sistema immunitari mitjançant l'escissió de C3b en inactiu iC3b i així disminuir la fagocitosi mitjançada pel complement (3).

La **Proteïna A** recobreix la superfície de la majoria de soques de *S. aureus*. Aquesta s'uneix a la capa de peptidglicà o a la membrana citoplasmàtica i té afinitat d'unió al receptor Fc de les immunoglobulines (Ig) Ig G1, Ig G2 i Ig G4. D'aquesta manera inhibeix la opsonització i la fagocitosi. També té la capacitat d'unió al factor de von Willebrand, present a l'endoteli vascular, participant així en l'adhesió a l'inici de la infecció intravascular. Enfront d'aquest receptor i utilitzant anticossos monoclonals s'ha desenvolupat una prova d'aglutinació per la identificació del microorganisme.

Les denominades **NEAT motif family**. *Near iron transporter* (NEAT), li confereixen a *S. aureus* la capacitat de captar i utilitzar l'hemoglobina com a font de ferro pel creixement bacterià.

Aquest mecanisme està regulat per un sistema denominat *iron-regulated-surface* (Isd) que codifica per tres proteïnes ancorades a la membrana denominades IsdA, IsdB i IsdH. Aquestes tenen la capacitat d'unir-se a la hemoglobina i transportar-la al citoplasma on s'allibera el ferro.

Finalment, un grup de proteïnes de la superfície que contenen múltiples dominis G5 tàndem, denominades **G5-E repeat family**, Aap (*acumulation-associated-protein*) i SasG (*S. aureus surface protein G*); la Aap promou la fixació inicial o la fase d'acumulació en la formació del biofilm i la SasG participa en la fase d'acumulació (figura 3).

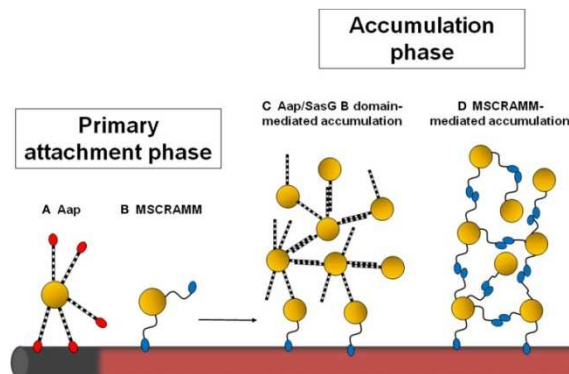


Figura 3. Fases formació biofilm. Pietro Speziale. Front Cell Infect Microbiol. 2014

1.1.2 Factors extracel·lulars produïts per *S. aureus*

S. aureus és capaç de produir i excretar proteïnes amb un paper important en la patogènia de les infeccions causades per aquest microorganisme. Aquestes proteïnes poden ser enzims i certes toxines.

1.1.2.1 Enzims estafilocòccics

Coagulasa és una altra proteïna que pot trobar-se lligada a la paret cel·lular (coagulasa lligada o clumping factor) o de forma lliure en el medi (coagulasa lliure). La coagulasa lligada o clumping factor és capaç de convertir directament el fibrinogen en fibrina produint la coagulació del plasma, sense necessitar de la participació de factors plasmàtics. La coagulasa lligada necessita de la protrombina, ja que al unir-se a ella s'activa i catalitza la conversió del fibrinogen en fibrina. El paper de la coagulasa en la patogènia de la malaltia passa per la capacitat de formació d'una capa de fibrina al voltant d'un abscess estafilocòccic, de manera que la infecció quedi localitzada i els microorganismes protegits de la fagocitosi.

La prova de la coagulasa continua sent la més utilitzada per la seva identificació

S'han desenvolupat diferents tècniques comercials que permeten detectar tant la coagulasa lliure com la coagulasa lligada.

La detecció de la coagulasa lliure (en tub) es basa en la demostració de l'activitat coagulasa per part del microorganisme, posant en contacte el plasma de conill citratat amb la soca problema, incubant a 37°C durant 4 hores i observant la posterior formació d'un coàgul en cas que es tracti de *S. aureus*. La detecció de la coagulasa lligada o clumping factor es fa mitjançant hemaglutinació o aglutinació en làtex, utilitzant partícules de làtex sensibilitzades amb fibrinogen humà, un anticòs monoclonal enfront la proteïna A i polisacàrids capsulars

Els estafilococs són capaços de produir una sèrie d'enzims que hidrolitzen els components tissulars de l'hostatger i ajuden a la disseminació bacteriana, donant lloc al que anomenem metàstasis sèptiques. La **hialuronidasa** hidrolitza els àcids hialurònics, presents a la matriu acel·lular del teixit connectiu. La **fibrinolisisina**, també denominada estafilocinasa, pot dissoldre els coàguls de fibrina. Les **lipases** hidrolitzen els lípids i garanteixen la supervivència dels estafilococs a les regions sebàcies de l'hostatger. La nucleasa termostable és capaç d'hidrolitzar el ADN viscos. La catalasa, té la funció de descomposar el peròxid d'hidrogen que generen els polimorfonuclears i que és tòxic per la bactèria, en aigua i oxigen. La **penicil·linasa** és un enzim produït per la majoria de *S. aureus* i és capaç d'inactivar la penicil·lina hidrolitzant l'anell β -lactàmic.

1.1.2.2 Proteïnes extracel·lulars

Staphylococcus aureus és capaç de produir una gran varietat d'exoproteïnes amb diferents papers en la patogènia de la infecció.

Tradicionalment s'ha considerat que les proteïnes de superfície intervenen en l'adhesió i s'excreten en la fase exponencial, contribuint a la colonització i per altra banda les proteïnes excretades, ho fan en la transició a la fase estacionària i intervenen més endavant en la invasió.

Algunes d'elles són les hemolisines o citotoxines, les leucidines, la toxina de la síndrome del shock tòxic (TSST-1), les enterotoxines, les toxines exfoliatives i altres com les proteïnes EDIN (*Epidermal*

Cell Differentiation Inhibitor), SCIN (*Staphylococcal Complement Inhibitor*) o CHIPS (*Chemotaxis Inhibitory Protein*).

1.1.2.3 Toxines estafilocòcciques

Staphylococcus aureus produeix una gran quantitat de toxines que contribueixen a la capacitat del microorganisme de colonitzar i causar malaltia a l'home (4). Es coneixen cinc toxines citolítiques que actuen lesionant la membrana citoplasmàtica de l'hostatger (alfa, beta, delta, gamma i leucocidina de Pantón Valentine), dues toxines exfoliatives (A i B), vuit enterotoxines (A a E, G a I) i la toxina-1 del síndrome del shock tòxic (TSST-1).

La toxina exfoliativa A, les enterotoxines, i la TSST-1 pertanyen a una classe de polipèptids coneguts com superantígens. Aquestes s'uneixen en els macròfags a les molècules del complex principal d'histocompatibilitat de classe II (CPH II) produint una estimulació dels limfòcits T (interacció amb la subunitat β dels receptors específics dels limfòcits T) i una alliberació massiva de citocines per part dels macròfags i els limfòcits T (5).

Aquesta modulació de la resposta immune pot contribuir a l'evasió de les defenses de l'hostatger i a la persistència bacteriana(6).

1.1.2.4 Citotoxines

La **toxina α** , tant pot estar codificada pel cromosoma bacterià com per un plàsmid i està produïda per la majoria de soques que causen malaltia a l'humà. Altera el múscul llis dels vasos sanguinis i és tòxica per moltes cèl·lules (eritròcits, leucòcits, hepatòcits i plaquetes) integrant-se en regions hidrofòbiques de la membrana i formant porus de 1 a 2 nm, alterant en certa manera la osmoregulació, el flux de cations i altres molècules, arribant fins i tot a provocar apoptosi (7).

La **toxina β** , coneguda també com esfingomielinasa C, codificada pel gen *hlyB*, és una proteïna termolàbil que també la trobem en la majoria de soques que produeixen patologia humana o animal. Té una especificitat per la esfingomielinina i la lisofosfatidilcolina, essent tòxica per nombroses cèl·lules com els eritròcits, fibroblasts, leucòcits i macròfags. La seva toxicitat ve conferida per la capacitat d'hidrolitzar els fosfolípids de la membrana. Aquesta és la hemolisina que dona lloc al CAMP (Test de Christie, Athkins i Muench-Petersen).

Toxina γ i Leucocidines formades per dos components; consten de dues cadenes de polipèptids, els anomenats component S (Slow) i el component F (Fast), basant-se en la seva mobilitat electroforètica.

Aquest grup inclou: 1) la **γ hemolisina** que correspon a dues combinacions d'un component S (HlgA o HlgC) amb un component F (HlgB); 2) la **Leucocidina Pantón Valentine (PVL)** formada per dos subunitats LuKF-PV i LukS-PV; 3) **LukED** i 4) **LukGH**, també conegut com LukAB (8).

Aquestes toxines bi-components formadores de porus, consisteixen en dues subunitats amb una estructura de barril beta, sintetitzades i excretades en moments diferents.

Actuaran de forma sinèrgica, de tal manera que la subunitat S iniciarà la unió a la superfície cel·lular mitjançant receptors específics (9) i formarà un heterodímer amb la subunitat F, tot seguit es produirà una oligomerització que conduirà a la formació de una estructura en anell i a la formació d'un porus transmembrana que participarà en la lisis cel·lular (Figura 4)(10, 11).

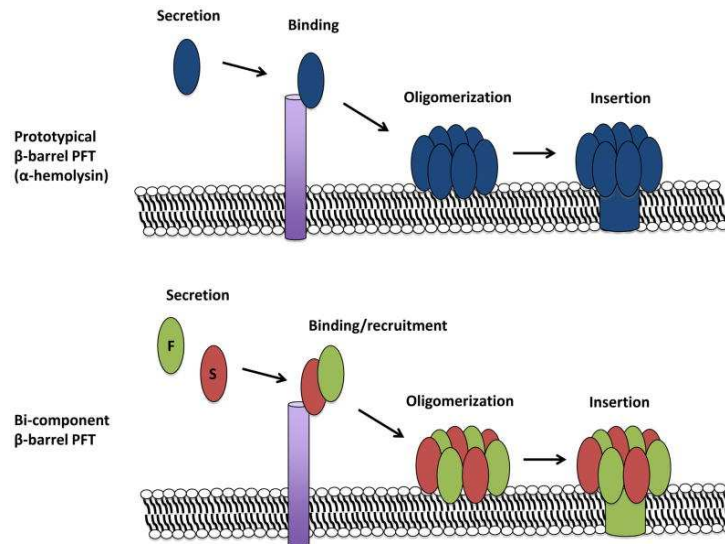


Figura 4. Mecanisme formació porus. Posar el 1er autor, igual que a les fig prèvies Trends Microbiol. 2014

Una sola soca de *S. aureus* pot produir fins a cinc citotoxines de dos components diferents, incloent dues formes de γ hemolisina (HlgAB i HlgCB), leucocidina ED (LukED), leucocidina LukF-PV i LukS-PV també coneguda com PVL i leucocidina LukGH també coneguda com LukAB. L'heterogeneïtat observada pot ser deguda a la presència o absència d'un gen que codifica per la toxina, la interrupció dels loci que codifiquen per les toxines o bé per les variacions en el nivell d'expressió. La majoria de soques aïllades contenen els gens que codifiquen algunes hemolisines (*hla*, *hlb*, *hld*, i *hlg*). La prevalença del gen lukED és diferent segons l'estudi, en algun trobem que el 87% de les soques de *S. aureus* contenen aquest gen (12), mentre en d'altres es descriu una prevalença al voltant del 30% (13-15). Pel que fa a la prevalença de LukGH /AB no hi ha gaires estudis amb soques clíniques, però s'ha vist conservat en totes les soques seqüenciades (16).

En contrast, els gens LukF-PV i LukS-PV estan presents en menys de 5% de les soques SASM (16, 17), però pel contrari els trobem a la majoria de soques CA-SARM (18). Aquesta elevada prevalença en soques CA-SARM fa difícil valorar quin és el seu paper en la patogènia de la infecció (19). Els gens *LukS-PV* i *LukF-PV* estan codificats fora del genoma del core i es localitzen a diferents bacteriòfags, fet que els fa fàcilment transmissibles (20).

Com el seu nom indica aquestes leucocidines són citotòxiques pels neutròfils, però no totes ho són d'igual manera (Figura 5) Així, la PVL mostra activitat enfront leucòcits, monòcits i macròfags, però no ho fa enfront els limfòcits i també s'observa una certa resistència a la activitat citotòxica de la PVL en models de PMN murins (21).

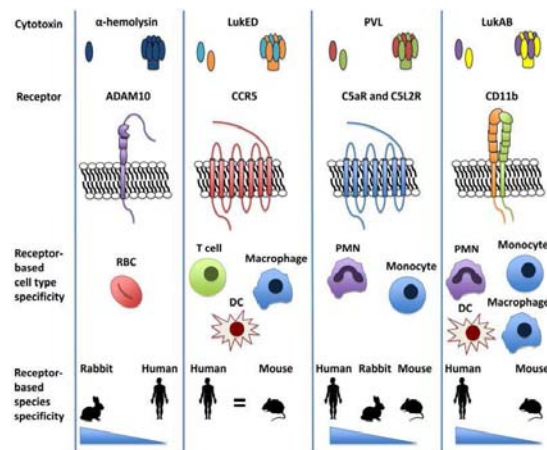


Figura 5. Receptors proteics de les citotoxines. Trends Microbiol. 2014

Aquesta activitat enfront els neutròfils és difícil de mesurar en models animals, degut a la diferent capacitat d'actuar enfront els neutròfils de diferents espècies de mamífers. Així estudis recentment publicats on s'indueix una sobreexpressió de receptors de C5a en cèl·lules de diferents mamífers, es confirma que la toxicitat mediada per aquestes toxines cap als neutròfils es dur a terme mitjançant interaccions específiques d'espècie. Així es demostra que la PVL interactua de manera diferent a la Hlg CB amb els receptors i a més diferents parts dels receptors estan implicats en el procés inicial d'unió i posterior formació del porus. D'aquesta manera s'obren possibles alternatives al bloqueig de l'acció de la PVL mitjançant antagonistes de C5aR1 (22).

La baixa activitat de la PVL enfront les cèl·lules murines ha posat en dubte els resultats obtinguts en models murins de pneumònia i SSTI (23, 24). Es pensa que potser l'elevat inòcul podria ser la causa dels resultats obtinguts.

En quant a la seva implicació en la virulència de les soques de Community-Acquired Methicillin-Resistant *S. aureus* (CA-SARM), estudis en models animals amb conills i amb les mateixes soques han mostrat resultats oposats. Des d'estudis que posen de manifest la seva elevada implicació en infeccions cutànies greus (25) fins a estudis que demostren que pot participar en la resolució de la infecció i fins i tot en la cicatrització (26). D'aquí que la seva patogènia i la seva virulència segueixen sent controvertides.

En models de conill amb bacterièmia s'ha vist que juga un paper menor (27), però pel contrari contribueix en la persistència en models de conill amb osteomielitis (28).

Finalment, les infeccions experimentals en conill han demostrat ser un bon model per a l'estudi de la pneumònia necrotitzant. En aquest model, la PVL desencadena una inflamació pulmonar massiva, el reclutament de neutròfils, i promou el dany pulmonar i la mort en els animals infectats (29).

Per altre banda, és excepcional la presència de PVL en portadors (30-32) o en un altre tipus d'infeccions, com la bacterièmia (33).

La toxina δ i Modulines solubles en fenol (PSMs)

En els últims anys s'han descrit un nou grup de toxines conegudes com **Modulines solubles en fenol (PSMs)** (34). Aquestes són pèptids anfipàtics, amb elevada capacitat de difondre per les superfícies, tenen una estructura en hèlix α i són expressades com a productes primaris de traducció. Les PSMs es poden classificar en funció de la seva mida: les de tipus α tenen entre 20 i 25 aminoàcids i tenen activitat citolítica, mentre que les PSM tipus β tenen entre 43 i 45 aminoàcids i no en tenen.

La toxina δ o δ hemolisina és un petit pèptid anfipàtic amb estructura en hèlix α , produïda per quasi totes les soques de *S. aureus* i la majoria d'espècies d'estafilococs coagulasa negatius.

La toxina afecta sobretot als eritròcits i a les estructures de membranes extracel·lulars i intracel·lulars actuant com un surfactant mitjançant una acció detergent.

La família de les PSMs tipus α conté la denominada **toxina δ** i el seu gen codificant *hld*. Igual que la majoria de les PSMs està present en totes les soques de *S. aureus*, perquè es troba codificada al genoma core (35). Aquest gen *hld* es troba inserit en la seqüència que codifica per l'RNAIII, molècula efectora de tot el sistema.

S'ha identificat un nou pèptid PSM tipus α en el que la seva seqüència no es localitza als operons α o β de les PSMs, sinó que es troba inserit al *SCCmec* II o III de diferents soques de *S. aureus*. Aquest pèptid s'anomena PSMmec. Tot i que presenta propietats inflamatòries i citolítiques, aquestes són menors que en les altres PSMs. Aquest element genètic també s'ha identificat a d'altres *SCCmec* com el tipus VIII o *SCCmec* IIA, IIB o IID i en formes truncades de PSM α 1 i PSM α 4 com productes metabòlics de soques USA-300 (36).

Les PSMs clàssiques es regulen mitjançant el sistema accessory gene regulador *agr* de quorum sensing, però no s'ha demostrat relació entre els nivells d'expressió de RNAIII (regulador del *agr*) i els nivells d'expressió de PSM tipus α .

Posteriorment es va trobar que la regulació de l'expressió de les PSMs era mediada pel sistema *agr*, però de forma independent al RNAIII. De tal manera, que la sobre expressió de PSMs es deu a la unió directa del pèptid AgrA a les regions promotores dels operons. El PSMmec es regula d'igual manera.

Un altre mecanisme important en l'expressió d'aquestes molècules és la manera per la qual són excretades al medi. S'ha descobert la existència d'un sistema transportador ABC (ATP-binding cassette) denominat **pmt** (37), present a tot el gènere *Staphylococcus* i que podria explicar que aquestes proteïnes només es trobin en aquest gènere.

S'han utilitzat models in vivo i in vitro per estudiar quin és el paper de les PSMs en la patogènia de *S. aureus* i sobretot en aquelles infeccions produïdes per soques CA-SARM. En aquests casos s'han mostrat nivells d'expressió de PSMs més elevats i una major capacitat invasiva de les soques CA-MRSA si les comparem amb soques HA-MRSA (38).

Aquestes molècules poden actuar en la patogènia de les infeccions estafilocòcciques a diferents nivells. Les PSMs α tenen la capacitat de lisar les cèl·lules eucariotes de manera independent al receptor, poden actuar tant sobre els eritròcits com sobre els leucòcits humans. Aquesta capacitat les fa diferenciar d'altres citotoxines com la PVL que són receptors específiques i per tant, també específiques de les cèl·lules i l'espècie de l'hostatger al qual infecten. La toxina δ té una activitat citolítica moderada.

D'altra banda també es va descriure la capacitat d'interferir en la resposta quimiotàctica dels neutròfils a través del receptor dels pèptids formilats FPR2 (39). Aquí faria dues frases perquè sino no acaben de lligar. i poder diferenciar entre soques CA-MRSA i soques comensals o no relacionades amb l'assistència sanitària, mesurant l'alliberació de PSMs (Figura 6).

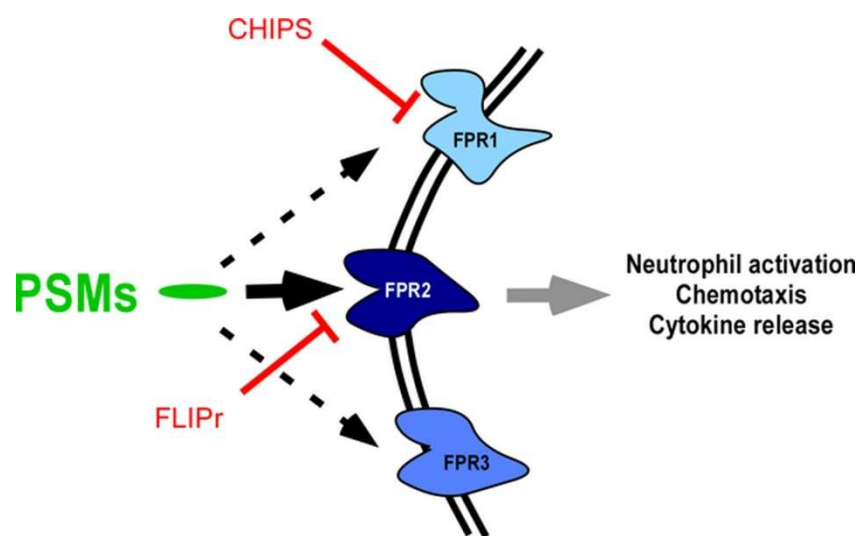


Figura 6. Interacció PSMs amb FPR2. Gordon Y. FEMS Microbiology Reviews. 2014

S'ha descrit la relació entre PSMs i formació del biofilm. La seva capacitat surfactant interromp les interaccions cel·lulars dins els biofilms, trenca les aglomeracions i introdueix nous canals en la seva estructura. Aquests canals permeten l'arribada de nutrients a les capes més profundes i permeten la supervivència dels microorganismes que es troben a aquell nivell. Quan hi ha una elevada producció de PSMs en el biofilm, i la formació dels porus permet separar els cúmuls, també es veu afavorida la difusió dels microorganismes i per tant la disseminació de la infecció.

Per últim algunes PSMs com la toxina δ s'ha vist que té una certa activitat antimicrobiana, però el mecanisme molecular encara es desconeix.

S. aureus està protegit de la seva activitat antimicrobiana gràcies al **Sistema d'excreció Pmt**, que li confereix immunitat i que s'ha vist com una potencial diana sobre la qual desenvolupar vacunes enfront la infecció per *S. aureus* (40).

1.1.2.5 Toxines exfoliatives

La síndrome de la pell escaldada estafilocòccica (SPEE) que es caracteritza clínicament per una dermatitis exfoliativa, està mitjançada per aquestes toxines. S'han descrit dos tipus de toxines

exfoliatives ETA A i ETA B que produeixen aquest tipus de manifestacions clíniques. ETA A és termostable i codificada per un gen cromosòmic i ETA B és termolàbil i mitjançada per un plàsmid. Altres tipus menys relacionats amb aquesta síndrome són la ETA C i ETA D.

El mecanisme patogènic d'aquestes toxines es creu que és la seva activitat com a proteasa, mitjançant la unió a la desmogleïna que es troba formant part de l'extracte granulós de la epidermis i que és la responsable de la formació de ponts intercel·lulars.

1.1.2.6 Toxines EDIN (*epidermal cell differentiation inhibitor*)

La família està formada per la toxina EDIN-A, EDIN-B i EDIN-C. Alguns estudis demostren la capacitat de EDIN-A de bloquejar la diferenciació del queratinocit i induir la hiperplàsia de la dermis (41)

La toxina EDIN-B, s'ha descrit que és capaç d'inhibir les GTPases RhoE i RhoA (42). Aquestes toxines estan codificades pels gens *edinB* y *edinC* localitzats a elements mòbils que a la vegada poden portar associats altres gens que codifiquen per diferents factors de virulència (43).

Un estudi recent en ratolins ha mostrat el paper fonamental d'EDIN-B en la translocació de bacteries des del teixit pulmonar al torrent sanguini, Per d'altra banda, no s'ha observat que EDIN-B promogui la bacterièmia persistent (44). EDIN-B pertany a una família d'enzims que té com a diana la GTPasa RhoA, que està implicada en la regulació de la contractibilitat del citoesquelet d'actina, participant en l'adhesió, la divisió i la migració cel·lular. Té un paper important en el control de les funcions de la barrera epitelial i l'endoteli i això podria explicar el fet que la seva activació pogués ajudar a la disseminació de *S. aureus* des del teixit pulmonar al torrent sanguini. Altres estudis mostren la capacitat d'aquestes toxines EDIN per induir túnels transcel·lulars a les cèl·lules endotelials (45).

Aquestes dades s'afegeixen a estudis previs que mostraven que la RhoA ADP-ribosiltransferasa promou la difusió metastàsica de *S. aureus* (45, 46).

1.1.2.7 La toxina de la síndrome del shock tòxic (TSST-1)

És una toxina codificada pel gen *tst*, termostable i resistent a la proteòlisi, amb capacitat de travessar les barreres de les mucoses. És un superantigen que estimula l'alliberament de citocines i provoca extravasació de cèl·lules endotelials. En grans quantitats té un efecte citotòxic.

1.1.2.8 Enterotoxines

La producció per part de *S. aureus* d'alguna d'aquestes enterotoxines causa la síndrome de la intoxicació alimentària. La causa és la ingestió d'aliments contaminats amb enterotoxines ja pre-formades. Aquestes s'han descrit com superantígens amb la capacitat d'induir l'activació inespecífica dels limfòcits T i l'alliberació de citoquines.

Fins al moment s'han descrit 18 enterotoxines; SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER i SEU, cada una d'elles codificada per un gen que es denomina amb el prefix *se-* o *ent-* seguit de la lletra a la que correspon l'enterotoxina que codifica. La majoria també es troben codificats a elements mòbils.

1.1.2.9 Proteïnes implicades en l'evasió del sistema immunitari

Staphylococcus aureus es caracteritza per la presència d'altres factors de virulència que els permeten colonitzar, proliferar, envair i destruir els teixits de l'hostatger. El sistema immunitari ha desenvolupat estratègies per lluitar enfront aquests factors, requerint en primer lloc el seu reconeixement (5). Tot i l'heterogeneïtat molecular dels microorganismes, aquests presenten un seguit de patrons moleculars, anomenats **PAMPs** (*Pathogen associated molecular patterns*) que són reconeguts pels receptors, anomenats *pattern recognition receptors* (PRR) i que són capaços de desencadenar una resposta immunitària (47, 48).

Els àcids teicoïcs, el grup de superantígens i els pèptids formilats serien alguns exemples de PAMPs.

La immunitat innata és capaç de reconèixer un seguit de PAMPs que formen part de nombrosos microorganismes, mitjançant l'expressió de receptors reconeixadors de patrons (PRR). Aquests poden expressar-se a la superfície cel·lular, a compartiments intracel·lulars o bé secretar-se al torrent circulatori o altres fluids orgànics. Tenen la funció d'opsonització, activació del complement, de les cascades de la coagulació, fagocitosis, activació de senyals proinflamatoris i inducció d'apoptosi. Entre els PRR hi ha els receptors dels pèptids formilats (FPR). Aquests envolten els bacteris i actuen com a factors quimiotàctics pels neutròfils (49). D'aquests el N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP) és el prototipus i inclouen el receptor d'alta afinitat, FPR (*Formyl peptide receptor*), i uns altres dos homòlegs, el FPRL1 (*Formyl peptide receptor like 1*) actualment denominat FPR2/ALX i el FPRL2 (*Formyl peptide receptor like 2*).

L'activació d'aquests receptors donarà lloc mitjançant diferents vies a l'activació de la resposta immunitària i a la posterior eliminació dels microorganismes invasors. S'han identificat un gran nombre d'agonistes i antagonistes del pèptid formilat, incloent components bacterians i molècules exògenes.

Tradicionalment s'ha considerat que les proteïnes de superfície intervien en l'adhesió i s'excreten en la fase exponencial, contribuint a la colonització.

Per altra banda les proteïnes excretades, se secreten en la transició a fase estacionària i intervien més endavant en la invasió.

Tot i això, s'han descrit proteïnes d'acció antiinflamatòria que in vitro són immunomoduladors com **CHIPS** (*Chemotaxis Inhibitory Chemotaxis Inhibitory Protein of S. aureus*) i **SCIN** (*Staphylococcal complement inhibitor*), excretades de manera precoç en el creixement del microorganisme i, tot i ser proteïnes excretades, la seva funció està relacionada amb l'evasió en el reconeixement del sistema immunitari a l'inici de la infecció.

La funció de **CHIPS** és inhibir la resposta dels leucòcits i monòcits a la fracció C5a del complement i a FPR com fMLP, bloquejant doncs els receptors dels neutròfils humans que estan implicats en la

quimiotaxi . Per la seva banda **SCIN**, bloqueja les tres vies del complement, impeding la fagocitosis del microorganisme pel neutròfil humà.

Els gens que codifiquen per aquestes proteïnes es troben localitzats a un bacteriòfag junt amb els gens de la estafilokinasa (*sak*) i la enterotoxina A (*sea*)(50).

Posteriorment es van descriure altres proteïnes implicades en el bloqueig dels pèptids formilats com FLIPr (51). Aquesta inhibeix la resposta dels leucòcits als agonistes dels FPRL1 i la FLIPr-like (52). La FLIPr està codificada en un clúster que codifica també proteïnes homòlogues de SCIN, la α -hemolisina, a més d'altres proteïnes excretades (53), per la qual cosa pot jugar un paper important en la evasió inicial de *S. aureus* de la immunitat innata de l'hostatger i afavorir la disseminació (51, 52, 54).

Per d'altra banda, *S. aureus* produeix una sèrie d'exoproteïnes immunomoduladores denominades ***Staphylococcal superantigen-like proteins (Ssls)***.

Aquestes SSLs actuen inhibint l'activació del complement ; s'uneixen a IgG i IgA, i inhibeixen el reclutament de neutròfils (55). Alguns estudis en models animals han observat que un excés de producció de Ssls es relaciona a una major virulència d'infecció sistèmica. L'expressió d'aquestes Ssls també està regulada per sistema *agr* (56).

1.2. Sistemes de regulació de l'expressió de factors de virulència

L'expressió dels factors de virulència, tants els involucrats en l'adhesió com els excretats està regulada per diferents sistemes de regulació. Es tracta d'un mecanisme complex que vé condicionat majoritàriament per les condicions ambientals, que controlen l'expressió de certs determinants metabòlics i de virulència.

El sistema regulador més conegut i estudiat és el accessory gene regulator (*agr*), aquest és el responsable de l'expressió de gens de virulència via quorum sensing (57).

Quorum sensing és la regulació de l'expressió gènica en resposta a fluctuacions de la densitat cel·lular. Durant el creixement bacterià, es produeixen i excreten molècules químiques que tenen com a funció actuar com a senyals (autoinductores). La seva concentració augmenta en funció de la densitat bacteriana així, permet l'expressió d'adhesines durant la fase exponencial de creixement quan la densitat bacteriana és baixa. D'igual manera, activa l'expressió d'exoproteïnes durant la fase post exponencial i estacionària del creixement, quan la densitat poblacional és alta (58). El bloqueig del quorum sensing es presenta com una estratègia per atenuar la infecció i una alternativa al tractament amb antimicrobians (59, 60). El sistema *agr* és un locus de 3 kb que conté dues unitats de transcripció divergents denominades RNAII i RNA III que estan sota el control de dos promotors P2 i P3 (61). RNAII codifica quatre proteïnes, AgrB, D, C i A de les quals, AgrA i AgrC formen el sistema regulador de dos components, AgrC és el sensor i AgrA el regulador de la resposta. AgrB és una proteïna transmembrana implicada en el processament i la secreció de AgrD, donant lloc al Pèptid

Senyal autoinduïble (AIP) (62). Aquest AIP s'unirà al sensor Agr C que s'autofosforila i activa el regulador de la resposta AgrA. Això donarà lloc a un increment de la transcripció d' RNAII i RNAIII (62, 63). (Figura 7).

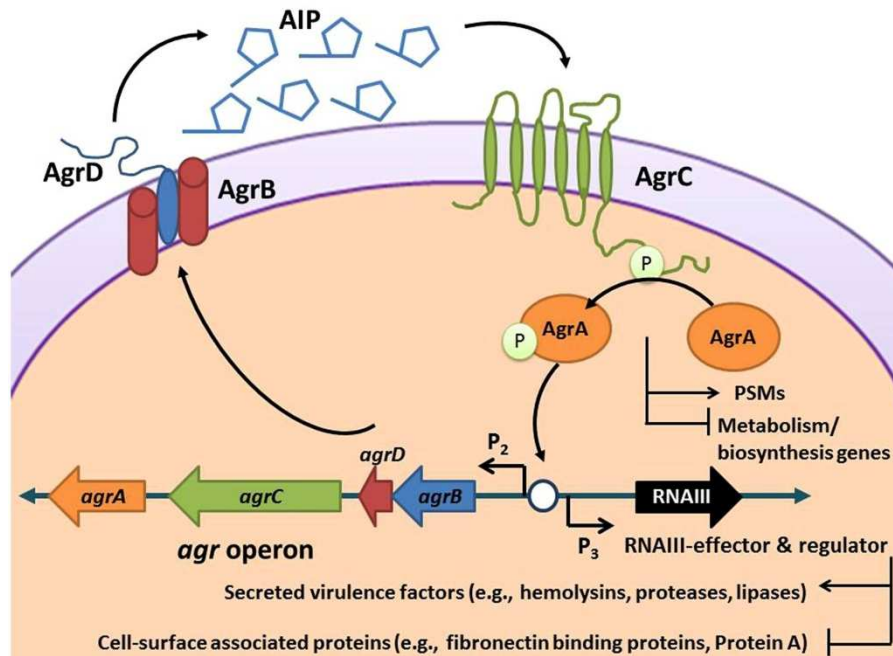


Figura 7. Esquema del sistema regulador Agr de *S. aureus*. Cassandra L. Quave. Front. Microbiol. 2014

La molècula efectora del sistema regulador és RNAIII, actua a un nivell transcripcional inhibint l'expressió de proteïnes de superfície (proteïna A, proteïnes d'unió a fibronectina, etc.), activant l'expressió de toxines, enzims extracel·lulars (α -toxina, β -toxina, lipases, proteases, etc.), així com factors de virulència que estan relacionats amb l'adquisició de nutrients, la supervivència i la disseminació bacteriana.

Altres sistemes reguladors de dos components descrits en *S. aureus* son SaeRS (61, 64), ArlRS y SrrAB/SrhSR. Aquests sembla que actuarien com a mitjancers entre les senyals ambientals (concentracions de sal, glucosa, antibiòtics, pH, nivells d'oxigen) i els reguladors globals Agr i SarA(64). Per la seva banda, SarA modula l'expressió de diversos factors de virulència a través de la transcripció del RNAIII, però també per mecanismes independents al sistema agr. Es creu que afecta l'expressió d'uns 120 gens i ho fa promovent l'expressió de hemolisines i proteïnes d'unió a la fibronectina. Els factor alternatiu sigma B regula el metabolisme de la paret cel·lular i processos de transport de membrana (65), la seva activació es tradueix en un augment de les proteïnes de superfície i una disminució en la producció de diverses exotoxines (66). El sistema sigB augmenta l'expressió de sarA, mentre que disminueix la producció de RNA III (67).

2. Epidemiologia molecular de *S. aureus*

Per conèixer la dinàmica global de l'epidemiologia de les infeccions per *S. aureus*, és important conèixer les característiques genètiques de les soques aïllades. D'aquesta manera entendrem l'aparició i disseminació d'algunes clones més virulents i més resistents als antibiòtics.

El protagonisme del SARM en les infeccions nosocomials, la gravetat de les infeccions que causa, la seva implicació en les infeccions relacionades amb les cures sanitàries realitzades a nivell extrahospitalari i l'aparició de soques resistents a antibiòtics com la vancomicina, linezolid o daptomicina, posen de manifest la importància de la pràctica d'un conjunt de mesures (**bundles**) per al control de la infecció. Establir la relació epidemiològica entre aquestes soques és important a l'hora de prendre decisions sobre el control de la infecció i l'ús adequat dels antibiòtics.

Així doncs, des dels anys 50 i 60 es van posar en marxa estratègies microbiològiques per poder tipificar aquestes soques productores de malaltia i obtenir informació sobre els reservoris, els focus d'infecció i la seva transmissió horitzontal.

Les primeres estratègies, basades en **mètodes fenotípics**, comparaven soques en funció de la seva sensibilitat antibiòtica; així, sensibilitat diferent, antibiotips diferents (68, 69); o en funció del seu perfil de fags capaç de provocar lisis bacteriana, fagotípic (70).

Si més no, el poder discriminador i l'exactitud d'aquestes tècniques es va millorar a partir dels anys 70, amb el desenvolupament de **mètodes de caracterització molecular**, que es basen en la comparació entre soques d'un fragment del genoma bacterià amb la variabilitat adequada.

Destaquen els mètodes basats en l'anàlisi plasmídica, ribotipatge per PCR, amplificació de fragments de longitud polimòrfica (AFLP) o amplificació amb encebadors a l'atzar de regions polimòrfiques del DNA (RAPD), electroforesi en camp polsant (PFGE) (que s'ha convertit en la tècnica més utilitzada i actualment considerada el "gold standard") i, finalment mètodes basats en la seqüenciació de DNA com l'anàlisi de seqüències repetides de la proteïna A (*spa typing*) o la tipificació mitjançant seqüenciació de varis loci o MLST (*multi locus sequence typing*).

La introducció de tècniques de seqüenciació massiva pot acabar millorant aquesta tipificació molecular, reduint els temps i donant-nos informació addicional sobre nous patrons de resistències i factors de virulència d'aquestes soques (71).

L'avantatge d'aquests mètodes de tipificació molecular és la possibilitat de poder aplicar-los universalment a diferents gèneres i espècies de microorganismes.

L'aplicació d'aquestes tècniques en l'estudi genotípic de soques de SARM procedents d'aïllats clínics, ha permès establir uns perfils que ens ajuden a relacionar i identificar soques amb infeccions d'origen hospitalari i alhora diferenciar-les d'altres perfils associats a soques provinents de la comunitat o relacionades amb l'assistència sanitària.

2.1. Mètodes de tipificació genotípica i molecular

2.1.1 Anàlisi plasmídica

L'anàlisi plasmídica és fàcil d'implementar, i està basada en la diferenciació de les soques de *S. aureus* per la diferent mida i número dels seus plàsmids, fàcilment detectables en un gel d'agarosa. Si més no, amb freqüència té poc poder discriminador per diferents motius: en primer lloc, només un 90% de les soques presenten plàsmids, aquests són susceptibles de perdre's o guanyar-se o, i fins i tot, tenen la capacitat d'adoptar diferents conformacions, que varien el seu grau de superenrollament i per tant el seu perfil electroforètic. D'altra banda, diferents espècies bacterianes poden portar els mateixos plàsmids (72). Alhora, canvis en el sistema d'extracció o en les condicions de l'electroforesi, també podrien fer variar el perfil plasmídica. Degut a aquestes limitacions, la tipificació per perfils plasmídics és una tècnica d'ajuda en estudis epidemiològics, limitats temporalment i geogràficament, i que pot tenir més valor si es complementa amb d'altres tècniques genotípiques.

2.1.2 Tècniques de tipificació basades en la PCR

El fonament d'aquestes tècniques és l'amplificació de gens o seqüències de DNA polimòrfiques amb la posterior separació electroforètica dels productes amplificats.

Existeixen descrites tres variants de la PCR:

1. Aquelles que utilitzen encebadors arbitraris o amb certa especificitat que amplifiquen regions del genoma localitzades entre dos encebadors.
2. Aquelles en què abans o després de l'amplificació genètica se sotmet al genoma o al producte amplificat a la digestió amb enzims de restricció
3. Aquelles que amplifiquen regions internes de certs gens amb posterior seqüenciació.

2.1.2.1 *Amplificació a l'atzar del DNA polimòrfic. (RAPD)*

Utilització d'encebadors de 9-10 bases de longitud que hibriden amb regions del cromosoma bacterià a baixes temperatures, d'aquesta manera permeten amplificar regions localitzades entre dos encebadors consecutius. Si els dos encebadors hibriden a una distància òptima i en la direcció apropiada, s'obtindrà un producte de PCR amb una mida corresponent a la distància entre els dos encebadors. El número i la localització de les regions reconegudes pels encebadors varia per les soques d'una mateixa espècie bacteriana. Degut a que aquests encebadors no estan dirigits enfront a un locus genètic determinat, es poden produir unions inespecífiques, d'aquí que la amplificació és molt sensible a petites variacions de temperatura, cosa que pot provocar variacions en el patró de bandes, condicionant la seva reproductibilitat.

2.1.2.2 Ribotípia

Aquesta tècnica basa la seva capacitat de discriminació en la variabilitat existent entre les regions espaiadores que separen els gens ribosomals 16S i 23S (73). En els microorganismes procarïotes, les tres subunitats de l'operó *rrn* (16s, 23s i 5s) estan separades per regions espaiadores que poden presentar gran variabilitat, tant en la seva seqüència, com en la seva mida a nivell de gènere i espècie. D'aquesta manera, un cop amplificades aquestes seqüències s'obtenen diferents bandes, en funció de la mida de la regió espaiadora del l'operó *rrn*. Així doncs, utilitzem encebadors que amplifiquen els gens que codifiquen per ARNr. D'aquesta manera és una tècnica reproducible, encara que poc discriminativa.

2.1.2.3 RLFP (polimorfisme de longitud dels fragments de restricció)

És una tècnica basada en la digestió amb enzims de restricció dels productes d'amplificació de gens o seqüències de DNA polimòrfic (73). S'utilitza per a l'estudi sobretot de gens codificants per a factors de virulència, utilitzant encebadors que amplifiquen específicament aquesta regió. Un cop amplificat es digereix amb una endonucleasa escollida en funció de la composició de bases coneguda de l'amplicó i els productes obtinguts es separen en un gel d'agarosa.

2.1.2.4 REP (anàlisi de seqüències repetides)

És una tècnica d'amplificació de fragments repetits que utilitzen encebadors que hibriden seqüències de DNA repetides (seqüències rep) o presents en múltiples còpies en el genoma de la majoria de bacterïes. Quan dues seqüències estan suficientment a prop, el fragment de DNA que es troba entremig s'amplifica. D'aquesta manera el número i la localització d'aquestes seqüències repetides entre soques és variable i per tant també el número i la mida dels fragments de DNA generats. Aquesta tècnica es caracteritza per la seva senzillesa, rapidesa i baix cost. Els patrons de bandes solen ser senzills d'interpretar, depenent una mica del microorganisme, i en el cas de *S. aureus*, estudis realitzats per Tenover *et al* (1995)(74) indiquen que la REP-PCR es tan discriminativa com la RAPD o el PFGE.

2.1.2.5 AFLP (polimorfismes en la longitud de fragments amplificats)

Mètode descrit a l'any 1995(75) que es fonamenta en l'amplificació mitjançant PCR de fragments de restricció, generats a partir del DNA cromosòmic, als que prèviament se'ls ha unit uns adaptadors que hibriden amb uns encebadors específics. És una tècnica amb elevada sensibilitat i molt bona capacitat de discriminació, encara que no tant com el PFGE, però requereix d'un equip costós i l'anàlisi dels patrons de bandes resulta complicat i requereix d'un programa informàtic adequat.

2.1.2.6 MLVA (Multiple-Locus Variable-number tandem repeat Assay)

Es tracta d'una tècnica basada en les seqüències repetides del genoma. Es realitza l'anàlisi de seqüències repetides en tàndem en un número variable en diferents loci. Les variacions en el nombre

d' aquestes repeticions donarà lloc a fragments de diferents mides i aquestes variacions seran les que es faran servir per fer la diferenciació filogenètica. (Figura 8).

Els cinc loci que s'estudien contenen 7 gens que codifiquen per proteïnes implicades en la virulència de la bactèria.

En resum, el MLVA discrimina entre diferents soques *S. aureus* basant-se en el patró de bandes que ofereix cadascun, en funció del nombre de repeticions en tàndem d'aquests set gens individuals.

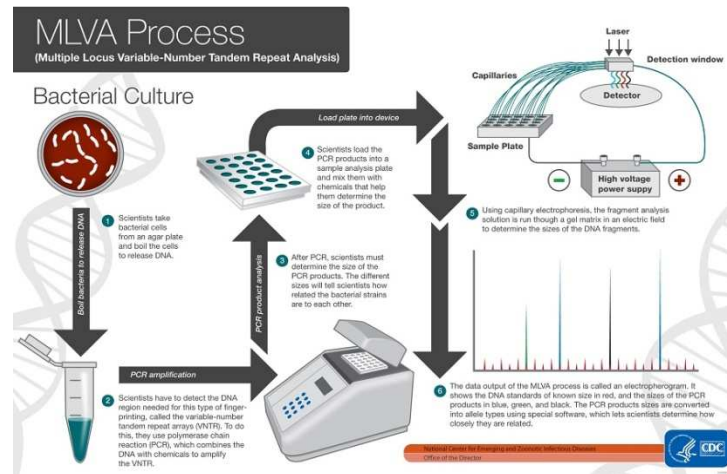


Figura 8 . Procés MLVA (Centers for Disease Control and Prevention. CDC)

2.1.2.7 MLST (Multilocus sequence typing)

Es una tècnica que es basa en la seqüenciació de 7 gens constitutius o *housekeeping* implicats en el metabolisme cel·lular (*arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi* i *yqiL*). Les seqüències obtingudes són comparades amb al·lels prèviament descrits i caracteritzats, a la base de dades www.mlst.net. En realitzar la comparació, a les seqüències obtingudes se'ls assigna un número que indica quin és l'al·lel. Cada soca queda definida per la combinació dels 7 al·lels, donant un perfil al·lèlic o ST (Sequence Type)(76). Els STs s'agrupen en complexes clonals (CC) que mostren almenys, 5 al·lels comuns. La relació evolutiva entre els diferents STs i l'agrupació d'aquests complexes clonals es realitza gràcies a l'algoritme eBURST (eburst.mlst.net), de l'anglès Based Upon Related Sequence Types.

La tècnica de MLST permet l'estudi de l'evolució de les soques en el temps, ja que al tractar-se de gens *housekeeping* estan molt conservats i és infreqüent que es produeixin mutacions, per això els clons mantenen el ST durant llargs períodes de temps. Gràcies a aquesta base de dades, accessible a través d'Internet es poden realitzar anàlisis de soques estudiades i enviar nous perfils al·lèlics als que se'ls assignarà un nou ST. D'aquesta manera, es genera una base de dades amb informació epidemiològica global, podent-se detectar noves clones i fer-ne així un estudi de la seva disseminació.

2.1.2.8 Anàlisi de les seqüències repetides de la proteïna A (*spa typing*)

És un mètode de tipificació molecular basat en la seqüenciació d'un únic locus cromosòmic, analitzant les regions repetides que conté. La seqüenciació de la regió polimòrfica X del gen que codifica per la proteïna A ens permetrà mitjançant l'anàlisi del número de repeticions i la seva variabilitat, assignar diferents tipus de *spa typing*.

Gràcies a l'alt grau de polimorfisme, aquesta seria una tècnica potencialment adequada per a l'estudi de brots, donada la seva elevada capacitat discriminativa (77).

La seqüenciació del gen es realitza segons el protocol descrit pel "European Network of laboratories for Sequenced Based Typing of Microbial Pathogens" (SeqNet) i les seqüències s'analitzen amb el software Ridom StaphType TM (Münster, Germany)(78).

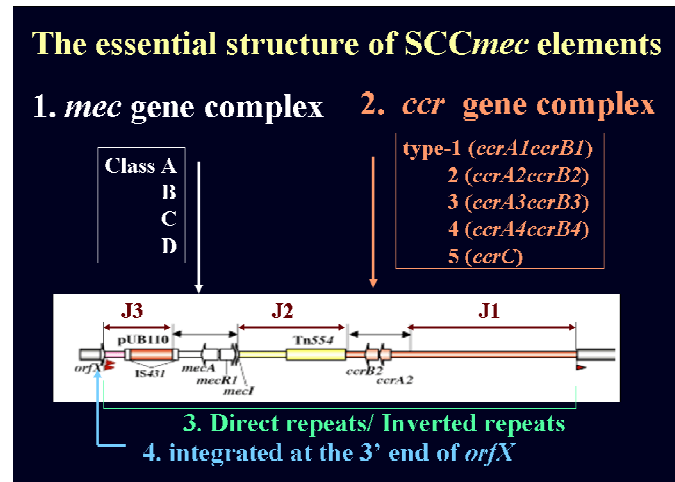
Actualment el programa Ridom StaphType TM disposa d'un mètode algorítmic denominat BURP (Based Upon Repeat Patterns) que té en compte l'associació que s'ha trobat entre certes repeticions específiques i certes freqüències amb un determinat ST. D'aquesta manera es classifiquen els tipus de seqüències *spa* relacionades dins dels diferents grups BURP (79). La nomenclatura d'aquests és un número amb el prefix CC BURP (clonal complex BURP).

2.1.2.9 Tipificació del Cassette Cromosòmic SCC*mec*

Staphylococcal cassette chromosome (SCC) és una illa genòmica present en els estafilococs tant en els que viuen com a comensals humans com també en els animals, En aquest cassette trobem el gen que codifica per a la resistència a la meticil·lina. La determinació de les seqüències d'alguns elements del *SCCmec* ha permès identificar diferències estructurals que han estat utilitzades com a base d'estudis epidemiològics.

En els *S. aureus* la resistència a la meticil·lina codificada pel gen *mecA* es localitza en una gran regió cromosòmica que està absent en el cromosoma dels meticil·lina sensibles. La regió designada inicialment amb el nom de *mecDNA* es va especular des d'un primer moment que originalment formava part del genoma d'una altra espècie bacteriana i que es va acabar integrant en el cromosoma de *S. aureus*. La descripció d'aquesta regió *mecDNA* es va realitzar a partir de la clonació i la determinació de tota la seva estructura a partir d'una soca de *S. aureus* Japonesa denominada N315 (80).

Aquesta estructura està formada pel **complex gènic *mecA*** que inclou el gen *mecA*, els seus gens reguladors *mecI* i *mecR1*, i la seqüència d'inserció IS431. A més trobem dues recombinases específiques del lloc que formen el **complex *ccr*** (81) i repeticions directes i invertides en els dos extrems. La integració en el genoma es fa en el extrem 3' de la regió *orfX*, punt de lectura oberta del que es desconeix la seva funció.(Figura 9)

Figura 9 . Estructura SCC_{mec}. www.Staphylococcus.net

Segons la distribució dels gens reguladors *mecI* i *mecR1* i la posició exacta de IS431, el complex *mec* es pot classificar en 6 tipus (82). D'igual manera pel complex gènic *ccr* s'han identificat 5 tipus diferents (83). En funció de la combinació del **complex gènic *mecA*** i del **complex *ccr*** s'han descrit 11 tipus de SCC_{mec}.

La regió del cassette *mec* que no forma part ni del complex gènic *mec* o *ccr* s'anomena **regió J**. Aquesta es pot dividir en tres parts: J1 (la regió entre *ccr* i la regió cromosòmica que flanqueja SCC_{mec}), J2 (la regió entre *mec* i *ccr*), i J3 (la regió entre *orfX* i *mec*). Aquestes regions contenen alguns gens de resistència a β -lactàmics.

Així doncs, podem dir que en funció del tipus de complex gènic *mec* i *ccr* que integra el SCC_{mec} se'n descriuen 11 tipus. El subtipus vindrà definit en funció dels polimorfismes o les variacions de les regions J del SCC_{mec} (82).

2.1.3 Anàlisi del DNA cromosòmic

Consisteix en la ruptura del DNA en fragments mitjançant enzims de restricció que reconeixen una seqüència específica de nucleòtids de quatre a vuit parells de bases. A aquesta seqüència específica se la coneix com lloc de restricció. Els fragments de DNA obtinguts dels talls s'anomenen fragments de restricció.

Aquests enzims tenen la funció natural de destruir el DNA exogen, però existeix un procés de metilació del DNA propi en el lloc de restricció que evita que sigui digerit pel propi enzim. Molts enzims de restricció reconeixen seqüències o dianes molt freqüents en el DNA per la qual cosa generen molts talls i donen lloc a molts fragments de DNA. Altres enzims són de baixa freqüència i donen fragments de restricció de gran mida o macrorestricció.

Hi ha varis tipus d'anàlisi del DNA cromosòmic:

2.1.3.1 Polimorfisme de la longitud dels fragments de restricció (RFLP)

L'estudi dels fragments de restricció per mètodes convencionals consisteix en extracció del DNA del microorganisme, restricció per l'enzim de restricció escollit i un cop obtinguts els fragments produïts es posen en un pouet del gel d'agarosa que es sotmet a un camp elèctric (electroforesi). Els diferents fragments es desplaçaran pel gel a una distància inversament proporcional a la seva mida. Els fragments es revelaran amb bromur d'etidi o una altra substància reveladora de DNA.

La mida dels diferents fragments es tradueix en un separació determinada entre dos llocs. Aquest perfil també variarà si existeixen delecions o insercions en el DNA. Cada banda obtinguda en l'electroforesi correspondrà a la suma de tots els fragments generats de la mida corresponent a aquella mobilitat electroforètica.

La mutació o la recombinació en un d'aquests llocs fa que l'enzim de restricció no reconegui la seqüència i variï el perfil dels fragments obtingut i per tant s'obtindrà un patró de bandes diferent en la posterior separació per electroforesi en gel agarosa.

La comparació del perfil de restricció de diverses soques permet establir la identitat o la diferència entre elles. (Figura 10)

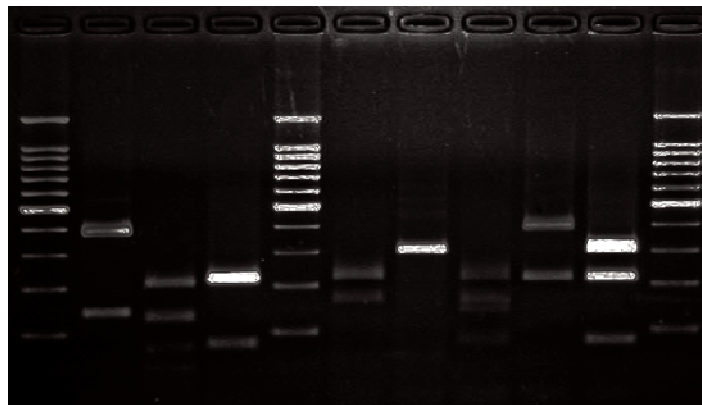


Figura 10. Gel electroforesi de RFLP gen *coa* en soques *S. aureus*. Korean J Lab Med 2008 Aug; 28(04) 286-29

2.1.3.2 Anàlisi dels fragments de restricció per hibridació després de transferència de Southern

L'obtenció de fragments de restricció de mida petita per l'acció d'enzims d'elevada freqüència de tall fa que la separació per electroforesi convencional sigui de difícil interpretació pel gran nombre de bandes que s'obté i per tant es fa complexa la comparació dels patrons de bandes. Per tal de simplificar aquesta tècnica s'han desenvolupat estratègies per la interpretació que consisteixen en revelar només d'algunes bandes. Així, per exemple, la transferència de fragments a una membrana de nitrocel·lulosa o de paper impregnat amb 2-amino-tioéter (*Southern Blot*) amb la posterior hibridació mitjançant una sonda marcada complementària a una determinada seqüència. El número de bandes estarà en relació al número de còpies de la seqüència específica i la localització en relació a la posició en el genoma, variant en funció dels llocs de restricció de cada soca. En la tècnica del

Ribotipat s'utilitza una sonda única per totes les bactèries, complementària a un fragment de rDNA del que existeixen diverses còpies en el genoma bacterià.(Figura 11).

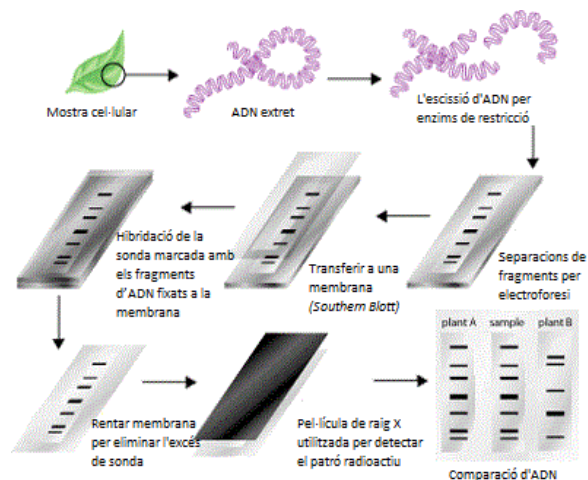


Figura 11 . Metodologia hibridació Southern Blot

2.1.3.3 Macrorestricció. Electroforesi en camp pulsant (PFGE)

Es basa en l'estudi del DNA total mitjançant la macrorestricció, és a dir, utilitzant enzims amb baixa freqüència de tall i posteriorment separant els fragments obtinguts per electroforesi. Donat que els fragments són d'una gran mida, l'electroforesi convencional no és suficient per separar-los. Així doncs, s'han d'utilitzar tècniques electroforètiques especials com la PFGE. Aquesta tècnica utilitza una càmera amb tres jocs de elèctrodes que formen un hexàgon al voltant del gel (84). Els canvis d'orientació periòdica dels camps elèctrics, permeten la separació i la determinació de la mida dels fragments de macrorestricció. També permet la detecció de duplicacions, insercions o cancel·lacions de seqüències. Finalment s'obté un patró que ens ajuda seguint els criteris de Tenover, 1995 a analitzar la correlació entre els aïllats i la seva relació clonal. (Figura 11)(74)

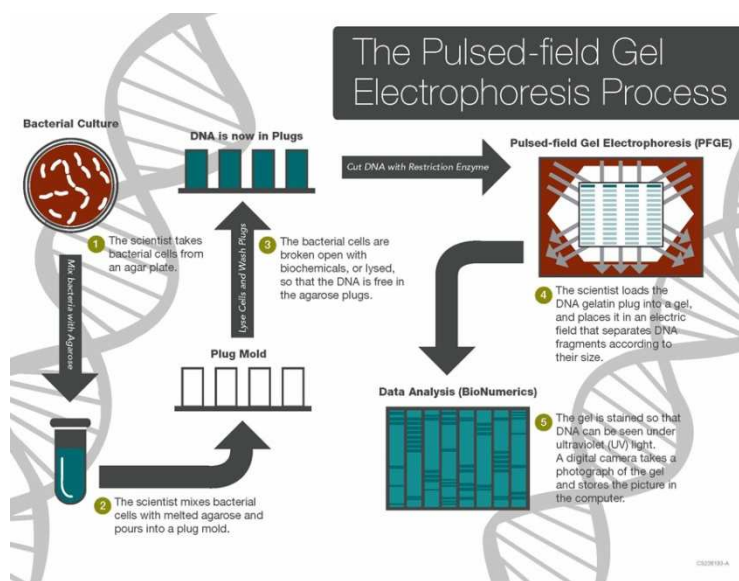


Figura 11. Procés PFGE (Centers for Disease Control and Prevention. CDC)

Tot això ha fet que la PFGE sigui una tècnica molt discriminativa i per tant, en l'actualitat una de les tècniques epidemiològiques de referència. El seu principal inconvenient és la complexitat tècnica i de manipulació, així com la necessitat de disposar de l'equip tècnic adequat.

2.1.4 Whole Genome Sequencing (WGS)

En els últims anys s'ha incorporat el WGS com una eina més per tipificar els microorganismes.

La tècnica, com el seu nom indica, consisteix en la seqüenciació complerta del genoma d'un microorganisme. Això suposa la determinació del DNA cromosòmic i del DNA mitocondrial. La seqüenciació del genoma complet permetrà establir una relació genètica entre microorganismes, establir el seu origen i fins i tot la susceptibilitat de l'hostatger a patir certes malalties.

Aquesta tècnica a diferència de la seqüenciació Sanger, permet l'obtenció de milers de fragments de DNA en un únic procés. Es basa en la fragmentació a l'atzar del DNA i la unió d'aquest a uns adaptadors específics que facilitaran el seu anclatge a una superfície sòlida, com són les microesferes o directament a la placa de seqüenciació. Un cop units als adaptadors els fragments de DNA són amplificats clonalment i agrupats en *clusters* per seqüenciar.

La seqüenciació i la detecció de les bases té lloc alhora en totes les molècules de DNA (seqüenciació massiva i paral·lela). Les lectures generades són curtes i es denominen *reads*. En general els nous seqüenciadors generen lectures a partir de cada un dels extrems del fragment de DNA, donant lloc a lectures emparellades mitjançant dues estratègies; *mate pairs*, que es creen a partir de fragments de DNA d'una mida coneguda (llibreries amb mides des de >600 pb a 4kb) o *paired end*, que es generen per la fragmentació en petits fragments de DNA (<300pb) i dels quals es seqüencia l'extrem final.

Un aspecte important de la WGS és el número de vegades que una base està present en les diferents *reads* de seqüenciació que s'han generat. Aquest valor es denomina *depth of coverage* (profunditat de cobertura) i ens dona una idea del grau de fiabilitat alhora d'assignar un nucleòtid a aquella posició del genoma.

La importància de la ràpida identificació i caracterització dels patògens és fonamental per al tractament adequat de les infeccions, per predir brots i per detectar la transmissió i el fracàs d'algun tractament.

La utilització de WGS també ens ajudarà a reduir el temps de tot aquests processos i d'aquesta manera millorar el pronòstic. Permet distingir soques que només difereixen en un sol nucleòtid i hi ha nombrosos estudis que han mostrat el seu poder discriminatiu en l'estudi de brots (85). A més ens permetrà conèixer nous patrons de resistència i l'adquisició de gens que codifiquin per factors de virulència.

Una de les limitacions seria que té la capacitat de detectar un gen, per exemple *luk-S* implicat en la producció de PVL, però això no ens demostra la expressió d'aquest i per tant la posterior excreció d'aquesta toxina (86).

Els avenços que ens aporta aquesta nova metodologia estan en relació a la reducció del cost econòmic global i en la velocitat d'obtenció dels resultats de la seqüenciació del genoma complet. Aquesta combinació de "low cost" i informació precoç farà que creui la frontera que separa la recerca del diagnòstic i passi a ser una eina molt útil pels laboratoris de microbiologia clínica.

Ens ajudarà a descriure i millorar la comprensió de l'evolució dels microorganismes, la detecció dels brots i el mecanisme de transmissió com ja mostren alguns estudis recents amb *S. aureus* (87).

2.2. Epidemiologia de les infeccions per *S. aureus* i evolució de la seva sensibilitat als antibiòtics

S. aureus colonitza habitualment la pell i mucoses de les persones i d'alguns animals. Principalment el trobem a les fosses nasals, on té el seu nínxol ecològic, aixelles, regió perianal, orofaringe, mucosa genital i tracte digestiu. Aproximadament el 30% dels adults sans són portadors permanents de *S. aureus* a la seva nasofaringe. Hi ha estudis que demostren que aquest estat és més freqüent en nens que en adults. S'ha descrit una incidència més elevada en pacients hospitalitzats, amb malalties de la pell o sotmesos a procediments mèdics i en personal sanitari.

Des de que *S. aureus* va ser identificat per primera vegada a l'any 1880 ha demostrat una eficaç capacitat d'adaptació a les condicions del medi, tant des del punt de vista de la seva patogenicitat com de l'evolució de la resistència als antimicrobians. En les dues últimes dècades s'ha observat un progressiu augment en la incidència de les infeccions per aquest microorganisme, a més d'un increment de la seva resistència als antibiòtics de primera línia utilitzats en el seu tractament (88).

A mitjans dels anys 40 es van descriure les primeres soques amb resistència a la penicil·lina (89) deguda a la capacitat de produir penicil·linasa, un enzim que inactiva les penicil·lines i les aminopenicil·lines i codificat per un gen que es troba localitzat en un plàsmid transmissible, el que va facilitar molt la seva disseminació. D'aquesta manera, la resistència a la penicil·lina va passar de ser un fenomen esporàdic o només observat a nivell hospitalari a representar el 75% dels aïllats, incloent ja els *S. aureus* comunitaris.

Aquest increment i disseminació de la resistència a la penicil·lina, afegit a l'associació de resistències a altres agents antimicrobians com la estreptomicina, tetraciclina, cloramfenicol i eritromicina va estimular el desenvolupament de les penicil·lines semi-sintètiques resistents a la acció de la penicil·linasa, com la meticil·lina.

Al 1961, el mateix any de la seva introducció com agent terapèutic, ja es van descriure les primeres soques de *S. aureus* resistents a la meticil·lina (SARM) al Regne Unit (90) que poc a poc es van anar distribuint pels hospitals a nivell mundial.

Una de les primeres soques de SARM descrites es va denominar “ genotip arcaic o ancestral” que pertanyia a la clona ST250 i es va disseminar pels hospitals de tota Europa. Per raons que no es coneixen va desaparèixer als anys 80 (91). La primera descripció d’una infecció per SARM a Espanya va ser a l’any 1981 (92) i actualment el percentatge de *S. aureus* SARM del total de soques de *S. aureus* aïllades al nostre medi és d’aproximadament el 25% .

A Europa, però trobem diferències molt importants, pel que fa a la resistència a la meticil·lina, entre alguns països. Als de la conca Mediterrània el percentatge de SARM pot arribar fins al 40% mentre que a d’altres del nord d’Europa la resistència és menor al 3% . A Estats Units, el SARM és el patogen intrahospitalari resistent als antibiòtics més freqüent i té una prevalença en algunes unitats de crítics de fins al 60%.

La disseminació de diferents clones de SARM en el medi hospitalari a partir dels anys 70 i 80, donant lloc a l’actual pandèmia i l’evolució de les resistències que aquestes soques han anat desenvolupant, ha limitat les possibilitats terapèutiques de les infeccions causades per SARM, amb el conseqüent augment del consum de glicopèptids. Sota aquesta pressió antibiòtica van aparèixer al Japó, les primeres soques amb sensibilitat disminuïda a la Vancomicina (VISA, vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (93) i les primeres soques amb resistència heterogènia a aquest fàrmac (94). Poc temps després es van descriure soques de les mateixes característiques a Estats Units, Europa o Espanya. Va ser al 2002 quan es van descriure soques de SARM amb resistència d’alt nivell a la vancomicina (95) i la seva codificació plasmídica, fet que va produir un nou canvi en el ventall terapèutic d’aquestes infeccions, provocant la introducció en la pràctica clínica de nous agents antimicrobians com el Linezolid o la Daptomicina. Tot i que, en els últims anys, també s’han descrit soques resistents a aquests fàrmacs (96).

A la dècada dels 90 les infeccions per SARM, que fins el moment només s’havien descrit en l’àmbit hospitalari, es comencen també a diagnosticar en malalts procedents de la comunitat i que no havien tingut cap relació amb el medi hospitalari, primer als EEUU i Austràlia i després a Europa. Inicialment, es van aïllar en pacients que residien a centres sociosanitaris o en pacients ADVP (addictes a drogues per via parenteral) (97-100).

A partir d’aquest moment, als 90 i principis dels 2000 aquestes soques es disseminen ràpidament, sobretot per EEUU on s’arriben a descriure increments de la incidència des del 25% al 67% en alguns hospitals, en un període de 5 anys, així com de la detecció de brots d’infeccions cutànies que afecten a persones prèviament sanes (101). També es descriuen les primeres pneumònies necrotitzants greus adquirides a la comunitat causades per aquestes soques. Actualment, les infeccions per *S. aureus* adquirit a la comunitat (CA-SARM) són molt prevalents a tot el món. Fins i tot, en determinats països, són causants d’infeccions a nivell intrahospitalari (102)..

A Espanya tot i que la prevalença de HA-SARM es troba al voltant del 25-30% (103) de les soques de *S. aureus* aïllades, la taxa d'infeccions causades per CA-SARM continua essent baixa, tal com nombrosos estudis ho descriuen en els últims anys (104-107).

Tot i que aquestes soques comunitàries es van originar de forma independent a tot el món, comparteixen alguns trets comuns: 1) Tipus de cassette *SCCmec* IV que conté el gen *mecA* que codifica per la resistència a la meticil·lina; 2) presència del gen que codifica la leucocidina de Pantone Valentine i 3) la susceptibilitat a la major part dels antibiòtics, amb excepció dels beta-lactàmics.

2.2.1 Epidemiologia i característiques moleculars de *S. aureus* resistent a meticil·lina d'origen comunitari

Tal i com s'ha comentat prèviament totes les soques de SARM presenten una illa genòmica denominada *Staphylococcal cassette chromosome* (SCC) a la qual es localitza el gen *mecA*, determinant de la resistència genètica a la cloxacil·lina i en conseqüència a tots els betalactàmics (108), addicionalment aquest element pot portar gens que confereixen resistència a d'altres grups de antibiòtics.

Els tipus IV i V són més petits que els I, II i III i per tant més fàcilment transferibles entre soques, però pel contrari, el fet de que la mida dels tipus I, II, i III sigui major fa que puguin portar associats altres gens de resistència i s'hagin relacionat més amb infeccions d'origen hospitalari.

Les característiques genotípiques i fenotípiques del CA-SARM són diferents de les dels HA-SARM o relacionats amb l'assistència sanitària. L'explicació més probable és l'adquisició per transferència horitzontal del gen *mecA* (probablement a partir d'un estafilococ coagulasa negativa) i dels *SCCmec* tipus IV i V en un entorn de *S. aureus* sensibles a la meticil·lina (109). Aquests dos tipus de *SCCmec* són més petits (21-24 kb i 28 kb respectivament) cosa que els fa més fàcilment transferibles i s'associen a soques sensibles a múltiples antibiòtics, simplement per una qüestió d'espai i la impossibilitat de contenir altres gens que conferirien resistència a d'altres antibiòtics. L'altra probable explicació seria que les clones de CA-SARM podrien ser descendents de soques hospitalàries que haurien patit canvis, ja que tenen perfils electroforètics diferents i en general menys resistències antibiòtiques associades.

Als EEUU les clones més freqüents són la USA400 i la USA300, que pertanyen al ST1 i al ST8 respectivament (110). La denominada USA300, també denominada USA300-0114, ha desplaçat a la USA400 i s'ha convertit en la que causa la majoria d'infeccions, disseminant-se pels hospitals i fins i tot per Europa i Austràlia (111, 112).

A altres continents els ST més freqüents són el ST30 (Pacífic Sur), ST59 (Taiwan) i el ST80 (Europa). A Europa també s'han descrit els clons pertanyents als ST8 i al ST30 (111).

La clona Europea pertanyent al CC80 es va descriure per primera vegada a Dinamarca al 1997 com EDK-47, poc després ja es va descriure a d'altres països com Finlàndia, Grècia i França, posteriorment disseminant-se i convertint-se en la clona predominant. Les dades epidemiològiques suggereixen que aquesta clona es podria haver originat fora d'Europa com s'ha vist per exemple en països escandinaus on es troba relació amb la importació des de països del Est Mitjà i Àfrica (113, 114). Al mateix temps diversos treballs mostren l'existència de la clona Europea a aquest països (115).

Pel que fa a Espanya, el clon més freqüent és el ST8 i està relacionat amb el clon USA300. Amb menys freqüència també s'han detectat clons que pertanyen al ST80 i al ST5 (pediàtric) (107, 111).

A Espanya els CA-SARM descrits presenten el *SCCmec* tipus IV (variants IVc i IVa), aquest també s'ha descrit com el tipus de cassette més freqüent en les clones que causen infeccions a nivell hospitalari (ST-125-SARM-IV), per tant, només la identificació del tipus de cassette no serveix per saber si pertany a un CA-SARM, HA-SARM o relacionat amb l'assistència sanitària. No obstant, el patró de bandes en l'electroforesi en camp pulsant és diferent i també les diferents seqüències del MLST. Així doncs la clona més freqüent de CA-SARM és ST-8-SARM-IV i la clona més freqüent de HA-SARM i relacionat amb assistència sanitària és ST-125-SARM-IV (103).

Les soques de CA-SARM poden adquirir resistències a altres antimicrobians per adquisició de plàsmids i així doncs presentar resistència a eritromicina i clindamicina per adquisició de gens *erm* i *msrA*, o a les tetraciclins per adquisició del gen *tet* (102).

Aquestes soques CA-SARM a més es caracteritzen per la producció de la denominada PVL, causant la destrucció de leucòcits i la necrosi dels teixits associant-se a infeccions com furúncols i abscessos en la pell que poden arribar a ser molt greus (17, 116). A més de la PVL, s'han descrit les PSM i α -toxina que poden jugar un paper important com a determinants de virulència de la soca USA300 (26) (Figura 12).

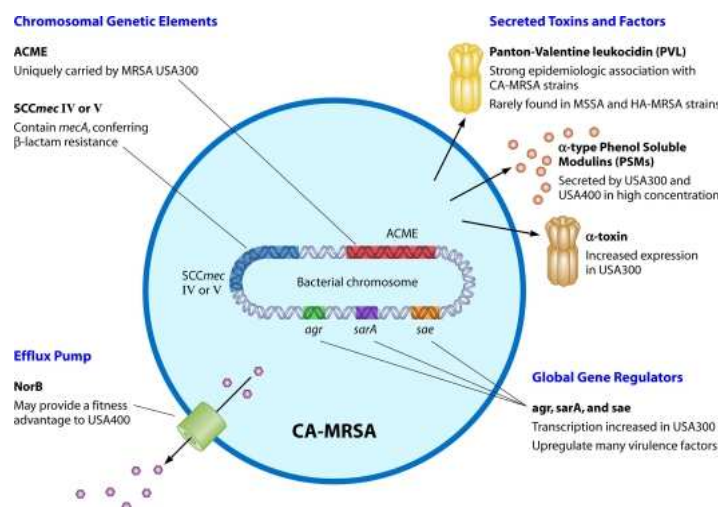


Figura 12 .Factors de virulència associats a CA-SARM. Clin Microbiol Rev. 2010

Un altre factor que es creu que pot estar implicat en la patogènia de les infeccions per CA-SARM és l'element genètic mòbil denominat ACME (*Arginine Catabolic Mobile Element*), que s'ha relacionat epidemiològicament amb la USA300. Aquest element és un fragment que es troba situat al gen *orfX*, adjacent al *SCCmec*, codifica una ruta de metabolisme de la arginina (arginina deaminasa) i l'operó *opp-3* (*operon oligopeptide permease*) i s'ha suggerit que podria estar relacionat amb la patogènesi de la soca USA300 i que podria contribuir al *fitness* de la bactèria (117). Existeix controvèrsia al voltant del paper d'aquest element en la patogènesi degut a que en un estudi publicat per Montgomery *et al.* en el que s'utilitza un model animal de pneumònia i infecció cutànies, no es troben diferències quant a la virulència de les soques portadores o no del ACME (118). Altres estudis descriuen com aquest element pot proporcionar una major supervivència a la bactèria quan es troba colonitzant (119).

En relació a la presència del ACME, es va descriure per primera vegada a Amèrica Llatina una variant de la USA300 que no conté aquesta regió (USA300, ST-8-MRSA-IVc) (120), i es va veure en pacients pediàtrics que presentaven infeccions de pells i parts toves (IPPT) i infeccions del lloc quirúrgic. Això va posar de manifest l'emergència d'un clon CA-SARM (CC8-MRSAIVa; PVL positiu i ACME negatiu, tipus *spa* t1635) que si bé té algunes característiques moleculars similars a USA300, no està genèticament relacionat amb aquest clon i es va denominar USA-300 *like* (121). Diversos estudis de caracterització molecular de soques aïllades en IPPT a Espanya mostren una predominança de la soca USA-300 *like*, i per tant ACME negatiu, tant en casos importats com en autòctons (111, 122). Així doncs, cal que diferenciem dues clones de CA-SARM, la USA-300 i la USA-300 *like*, la primera ACME positiva i amb el subtipus *SCCmec* IVa i la més freqüent a Espanya que és ACME negativa i amb el subtipus *SCCmec* IVc.

3. Manifestacions clíniques

Staphylococcus aureus és un dels microorganismes més versàtils, amb la capacitat de causar diferents tipus d'infeccions, des d'infeccions lleus i localitzades fins a infeccions disseminades que poden presentar un curs greu i inclús fatal.

S. aureus pot causar malaltia mitjançant la producció de toxines o a través d'invasió directa i destrucció del teixit. Així doncs, *S. aureus* causa algunes de les malalties exclusivament per l'efecte de la toxina mentre que d'altres són conseqüència de la proliferació del microorganisme, que donarà lloc a la de formació de abscessos i destrucció tissular. Aquest és el cas de les infeccions cutànies, osteoarticulars, endocarditis, pneumònia o empiema.

3.1. Infeccions cutànies

Staphylococcus aureus és el principal agent causal de les infeccions de pell i parts toves (IPPT). Aquestes es classifiquen en funció de quina és la estructura anatòmica afectada. L'**impetigen** és una infecció superficial, que afecta a la epidermis i sobretot a nens petits fonamentalment a cara i extremitats. Habitualment existeixen lesions en les diferents fases de màcula, pústula i crostra. La **fol·liculitis** és una infecció del fol·licle pilós i de les àrees contigües, amb una acumulació de pus per sota la epidermis, afectant-se les zones velloses del cos. L'extensió de la infecció al teixit perifol·licular dona lloc al **furóncol**. Aquest és un nòdul elevat gran que pot presentar acúmulo de material necròtic i que pot drenar espontàniament o després d'una incisió quirúrgica.

L'extensió d'aquest furóncol amb la conseqüent afectació del teixit cel·lular subcutani ens dona lloc a l'anomenat **carboncle**. Aquesta lesió pot donar origen a una bacterièmia i els malalts poden presentar febre i calfreds amb afectació de l'estat general.

L'extensió superficial o profunda de la infecció pot provocar **erisipela, cel·lulitis i fascitis**.

L'**erisipela** es caracteritza per la presència d'una placa eritematosa elevada amb les vores ben definides.

La **cel·lulitis** és una infecció difusa amb afectació de la dermis i del teixit cel·lular subcutani, a diferència de l'erisipela no trobem les vores ben definides, la progressió sol ser lenta i existeix una elevada tendència a la supuració i en ocasions a la formació d'abscessos.

La **fascitis** inclou una sèrie d'infeccions que afecten a la fàscia i al teixit cel·lular subcutani, la seva característica principal és la ràpida progressió i la necrosi extensa de la pell, teixit cel·lular subcutani, en ocasions arribant a afectar al múscul. Clínicament, les lesions inicials no es diferencien molt d'una cel·lulitis. La presència d'un dolor desproporcionat en relació a l'afectació observada o a l'extensió dels teixits afectes, fa pensar en aquesta entitat clínica.

Per altre banda *S. aureus* és la principal causa d'infeccions de ferida quirúrgica ja que forma part de la flora transitòria de la pell. En situacions en què les mesures de prevenció i control de la infecció no són adequades, pot tenir una elevada prevalença en els hospitals.

Tradicionalment *S. aureus* s'ha descrit com un dels principals causants IPPT, però des de la seva aparició a finals dels anys noranta la seva importància ha augmentat degut a la expansió mundial de les soques CA-SARM (123). Aquestes causen fonamentalment infeccions de pell i parts toves i normalment afecten a comunitats tancades com atletes, homes que tenen sexe amb homes, personal militar i població indigent (123). Avui en dia les infeccions causades per CA-SARM són endèmiques a molts països i sent responsables de la majoria de les infeccions per *S. aureus* adquirides en la comunitat als EEUA, Austràlia, Orient Mitjà i alguns països d'Europa (122, 124-126).

3.2. Infecció respiratòria

La infecció de les vies respiratòries altes per *S. aureus* ha anat en augment en els últims anys, i existeixen hipòtesis que expliquen aquest augment pel desplaçament d'alguns microorganismes comensals amb la introducció de la vacuna pneumocòccica (127). Aquestes infeccions habitualment benignes poden donar lloc a complicacions locals provocant otitis, mastoïditis, sinusitis o fins i tot altres patologies més greus com poden ser abscessos retrofaringis o epiglottitis que poden comprometre el flux aeri.

Pel que fa a les vies respiratòries inferiors sol produir malaltia per dos mecanismes, bé per aspiració de secrecions procedents de la nasofaringe o per disseminació hematògena des d'un altre focus.

La pneumònia per aspiració la solem trobar en malalts molt joves, ancians i malalts afectes de fibrosi quística, bronquièctasies, malaltia pulmonar obstructiva crònica, neoplàsies amb pneumonitis obstructiva o després d'infeccions respiratòries pel virus de la grip. En ocasions es pot aïllar en mostres procedents del tracte respiratori inferior resultant difícil interpretar quin és el seu significat clínic. És causa d'un percentatge molt important de les pneumònies en el pacient ventilat, i també es diagnostica com a una complicació en pacients amb infecció pel virus de la grip.

En els últims anys s'ha descrit com l'agent causal d'una pneumònia necrotitzant d'origen comunitari amb hemoptisis massiva, shock sèptic i elevada mortalitat, relacionant-se amb soques de CA-SARM portadores del *SCCmec* tipus IV i productores de la PVL. Aquesta entitat clínica afecta principalment a adults joves i nens sans, típicament precedida d'un quadre gripal, amb un pronòstic molt desfavorable i una elevada mortalitat (116, 128).

La pneumònia per disseminació hematògena és freqüent en pacients amb bacterièmia o endocarditis.

3.3. Infeccions osteoarticulars

Diversos estudis en les últimes dècades situen a *S. aureus* com el responsable del 40-50% dels casos de artritis sèptica, i entre un 6-22% es corresponen a SARM (129-132). Aquests percentatges augmenten en malalts amb artritis reumatoide (AR), diabetis mellitus (DM), sotmesos a hemodiàlisi, ADVP i aquells que pateixen malalties cutànies, situacions en les que també existeix un major risc de colonització per *S. aureus* i de bacterièmia.

3.3.1 Artritis sèptiques

La incidència d'artritis sèptica en articulacions sanes és infreqüent en els països desenvolupats. En adults, malalties com la AR o altres artropaties, factors com l'edat avançada, la diabetis mellitus, una intervenció quirúrgica recent o una infecció cutània s'han descrit com factors predisponents per desenvolupar-la.

En les artritis sèptiques la via més freqüent per la qual el microorganisme arriba a l'articulació és l'hematògena, encara que no sempre trobem bacterièmia acompanyant.

A més, la infecció també pot tenir el seu origen en una inoculació directa a través d'un traumatisme, intervenció quirúrgica o bé una punció sobre la articulació.

S. aureus és el segon microorganisme causal d'artritis sèptica en malalts sotmesos a procediments diagnòstics com podria ser una artroscòpia, després dels estafilococs coagulasa negatius. Els models experimentals demostren que poques hores després de la inoculació del microorganisme a la cavitat articular, apareixen les cèl·lules inflamatòries que alliberen citosines i proteases que provoquen dany al cartílag articular i la pèrdua irreversible del teixit ossi (133).

L'artritis estafilocòccia característicament és monoarticular, i en només un 10% dels casos la trobem causant infecció en diferents articulacions, en aquests casos majoritàriament en el context d'una bacterièmia. L'articulació que es veu més freqüentment implicada és el genoll. Es caracteritza per dolor i signes inflamatoris locals, acompanyats de febre en el 30% dels casos. El diagnòstic definitiu el dona d'artrocentesis que mostra un líquid purulent amb una bioquímica amb un augment de la cel·lularitat a expenses dels leucòcits polimorfonuclears (134).

3.3.2 Osteomielitis sèptica

L'osteomielitis (OM) es defineix com la infecció de l'ós que dona lloc a la destrucció inflamatòria, la necrosi òssia i la posterior formació d'ós nou. S'han descrit tres tipus de OM en funció del seu mecanisme patogènic; OM per disseminació hematògena, OM per contigüitat (des de l'articulació o teixit tou adjacent, traumatisme o directament per la inoculació mitjançant un procediment quirúrgic) i OM per insuficiència vascular, característica en malalts amb diabetis o vasculopatia perifèrica i que afecta fonamentalment als peus) (135). En les OM per disseminació hematògena que afecten a nens, la infecció cutània per *S. aureus* és l'origen més comú. Afecta normalment a les metàfisis dels ossos llargs, donat que el creixement ossi és una zona molt vascularitzada. Aquesta infecció es caracteritza per la presència de dolor a la zona afectada i febre elevada i els hemocultius són positius en un 50% dels casos (136). En adults, l'afectació sol ser vertebral i en poques ocasions es troba en infeccions d'ossos llargs. Estudis recents descriuen l'increment d'aquestes infeccions en els últims anys, on fins i tot s'ha observat *S. aureus* com l'agent causal del 55% de les OM vertebrales (137, 138). Estudis animals han demostrat que un ós prèviament sa és més resistent a la infecció, i doncs caldrà un traumatisme directe o un elevat inòcul per què aquesta infecció es produeixi (133).

Tot i això, *S. aureus* està preparat per superar aquesta resistència natural de l'ós a la infecció, l'elevat nombre de factors de virulència que posseeix li confereix la capacitat d'adherir-se a proteïnes com la fibronectina o la elastina, evadint la resposta immune i a degradar la matriu òssia. Per d'altra banda presenta una elevada capacitat de formar biofilm, on podrà persistir més protegit de la resposta immune i de l'acció dels antimicrobians.

En alguns casos *S. aureus* és capaç d'inviar els osteoblasts i formar les denominades **Small Colony Variant (SCV)**, subpoblacions de la bactèria que es caracteritzen per un baix metabolisme, una reduïda síntesis de paret cel·lular a causa de un defecte en el transport de electrons (139), resistència a aminoglicòsids i a aquells antibiòtics d'acció a la paret cel·lular. Aquestes SCV tenen capacitat de persistir intracel·lularment i per tant de ocasionar infeccions cròniques i recurrents (140). Aquestes SCV tenen característiques metabòliques diferents, però també trets fenotípics diferents; com un menor creixement, menys pigment, i menys producció de coagulasa, tret que dificulta la seva identificació al laboratori. El seu lent creixement i la seva capacitat de persistència intracel·lular fa que l'eradicació amb el tractament antibiòtic estàndard sigui difícil, d'aquí que es recomani l'ús d'antibiòtics com la rifampicina o les quinolones amb capacitat de penetració intracel·lular i es posi molt d'èmfasi en un bon desbridament quirúrgic en el tractament d'aquest tipus d'infeccions (141).

3.3.3 Infeccions protèsiques

L'augment del nombre de recanvis protèsics es creu que ve donat pel desenvolupament tecnològic de la cirurgia, l'envelliment progressiu de la població i la prolongació de la vida dels malalts amb comorbiditats. Per d'altre banda, tots aquests factors relacionats, junt amb altres com l'obesitat, l'AR, la immunosupressió, la duració de la cirurgia i la implantació d'un material estrany fan augmentar el risc d'infecció, principal complicació d'aquests procediments (142).

La característica principal d'aquestes infeccions és la presència d'un material estrany protèsic. *S. aureus* és capaç adherir-se al material protèsic mitjançant una sèrie d' adhesines que pertanyen al grup de les proteïnes MSCRAMM, descrites en capítols anteriors. Un cop adherit, el microorganisme pot iniciar la formació del denominat biofilm en el que les bactèries estan aglutinades per un polisacàrid bacterià denominat *slime*, d'aquesta manera el microorganisme queda protegit de l'activitat immune de l'hostatger i de l'acció dels antibiòtics (figura 13). La tolerància antibiòtica de caràcter fenotípic amb un increment de la concentració bactericida mínima, explicaria l'elevada taxa de fracassos del tractament conservador, especialment en les infeccions cròniques (143). A més a més, els microorganismes que formen part del biofilm queden en una fase estacionària de creixement en un medi amb escassa oxigenació, elevada quantitat de detritus i un pH baix, cosa que encara els fa més resistents enfront dels antimicrobians.

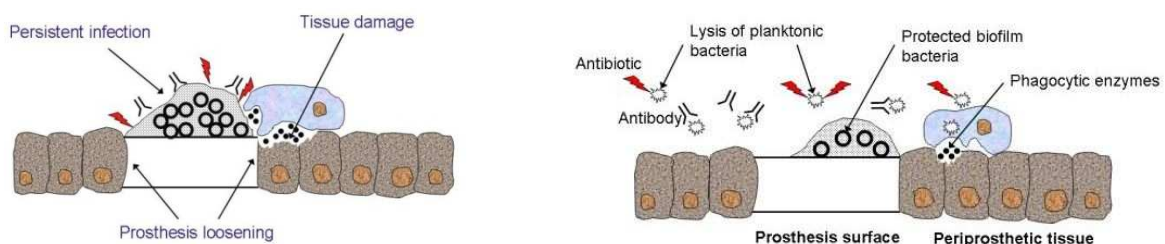


Figura 13. Formació biofilm.

La presència d'un cos estrany facilita la infecció de tal manera que s'ha vist que aquesta s'estableix amb una menor quantitat d'inòcul bacterià. Un implant protèsic és avascular i la interfase ós-pròtesi està relativament poc vascularitzada. Ambdós factors dificulten encara més el tractament mèdic d'aquestes infeccions, pel que habitualment cal retirar el material infectat per obtenir una curació definitiva.

En funció del temps transcorregut des del procediment fins a l'aparició de la clínica es pot classificar la infecció en Infecció post-quirúrgica precoç (IPP): aquella que es dona dins dels primers 30 dies i que es presenta amb un predomini de símptomes locals com cel·lulitis i exsudat de la ferida quirúrgica i que es pot acompanyar de febre i afectació sistèmica. La principal dificultat diagnòstica radica en diferenciar aquesta entitat d'una infecció de la ferida quirúrgica. Si la infecció es produeix a partir del segon mes de la cirurgia, es denomina Infecció post-quirúrgica tardana (IPT). Aquesta està caracteritzada per símptomes de predomini ortopèdic i habitualment amb afluirament protèsic. La seva clínica és larvada, principalment amb un dolor de tipus inflamatori o mecànic. En alguns casos, la manifestació clínica de la infecció és l'aparició d'una fístula cutània.

Per una altra banda, la infecció hematògena aguda, de presentació precoç o tardana és una complicació d'una bacterièmia per *S. aureus* que solem trobar en les primeres setmanes del post operatori on existeix més risc d'implantació del microorganisme que està causant la bacterièmia. El seu diagnòstic es basa fonamentalment en la sospita clínica ja que en la IPP els paràmetres bioquímics i radiogràfics estan alterats per la pròpia intervenció i en la IPT cal plantejar el diagnòstic diferencial amb l'afluirament asèptic. Així doncs, l'obtenció d'una bona mostra per a l'estudi microbiològic en qualsevol de les premisses clíniques és fonamental pel diagnòstic (144).

3.4. Bacterièmia

S. aureus és globalment la segona causa de bacterièmia a nivell global i la primera causa de bacterièmia d'origen nosocomial. El increment de la seva prevalença s'ha produït de forma simultània a l'augment de les proves invasives diagnòstiques i terapèutiques. Al món industrialitzat la incidència de bacterièmia per *S. aureus* (**SAB**) es calcula que està entre el 10-30 per cada 100.000 habitants/any (145) amb unes taxes de mortalitat entre el 15-25% (146). L'origen més freqüent de les bacterièmies per *S. aureus* en el nostre medi és el nosocomial, habitualment en relació als catèters vasculars i relacionades amb l'assistència sanitària, en malalts portadors de catèters venosos permanents sotmesos a hemodiàlisi, quimioteràpia o malalts institucionalitzats. Això es deu a l'elevada capacitat d'aquest microorganisme d'infectar catèters i dispositius protèsics vasculars, gràcies a la seva capacitat d'adherir-se mitjançant les proteïnes MSCRAMM i de persistir mitjançant la producció del biofilm. Al voltant del 40-50% de les SAB no tenen una porta d'entrada, és el que denominem bacterièmia sense focus, aquest percentatge és menys quan l'origen de la bacterièmia és nosocomial.

Aproximadament un terç d'aquests malalts desenvoluparan complicacions locals o metàstasis sèptiques a distància, algunes d'elles molt greus i potencialment mortals com d'endocarditis i d'altres més freqüents com són a ossos i articulacions (sobretot quan hi ha material protèsic), a l'espai epidural, discos intervertebrals i a vísceres, amb la formació de abscessos sobretot a nivell esplènic i renal.

S'han descrit diversos factors que s'associen a un major risc de complicacions com son l'edat avançada (>65 anys), la presència de malalties de base, valvulopaties prèvies, pròtesis o marcapassos, l'adquisició comunitària, el retard en iniciar un tractament antibiòtic efectiu, associant-se aquest últim també a una major mortalitat (147, 148).

Un dels principals factors predictius del desenvolupament de complicacions és el que denominem bacterièmia persistent (hemocultius positius a les 72 hores de l'inici del tractament antibiòtic eficaç). En aquesta línia Fowler (149, 150), va dissenyar un sistema de càlcul del risc de complicacions basat en la presència de bacterièmia persistent, l'origen comunitari, la presència de lesions cutànies com indicació de afectació sistèmica i la persistència de la febre més de 72 hores. La probabilitat augmentava quan coincidien més d'un d'aquests factors.

A l'elevada incidència de la infecció s'afegeix la importància de la resistència antibiòtica a meticil·lina en algunes de les soques de *S. aureus*, sobretot en aquelles infeccions d'origen nosocomial. Aquesta resistència provoca una demora en el inici del tractament antibiòtic adequat i com a conseqüència un pitjor pronòstic, sent la raó principal d'una major mortalitat intrahospitalaria relacionada amb la infecció (151).

En alguns treballs retrospectius en pacients amb bacterièmies per SARM, s'ha posat de manifest la importància d'un tractament antibiòtic empíric adequat. La mortalitat observada en pacients que no rebien un tractament adequat era del 49,1% (168/342), en comparació al 33,3% en aquells que sí el rebien (56/168) (9, 38, 59, 98, 152-158).

Dades similars es van trobar en un estudi que va analitzar 209 pacients ingressats a UCI amb bacterièmia per SARM, procedents de 59 hospitals espanyols. La mortalitat global va ser del 23%. Tenint en compte la gravetat de les malalties de base, l'estada a UCI, la presència de xoc sèptic i el lloc de la infecció, el tractament empíric inadequat es va associar a un augment de la probabilitat de morir (OR = 3,0; IC del 95%: 1,01-9,0; p=0,04). Només el 21,1% dels pacients van rebre tractament empíric adequat. Les variables associades de forma independent amb la teràpia adequada eren: cirurgia recent, catèter venós central i certs focus d'infecció (bacterièmia primària, infeccions intraabdominals i infeccions del tracte respiratori). També es va observar que els pacients amb càncer tenien un major risc de rebre una teràpia inadequada (159).

Per d'altra banda, hi ha un altre factor que pot contribuir a la major mortalitat de les bacterièmies per SARM i és el fet que la Vancomicina té menys activitat antiestafilocòccica que els betalactàmics i

alguns estudis mostren com en bacterièmies per SARM amb concentració mínima inhibidora (CMI) a la Vancomicina > 1mg/ml, la teràpia amb aquest antibiòtic s'associa a major mortalitat (160, 161). Pràcticament qualsevol estructura anatòmica pot veure's afectada secundàriament després d'una SAB.

3.4.1 Endocarditis infecciosa

L'endocarditis infecciosa (EI) és una complicació freqüent, sobretot de la bacterièmia adquirida a la comunitat. Altres factors que també s'associen amb el desenvolupament de EI són: presència d'alteracions cardíques adquirides, història d'EI prèvia i bacterièmia persistent. La seva incidència oscil·la entre les diferents sèries, des d'una incidència al voltant del 30% en estudis internacionals (149) fins a un 25% d'EI per *S. aureus* en el nostre medi (162), amb una mortalitat intrahospitalària entre el 22% i el 40%.

Les manifestacions clíniques dependran de la localització de la infecció; vàlvules dretes en ADVP o associades a cables de marcapàs o a vàlvules esquerres, tenint en compte també si es tracta de una EI sobre vàlvula nativa o sobre un dispositiu intracardíac. D'aquesta manera el pronòstic també serà diferent en funció de si la vàlvula és nativa o protèsica, si és el costat dret o l'esquerra l'afectat o quina és la sensibilitat antibiòtica de la soca causant de la infecció. L'endocarditis esquerra és una malaltia molt greu que pot complicar-se amb embòlies sèptiques, abscessos hematògens cerebrals o viscerals, destrucció valvular, abscessos miocàrdic o pericarditis purulenta. L'endocarditis sobre vàlvula tricúspide té millor pronòstic i encara que en els últims anys, s'està diagnosticant amb menys freqüència, s'ha de sospitar davant d'un malalt ADVP. La infecció per *S. aureus* d'un vas prèviament danyat pot produir aneurismes micòtics i pseudoaneurismes. Aquestes infeccions s'associen a bacterièmia amb un elevat inòcul i amb un elevat risc de ruptura, que pot ser mortal.

La cèl·lula endotelial té un paper molt important en la infecció sistèmica per aquest microorganisme, degut a la seva gran avidesa a unir-se a través de interaccions entre adhesina i receptors, permetent la posterior fagocitosis per part de la cèl·lula endotelial. Dins de la cèl·lula, *S. aureus* és capaç de formar les SCV permetent la supervivència bacteriana i la infecció persistent i recurrent (163). Les soques productores d'endocarditis tenen la capacitat mitjançant la acció de les MSCRAMM d'unir-se al trombo adherit a la vàlvula cardíaca. A més la cèl·lula endotelial promou l'expressió del factor tissular que facilita la formació de berrugues, el que explicaria la capacitat de produir endocarditis de *S. aureus*, fins i tot si no hi ha dany valvular previ. Després de la fagocitosis, les cèl·lules endotelials expressen en la seva superfície receptors Fc i molècules de adhesió, alliberen interleucines com la IL1, IL6 i IL8 que faciliten la arribada de leucòcits al lloc de la infecció. També els macròfags tissulars i els monòcits plasmàtics alliberen interleucines i el factor de necrosi tumoral α i promouen l'activació dels macròfags produint l'alliberació de Interferó-gamma pels limfòcits T. Aquestes citocines contribuiran a les manifestacions clíniques de la sepsis per *S. aureus* (164) (Figura 14).

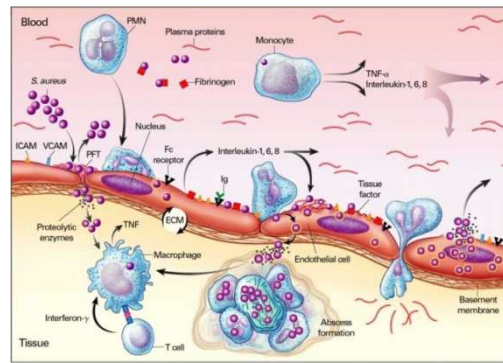


Figura 14. *Staphylococcus aureus* infections. Lowy.1998

3.5. Malalties mediades per toxines

3.5.1 Síndrome de la pell escaldada

Afecta principalment a nadons i nens, encara que també s'ha vist afectant a adults amb algunes malalties de base. Aquest síndrome es relaciona amb la producció de toxines exfoliatives (ETA, ETB). Aquestes es disseminen pel torrent sanguini des del focus d'infecció, són capaces de trencar els desmosomes cutanis i causar la separació de l'epidermis, fent que la pell es descami i causant una afectació generalitzada. Una petita pressió a la pell la desprèn (signe de Nikolsky positiu), amb la posterior formació d'ampolles i vesícules cutànies que segueixen descamant la pell, amb la característica que el cultiu d'aquestes ampolles resultaria negatiu. Tot i afectar a nadons i nens, la mortalitat és baixa; quan es produeix, és deguda a la sobreinfecció d'aquestes lesions cutànies. Quan aquesta infecció es localitza s'anomena **impetigen ampul·lós**. A diferència de la manifestació disseminada, en aquest cas, el cultiu de les ampolles seria positiu i el signe de Nikolsky negatiu.

3.5.2 Infecció alimentària estafilocòccica

Malaltia causada per una enterotoxina estafilocòccica preformada present en els aliments com a causa d'una contaminació fonamentalment d'origen humà. Aproximadament la meitat d'aquestes infeccions es deuen a contaminacions a partir de portadors nasofaríngeus sans del microorganisme. Els aliments contaminats no presenten un aspecte ni un gust desagradable i, tot i escalfar-los, el microorganisme mor però les toxines són capaces de sobreviure. La clínica és de presentació brusca, amb un període d'incubació d'unes 4 hores i es caracteritza per vòmits, diarrea aquosa, dolor abdominal i nàusees. L'evolució sol ser ràpida, autolimitant-se en 24 hores i el tractament fonamentalment és simptomàtic, sense indicació de tractament antibiòtic, ja que la malaltia està causada per una toxina preformada.

Hi ha certes soques que són capaces de produir enterocolitis, sent la majoria d'aquestes productores de enterotoxina A. Aquestes soques causen infecció principalment en malalts que han rebut tractament antibiòtic d'ampli espectre, que elimina la flora intestinal normal i permet la selecció i proliferació d'aquest microorganisme.

3.5.3 Síndrome del shock tòxic (STT)

Malaltia provocada per la producció de la toxina TSST-1 per algunes soques de *S. aureus*. Es tracta d'una infecció sistèmica que es caracteritza per febre, hipotensió arterial, rash eritematós difús amb descamació cutània incloent palmes i plantes i compromís de diversos òrgans. Aquesta síndrome es produirà en cas de que s'alliberin grans quantitats d'aquesta toxina i es dissemini a través del torrent circulatori. S'ha relacionat amb l'ús de tampons (4), afavorint el creixement localitzat del microorganisme productor de la toxina a la vagina i la seva capacitat de travessar les membranes mucoses, i també amb la sobreinfecció de ferides. La mortalitat del STT és aproximadament del 5% i és més freqüent en aquelles infeccions no relacionades amb l'ús de tampons.

4. Tractament antibiòtic de les infeccions per *S. aureus*

4.1. Generalitats i principals grups d'antibiòtics amb activitat sobre *S. aureus*

Tot i els avenços en el diagnòstic i la terapèutica dels últims anys, les infeccions invasives per *S. aureus* tenen una elevada morbimortalitat. La disseminació de soques resistents als antibiòtics més freqüentment utilitzats tant a nivell hospitalari com comunitari ha dificultat encara més l'elecció d'un tractament empíric adequat i ha contribuït en aquest percentatge de mortalitat atribuïble, moltes vegades a la demora en la prescripció de tractaments efectius en aquestes infeccions (147, 148).

En línees generals, davant d'una infecció causada per *S. aureus* és molt important el drenatge de col·leccions i l'extracció de qualsevol material protèsic que en sigui el focus o es tingui l'evidència que està infectat, siguin pròtesis cardíaques o articulars, catèters o altres dispositius intravasculars i com a mesura afegida al tractament antibiòtic.

El tractament de les infeccions sistèmiques per aquest microorganisme hauria de fer-se amb antibiòtics actius, per via parenteral, a dosis elevades i per un període de temps llarg, donada la possibilitat de recurrència de la infecció (165).

Els avenços en el coneixement de la patogènia de les infeccions estafilocòcciques, així com en els diferents mecanismes que utilitza per produir malaltia ja sigui per toxines o superantígens, mitjançant invasió dels teixits provocant necrosis tissular, o bé per la seva capacitat de provocar una bacterièmia amb disseminació hematògena i metàstasis a distància, de formar biofilm i originar una

bacterièmia persistent i fins i tot de mantenir-se de manera intracel·lular reactivant-se temps després. fa que junt amb l'experiència en l'ús de antibiòtics com el Linezolid, la Daptomicina o associacions de Rifampicina i Fosfomicina amb d'altres antibiòtics, es fa que potser no sempre qüestionari, en alguns casos, l'ús de la Cloxacil·lina com la millor opció terapèutica emprada empíricament i en monoteràpia. Tot i això, la cloxacil·lina continua sent, per la seva ràpida acció bactericida i el seu baix cost el millor tractament antibiòtic per la bacterièmia per *S. aureus*

A l'hora d'escollir un antibiòtic efectiu enfront *S. aureus* s'han de tenir en compte diversos aspectes com;

1. L'activitat intrínseca (concentració mínima inhibidora; CMI) d'aquell antibiòtic i la seva capacitat bactericida; sent l'element fonamental per a millorar el pronòstic de les infeccions greus.

Cal tenir en compte també la activitat de l'antibiòtic en diferents condicions ambientals; a nivell intracel·lular o en el si del biofilm o la capacitat d'augmentar o disminuir l'expressió de certes de toxines o factors de virulència (PMID24620024)

La suposada superioritat dels agents bactericides enfront els bacteriostàtics no sempre és tan evident en la majoria d'infeccions per bacteries grampositives. Agents bacteriostàtics com Clindamicina i Linezolid han demostrat en el tractament d'endocarditis, meningitis i infeccions osteoarticulares. Així doncs, cal considerar també dades farmacocinètiques i farmacodinàmiques per predir l'eficàcia in vivo dels tractaments antibiòtics (166).

2. Aspectes farmacocinètics i farmacodinàmics; dosis, formes de administració, efectes secundaris, concentració màxima, àrea sota la corba, temps per sobre la CMI .
3. Experiència clínica reflectida en estudis que mostren l'eficàcia dels antibiòtics en diferents tipus d'infecció i la possibilitat d'associacions antibiòtiques.

Els antibiòtics poden exercir el seu efecte de dues maneres: bacteriostàtica (inhibint temporalment el creixement bacterià) o bactericida (destruint la viabilitat cel·lular) i ho fa mitjançant tres processos (figura 15):

1. Actuant sobre la paret cel·lular inhibint la seva síntesi, com els beta-lactàmics i glicopèptids o produint un flux de ions potassi a l'interior de la bactèria que causa la mort cel·lular, com la daptomicina.

Inhibint la síntesi proteica, actuant sobre les subunitats ribosomals 30S i 50S, com passa amb el grup dels aminoglucòsids, tetraciclins, macròlids, lincosaminas, cloranfenicol, àcid fusídic , mupirocina i linezolid.

2. Bloquejant la síntesi dels àcids nucleics, com les sulfonamidas i el trimetoprim que actua inhibint el metabolisme de l'àcid fòlic, les quinolones que interfereixen en la síntesi del DNA per inhibició de la DNA-girasa o la rifampicina que afecta a la transcripció inhibint la RNA-polimerasa dependent del DNA.

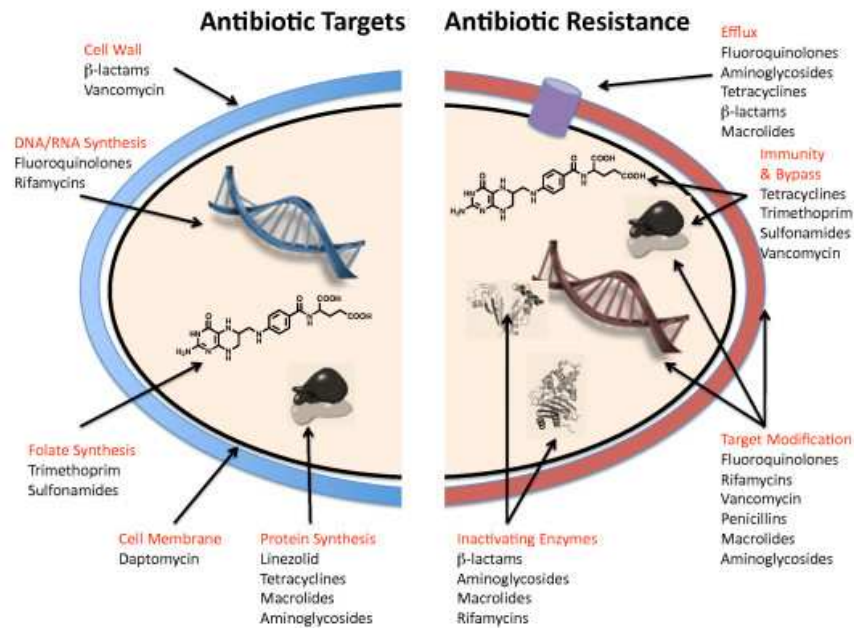


Figura 15. Wright BMC Biology 2010 8:123

A més de totes aquestes consideracions, el inici precoç d'un tractament antibiòtic eficaç és un factor pronòstic molt important en totes les infeccions greus per *S. aureus*, així com l'elecció d'un antibiòtic o una combinació d'antibiòtics que garanteixi una concentració òptima en el lloc d'infecció, des de la primera dosi d'administració. Per aquestes raons, és imprescindible la transmissió ràpida de la informació, per part del laboratori de microbiologia, a l'hora d'optimitzar l'eficàcia del tractament antibiòtic.

La diversitat de les infeccions produïdes per *S. aureus* fa que el tractament antibiòtic es faci en funció de diferents paràmetres, un dels més importants és la localització d'aquesta infecció.

4.2. Tractament antibiòtic recomanat en les infeccions estafilocòcciques

Així, les pautes de tractament recomanades per les infeccions estafilocòcciques són les següents:

4.2.1 Infeccions de pell i parts toves

Les infeccions cutànies lleus com l'impetigen o la fol·liculitis habitualment evolucionen bé amb un antibiòtic d'aplicació tòpica, com pot ser la mupirocina o l'àcid fusídric, sense diferències demostrades en la seva eficàcia.

Altres infeccions com la cel·lulitis o la fascitis necrotitzant requeriran de desbridament i drenatge, afegit a un tractament antibiòtic sistèmic durant 7 dies, en el cas de la cel·lulitis o fins que ja no es requereixi desbridament, com en el cas de la fascitis. Sempre que sigui possible, es farà tractament seqüencial a la via oral.

Els antibiòtics recomanats en aquest tipus d'infeccions causades per SASM són cloxacil·lina, amoxicil·lina-àcid clavulànic, clindamicina, trimetroprim-sulfametoxazol o cefalosporines de

1ª generació. Per les soques SARM es pot utilitzar trimetropim-sulfametoxazol, clindamicina, vancomicina o fins i tot linezolid en casos d'al·lèrgia o CMI's elevades a vancomicina .

Les infeccions greus de pell i teixit cel·lular subcutani requereixen habitualment d'un drenatge quirúrgic i administració d'antibiòtics sistèmics. S'ha de tenir en compte augmentar l'espèctre antibiòtic si existeix la possibilitat que es tracti d'una infecció polimicrobiana. La duració del tractament en aquets casos no sol ser inferior als 10-14 dies.

4.2.2 Infeccions respiratòries

En l'actualitat, les pneumònies per *S. aureus* d'origen comunitari són molt poc freqüents, la majoria es diagnostiquen en pacient ingressats i habitualment sotmesos a ventilació mecànica. El tractament d'aquest tipus d'infecció és la cloxacil·lina per via endovenosa durant dues setmanes. La presència de complicacions, com un abscess, pot fer que calgui allargar el tractament i la presència d'un empiema, que precisi de drenatge.

El tractament de les infeccions respiratòries de vies baixes per SARM és un tema que genera controvèrsia. Les opcions terapèutiques més estudiades son la vancomicina i el linezolid. Diferents assajos clínics han mostrat una disminució de l'inòcul bacterià i dels dies de ventilació mecànica en aquells malalts que rebien linezolid (167, 168), tot i que no s'ha pogut comprovar una menor mortalitat relacionada. Així, sembla raonable indicar el tractament amb Vancomicina en aquells malalts menys greus, sense risc de nefrotoxicitat i on la CMI a la vancomicina sigui inferior a 2. La duració de la antibioteràpia serà de 7 a 21 dies en funció de l'evolució.

Cal tenir en compte, que en les pneumònies causades per soques productores de PVL, es recomana l'ús del linezolid o de clindamicina en combinació amb rifampicina. L'elecció d'aquests antibiòtics enlloc de la Vancomicina es basa en la hipòtesi que suggereix la supressió de la producció d'aquesta toxina, deguda a la inhibició de la síntesi de proteïnes, per part de linezolid o la clindamicina, demostrat en models de pneumònia necrotitzant en porcs (169).

La daptomicina no és una opció terapèutica en la pneumònia per SARM, ja que és inactivada pel surfactant pulmonar (170).

4.2.3 Infeccions osteoarticulars

En les osteomielitis agudes hematògenes en adults que solen afectar al teixit vertebral, el tractament antibiòtic sol ser suficient per la seva curació, no ens caldrà drenatge quirúrgic a no ser que es demostrï la presència d'un abscess. El tractament inicial es farà amb cloxacil·lina o Vancomicina endovenosa durant quatre setmanes com a mínim. Tot i que es poden finalitzar les quatre setmanes amb un tractament oral associant una fluorquinolona o trimetropim-sulfametoxazol a rifampicina. En nens, la osteomielitis afecta més a ossos llargs i s'ha vist que és eficaç una setmana de tractament endovenós i posteriorment amb via oral fins a completar les quatre setmanes.

Pel que fa a l'artritis sèptica, tant en nens com en adults, es produeix habitualment per disseminació hematògena i requereix de desbridament quirúrgic o drenatge per punció de forma precoç. El tractament antibiòtic es realitza amb una pauta de dues setmanes de tractament antibiòtic endovenós fins a completar posteriorment les quatre setmanes per la via oral.

Staphylococcus aureus també pot causar infeccions de pròtesis articulars i a vegades osteomielitis cròniques, en ambdós casos la intervenció quirúrgica és fonamental per a la resolució de la infecció. El tractament antibiòtic es pot iniciar també via endovenosa i continuar via oral, durant un temps perllongat en la majoria dels casos. L'associació de fluorquinolones o trimetoprim-sulfametoxazol amb la rifampicina, s'utilitza pel tractament perllongat oral de les infeccions òssies cròniques o produïdes sobre material protèsic, donada la seva capacitat d'actuar a nivell intracel·lular i enfront de bacteries que formen biofilm.

En els casos d'infeccions per SARM, la daptomicina (171), el linezolid (172) i la combinació rifampicina amb una quinolona o àc fusídic (173) són una bona alternativa al tractament amb vancomicina, ja que s'ha vist en alguns estudis una major penetració òssia i una taxa de curació més elevada.

4.2.4 Bacterièmia

La bacterièmia per *S. aureus* és una entitat que inclou infeccions no complicades, generalment relacionades amb catèters endovenosos fàcils d'extreure o amb infeccions de pell i parts toves, fins a d'altres situacions més greus que poden estar relacionades amb la producció d'endocarditis o osteomielitis.

A l'era preantibiòtica la taxa de mortalitat de la bacterièmia per *S. aureus* era del 80%, encara que la introducció de la Penicil·lina va reduir de manera dràstica aquesta xifra, en les últimes dècades s'ha estabilitzat entre el 15-50%.

Això posa de manifest la limitació de l'eficàcia dels tractaments antibiòtics emprats i la influència d'altres variables.

Així, en els últims anys hem après que factors com l'edat avançada, la presència de comorbiditat, el tipus focus d'infecció, la bacterièmia persistent i el fracàs en l'eliminació del focus erradicable empitjoren el pronòstic.

Hi ha varies guies amb recomanacions per definir quines serien les mesures a tenir en compte per tal de millorar el maneig d'aquests pacients (165, 174).

Tot i què calen més estudis que aprofundeixin en algunes d'aquestes qüestions, podem dir que hi ha uns principis claus i acceptats a tenir en compte pel maneig de la bacterièmia per *S. aureus*.

Així caldria definir: pacient amb bacterièmia no complicada i complicada; identificació i eliminació del focus d'infecció; antibioteràpia adequada en funció del microorganisme, dosi i duració.

La Societat Espanyola de Malalties Infeccioses i Microbiologia Clínica (SEIMC) ha publicat les següents condicions per definir una bacterièmia per *S. aureus* no complicada: endocarditis descartada per ecocardiografia; absència d'implants protètics; hemocultius de control negatius i manca d'evidència de focus metastàtic (165).

Per d'altra banda, l'assessorament del microbiòleg clínic i de l'especialista en malalties infeccioses s'han demostrat claus en la millora del pronòstic del malalt amb bacterièmia per *S. aureus*. S'associen a taxes més elevades en una major adherència a les mesures que tenen a veure amb una bona qualitat assistencial, entre elles la realització d'ecocardiograma (valorant en cada cas quina seria la indicació de realitzar un ecocardiograma transtoràcic o transesofàgic de manera individualitzada i seguint les recomanacions establertes), el seguiment clínic i extracció d'hemocultius de control, en eliminar els focus d'infecció o adequar el tractament antibiòtic i la durada, posant èmfasi en la utilització d'antibiòtics beta-lactàmics en les infeccions per SASM. Aquesta actuació s'ha demostrat que redueix la mortalitat i l'estada hospitalària (175, 176).

Es recomana que la durada del tractament antibiòtic en les bacterièmies no complicades per *S. aureus* sigui com a mínim de dues setmanes. En un estudi recent, s'ha observat una menor taxa de recaigudes en malalts que havien portat tractament durant dues setmanes, respecte els que n'havien rebut menys temps (177). Tot i que en alguns estudis observacionals es suggereix que un tractament endovenós durant només 7 dies podria ser suficient (178).

Pel que fa al tractament antibiòtic empíric davant la sospita d'una bacterièmia per *S. aureus*, les guies recomanen un betalactàmic, la cloxacil·lina, com a primera opció. S'ha observat una major mortalitat en aquells pacients que han rebut tractament amb cefalosporines de segona o tercera generació. Molts estudis in vitro han demostrat una menor activitat de la vancomicina en la bacterièmia per SASM i s'ha descrit en nombrosos estudis un pitjor pronòstic d'aquests malalts i una major presència de complicacions.

En contrast amb la vancomicina, la daptomicina ha presentat una eficàcia similar a la cloxacil·lina en el tractament d'aquestes infeccions.

Hi ha situacions clíniques que han portat a plantejar una combinació antibiòtica pel tractament empíric. Seria el cas dels malalts amb factors de risc de presentar una bacterièmia per SARM, com poden ser: història de colonització prèvia, úlceres de decúbit, procedència de centres de llarga estada o hemodiàlisi (174).

Així les guies de tractament de les bacterièmies per *S. aureus* recomanen associacions d'antibiòtics que garanteixin una òptima activitat bactericida el més aviat possible. Aquest tractament empíric ha d'incloure un betalactàmic i una de les següent possibilitats; Vancomicina, excepte en aquells casos on hi hagi un shock sèptic amb antecedent d'antibioteràpia prèvia amb aquest fàrmac en els últims 30 dies, una sòca *S. aureus* amb CMI a vancomicina ≥ 1.5 mg/L (determinada pel mètode Epsilon-test)

o insuficiència renal, en els que l'ús de la daptomicina en combinació amb el beta-lactàmic seria el tractament d'elecció o fins i tot daptomicina en monoteràpia a dosis de 10 mg/kg (165).

Davant una bacterièmia complicada, és a dir, aquella en la que trobem una persistència dels hemocultius positius a les 72 hores de l'inici d'un tractament antibiòtic adequat o en el curs de la qual observem una tromboflebitis sèptica, un focus metastàsic o una endocarditis, el tractament antibiòtic encara no està ben establert, però es recomana fer un tractament combinat amb alguna de les següents opcions:

SASM: cloxacil·lina+daptomicina o cloxacil·lina +fosfomicina si persistència de la febre o no milloria clínica o fracàs microbiològic o CMI Vvncomicina ≥ 1.5 mg/L

SARM: daptomicina+ fosfomicina o fosfomicina + imipenem si hi ha sepsis greu, bacterièmia persistent i antecedent de daptomicina a dosis de 10mg/kg. També s'ha descrit eficaç la combinació de Daptomicina amb ceftarolina o trimetoprim-sulfametoxazol.

Altres recomanacions pel tractament combinat serien: malalt clínicament greu, bacterièmia de focus desconegut o pacient jove amb endocarditis dreta per SASM. Caldrà tenir en compte que es recomana que aquesta combinació es mantingui de 3-5 dies o fins a la milloria clínica o hemocultius negatius, en el cas de SASM i de 2 setmanes mínim en els casos de SARM, amb l'excepció que sigui una bacterièmia no complicada.

4.3. Efecte dels antimicrobians sobre els factors de virulència i els sistemes reguladors

Per a l'elecció del fàrmac antiestafilocòccic i establir la durada més adequada del tractament antibiòtic s'han de tenir en compte, amb independència de la sensibilitat antibiòtica, altres característiques de *S. aureus* que fan referència als diferents mecanismes implicats en la infecció estafilocòccica.

Les infeccions greus produïdes per *S. aureus*, sobretot aquelles que cursen amb bacterièmia i que poden presentar complicacions amb una elevada morbi mortalitat, requereixen de l'elecció d'un fàrmac bactericida que ens ajudarà a millorar el pronòstic de les infeccions.

En el cas de infeccions per SASM els betalactàmics serien una excel·lent opció, però amb independència de la sensibilitat a aquests antibiòtics caldrà tenir en compte altres característiques de la infecció estafilocòccica per tal de decidir l'antimicrobià i la durada de tractament més adequada.

Algunes d'aquestes característiques son:

4.3.1 Quorum sensing

Staphylococcus aureus posseeix mecanismes de regulació de l'expressió d'alguns dels seus factors de virulència, facilitant la invasió i la supervivència en el lloc de la infecció.

L'anomenat “**quorum sensing**” permet la detecció de la densitat bacteriana i la posterior regulació de l'expressió gènica de certes molècules químiques que participen en l' adhesió i invasió del microorganisme. Es tracta d'una mena d'“interruptor”, que confereix capacitat de supervivència al microorganisme. Té com a únic requisit inicial la colonització que posteriorment serà reemplaçada per la invasió i penetració al arribar a una determinada densitat bacteriana. Així doncs, quan hi ha un inòcul bacterià suficient en el lloc d'infecció, aquest sistema és capaç de disminuir l'expressió de gens que faciliten l'adhesió bacteriana i fer augmentar la expressió d'aquells que codifiquen per a la síntesi de molècules que faciliten la invasió dels teixits i la disseminació sistèmica, poden arribar a llocs on puguin persistir.

Dins d' aquests sistemes de regulació “*quorum sensing*” trobem el sistema “*agr*” que permet la transcripció dels gens responsables de la codificació de diverses toxines com la α -toxina, β -toxina i δ -toxin (179).

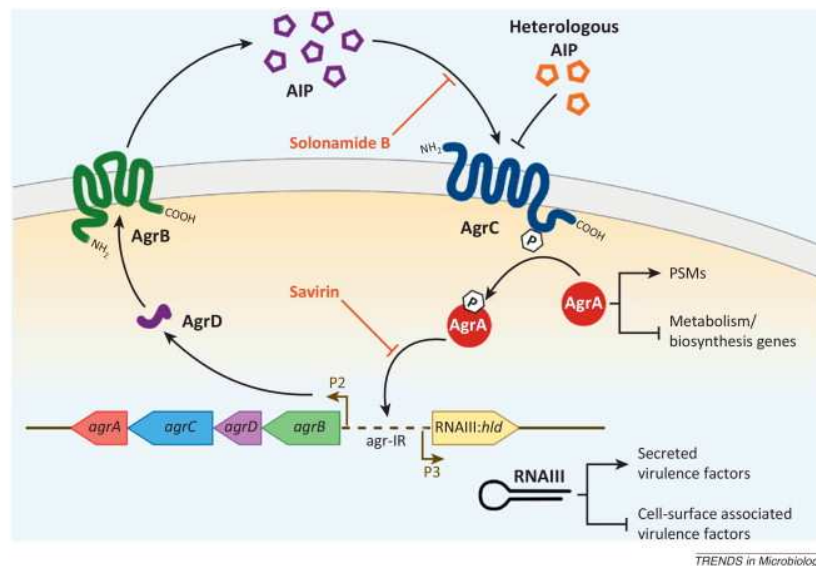


Figura 16. Esquema del sistema regulador Agr de *S. aureus*. Trens in Microbiology

Un tractament antibiòtic inadequat o insuficient, mitjançant l'eliminació de *S. aureus* sensibles que formen part de la flora comensal, podria estimular la proliferació de soques SARM i accelerar el procés de detecció de quòrum, convertint algunes soques recentment adquirides en invasores virulentes.

No obstant això, aquest sistema de regulació ofereix algunes alternatives per al desenvolupament de noves estratègies en el tractament de les infeccions per *S. aureus*. Aquestes es basen en la inhibició de molècules que provoquen una activació d'aquest sistema, d'aquesta manera es deixaria de produir toxines que contribueixen a augmentar la virulència d'algunes soques o bé mitjançant el bloqueig d' alguns receptors per determinats pèptids i deixant així més temps per la actuació dels antibiòtics, abans que s'activi la senyal del “quorum sensing” (180, 181).

4.3.2 Toxines estafilocòcciques

La gravetat d'algunes infeccions per *S. aureus* s'atribueix a la producció de toxines com la α -toxina codificada per gen *hla*, la PVL o els denominats superantígens (TSST-1, enterotoxines). Hi ha alguns antibiòtics que potencien la producció d'aquestes, com pot ser el cas de la cloxacil·lina. S'ha descrit una inducció de la producció de la α -toxina amb un augment de la letalitat i un empitjorament de les manifestacions clíniques de la infecció estafilocòccia (182).

Provant altres antibiòtics i mesurant la inducció de l'expressió de *hla* després de l'exposició a soques de *S. aureus*, es va demostrar una forta inducció de l'expressió d'aquest gen a concentracions subinhibitòries de diversos antibiòtics betalactàmics, incloent les cefalosporines i l'imipenem. Pel que fa a la clindamicina, es va veure que inhibia l'expressió del gen *hla*, efecte que en menor grau també es va apreciar utilitzant macròlids i aminoglucòsids (183).

L'exposició a concentracions subinhibitòries de fàrmacs com el linezolid, clindamicina i àcid fusídric sobre soques productores de PVL i causants d'infeccions de pells i parts toves o pneumònies necrotitzants, s'ha vist que té el mateix efecte de disminució en l'expressió del gen *hla* i en la producció de α -toxina. La vancomicina té el mateix efecte, però la cloxacil·lina podria augmentar la producció de PVL (184-186).

Aquests resultats *in vitro* suggereixen que la producció de α -toxina també es pot incrementar juntament amb la producció de PVL després de l'exposició als antibiòtics seleccionats. El dany endotelial característic en la pneumònia necrotitzant, podria ser conseqüència de l'efecte sinèrgic de la combinació d'aquestes dues toxines i probablement aquests antibiòtics que inhibeixen la producció PVL serien la millor opció terapèutica per aquestes infeccions greus (187).

Pel que fa a la producció de la TSST-1, no hi ha estudis que demostrin que l'administració d'algun antibiòtic pugui intervenir en el increment o reducció de l'excreció d'aquesta toxina.

4.3.3 Sistema SOS

Quan els microorganismes estan sotmesos a condicions adverses, com podria ser l'exposició als antibiòtics s'activa el denominat "Sistema SOS". L'activació d'aquest sistema activarà els gens implicats en la reparació cel·lular i la supervivència. D'altra banda afavorirà la transferència horitzontal d'elements genètics mòbils, com plàsmids, illes de patogenicitat, bacteriòfags, transposons i seqüències d'inserció, participant de manera crucial en la disseminació de les resistències i factors de virulència entre soques (188). Aquesta inducció del sistema SOS s'ha observat en exposar el microorganisme a beta-lactàmics, fluoroquinolones i trimetoprim (189, 190), provocant una millor disseminació, no només de les resistències, sinó també de factors de virulència, convertint-se determinades poblacions en reservoris d'aquests gens.

4.3.4 Adhesió bacteriana

S. aureus disposa de varies proteïnes de superfície que faciliten la seva adhesió a components de la matriu extracel·lular, com la col·làgena, fibrina o fibrinogen i d' aquesta manera afavoreixen la colonització de catèters o dispositius ortopèdics. S'ha vist que l' exposició a certs antibiòtics afavoreix aquesta unió. L' administració de fluoroquinolones augmenta la secreció de l'adhesina, i condueix a una major unió a la fibronectina. També s' ha descrit una relació entre la adquisició del gen *mecA* i l'augment d'aquestes proteïnes (191).

S'ha relacionat l' augment de la resistència a la vancomicina en soques amb sensibilitat intermitja a aquest antibiòtic (VISA) ,amb una major virulència per un augment dels nivells d'adhesió a la fibronectina.

4.3.5 Persistència intracel·lular

Staphylococcus aureus té la capacitat de persistir de manera intracel·lular, fet que te un paper molt important en la patogènia de les infeccions que causa i que condiona el seu tractament amb antibiòtics amb activitat intracel·lular.

Excepte en el cas de la rifampicina, l'activitat citotòxica dels antibiòtics utilitzats en el tractament de les infeccions estafilocòcciques dura mentre dura l'exposició. Les formes intracel·lulars recuperaran la seva activitat i fins i tots alguns d'aquests poden provocar l'aparició de variants intracel·lulars més invasives, afavorint la persistència i la recurrència (192).

Com s'ha comentat anteriorment, les *Small Colony Variants* (SCV) s'han relacionat amb l'osteomielitis crònica i altres infeccions associades a biofilms.

S'ha demostrat que les SCV tenen capacitat de persistir sota la pressió antibiòtica o fins i tot de seleccionar-se i contribuir al fracàs terapèutic (193).

Aquestes dues estratègies fan que *S. aureus* pugui ser altament resistent a l'acció bactericida de la cloxacil·lina i la vancomicina, fet que demostra la necessitat d'emprar fàrmacs amb acció antibacteriana a d'altres nivells. Un exemple seria la rifampicina, fàrmac amb una bona difusió al citoplasma cel·lular i certa acció en la formació del biofilm, ja que és activa enfront de bactèries en fase estacionària i és capaç d'augmentar l'eliminació intracel·lular.

Justificació

Staphylococcus aureus és un dels agents patògens més versàtils i amb major capacitat de causar infeccions en tot tipus de pacients, donant lloc des de malalties lleus i localitzades de curs benigne fins a infeccions disseminades de curs greu i fins i tot fatal. La freqüència de bacterièmies per *S.aureus* intra i extrahospitalàries ha anat en augment en els últims anys, calculant-se una incidència entre el 10-30% (145) amb una taxa de mortalitat al voltant del 15-25% (146) assolint fins al 30% en algunes sèries (174).

L'augment de la freqüència de les bacterièmies per *S.aureus*, així com el manteniment en les xifres de mortalitat associades, està en relació amb canvis relacionats amb les característiques de l'hostatger (increment de l'edat i canvis en les malalties de base, augment de la presència de dispositius endovenosos o d'altres com els *stents* nous tipus d'immunosupressió), i també amb factors específics de la soca (genoma, factors de virulència, facilitat de colonització, patró de resistència antibiòtica) i epidemiològiques (portadors, transmissió, insuficient compliment de les normes d'asèpsia bàsica). Altres factors com la utilització del tractament antibiòtic més adequat, i la durada d'aquest també influeixen en l'evolució i en el desenvolupament de complicacions.

D'aquí la importància de definir una estratègia diagnòstica fiable que permeti, a partir de l'anàlisi de la presència de certs factors de risc, com detectar precoçment els pacients amb major probabilitat de presentar bacterièmia complicada. A més, una correcta avaluació inicial de l'extensió de la infecció pot permetre detectar un focus erradicable, traduint-se en una disminució de la morbimortalitat. L'estudi conjunt dels factors dependents del pacient i els factors dependents del microorganisme, hauria de permetre una millor estratificació dels pacients per tal de rebre el tractament més ajustat.

D'altra banda, tradicionalment, *S.aureus* SARM s'havia considerat un patògen nosocomial, però ja fa uns anys va sorgir en alguns països com una important causa d'infeccions adquirides a la comunitat (CA-SARM). Una característica d'aquestes soques era que eren portadores d'un *cassette* cromosòmic SCCmec tipus IV i de la Leucocidina de Panton-Valentine. Aquest factor de virulència s'havia associat epidemiològicament a major gravetat, presentant-se com pneumònia necrotitzant i infeccions de pells i parts toves. A més, també tenien un patró de sensibilitat antibiòtica característic, sent només resistents a cloxacil·lina, a diferència del patró de SARM intrahospitalari, amb resistència associada a altres grups d'antibiòtics. Un aspecte important d'aquestes soques és la seva elevada capacitat de transmissió, arribant a ser les soques més prevalents en algunes àrees. En conseqüència, un altre aspecte preocupant era la disseminació des de la comunitat cap a l'hospital, podent ser causa de brots. L'increment descrit en alguns estudis en la població pediàtrica fonamentalment relacionada amb determinats llocs geogràfics, ha fet que la caracterització molecular de les soques de *S.aureus* causants d'infeccions de pells i parts toves en la població del nostre entorn, i establir una possible relació amb les característiques de l'hostatger (clíniques o epidemiològiques) sigui essencial alhora

de dissenyar estratègies de prevenció de la transmissió i poder preveure l'evolució dels pacients.
Així, els objectius d'aquesta Tesi:

Objectius

1. Estudi de l'epidemiologia, diagnòstic i aspectes clínics de la bacterièmia per *Staphylococcus aureus*

- 1.1. Estudi dels factors de virulència i tipificació molecular de les soques causants de bacterièmia per *S. aureus* de diferents orígens
- 1.2. Avaluació de diferents mètodes ràpids d'identificació i determinació de la sensibilitat antibiòtica de *S. aureus* directament de l'hemocultiu positiu.
- 1.3. Descripció de les característiques clíniques i epidemiològiques de les bacterièmies per *S. aureus* durant un període de 7 anys
- 1.4. Impacte dels factors de virulència i les característiques moleculars de les soques en la presència de complicacions derivades de la bacterièmia per *S. aureus*.

2. Estudi de l'epidemiologia i aspectes clínics de la infecció de pell i parts toves per *S. aureus* a la població pediàtrica

- 2.1. Estudi dels factors de virulència i tipificació molecular de les soques causants d'infecció de pell i parts toves en nens
- 2.2. Descripció de les característiques clíniques i epidemiològiques de les infeccions de pell i parts toves en aquesta població
- 2.3. Impacte dels factors de virulència i les característiques moleculars de les soques en la presentació clínica de la infecció cutània

Objectiu 1. Estudi de l'epidemiologia, diagnòstic i aspectes clínics de la bacterièmia per *Staphylococcus aureus*

Estudi dels factors de virulència i tipificació molecular de les soques causants de bacterièmia per *S. aureus* de diferents orígens

Cal abans d'iniciar la descripció de la metodologia d'estudi tenir en compte com es defineixen les variables epidemiològiques i clíniques que s'han considerat més rellevants.

Definicions

Servei: Servei mèdic o quirúrgic on el pacient estava ingressat quan es va produir la bacterièmia o en el que es va diagnosticar en el cas de les d'origen comunitari.

Origen: Comunitari, succeeix <72 hores abans d'ingrés d'un pacient que no té contacte habitual amb el centre hospitalari. Hospitalari, succeeix >72 hores de l'ingrés, tenint en compte que la clínica no s'hagués iniciat abans o estès ja present en el moment de l'ingrés. Relacionat amb el sistema sanitari, en un pacient que ha estat amb el centre hospitalari en els últims 30 dies (diàlisi, cirurgia) o ingressat en un centre de llarga estada.

Bacterièmia complicada: Aquella que en la seva evolució presenta metàstasi sèptica en un focus d'infecció diferent al primari, via hematògena (endocarditis, osteomielitis vertebral, accident cerebrovascular embòlic, embòlies sèptiques pulmonars) o extensió local (tromboflebitis, abscessos) o presència de shock sèptic.

Focus d'infecció aparent: dividits en erradicables, com catèters venosos i urinaris, abscessos drenables, marcapassos i empiema o no erradicables com el focus cutani, respiratori, urinari, endovascular, osteoarticular i meningi.

Evolució: Es va definir curació com aquell episodi amb resolució clínica i sense evidència de recurrència durant el seguiment; recidiva como aquell episodi que presenta una recurrència de la bacterièmia o d'infecció en qualsevol localització en el període de seguiment per un *S. aureus* amb antibiograma similar. Mortalitat relacionada o atribuïble si el malalt va morir amb signes de infecció sistèmica persistent, hemocultius positius o amb un focus persistent, en absència d'altres causes. Evolució desfavorable quan apareixen complicacions, recidiva o èxitus relacionat.

Bacterièmia persistent: pacient amb hemocultiu positiu a les 72 hores des del primer aïllament.

Selecció de pacients i recollida de mostres

Estudi prospectiu longitudinal on es van incloure tots el malalts atesos als servei d'urgències, consultes externes o hospitalitzats amb bacterièmia documentada per *S. aureus*, durant un període de 7 anys. (2002-2009).

En primer lloc, conjuntament amb el servei de Medicina Interna, es van recollir les dades epidemiològiques, l'origen (comunitari, nosocomial o relacionat amb l'assistència sanitària), la patologia de base, el risc de metàstasis sèptiques (valvulopatia, marcapassos, pròtesi articular), el focus infecció aparent, focus erradicable (desbridament quirúrgic, retirada de catèter o cos estrany), presència de complicacions (shock sèptic, metàstasis sèptiques), bacterièmia persistent, sensibilitat a la cloxacil·lina, tractament antibiòtic adequat i evolució.

Simultàniament al laboratori, un cop aïllada la soca de *S. aureus* es van realitzar els estudis d'identificació i sensibilitat antibiòtica i posteriorment es va congelar la soca a -20°C per, en una segona fase, realitzar el tipat fenotípic, genotípic, detecció de mecanisme de resistència i estudi dels factors de virulència.

Estudis identificació i sensibilitat antibiòtica

Tots els hemocultius eren enviats al Laboratori de Microbiologia pel seu processament rutinari, un cop arribaven eren incubats al sistema automàtic BacTAlert automatic blood culture system (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France). Si l'hemocultiu era positiu es realitzava una tinció de Gram. Quan en aquesta tinció observàvem cocs grampositius amb morfologia d'estafilococ, es realitzava la determinació de la coagulasa lliure (en tub) directament del flascó d'hemocultiu. Posteriorment, a les 4 i 24 hores es feia la lectura, observant la formació d'un coàgul en cas que es tractés d'un *S. aureus*.

Alhora, es realitzava la identificació bioquímica i sensibilitat antibiòtica directament del flascó amb el Sistema Vitek-2 Compact (bioMérieux).

A més, es realitzava la sembra directa d'un medi Mueller-Hinton sal amb un E-test de cloxacil·lina i un disc de cefoxitina, amb lectura també a les 4 i 24 hores.

A les 18-24 hores i a partir de una colònia aïllada del microorganisme es realitzava la determinació de la coagulasa lligada (DiaMondial Staph Plus Latex Kit) o *clumping factor*, mitjançant aglutinació, utilitzant partícules de làtex sensibilitzades amb fibrinogen humà, un anticòs monoclonal enfront la proteïna A i polisacàrids capsulars.

Per cada soca es va determinar la Concentració mínima inhibidora (CMI) mitjançant la targeta de sensibilitat AST-588 del Sistema Vitek-2 Compact (bioMérieux). Aquesta testava els següents antibiòtics: benzilpenicil·lina, oxacil·lina, gentamicina, tobramicina, levofloxacina, eritromicina, clindamicina, quinupristina/dalfopristina, linezolid, teicoplanina, vancomicina, tigeciclina, nitrofurantoïna, àcid fusídric, mupirocina, rifampicina i trimetoprim-sulfametoxazol.

Quan els resultats de sensibilitat a macròlids i lincosamides obtinguts per microdilució, mostraven que la soca era resistent a eritromicina i sensible a clindamicina, es comprovava mitjançant el mètode D-test la possible existència d'un fenotip MLSB induïble a clindamicina. Per això, es

preparava un inòcul de la bactèria amb una terbolesa corresponent a 0.5 McFarland i es sembrava en un medi Mueller-Hinton. Posteriorment es col·locava un disc de clindamicina i un d'eritromicina a una distància de 15-25mm.

Després de 24 hores d'incubació a 37°C es realitzava la interpretació segons la forma de l'halo d'inhibició. L'existència d'una rectificació en l'halo d'inhibició de la clindamicina on es trobava la eritromicina (D-zona) ens indicava una resistència induïble a la clindamicina. En aquests casos es va considerar que la soca era resistent a aquest antibiòtic.

La heteroresistència a glicopèptids es va estudiar mitjançant un *screening* en un *brain-heart infusion* agar que contenia vancomicina a una concentració de 4 mg/l.

Els resultats de les CMI's obtingudes per microdilució i de les mesures dels halos d'inhibició van ser interpretats seguint els criteris del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI).

Un cop realitzats aquestes proves d'identificació i detecció del patró de resistència fenotípic, les soques estudiades es congelaven a -20°C.

Tipificació *Staphylococcus aureus*

Tipificació fenotípica mitjançant Fagotipia

En una primera fase es va realitzar al Centre Nacional de Microbiologia, la tipificació de les 128 soques de *S. aureus* causants de bacterièmia recollides fins a aquell moment, seguint el protocol utilitzat en aquest centre de referència.

1. Propagació del joc internacional de fags

Els fags utilitzats per realitzar la fagotipia al laboratori de Centre Nacional de Microbiologia es van propagar a partir del joc bàsic subministrat pel Laboratori Internacional de Referència de Fagotipia de *Staphylococcus aureus* a Colindale (Central Public Health Laboratory, Londres), que consta de 23 fags. Aquests fags s'agrupen en quatre fagogrups, quedant distribuïts de la següent manera:

Fagogrup	Fago
I	29 52 52A 79 80
II	3A 3C 55 71
III	6 42E 47 53 54 75 77 83A 84 85
V	94 96
No classificació	95
No classificació	81

A més dels fags es van incloure soques propagadores d'aquests , que es designen amb el mateix número que el fag, excepte la soca 52A/79. Es van utilitzar soques amb fagotipia coneguda per tal de realitzar els controls; W57, 1030, 2009, 18042.

2. Determinació del RTD ("Routine test dilution")

Abans de la propagació del fag, es va calcular la seva RTD, titulant-lo sobre la soca propagadora. Per dur a terme la titulació es va inundar la placa d'agar comú 1:1 amb un cultiu de la soca propagadora, retirant-se l'excés de líquid. Un cop seca es van col·locar dilucions creixents del fag que volíem titular de 10^{-1} a 10^{-7} .

Després d'incubar durant 18 hores a 30°C, observàvem la presència de plaques de lisi, considerant-ne RTD la màxima concentració a la que vèiem confluència de la lisi.



Cl: lisi confluent
 ++: 50 plaques de lisi
 +: 20-50 plaques de lisi
 +/-: <20 plaques de lisi

3. Propagació en medi sòlid

Es va realitzar mitjançant el mètode de l'agar semisòlid descrit per *Swastrom et al* (1951). Vam escalfar un tub d'agar semisòlid distribuït en 6mL per fondre'l, deixant-lo refredar a 45°C. Aleshores vam afegir:

- 0.6mL d'un cultiu en brou comú de la soca propagadora crescuda a 37°C durant 4 hores en agitació.
- 0.6mL del fag diluït a la seva RTD
- 0.25mL de clorur càlcic al 1%

Aquest contingut es va distribuir sobre una placa i es va incubar durant 18h a 30°C. Després d'aquest temps es va recuperar del creixement de la placa el fag.

Això es va fer afegint 15 mL de brou comú i utilitzant una pipeta Pasteur doblegada en angle recte, es va recuperar arrossegant-la per tota la superfície. La suspensió recollida es va centrifugar a 5000 r.p.m. una hora i el sobrenedant recuperat es va filtrar amb unes membranes de 0.22 µm.

Finalment es va fer una nova titulació dels fags sobre la soca propagadora i no es van conservar aquells que no arribaven al títol esperat. D'aquesta manera els fags recuperats es poden conservar a 4 °C fins a la seva utilització.

4. Espectre lític

Cada fag propagat es va enfrontar amb 20 soques patró per comprovar el seu espectre lític. Així es comprova qualsevol modificació que hagi pogut succeir durant la propagació.

L'espectre lític es determina segons la descripció de Blair et Williams (1961) (194).

Cada fag es va titular enfrontant-lo sobre les soques del joc: 29, 52, 52A/79, 80, 2009, 3A, 3C, 71, 8719, 42C, 42E, 47, 53, 54, 75, 77 i es va comparar els títols obtinguts amb el títol sobre la soca propagadora.

Posteriorment es van avaluar els títols en una escala de 1 a 5. El número 5 s'adjudicava a aquelles soques en què el títol obtingut era el mateix en els dos casos, el 4 a aquelles en que el títol era 10^{-1} o 10^{-2} menor, el 3 a títols 10^{-3} o 10^{-4} i així successivament. En aquells casos en què l'espectre lític no coincidia amb el conegut es desestimava la conservació d'aquests fags.

Un cop obtinguts els nous fags propagats es conservaven a 4°C, a partir d'ells es preparaven les dilucions del RTD i 100X RTD per fer la fagotipia amb les nostres soques problema.

5. Fagotipat soques problema

El Fagotipat es va realitzar en primer lloc al 100x RTD. Cada soca s'inoculava en un brou comú a partir d'un cultiu pur a 37°C i es posava durant 4 hores en agitació. Després d'aquest temps i un cop crescut el cultiu, es va inocular en un agar comú 1:1, assecat prèviament a 37°C durant 2 hores. Novament es va deixar assecat durant 15 minuts i es va inocular 20µl de cada un dels fags en una distribució determinada. (figura 1. Disposició de fags a la placa) Un cop les gotes amb cada fag estaven seques, s'incubaven a 37°C durant 18 hores i posteriorment es realitzava la lectura.

Per realitzar la lectura es va tenir en compte quin és el patró de lisi que cada soca presenta enfront del joc internacional de fags, classificant-se en fagogrups tal com s'ha descrit anteriorment.

En alguns casos ens podíem trobar un subgrup de soques no tipables, és a dir, que no s'obtenia lisi amb cap fag o bé per d'altra banda, soques que mostraven lisi amb els fags 95 ó 81, que no s'assignaven a cap fagogrup i quedaven denominades amb el nom d'aquests fags.

Aquelles soques que combinaven fags del Fagogrup I i Fagogrup III, s'interpretaven com Fagogrups mixtes, aquelles que mostraven un perfil de lisi corresponent al Fagogrup I i al 95, s'anomenaven com I/95

Com van descriure Williams *et al* (1952)(70) es poden trobar petites diferències en el fagotip de cultius individuals de la mateixa soca. Aquests autors van suggerir l'aplicació de la "norma de les dues diferències", segons la qual, quan dos cultius presenten dos o més diferències, la probabilitat que siguin d'un origen comú és menor del 5%. Així, la fagotipia serà capaç de reconèixer soques diferents, però si obtenim patrons iguals indicarà una probable identitat, mai segura (70).

6. Controls de qualitat

Per tal de garantir la reproductibilitat de la tècnica es va realitzar controls amb soques amb patró polivalent i conegut, en aquest cas les utilitzades van ser les **1030** i **W57**.

7. Tècnica Fagotipia inversa

Tècnica realitzada segons el mètode de DeSaxe i Notley per inducció de profags o fags lisogènics amb Mitomicina C.

Cada soca problema es va fer créixer en un brou comú durant 18 hores, aquest cultiu es va diluir 1/3 i incubar al bany a 37°C durant 30 minuts.

Un cop passat aquest temps es van afegir 100µl de Mitomicina C per obtenir una concentració final de 0.5pg/mL. Posteriorment es va incubar novament a 37°C durant 30 minuts i després es va centrifugar a 5000 rpm 15 minuts, descartant el sobrenedant. El sediment es va resuspendre en 2 mL de brou comú i es va incubar 90 minuts més a 37°C, per tal de permetre l'alliberació dels fags de les restes bacterianes, centrifugant a 5000 rpm 15 minuts més i recollint el sobrenedant vam obtenir els fags induïts resuspesos. A partir d'aquí realitzarem la mateixa tècnica que la fagotipia directa i estudiarem el patró de lisi que produeixen sobre les soques propagadores, inoculant 20 µl de cada soca . Utilitzarem com a control les soques **1030**, **W57**, **2009**, **18042**.

Tipificació molecular i Detecció Factors de virulència

Un cop realitzats els estudis d'identificació, sensibilitat antibiòtica i fagotipat es va dur a terme la tipificació molecular i la detecció molecular d'alguns factors de virulència.

Per a realitzar aquestes tècniques es va seguir un procés inicial comú, mitjançant el qual obtenim el DNA de cada soca.

Preparació de l'extracte de DNA

Per cada soca i a partir d'un cultiu pur, vam resuspendre amb una nansa de 10 µl en un *ependorf* amb 100µl d'una solució d'extracció (10% EDTA 0.1M; 1% Tris HCl 1M pH 7.5; 88.6 % de aigua lliure de nucleases; 0.4% Lisostafina 2000U/ml).

Un cop fet això, aquests *ependorf* es van introduir a un termobloc durant 30 minuts a 37°C i a continuació 10 minuts a 100°C. Es va deixar refredar i es va afegir 900 µl d'aigua lliure de nucleases. Es va barrejar bé amb vòrtex i finalment es va centrifugar a 13.000rpm durant 10 min. Al sobrenedant obtingut és on es troba el DNA bacterià.

Aquest DNA es congelava a -20°C si en aquell moment no s'utilitzava.

Determinació de la presència del gen *pvl*

En les soques de bacterièmies SARM es va estudiar la presència de la Leucocidina de Pantone Valentine. Aquesta toxina està formada per dues subunitats que són codificades per dos gens *LukF-PV* i *LukS-PV*. La detecció d'aquests gens es va realitzar mitjançant una PCR descrita per Lina *et al.*

La seqüència dels primers per la detecció de la PVL era la següent:

luk-PV-1, 50-ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA-30

luk-PV-2, 50-GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAAGC- 30

Dissenyada d'acord amb la seqüència del GenBank: X72700 i AB0067796, que donen un amplicó de 433pb (195).

A més com a controls es van incloure cebadors per amplificar una seqüència específica de *S. aureus* (*sau*) i del gen *mecA*. Aquestes van ser:

sau 1, AAT CTT TGT CGG TAC ACG ATA TTC TTC ACG

sau 2, CGT AAT GAG ATT TCA GTA GAT AAT ACA ACA

mecA 1, GTA GAA ATG ACT GAA CGT CCG ATA A

mecA 2, CCA ATT CCA CAT TGT TTC GGT CTA A

Donant lloc a un producte de amplificació de 107 pb (196).

Per tal de fer la barreja d'amplificació vam dispensar 2 µl del primer *luk-PV-1* i 2 µl del primer *luk-PV-2*, amb 1 µl del primer *sau 1* i 2 µl del primer *sau 2* µl, amb 12 µl de aigua lliure de nucleases. Un total de 22 µl, al que se'ls va afegir 3 µl del DNA de cada soca. Tot això en un tub de *Pure Tag Ready To Go* amb les següents condicions de PCR; 5 minuts a 94°C, 30 cicles de 30 segons a 94°C, 30 segons a 55°C, 60 segons a 72°C, per últim una fase de extensió de 7 min a 72°C.

Per la detecció es va preparar un gel agarosa al 2% (100ml de TAE 1X + 2grams de agarosa MS8), on es carreguen 7µL de tampó de càrrega i 10µL del DNA de cada mostra. Posteriorment teníem durant 10 minuts amb bromur d'etidi i es feia la lectura.

Determinació de la presència del gen *mecA* i anàlisi del polimorfisme associat al *Staphylococcal cassette chromosome (SCCmec)* i subtipat del *SCCmec IV* (subtipus IVa ó IVc)

A les soques de *S. aureus* resistents a la meticil·lina es va determinar presència del gen *mecA* i tipus de *SCCmec* mitjançant una reacció de PCR, basant-nos en el mètode descrit per Oliveira *et al* (154)

El gen *mecA* codifica per un PBP2a, regulat per dos gens, ***mecI*** i ***mecR1***. El primer codifica la proteïna represora de la transcripció del gen *mecA*, mentre el segon actua com a regulador de la senyal de transducció d'aquest gen. Per tal que el gen *mecA* sigui transcrit, el β-lactàmic s'ha d'unir al domini receptor d'una proteïna de membrana codificada pel gen *mecR1*, això indueix una proteasa autocatalítica que inactiva el repressor amb la qual cosa l'operador de *mecA* queda lliure i pot expressar la PBP2a (83).(Figura 17)

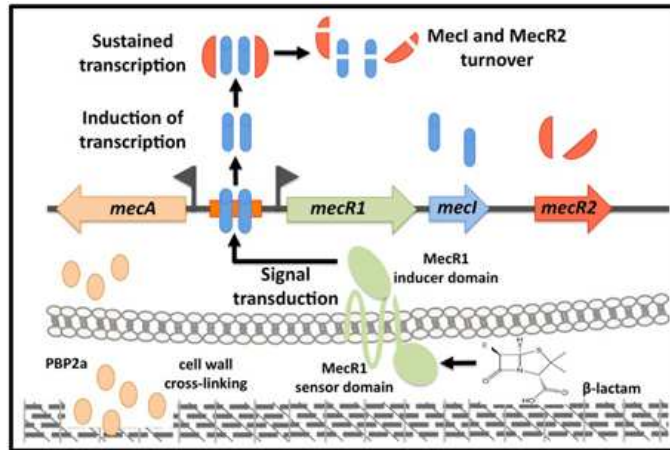


Figura 17 . Mecanisme inducció resistència meticil·lina

S'han descrit diferents classes variants genètiques del complex mec, que inclou en gen *mecA*, els gens reguladors (*mecI* i *mecR1*) i les seqüències d'inserció *IS431* i *IS1272*.

Classe de complex <i>mec</i>	Estructura
A	<i>IS431 -mec A-mec R1-mec I</i>
B	<i>IS431 -mec A-Δmec R1-IS1272</i>
C1	<i>IS431 -mec A-Δmec R1-IS431</i> (two <i>IS431</i> s were arranged in the same direction)
C2	<i>IS431 -mec A-Δmec R1-IS431</i> (two <i>IS431</i> s were arranged in the opposite direction)
D	<i>IS431 -mec A-Δmec R1</i>
E	<i>blaZ-mec ALGA251 -mec R1LGA251 -mec ILGA251</i>

Figura 18 . Classes del complex mec

D'aquesta forma el gen *mecA* forma part d'una illa genòmica coneguda com ***Staphylococcal cassette chromosome (SCCmec)***, integrada dins el cromosoma de *S. aureus*. No es coneix amb exactitud el mecanisme d'adquisició, però existeixen dos gens, ***ccrA*** i ***ccrB***, presents en l'element *SCCmec*, que codifiquen per dues recombinases que són capaces d'escindir-lo o integrar-lo en el cromosoma.

S'han descrit diferents tipus de *SCCmec* en funció de les característiques dels gens *ccr* i de les seves seqüències adjacents, de la variabilitat del complex *mecA* i els seus gens reguladors i de determinants genètics adquirits com a resultat de l'adquisició de plàsmids i transposons. Fins al moment, es coneixen 11 tipus de *SCCmec* i diferents subtipus, en base a la seqüència de les seves regions J (*junkyard*)

Classe SCCmec	gens ccr	Classe de complex mec
I	1 (<i>ccrA1ccrB1</i>)	B
II	2 (<i>ccrA2ccrB2</i>)	A
III	3 (<i>ccrA3ccrB3</i>)	A
IV	2 (<i>ccrA2ccrB2</i>)	B
V	5 (<i>ccrC</i>)	C2
VI	4 (<i>ccrA4ccrB4</i>)	B
VII	5 (<i>ccrC</i>)	C1
VIII	4 (<i>ccrA4ccrB4</i>)	A
IX	1 (<i>ccrA1ccrB1</i>)	C2
X	7(<i>ccrA1ccrB6</i>)	C1
XI	8(<i>ccrA1ccrB3</i>)	E

Figura 19. Tipus SCCmec en funció tipus gens *ccr* i complex *mecA*.

La seqüència dels primers i les condicions de PCR utilitzades per la determinació del tipat del SCCmec va ser la descrita per Oliveira *et al* (154).

Un cop vam tenir el subtipus de SCCmec, vàrem fer el subtipat del SCCmec tipus IV. Per realitzar-lo vam utilitzar els primers descrits per Milheiro C et al (154).

Primer	Primer sequence (5'→3')	Primer specificity
<i>ccrB</i> 2 F	CGAACGTAATAACATTGTCTG	<i>ccrB</i> 2 (internal positive control)
<i>ccrB</i> 2 R	TTGGCWATTTTACGATAGCC	
J IVa F	ATAAGAGATCGAACAGAAGC	Type IVa
J IVa R	TGAAGAAATCATGCCTATCG	
J IVb F	TTGCTCATTTTCAGTCTTACC	Types IVb and IVF
J IVb R	TTACTTCAGCTGCATTAAGC	
J IVc F	CCATTGCAAATTTCTCTTCC	Types IVc and IVE
J IVc R	ATAGATTCTACTGCAAGTCC	
J IVd F	TCTCGACTGTTTGCAATAGG	Type IVd
J IVd R	CAATCATCTAGTTGGATACG	
J IVg F	TGATAGTCAAAGTATGGTGG	Type IVg
J IVg R	GAATAATGCAAAGTGAACG	
J IVh F	TTCTCGTTTTTTCTGAACG	Type IVh
J IVh R	CAAACACTGATATTGTGTCTG	

Figura 20 . Subtipat SCCmec IV

Per tal de fer la barreja d'amplificació vam dispensar 2 µl del primer IVa F i IVa R més 1 µl de la resta de primers, amb 2 µl de aigua lliure de nucleases. Un total de 22 µl, al que se'ls va afegir 3 µl del DNA de cada soca. Tot això en un tub de *Pure Tag Ready To Go* amb les següents condicions de PCR; 4 minuts a 94°C, 35 cicles de 30 segons a 94°C, 30 segons a 48°C, 2 minuts a 72°C, per últim una fase de extensió de 4 min a 72°C.

Per la detecció es va preparar un gel agarosa al 2% (100ml de TAE 1X + 2grams de agarosa MS8), es carreguen 7 µl de tampó de càrrega i 10 µl del DNA de cada mostra. Posteriorment tenyíem durant 10 minuts amb bromur d'etidi i es feia la lectura.

Determinació de la presència de l'element genètic mòbil denominat ACME (Arginine Catabolic Mobile Element)

Aquest element és un fragment que es troba situat al gen *orfX*, adjacent al *SCCmec*, codifica una ruta de metabolisme de l'arginina (*arginina deaminasa*) i l'operó *opp-3* (*operon oligopeptide permease*). La seva detecció es va dur a terme mitjançant una PCR que utilitzava cebador amb les següents seqüències:

arcA R, 5'-TGCTAACTTTTCTATTGCTTGAGC-3'

arcA F, 5'- GCAGCAGAATCTATTACTGACC-3'

Per fer la barreja d'amplificació vam utilitzar per cada soca un tub amb la *Pure Tag Ready To Go*[®] amb 2 µl de cada primer, 18 µl d'aigua lliure de nucleases 3 µl de l'extracte de DNA.

Un cop realitzada la Màster Mix es va dur a terme l'amplificació amb les següents condicions de PCR; 5 minuts a 95°C, 10 cicles de 30 segons minut a 94°C, 30 segons a 60°C, 45 segons a 72°C, 25 cicles de 30 segons minut a 94°C, 30 segons a 52°C, 45 segons a 72°C .

Per la detecció es va preparar un gel agarosa al 2% (100ml de TAE 1X + 2grams de agarosa MS8), es carreguen 7µL de tampó de càrrega i 10µL del DNA de cada mostra. Posteriorment teníem durant 10 minuts amb bromur d'etidi i es feia la lectura.

Seqüenciació del gen de la proteïna A (*spa* typing) per la caracterització de *S. aureus* resistents i sensibles a meticil·lina utilitzant BURP anàlisi (based-upon-repeat-pattern)

Reacció d'amplificació

A partir de l'extracte de DNA i per realitzar l'amplificació per PCR de la regió X del gen de la proteïna A, es va utilitzar per cada aïllat un tub *Pure Tag Ready To Go*[®](*Amersham biociences*) que conté un liofilitzat amb les concentracions òptimes de dNTPs, Cl2Mg i polimerasa).

Els primers utilitzats són (77).

spa F 5'- TCA AGC ACC AAA AGA GGA AGA -3'

spa R 5'- GTT TAA CGA CAT GTA CTC CGT TG-3'

Per fer la barreja d'amplificació vam utilitzar per cada soca 1 µl de cada primer, 18 µl d'aigua lliure de nucleases , 20 µl de *Pure Tag Ready To Go*[®] i 5 µl de l'extracte de DNA. Un cop realitzada es va posar al termociclador amb les següents condicions de PCR; 5 minuts a 80°C, 35 cicles de 45 segons minut a 94°C, 45 segons a 60°C, 90 segons a 72°C. Finalment, una fase de extensió de 10 min a 72°C.

Per comprovar que teníem producte amplificat realitzàvem un gel d'agarosa al 2% (100ml de TAE 1X + 2grams de agarosa MS8). Les mostres que mostraven banda, es purificaven per posteriorment fer la reacció de seqüenciació.

Purificació del producte de PCR

Vam afegir en un *epENDORF* 5 µl del producte de PCR i 2 µl de *ExoSAP-IT* (*GE Healthcare Life Science*). Novament els vam introduir al termociclador durant 15 minuts a 37°C per degradar els primers i els nucleòtids que no han quedat units i un segon de 15 minuts a 80°C per inactivar *ExoSAP-IT*.

Reacció de Seqüenciació

La seqüenciació del producte amplificat i per tant de la regió X de la proteïna A de cada mostra es va dur a terme mitjançant un sistema basat en el mètode Sanger i utilitzant el *The BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*[®] (*Applied Biosystems*) que conté la barreja necessària per la reacció. Cada reacció ha d'incloure els primers que hibridin amb els dos extrems i de manera bidireccional amb el fragment a seqüenciar, així es preparaven dues barreges d'amplificació, una barreja *forward* i una *reverse* que contenien; **spa F**: 1 µl primer *spaF*, 6 µl de aigua lliure de nucleases, 2 µl de producte purificat i 1 µl de BigDye, **spa R**: 1 µl primer *spaR*, 6 µl de aigua lliure de nucleases, 2 µl de producte purificat i 1 µl de Big Dye.

Seguidament es van introduir al termociclador i es van sotmetre al programa de seqüenciació que consistia en 25 cicles de desnaturalització de 10 minuts a 96°C, una extensió de 4 minuts a 60°C.

Els productes de la reacció de seqüenciació van ser passats per una columna de Sephadex G-50 per tal de retirar els dideoxiNTPs fluorescents no incorporats, les seqüències es van obtenir mitjançant el seqüenciador del CNM 3130 *Genetic Analyser*[®] (*Applied Biosystems*)

Assignació spa tipus i anàlisi BURP i assignació eBURST

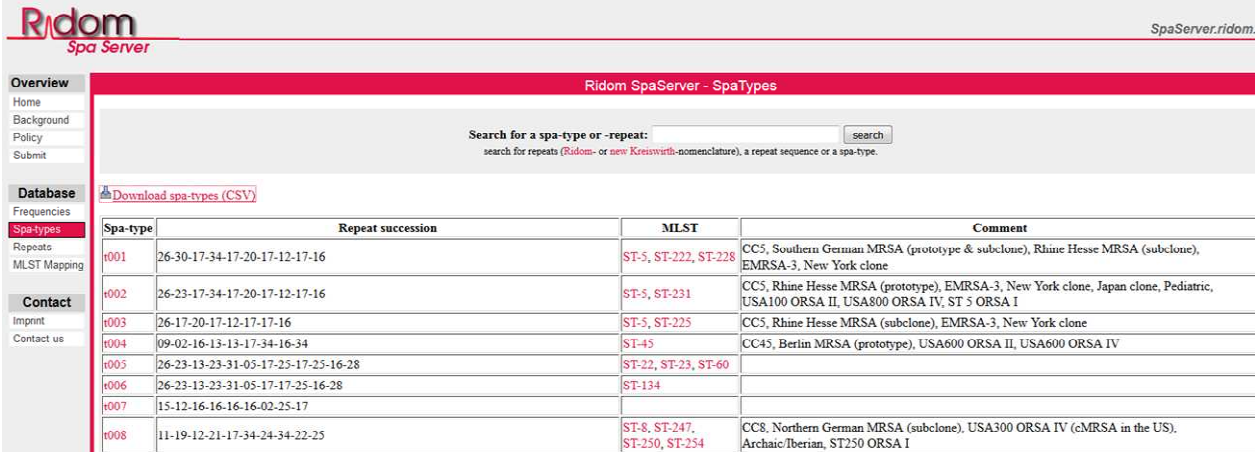
Les seqüències de DNA es van analitzar amb el **StaphType software**[®] (*Ridom*). Aquest construeix una seqüència consens, que automàticament detecta les repeticions spa, els assigna un codi alfanumèric i en funció del perfil de repeticions assigna el **spa** tipus.

Aquelles soques que tenien el mateix *spa* tipus es consideraven indistingibles. Es va utilitzar l'algoritme BURP del **StaphType Software**[®] per classificar-los dins d'un mateix clúster aquell que tenien un *spa*-tipus similar. Així doncs, s'agrupaven dins un mateix clúster aquells que aplicant l'algoritme s'obtenien diferències entre ells menors o igual a 6. Els clústers reben el nom utilitzant les sigles CC (complex clonal) seguit del número corresponent al *spa* tipus de la majoria dels seus components.

Aquells *spa* tipus amb una longitud menor a 5 repeticions quedaven exclosos de l'anàlisi BURP i no s'incorporaven a cap clúster. Quedaven definits com "excluded" aquells que no quedaven representats per un nombre suficient de soques; es denominaven "no founder" i aquells que no presentaven la suficient similitud amb un altre *spa* tipus es denominaven "singletons".

Aquest software ens permetia també realitzar automàticament l'assignació *eBURST* per cada *spa* tipus i ens donava una idea de l'origen filogenètic. Així els *spa* tipus quedaven agrupats en nous *clústers*, també definits amb el CC seguit d'un número.

StaphType software[®] disposa d'una base de dades que mostra quins tipus de ST es corresponen més freqüentment a un *spa* tipus, amb quines altres nomenclatures es veuen reflectits a la literatura i quin és el seu percentatge a nivell mundial o per zones geogràfiques. (Figura 21).



The screenshot shows the Ridom SpaServer interface. At the top, there is a search bar with the text "Search for a spa-type or -repeat:" and a "search" button. Below the search bar, there is a table with the following columns: Spa-type, Repeat succession, MLST, and Comment. The table contains 8 rows of data, each representing a different spa-type (r001 to r008).

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

Figura 21 . Imatge de la web Ridom Spa server. Spa-types

Electroforesi en camp pulsant (PFGE)

Vam realitzar aquesta tècnica de tipificació de les 28 soques de SARM on s'havia confirmat prèviament la presència del gen *mecA* i en les 90 soques SASM.

Preparació dels gels agarosa

A partir d'un cultiu pur i amb una nansa calibrada de 10 µl , es va resuspendre cadascuna de les soques de *S. aureus* en un tub *ependorf* amb 1 ml de *buffer* SE (10mM Tris HCl, 10mM EDTA, 10mM EGTA, 1M ClNa pH7.5).

Per tenir una concentració cel·lular igual per cada soca, es van transferir 0.4ml de cada suspensió inicial a un tub Greiner que contenia 4.6 ml de *buffer* SE.

Posteriorment es mesurava l'absorbància (420nm) de cada suspensió mitjançant un espectrofotòmetre. Amb l'ajuda d'una corba de calibrat estandarditzada es determinava quina era la quantitat que calia afegir, tant de la suspensió bacteriana com de *buffer* TE per tal d'obtenir un volum final de 0.5 ml amb una concentració bacteriana final de 109 ufc/ml.

Seguidament aquests tubs *ependorf* els vam posar durant 5 minuts al bany a 56°C. Posteriorment vam transferir 0.5ml d'agarosa al 1% en *buffer* SE (prèviament fosa a 56°C) a cada *ependorf* i ho barrejàvem varies vegades, fins a comprovar la seva homogeneïtzació.

A partir de cada tub podíem utilitzar 0.5ml per fer tres blocs de agarosa. Aquests els deixàvem a la nevera fins a la seva homogeneïtzació complerta.

Lisi bacteriana

Vam agafar tants tubs *Bijoux* com mostres teníem i vam afegir 1 ml de Solució de lisi bacteriana composta per: 1ml *buffer* pre-lisi (6mM Tris HCl, 100mM EDTA, 1M ClNa, 0.5% Brij 59, 0.2% Deoxicolat sòdic, 0.5% Lauril Sarcosil, pH7.5), 1.5µl de Lisostafina 20 U/µl i 500 µgr de Lisozima 44700U/mg de proteïna.

Amb l'ajut d'una nansa es van alliberar els tres blocs d'agarosa del motllo i es van introduir dins el tub *Bijoux* amb 1ml de la solució de lisi, mantenint-se a 37°C durant tota la nit.

Al dia següent es va eliminar la solució de lisi amb una pipeta Pasteur i es va afegir la solució de proteòlisi, preparada amb; 1 ml de *buffer* lisi (0.5 mM EDTA, 20mM EGTA, 1% Lauril Sarcosil pH9) i 1.5 µl de proteïnasa K 50mg/ml.

Aquests tubs es van incubar al bany a 56°C durant tota la nit. Al dia següent es va eliminar la solució de proteòlisi i es van realitzar quatre rentats amb *buffer* TE (10mM Tris HCl, 0.1M EDTA, pH7.5), deixant-se entre cada rentat 30 minuts a 4°C.

Un cop rentats, aquests blocs es podien quedar a 4°C, fins un període màxim de 6 mesos, canviant el *buffer* TE cada mes.

Digestió

Per començar la digestió vam fer servir un bloc d'agarosa per cada mostra. En una placa de petri vam tallar la meitat del bloc i el vam introduir dins d'un *ependorf* amb 100 µl de solució d'estabilització (10% *buffer* Y amb BSA en aigua lliure de nucleases), deixant incubar 30 minuts a 4°C. Posteriorment eliminàvem la solució per tal d'afegir 100µl de solució de digestió, constituïda per : 10% *buffer* Y, 4% SmaI 10U/ µl en aigua lliure de nucleases i ho incubàvem durant 3 hores en un termobloc a 30°C. Passat aquest període, es van afegir 100 µl de *buffer* TE a cada *ependorf* per tal de detenir l'activitat enzimàtica.

Electroforesi

En un primer pas vam preparar el gel d'agarosa al 1% en *buffer* TBE 0.5x (45mM Tris, 45mM Àc bòric, 1 mM EDTA; pH8.4). Així en 150 ml *Buffer* TBE 0,5x vam afegir 1,8 gr agarosa PFG. Utilitzant una pinta en aquest cas de 30 pouets i un marcador de pes molecular a ambdós extrems del gel.

Cada meitat de bloc es va posar a un dels pouets fet a l'agarosa. A la part inferior, adherit al gel. Posteriorment es va omplir el que quedava dels pouets amb l'agarosa utilitzada per fer el gel.

El gel es va submergir a la cubeta de l'aparell de camp polsant denominat CHEF-DRIII (*BioRad*), prèviament en aquest s'havien afegit dos litres de *Buffer* TBE 0,5x. Les condicions d'electroforesi serien; temperatura de 12°C, gradient de voltatge de 6V/cm i dos blocs de polsos. El primer bloc de 10 hores amb polsos de 5 a 15 segons i el segon bloc de 13 hores amb polsos de 15-60 segons.

Tinció del gel

Un cop acabada l'electroforesi, es va retirar de la cubeta i es va submergir el gel en una solució de bromur d'etidi, en la foscor durant una hora, sense agitació. Posteriorment vam eliminar el bromur i afegint aigua destil·lada es va deixar amb agitació durant dues hores.

Un cop passat aquest temps es va col·locar el gel al lector Gel-Doc XR i es va visualitzar mitjançant llum ultraviolada.

El patró de bandes es va analitzar comparant-lo amb els patrons de la llibreria de soques de la Unitat de Infeccions Intrahospitalàries del Centre Nacional de Microbiologia. (Figura 22).

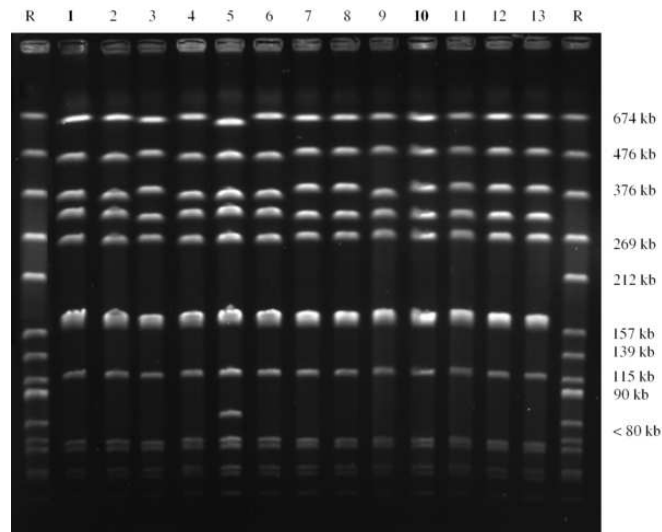


Figura 22 . Patró de bandes obtingut mitjançant PFGE

Tipificació molecular mitjançant microarrays. *StaphyType* kit de Clondiag Chip Technologies

A partir de la soca congelada a -20°C, es va realitzar una sembra en agar sang i després d'una incubació a 37°C amb 5%CO₂ durant 18-24 hores es va realitzar la tipificació genotípica (gens de resistència i factors de virulència) i la tipificació molecular, mitjançant la plataforma de microarrays *StaphyType* kit de Clondiag Chip Technologies.

La versió del kit utilitzada en aquell moment contenia 334 sondes que corresponen a 185 gens i les seves variants al·lèliques. Permet la detecció de gens que codifiquen per marcadors d'espècie, determinants de resistència, exotoxines, superantígens, proteïnes d'adhesió, tipus capsulars, gens reguladors com els diferents tipus de *agr* i factors de virulència que actuen evadint la immunitat

innata. Per un altre banda, la tècnica també permet determinar el tipus de *SCCmec* i en un elevat nombre de soques, el CC al que pertany la soca estudiada.

El protocol de la tècnica es va realitzar segons instruccions del fabricant i seguint els següents passos: En una primera fase es va realitzar l'**extracció de DNA**.

Prèviament, a partir d'una sola colònia de *S. aureus* es va fer un pretractament mitjançant un *Cell Lysis buffer*, seguint el següent protocol; agafant un *eppendorf* A2 proporcionat pel propi kit per cada soca, es reconstituïa el liofilitzat amb 200 µl de la solució A1, un cop feta la barreja s'afegia un "loop" (nansa 10µl) de la soca. Aquest tubs s'incubaven durant 60 minuts a 37°C en agitació (550rpm), posteriorment s'afegien 25 µl de *proteinasaK* i 200 µl de solució AL i s'incubaven durant 60 minuts a 56°C en agitació (550rpm).

A partir d'aquest pas es va seguir el protocol d'**extracció** descrit al manual del **DNAeasy Blood&Tissue Kit de Qiagen** i que segueix els següents passos; s'afegia a cada *eppendorf* 200 µl d'etanol absolut, es vortejava i es feia un spin. Es passava tot el volum per la columna d'extracció i es centrifugava 1' a 6000G, posteriorment tiràvem el tub col·lector amb l'eluit i se'n posava un de nou, afegíem 500 µl de la solució A1 i centrifugàvem 1' a 6000G, tornant a canviar el col·lector i s'afegien 500 µl de solució A2 i centrifugant 3' a 20000G. Finalment canviant el col·lector de nou s'afegien 50 µl de solució AE i es deixava durant 5 minuts a temperatura ambient. Posteriorment fèiem una última centrifugació de 1' a 6000 G, obtenint l'eluit de la mostra.

A partir del DNA extret es realitzava la **reacció d'amplificació** mitjançant una PCR lineal marcada amb biotina-dUTP.

Per a la preparació de la barreja d'amplificació s'afegien 4,9 µl del reactiu B1+ 0,1 µl del reactiu B2 per cada mostra i finalment 5 µl del DNA extret de cada soca, amb un volum final de 10 µl.

Les condicions de PCR eren les següents: pre-escalfar la tapa del termociclador a 105°C, 1 cicle de 5 min a 96°C, 45 cicles de 20 segons a 50°C, 30 segons a 72°C, 20 segons a 96°C.

Un cop amplificat el DNA es va realitzar **la fase d'hibridació**, per tal de transferir-lo a la membrana del microarray, on el producte d'amplificació podia unir-se amb les sondes específiques per cada un dels determinants a detectar.

Aquesta fase també consta de diferents passos dividits en; *pre-washing* o fase de rentats de les tires de pouets on es troba la matriu del microarray, mitjançant aigua ultrapura. Després de quatre rentats s'afegien 100 µl de *buffer* C1 i s'incubava al termoagitador *thermomixer* durant 2 minuts a 55°C a 550 rpm, descartant-lo posteriorment.

Entretant, preparàvem les mostres, afegint 90 µl de *buffer* C1 a cada un dels tubs *eppendorf* que contenien els 10 µl de la barreja d'amplificació.

Per a realitzar **el procés d'hibridació** es transferia la barreja d'amplificació (90 µl C1+10 µl producte PCR) a cada pouet amb la matriu, tapant-lo seguidament. S'incubava durant 1 hora a 55°C i 550rpm.

Posteriorment es descartava el *buffer* C1 i s'afegien 200 µl de *buffer* C2, es realitzaven 4 rentats i es descartava finalment tant el *buffer* C2 com les restes de DNA que es podia haver unit de manera inespecífica.

Per tal de fer la detecció del producte d'hibridació, s'afegia una barreja de conjugat d'estreptavidina peroxidasa que s'incubava en contacte amb la membrana del microarray. Aquest conjugat s'unia a través de l'estreptavidina a la biotina present als productes amplificats, que a la vegada estaven units a les sondes. L'activitat de la peroxidasa provocava l'aparició d'un producte insoluble que precipitava a les zones de l'array on s'havia produït l'hibridació.

La **lectura i interpretació** de la lectura es va realitzar mitjançant l'aparell *Array Mate* (Alere, Jena, Alemanya). Aquesta mesura la llum transmesa i d'aquesta manera detecta i quantifica el precipitat que s'ha format en hibridar el DNA amb les sondes específiques.

Posteriorment es captura la imatge de la membrana del microarray. A continuació i gràcies a un software específic proporcionat pel fabricant es feia la interpretació dels resultats, comparant-los amb la lectura dels controls i els marcadors d'espècie. Un cop interpretats els resultats s'emetia un informe amb la relació dels gens estudiats.

Estudis fenotípics d'alguns factors de virulència

1. Detecció de l'expressió de l'hemolisina α .

La α toxina, també denominada hemolisina α està codificada pel gen *hla* i s'ha descrit l'associació entre els nivells d'expressió i diferents CC de *S.aureus* (197). L'expressió d'aquesta toxina està regulada pel sistema *agr* i *saeR/S*. El gen *hla* està present en totes les soques i clones de *S.aureus*, per tant és la detecció de la seva expressió, mitjançant la producció de hemolisina α la que es relaciona amb la severitat de les manifestacions clíniques, tal i com es mostra en estudis en models animals per detecció directament de la proteïna *hla* (198, 199). Per aquesta raó, s'ha desenvolupat un assaig basat en una reacció antígen-anticòs que permet determinar la concentració d'alfa hemolisina alliberada pel microorganisme (197). Es van desenvolupar un conjunt d'anticossos monoclonals enfront diferents epítops de la hemolisina α . Es va utilitzar una toxina α (HT101; Toxina Tecnologia, Sarasota, Florida, E.E.U.U) procedent d'una soca de *S.aureus* Wood 46 (CC97 MSSA) que va ser exposada a diferents fags. Un cop obtinguts els anticossos enfront aquesta toxina es va seguir el mateix procediment de purificació que en desenvolupament de la tècnica per la detecció de PVL (200). En el disseny de l'array de proteïnes, es van escollir 3 tipus d'anticossos a 9 concentracions diferents, i posteriorment es van immobilitzar a la matriu de l'array, de tal manera que ens va permetre detectar quantitativament la concentració d'hemolisina α produïda per *S.aureus*. Per

d'altra banda, el perfil de β -hemòlisi produït per les soques també s'ha relacionat amb l'activitat de l'hemolisina α (201).

2. Estudi de la funcionalitat de l'operó *agr*.

En el context del Projecte FIS, **PI13/01418** (*Caracterització del cicle de vida intracel·lular de Staphylococcus aureus. Implicacions en l'evolució i el tractament de les infeccions estafilocòcciques*) i en el context dels estudis de doctorat de Meissiner Gomes Fernandes: Doutorado no exterior na/o UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA "Ministério da Educação-Coordenação de a perfeçoamento de Pessoal de Nivel Superior-CAPEs", en relació a l'estudi de l'expressió d'alguns factors de virulència mitjançant tests fenotípics, algunes soques de *S.aureus* procedents de malalts amb bacterièmia es van incloure en els assajos de funcionalitat del sistema regulador *accessory gene regulator (agr)*. L'operó *agr* és un dels sistemes de "Two components regulatory systems" que coordina entre d'altres l'expressió de certs factors de virulència com la δ hemolisina, que es troba codificada a la molècula RNAIII, que es la molècula efectora de l'operó (202). S'han descrit 4 variants al·lèliques de l'operó: I a IV, i s'ha proposat una correlació amb la severitat (203). La δ hemolisina, es una toxina de la família de les PSMs tipus α , i té amb una important activitat quimiotàctica, proinflamatòria i leucocitolítica (204). Igual que la majoria de les PSMs està present en totes les soques de *S.aureus*, perquè es troba codificada al genoma core (34). La disfunció del sistema *agr* s'ha relacionat amb la persistència bacteriana i la disminució de la sensibilitat a glicopèptids (205). Alguns estudis també han implicat aquesta disfunció en un augment de la mortalitat dels pacients amb bacterièmia (206, 207). S'han desenvolupat tests fenotípics que permeten valorar l'expressió de δ hemolisina i per tant de forma indirecta valorar la funcionalitat del *agr*, com son: **test *agr* CAMP assay** (208) i el **Test de lisis de vesícules** (209).

*Test *agr* CAMP assay*

Mètode fenotípic que utilitza la producció de δ hemolisina per valorar l'activitat de l'operó *agr*. Aquest assaig consisteix en enfrontar la soca problema amb la soca ***S. aureus* RN4220**, productora d'una gran β hemòlisi. L'observació d'una sinèrgia entre l'hemòlisi de la soca problema i la de **RN4220**, ens indica un *agr* funcional. La disfunció de l'operó es definirà com l'absència d'aquesta sinèrgia (figura 23). Per tal de donar un resultat final, es va determinar l'existència o no d'hemòlisi mitjançant la interpretació per tres observadors diferents (208).

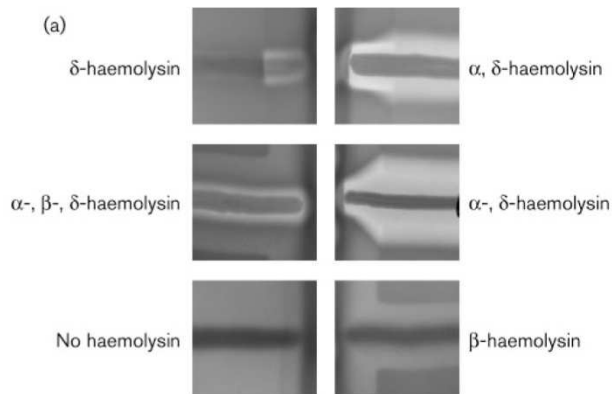


Figura 23 . Microbiology 2008_Traber_agr function in clinical *Saureus* isolates-3

Test de lisis de vesícules (VLT)

Es van preparar cultius bacterians *over night* per les diferents soques a testar en medi líquid (Tryptic Soy Broth). Posteriorment es van centrifugar i es van recuperar els sobrenadants. Donat que la metodologia es va realitzar a la University of Bath (Department of Biology & Biochemistry) es van liofilitzar els sobrenadants obtinguts. Posteriorment es van resuspendre en 500 µl de aigua d'alt pes molecular; i d'aquesta suspensió es van agafar 50 µl i es van incubar amb 50 µl de les vesícules fosfolipídiques marcades amb fluoresceïna, que ja estaven preparades prèviament (209). La intensitat de la fluorescència emesa ens indicava que hi havia presència de δ hemolisina als sobrenadants, per tant que hi havia lisi de les vesícules marcades i per tant que l'operó *agr* era funcional.

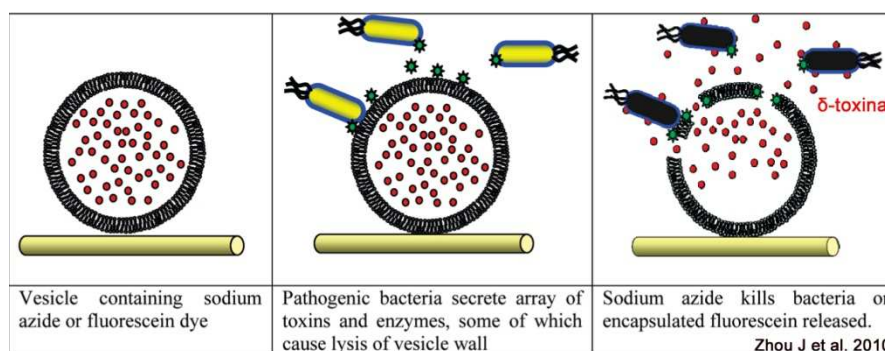


Figura 24. Vesícules fosfolipídiques marcades amb fluoresceïna. Zhou J *et al.* 2010

Avaluació de diferents mètodes ràpids de identificació i determinació de la sensibilitat antibiòtica de *S. aureus* directament de l'hemocultiu positiu.

L'augment de la freqüència de bacterièmies i el manteniment de les xifres de mortalitat es relaciona amb la susceptibilitat de l'hostatger, característiques específiques de la soca, característiques epidemiològiques i també amb el temps transcorregut fins a l'inici d'un tractament antibiòtic adequat.

En aquest últim punt la supervivència del pacient amb una bacterièmia per SASM o SARM depèn d'un diagnòstic etiològic precoç que permeti instaurar el tractament correcte en les etapes inicials del procés.

Així doncs, l'objectiu d'aquesta avaluació va ser:

Avaluar la fiabilitat de tres mètodes de diagnòstic ràpid per la identificació i la determinació de la sensibilitat a la cloxacil·lina, directament de l'hemocultiu positiu.

L'aplicació d'aquests mètodes en un laboratori de Microbiologia Clínica hauria d'afavorir la instauració precoç del tractament antibiòtic d'elecció, la detecció precoç de l'aparició de complicacions i accelerar l'aplicació de les mesures d'aïllament de contacte per SARM, contribuint tot això a la reducció de la morbi-mortalitat de les bacterièmies per *S. aureus*.

Selecció de pacients i recollida de mostres

El període d'estudi va ser de l'1 de Novembre del 2011 a l'1 Maig del 2012. Durant aquest període, tots els hemocultius que arribaven eren incubats al sistema automàtic *BacTAlert automatic blood culture system* (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) tal com es fa de manera rutinària.

Si l'hemocultiu era positiu es realitzava una tinció de gram. Quan en aquesta tinció observàvem cocs grampositius amb morfologia d'estafilococ, aquest s'inclouïa a l'estudi si sospitàvem que es tractava de *S. aureus* (210) amb significació clínica. També es van incloure alguns estafilococs coagulasa negativa (CNS), per tal d'avaluar l'especificitat de les tècniques de detecció ràpida.

En tots aquest hemocultius vàrem realitzar les tècniques d'identificació i determinació de la sensibilitat rutinàries i que s'han detallat en l'apartat anterior.

A més, paral·lelament es van realitzar les tres tècniques de diagnòstic ràpid. Per tal de realitzar la validació clínica, es van recollir de manera prospectiva les dades dels tractaments antibiòtics empírics dels malalts amb bacterièmia per *S. aureus* prèviament a rebre la informació microbiològica. Posteriorment es va comprovar l'actitud clínica que es derivava de la transmissió de l'identificació i sensibilitat, en base als resultats microbiològics.

Les tres tècniques avaluades van ser les següents: *Binax Now S. aureus/MRSA PBP2a* (Alere, Boston, USA), *GenomEra MRSA/SA* (Abacus Diagnostica Oy, Finland) i *MicroPhage MRSA/MSSA* (Alere, Boston, USA). El seu procediment es descriu a continuació:

Binax Now *S. aureus*/MRSA PBP2a (Alere, Boston, USA).

Binax Now *S. aureus* és un assaig in vitro mitjançant una tècnica immunocromatogràfica, que utilitza anticossos policlonals per detectar qualitativament una proteïna específica de *S. aureus* directament dels flascons d'hemocultiu.

El test es va realitzar d'acord a les instruccions del fabricant i seguint els següents passos:

A partir d'1 ml de la sang del flascó d'hemocultiu s'afegia 1 ml de la solució de lisi A. El tub es va agitar amb el vòrtex per barrejar bé i es va centrifugar durant 5 min a 1500 g, el sobrenedant es va aspirar sense tocar el sediment i es va descartar.

Seguidament, es va tornar a afegir reactiu A i després d'una nova centrifugació i un cop retirat el sobrenedant, es van dispensar cinc gotes del reactiu B (agent neutralitzant). A aquesta barreja es van afegir 25 µl de reactiu C (agent de membrana de lisi bacteriana), tornant a vortejar. Aquesta solució es va deixar incubar durant 5 minuts a temperatura ambient.

Transcorregut aquest temps, 50 µl del sobrenedant es van agafar i dipositar a la part mitja del coixinet, situat a la part superior dreta de la targeta de prova del dispositiu. Quatre gotes del reactiu D (solució de compensació) es va afegir a la part superior esquerra del dispositiu i 1 gota del reactiu D part superior dreta.

La targeta es va tancar, es va segellar, i es va deixar a temperatura ambient durant 10 minuts, moment en què va ser llegit.

Només una línia de control blau que es converteix en color rosa ens indicava una mostra negativa. Si pel contrari, es mostraven dues línees de color rosa, una corresponent al control i una altra en l'indicador sample, ens indicava un resultat positiu per *S. aureus*. Si la línia de control blava no canvia de color, la prova no es considerava vàlida.

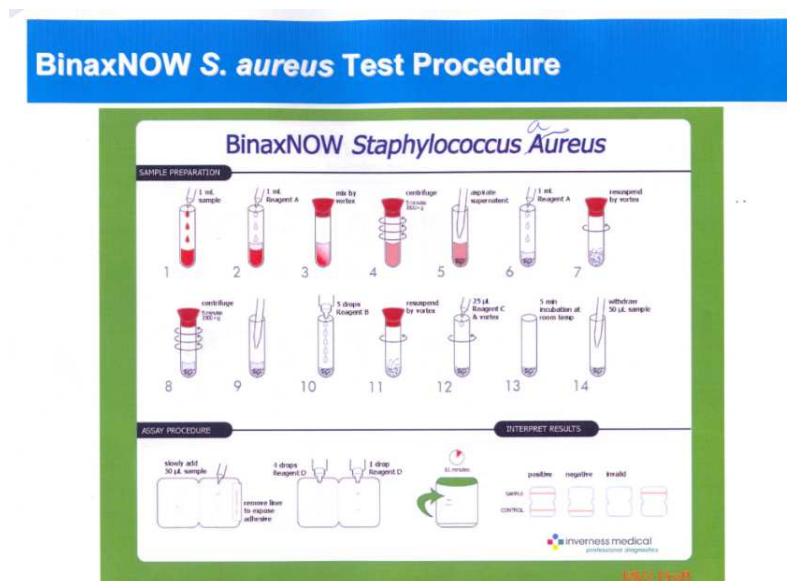


Figura 25. Metodologia de l'assaig Binax Now *S. aureus*



Figura 26. Dispositiu Binax Now *S. aureus* i localització del coixinet de dispensació de la mostra.

Quan obteníem un resultat positiu per *S. aureus* en el test Binax Now *S. aureus*, es realitzava la detecció de la resistència a la cloxacil·lina mitjançant el test Binax Now PBP2a.

Aquest també és un assaig de membrana immunocromatogràfica. En aquest cas utilitza anticossos monoclonals altament sensibles, per detectar la proteïna PBP2a directament del flascó de l'hemocultiu.

Per tal de realitzar aquesta assaig seguïem les instruccions del fabricant, tal com mostra la figura 27.

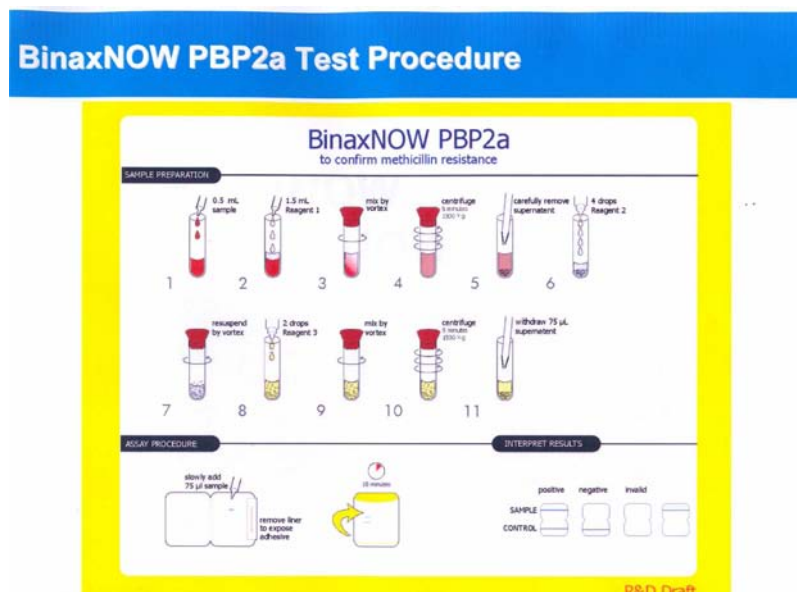


Figura 27. Metodologia de l'assaig Binax Now PBP2a

A partir d'1 ml de la sang del flascó d'hemocultiu s'afegeix 1.5ml de la solució 1. El tub es va agitar amb el vòrtex per barrejar bé i es va centrifugar durant 5 min a 1500 g, el sobrenedant es va aspirar sense tocar el sediment i es va descartar.

Seguidament, es van dispensar quatre gotes del reactiu 2. A aquesta barreja es van afegir 3 gotes de reactiu 3, tornant a vortejar i centrifugar durant 5 min a 1500 g. Un cop centrifugat vam agafar 75 µl del sobrenedant i es van dipositar a la part mitja del coixinet, situat a la part superior dreta de la targeta de prova del dispositiu, es va tancar seguidament i després de 10 minuts es va fer la lectura.

Només una línia de control blau que es converteix en color rosa ens indicava una mostra sensible. Si pel contrari, es mostraven dues línees de color rosa, una corresponent al control i una altra en l'indicador PBP2a ens indicava un resultat positiu per *S. aureus* SARM. Si la línia de control blava no canvia de color, la prova no és considerada vàlida.

MicroPhage MRSA/MSSA (Alere, Boston, USA)

MicroPhage MRSA/MSSA utilitza una bateria de bacteriòfags específics de *S. aureus* capaços d'infectar i reproduir-se a nivell cel·lular fins a provocar la seva lisi.

L'augment de la concentració d'anticossos específics enfront aquests bacteriòfags es pot detectar en el dispositiu d'immunoassaig del mateix kit. La detecció en presència o absència de cefoxitina indicarà la presència d'una soca SASM o SARM. (Figura 28)

Així, a partir d'un hemocultiu positiu agafàvem 10 µl i es dispensaven en el tub identificat com "ID", on trobàvem la barreja dels bacteriòfags i el medi de cultiu. Uns altres 10 µl es van dispensar en el tub identificat "RS" on trobàvem els bacteriòfags, el medi de cultiu i la cefoxitina.

Els tubs es van incubar a 35°C durant 5 hores (± 20 minuts). Durant aquest temps els bacteriòfags repliquen ràpidament i causen la lisi cel·lular, incrementant d'aquesta manera la seva concentració en el medi.

Passat aquest període de temps, es va dispensar el contingut dels tubs "ID" i "RS" en els pouets corresponents del dispositiu detector. Una reacció positiva, demostrada per l'aparició d'una línia en els pouets "ID" i "RS" ens indicava la presència de SARM. Si pel contrari només observàvem l'aparició de la línia en el pouet "ID" estàvem davant d'una soca SASM.



Figura 28. Dispositiu detector MicroPhage MRSA/MSSA

GenomEra MRSA/SA (Abacus Diagnostica Oy, Finland)

GenomEra MRSA/SA és un assaig basat en la detecció mitjançant amplificació genètica de dues dianes; una seqüència altament conservada i específica de *S. aureus* (SA) i una seqüència dins el gen *mecA*, que codifica per la resistència a meticil·lina. Aquesta plataforma està dissenyada per la

detecció de SARM i SASM a partir de diferents tipus de mostres, també validada per l'screenig a partir d'hemocultiu positiu.

Aquest assaig es duu a terme en dispositius individuals o chips. Aquests contenen liofilitzats tots els reactius necessaris per la reacció d'amplificació, incloent la polimerasa i un control intern d'amplificació. Aquest control intern és un DNA creat experimentalment que permet detectar la presència d'inhibidors i la conservació correcta dels reactius liofilitzats. El fons metàl·lic dels chips assegura una eficient transmissió de la temperatura del termociclador a cada una de les mostres per tal d'assegurar la reacció de PCR i per tant, disminuir el temps necessari per l'amplificació.

La detecció dels productes d'amplificació es fa mitjançant un mètode d'hibridació competitiva amb dues sondes d'oligonucleòtids complementàries. Una d'elles amb dos marcadors fluorescents, un pel gen *mecA* i un altre per la seqüència específica *S. aureus*. L'altre sonda conté una molècula quencher. La medició de la fluorescència es fa en dues fases i en dues temperatures, la primera quan les sondes es troben desnaturalitzades i la segona quan la sonda específica es troba unida a la diana. La relació entre les dues mesures de fluorescència, realitzades a dues temperatures, serà interpretada pel software del fabricant i ens proporcionarà un resultat presentat com: +MRSA positive, +SA positive, -negative, MRCONS-positive amb valors numèrics de -15(negatiu) a 100 (positiu) tant per SA com per *mecA*. Valors entre -5 i 5 seran informants com "no concloents", és a dir, per sota del nivell de detecció de l'assaig.

Per la realització de la tècnica a partir de l'hemocultiu varem agafar directament del flascó d'hemocultiu 25 µl que es van diluir en 1mL del GenomEra Sample *buffer*. Un cop feta la barreja vam agafar 35µl i els vam afegir mitjançant pipeteig invers al Chip. Un cop la mostra estava dispensada, es segellava el chip i ja estava preparat per introduir al termociclador. (Figura 29) El resultat el vam obtenir 50 minuts després.



Figura 29. Seqüència de preparació de la detecció de SA i gen *mecA* mitjançant GenomEra MRSA/SA.

Objectiu 2. Estudi de l'epidemiologia i aspectes clínics de la infecció de pell i parts toves per *Staphylococcus aureus* a la població pediàtrica

Selecció de pacients i recollida de mostres

Estudi prospectiu realitzat de Gener de 2008 a Maig del 2011, en el que es van incloure tots aquells pacients menors de 18 anys amb una infecció de pells o parts toves (IPPT), osteomielitis o infeccions articulars amb cultiu positiu per *S. aureus* d'origen comunitari (CA-SARM).

Durant un segon període de recollida que va anar del Març al Juny del 2015 i en el context d'un estudi multicèntric europeu (nom), es van recollir 32 soques de *S. aureus* (SASM i SARM) que corresponien a pacients nens i adults amb infeccions de pells i parts toves que consultaven al servei d'urgències.

Es va considerar un CA-SARM tots aquells aïllaments que procedien de nens sense factors predisponents a tenir infeccions relacionades amb l'àmbit sanitari, hospitalitzacions prèvies o antecedents de procediments quirúrgics.

Alhora es van recollir dades demogràfiques i clíniques com; edat, origen, antecedents de viatge previ, sexe, malaltia de base, presentació clínica, localització de la lesió, drenatge de la lesió, antibioteràpia prèvia o necessitat d'hospitalització.

Des del punt de vista clínic, vam definir els diferents tipus de infecció cutània;

Furunculosis/Fol·liculitis, lesió inflamatòria papulo-nodular de < 2 cm de diàmetre, amb col·lecció central de pus que apareix sobre pell prèviament sana. Si aquesta afecta al fol·licle pilós es denomina fol·liculitis.

Cel·lulitis, placa inflamatòria extensa de límits mal definits, a aquesta pot afegir-se alguns punts de supuració, presenta bona evolució només amb tractament antibiòtic.

Abscés, lesió inflamatòria de >2cm de diàmetre, amb col·lecció central de pus que apareix sobre pell prèviament sana no pilosa. Aquesta pot requerir de drenatge.

Osteomielitis, infecció de l'ós que dona lloc a la destrucció inflamatòria, la necrosi òssia i la posterior formació d'os nou.

Estudis identificació i sensibilitat antibiòtica

Totes les soques de *S. aureus* aïllades eren identificades pels mètodes estandarditzats i utilitzats de rutina al laboratori. Així, un cop teníem la soca i a partir d'una colònia aïllada del microorganisme, vam realitzar la determinació de la coagulasa lligada o *clumping factor*, mitjançant aglutinació, utilitzant partícules de làtex sensibilitzades amb fibrinogen humà, un anticòs monoclonal enfront la proteïna A i polisacàrids capsulars.

Per cada soca es va determinar la sensibilitat antibiòtica mitjançant el mètode de disc difusió , realitzant la interpretació dels halos d'inhibició seguint els criteris del *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*.

Els antibiòtics testats van ser els següents; penicil·lina, oxacil·lina, cefoxitina, gentamicina, ciprofloxacina, eritromicina, clindamicina, vancomicina, àcid fusídic, rifampicina, mupirocina i trimetoprim/sulfametoxazol.

Quan els resultats de sensibilitat a macròlids i lincosamides obtinguts per microdilució, mostraven que la soca era resistent a eritromicina i sensible a clindamicina, es va comprovar mitjançant el mètode D-test la possible existència d'un fenotip MLSB induïble a clindamicina, seguint la metodologia descrita prèviament.

En els casos en els que es va trobar una resistència a la mupirocina per Disc Difusió, es va realitzar la determinació de la sensibilitat mitjançant la tècnica de Epsilon Test (E-test, AB biodisk, Solna, Sweden). La heteroresistència a glicopèptids es va estudiar mitjançant un *screening* en un *brain-heart infusion agar* que contenia vancomicina a una concentració de 4 mg/l.

Un cop realitzades aquestes proves d'identificació i detecció del patró de resistència fenotípic, les soques estudiades es congelaven a -20°C, pel posterior tipatge mol·lecular.

Tipificació mol·lecular mitjançant microarrays. StaphyType kit de Clondiag Chip Technologies

A partir de la soca congelada a -20°C, es va realitzar una sembra en agar sang i després d'una incubació a 37°C amb 5%CO₂ durant 18-24 hores es va realitzar la tipificació genotípica (gens de resistència i factors de virulència) i la tipificació molecular, mitjançant la plataforma de microarrays *StaphyType kit de Clondiag Chip Technologies* i seguint el mateix protocol detallat en el capítol anterior.

Determinació de la Leucocidina de Panton Valentine (PVL) mitjançant Lateral Flow Assay

La presència de la PVL també va ser mesurada mitjançant un assaig fenotípic ràpid descrit per Monecke *et al* (200).

Aquest assaig es va desenvolupar a partir de la generació d'un conjunt d'anticossos monoclonals enfront la PVL , utilitzant una recombinació del seu component F mitjançant l'exposició a diferents fags. Un cop obtinguts aquests anticossos i sobreexpressats en *E. coli* es va fer un procés de purificació. Posteriorment es van caracteritzar, inicialment per ELISA i en segon lloc dipositant-se en diferents dilucions en una matriu de microarrays de proteïnes.

Per tal d'escollir quina era la combinació d'anticossos òptima, es van seleccionar cinc concentracions diferents de cadascun dels onze anticossos generats . Aquestes matrius de microarrays van ser testades amb diferents aïllats coneguts que van ser utilitzats com antígens; una recombinació del

component F de la PVL, PVL procedents d'una soca CC30-MSSA/ ATCC25923 a dues concentracions diferents i una leucocidina bovina procedent d'un aïllament CC151/705

Pel disseny de l'assaig immunocromatogràfic de membrana es van utilitzar les dues combinacions d'anticossos monoclonals més sensibles, escollides a partir de l'assaig anterior. Una d'elles es va utilitzar com antigen de captura a la tira de reacció i la segona que va ser marcada es va posar en el tub de reacció.

Així, aquest dispositiu de reacció, denominat **Dipstik** està format per una tira de reacció, un tub de reacció i un *buffer* d'extracció. En la tira de reacció tenim immobilitzats, el conjunt d'anticòs de captura i una proteïna control no relacionada amb *S. aureus*, que donaran lloc a dues línies de resultats diferents. El tub de reacció conté el liofilitzat dels anticossos monoclonals marcats i una proteïna control. Paral·lelament es va fer una altre presentació de l'assaig en format **Card**.

Les soques de *S. aureus* procedents de les IPPT recollides al nostre centre, van ser enviades en torundes amb medi de transport al Institute for Medical Microbiology and Hygiene (Technical University of Dresden, Dresden, Germany) i es van incloure en el pool de soques procedents d'aïllats clínics utilitzades per validar aquests assajos.

A partir de la torunda es va realitzar la sembra en un medi agar sang i després de 18-24 hores incubació es va realitzar la determinació de la PVL utilitzant les dues presentacions d'aquest mètode immunocromatogràfic.

Així, en un primer pas s'afegien 280 µl del reactiu d'extracció al tub de reacció, a continuació s'inoculava un loop (10 µl aproximadament) del *S. aureus* prèviament crescut s'afegia al tub de reacció, la tira de reacció s'introduïa en aquest tub on estava la solució de microorganisme i el conjugat. La lectura es realitzava passats 10 minuts, la presència o absència de una línia rosa, dues bandes (línia PVL i línia control) ens indica un resultat positiu, una sola única línia control ens indica un resultat negatiu.

Objectiu 1. Estudi de l'epidemiologia, diagnòstic i aspectes clínics de la bacterièmia per *Staphylococcus aureus*

Estudi dels factors de virulència i tipificació molecular de les soques causants de bacterièmia per *S. aureus* de diferents orígens

Durant el període d'estudi d'aquest objectiu es van recollir un total de 293 bacterièmies documentades per *S.aureus*. Tot i que es van recollir les dades clíniques de totes elles, es van caracteritzar genotípicament 118 soques.

En l'estudi dels diferents factors de virulència, el fagotipat i les tècniques de tipificació molecular es van obtenir els resultats següents.

Tipificació fenotípica mitjançant Fagotipia

Es va realitzar la fagotipia de les 118 soques.

En el cas de les soques resistents a la meticilina (SARM), només 10 de les 28 soques tipades, un 35.7% van poder ser englobades dins d'un dels fagotips (taula 1).

Fagogrup					Fagotipia inversa					RTD					Fagotipia
I	II	95	III	V	I	II	95	III	V	II	95	III	81	V	
	55		54/75/83A/84												II/III 100RTD
			NT												NT
			NT												NT
			NT												NT
							1030+W57+								NT
			54/75/84												III 100RTD
			NT		52A			6/47/84							NT
			NT					W57+							NT
			NT					6/47/84							NT
			NT					6/47/84							NT
	55		54/75/83A/84									75/77/84			III RTD
			NT					47							NT
			NT					6/42/47/84							NT
			NT					47/84							NT
29/52A		95	42E/47/75/77/83A/84									47/83A			III RTD
			NT					W57							NT
			54/84									84			III RTD
52A		95													I/95 100RTD
52A		95									95				95 RTD
	71		54												II/III 100RTD
			NT					6/47/84							NT
29															I 100RTD
			NT		52A			6/42E/47/53/54/77/83A/84							NT
			NT		52A			6/42E/47/53/54/77/83A/84							NT
			54/83A									83A			III RTD
			NT		52A			6/42E/47/53/54/77/83A/84							NT
	NT				52A			6/42E/47/54/77/83A/84							NT
								52A76/47							NT
	NT				52A			6/47/54							NT

Taula 1. Resultats perfils de lisi soques SARM i resultat fagotipia SARM.

Els resultats dels aïllats SARM mostraven la presència de 5 fagotips diferents, entre els que el tipus III amb 5 aïllats i el Mixte (II/III) eren els més freqüents.

En el cas de les 90 soques SASM, el resultat desglossat per tècniques es detalla a les taules 2 i 3.

Fagogrupos						Inversa						Fagotipia
I	II	95	III	81	V	I	II	95	III	81	V	Fagotipia
	NT											NT
	NT											NT
29/80			6									Mixto RTD
	NT						6/47					NT
	NT						3A/3C					NT
	NT								47/54			NT
	NT								47			NT
	NT								47			NT
	NT								47			95 RTD
	NT								47			NT
					94/96							94/96 100RTD
	NT							95				NT
	NT						3A/3C					NT
			77									III 100RTD
	55/71											II 100RTD
	NT								47			NT
29/52/79/80												I RTD
		95										95 100RTD
	NT					79			47			NT
			53/77									III 100RTD
	NT								6/47			NT
			53/77									III 100RTD
29/52/52A/79/80		95	47/53/54/75/77/83A/84/85									Mixto RTD
	NT					W57+						NT (W57)
	NT					W57+						NT (W57)
52A/79			42E									I RTD
29/52/52A/79/80		95	53/54/75/77/83A/84/85						47/54/84			Mixto RTD
	NT						3A/3C/55					NT
	NT								47/54/84			NT
	NT						3A/3C/55					NT
	71											II 100RTD
			42E/53/77									III 100RTD
	NT								6/54			NT
	NT								47/53			NT
	NT								47			NT
	NT								47/54			NT
	NT											NT
	71											II 100RTD
		95										95 100RTD
52A/79/80			47/53/75/77/83A/84									Mixto 100RTD
79/80												I 100RTD
	NT					W57+						NT (W57)
			53/77									III 100RTD

Taula 2. Resultats perfils de lisi soques SASM i resultat fagotipia SASM

Fagogrup						Inversa						Fagotipia
I	II	95	III	81	V	I	II	95	III	81	V	
29												I 100RTD
	NT						3A/3C					NT
	NT								6/47/54			NT
29/52/79/80												I RTD
	NT								47/53			NT
	NT								6/42E/47/53/54			NT
					94/96							V RTD
29/79/80												I RTD
	NT					52			47		64/96	NT
29												I 100RTD
	NT											NT
	NT							95			94/96	NT
29/52		95										Mixto RTD
	3C/71											II 100RTD
29/52/52A/79/80		95										Mixto RTD
	NT								47			NT
	NT								47			NT
	NT								54/84			NT
	NT											NT
29			6/75/84/85									Mixto 100RTD
	NT											NT
	NT								6/47			NT
	NT								47			NT
29/52/52A/79/80												I 100RTD
	NT						3A/3C					NT
	NT						3A/3C					NT
	NT								6/53			NT
52/52A/79/80			54/75/77/83A									III RTD
			53/77									III RTD
	NT					52A			6/47/42E			NT
80												I RTD
	71											II 100RTD
	NT								47			NT
		95										95 RTD
	NT								6/47/42E54/77			NT
52A/79												I 100RTD
29/52												I 100RTD
	NT								47			NT
	NT											NT (W57)
	NT								71			NT
	NT								47/54			NT
					81							81 100RTD
	NT								47/83A/84			NT
	71											II 100RTD
	NT					52A			6/42E/47/53/54/77/83A/84			NT
									47/53/54/75/77/84			III RTD
	NT								6/47/53/54/83A			NT

Taula 3. Continuació resultats perfils de lisi soques SASM i resultat fagotipia SASM

Els resultats dels aïllats SASM mostraven la presència de 8 fagotips diferents, entre els que el tipus I era present en 11 aïllats, el tipus III en 9 aïllats, el mixte (II/III) en 7, el II en 6 i el 95 en 4, per la resta teníem una soca que corresponia al fagotip 94/96, una al 81 i una al V.

Així pel que fa a les soques de SASM es van poder fagotipar 39 de les 90, representant un 43,3% del total.

Observant els resultats obtinguts en ambdós grups, SARM o SASM, veiem el baix percentatge de soques tipades i per tant el seu baix poder discriminatiu com a mètode de tipificació.

Tipificació molecular i factors de virulència

Determinació de la presència del gen *pvl* i del gen *mecA*. Anàlisi del polimorfisme associat al Staphylococcal cassette chromosome (*SCCmec*) i subtipat del *SCCmec* IV (subtipus IVa ó IVc).

Varem realitzar la detecció del gen *mecA* i la detecció de la *pvl* en les 28 soques en les que l'antibiograma ens indicava una resistència a la cloxacil·lina, determinada per CMI.

En totes elles es va confirmar la resistència amb la presència del gen, i només en una d'elles es va observar la presència de la *pvl* (figura 30 i 31).

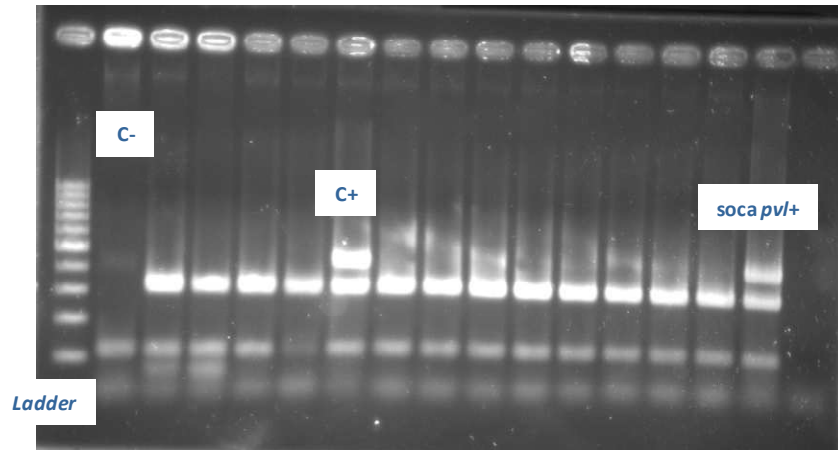


Figura 30. Gel electroforesi detecció gen *mecA* i gen *pvl*

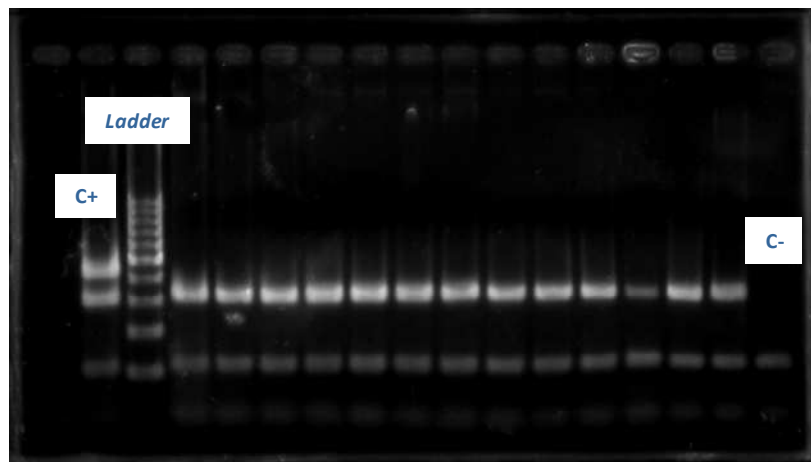


Figura 31. Gel electroforesi detecció gen *mecA* i gen *pvl*

Un cop confirmada la presència del gen *mecA* en les 28 soques de SARM es va fer l'anàlisi del polimorfisme associat al *SCCmec* (figura 32). I en funció dels resultats es va fer el subtipat del *SCCmec* IV (figura 33).

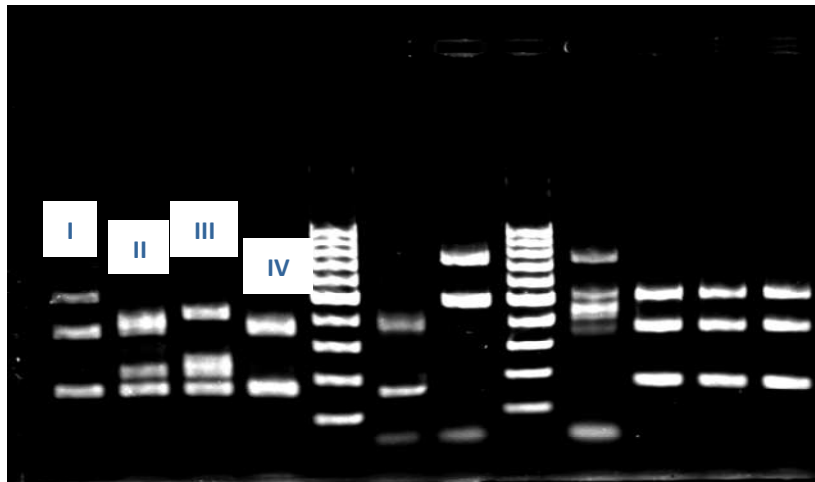


Figura 32. Exemple gel electroforesi detecció productes de detecció tipus *SCCmec*

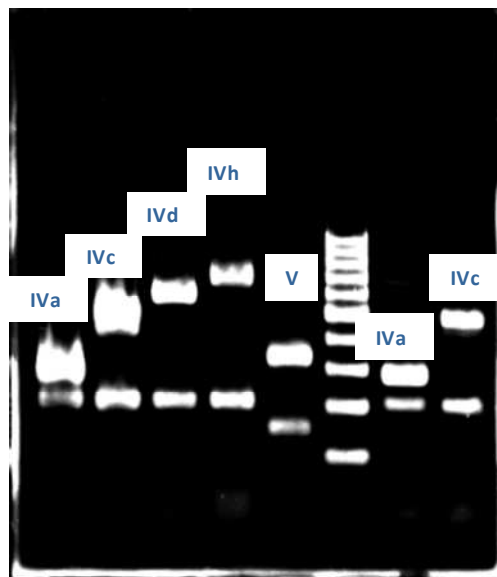


Figura 33. Exemple gel electroforesi detecció productes de detecció subtipat tipus *SCCmec* IV

Les 28 soques SARM de la nostra població d'estudi pertanyien al tipus *SCCmec* IV. Un cop confirmada aquesta tipificació es va fer el subtipat del *SCCmec* IV (figura 34). De les 28 soques subtipades, 27 de corresponien al *SCCmec* IVc i només una d'elles al *SCCmec* IVa.

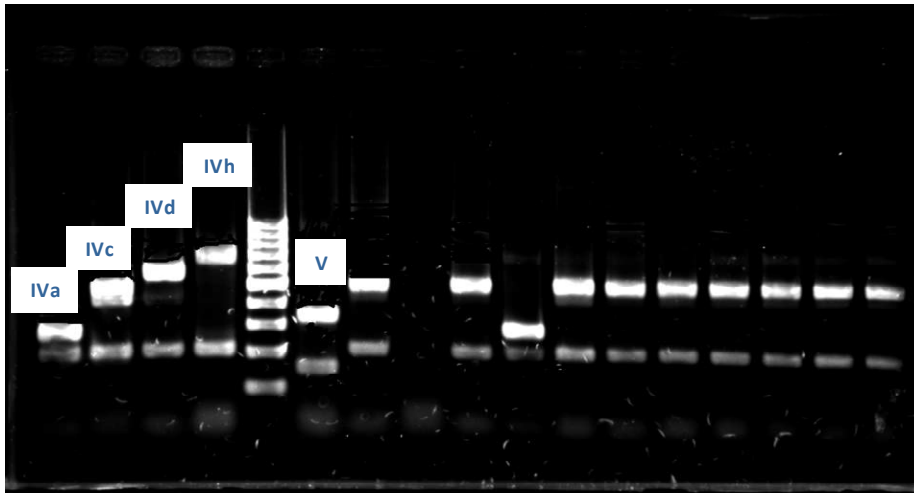


Figura 34. Exemple de Detecció productes PCR pel subtipat tipus *SCCmec* IV de les soques problema

Determinació de la presència de l'element genètic mòbil denominat ACME (*Arginine Catabolic Mobile Element*).

Un cop obtingut el tipat i subtipat del *Staphylococcal cassette chromosome (SCCmec)*, es va realitzar la detecció de la seqüència que codifica per aquest element mòbil ACME.

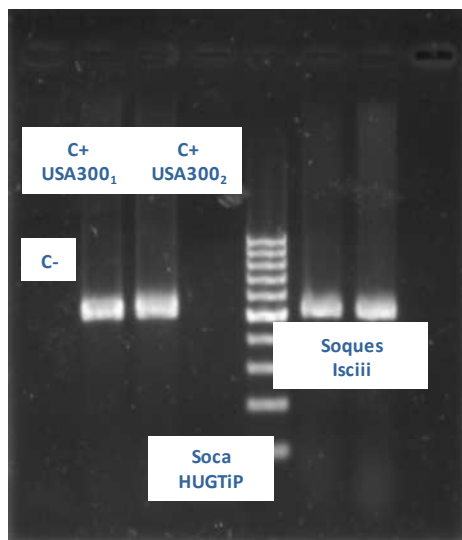


Figura 35. Detecció l'element genètic mòbil ACME

La determinació es va realitzar en aquella soca on vam obtenir el subtipus *SCCmec* IVa. Aquest és característic d'una clona específica denominada USA300 (MLST type ST-8 *SCCmec* IVa) descrita com la soca predominant de SARM causant d'infeccions de pell i parts toves als EEUU. Pel que fa a la nostra soca problema no es va observar la presència d'aquest element mòbil (figura 6).

Seqüenciació del gen de la proteïna A (*spa* typing)

L'anàlisi de les seqüències de DNA obtingudes de les 118 soques tipificades es va realitzar amb la plataforma **StaphType software**[®] assignant un *spa* tipus a cada aïllat, posteriorment i utilitzant la plataforma BURP anàlisi (*based-upon-repeat-pattern*) va quedar assignat a un ***spa* CC**.

Els resultats obtinguts en el subgrup de les 90 soques **SASM** van ser el següents:

<i>spa</i> CC (by use if BURP algorithm)	nº aïllaments	<i>spa</i> type	nº aïllaments
CC002	28	t067	13
		t002	11
		t1062	1
		t1084	1
		t6468	1
		t6352	1
CC012	14	t012	4
		t021	2
		t122	4
		t1070	1
		t6511	2
		t6513	1
CC008	9	t008	6
		t530	1
		t304	1
		t4816	1
CC2883	4	t189	1
		t209	1
		t2883	2

<i>spa</i> CC (by use if BURP algorithm)	nº aislamientos	<i>spa</i> type	nº aislamientos
no founder	5	t084	1
		t346	2
		t078	1
		t660	1
excluded	4	t251	2
		t1509	1
		t6528	1

La resta de soques, 26 de 90, no presentaven un *spa* tipus amb prou similitud amb cap altre i es van classificar dins la categoria de "singleton".

Es va observar el predomini d'un grup clonal, el **CC002**, que representava un 31% (28/90) de les soques, englobant dos spa tipus predominants : **t002** i **t067**.

El software **StaphType Software**[®] disposa d'una eina que representa de manera senzilla la relació evolutiva entre els *spa* tipus d'un mateix grup clonal CCBURP (figura 36).

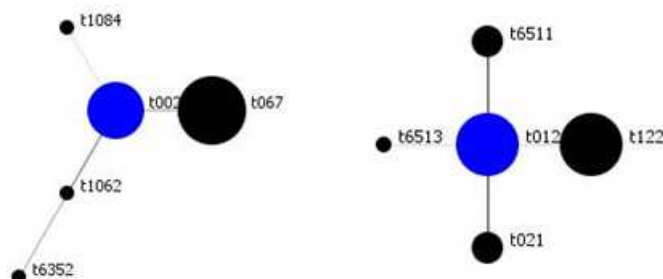


Figura 36 . Relació evolutiva entre spa tipus CC02 i CC012

Pel que fa als resultats obtinguts en el subgrup de les 28 **soques SARM** vèiem la següent distribució:

spa CC (by use if BURP algorithm)	nº aïllaments	spa tipus	nº aïllaments
CC067	9	t067	5
		t002	3
		t1084	1
CC302/015	3	t620	1
		t302	1
		t015	1
singleton	15	t012	2
		t156	2
		t6454	1
		t186	1
		t270	1
		t005	1
		t127	1
		t279	1
		t3772	1
		t701	1
		t166	1
		t5189	1
		t008	1
excluded	1	t026	1

S'observava el predomini d'un grup clonal, el **CC067**, que representava un 32.14% (9/28) de les soques, englobant dos spa tipus predominants : **t0067** i **t002**. La relació evolutiva queda representada a la figura 37.



Figura 37. Relació evolutiva entre spa tipus CC067 i CC302/015

Electroforesi en camp polsant (PFGE)

L'anàlisi del patró de macrorestricció obtingut mitjançant PFGE, després de la digestió amb l'enzim SmaI de les 28 soques SARM ens va mostrar 6 patrons, i per tant l'existència de sis genotips diferents (figura 38) .

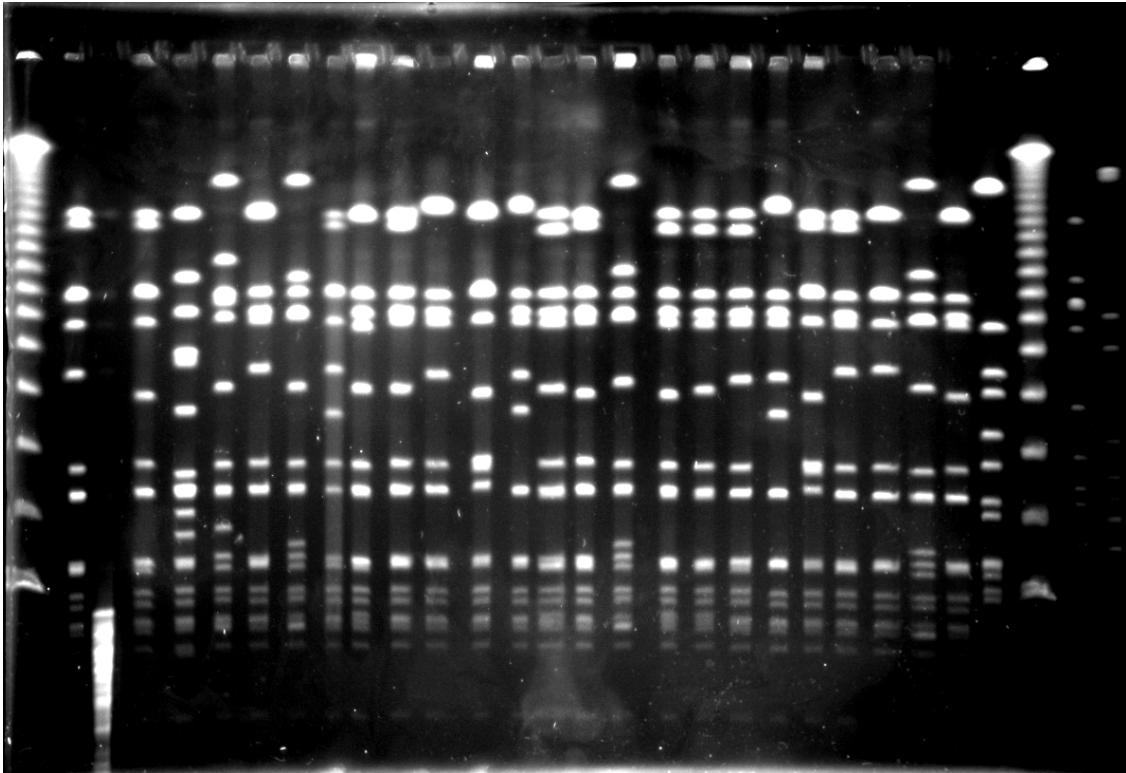


Figura 38. Patró PFGE de les 28 soques SARM

Els 75% dels aïllats es van agrupar en 6 genotips ja descrits en estudis previs i associats a soques d'origen nosocomial: E8b 26% (8/28), E7c 10.8% (3/28), E19 7.1% (3/28), E7 10.8% (3/28), E8c 7.1% (2/28) , E7b 7.1% (2/28) i un comunitari. La resta de soques pertanyien a perfis esporàdics.

Un cop seleccionat quin patró té cadascuna de les soques, amb el software InfoQuest Bioinformation es va poder normalitzar el patró de bandes i construir un dendrograma on s'aprecien les relacions d'agrupació entre els diferents patrons (figura 39).

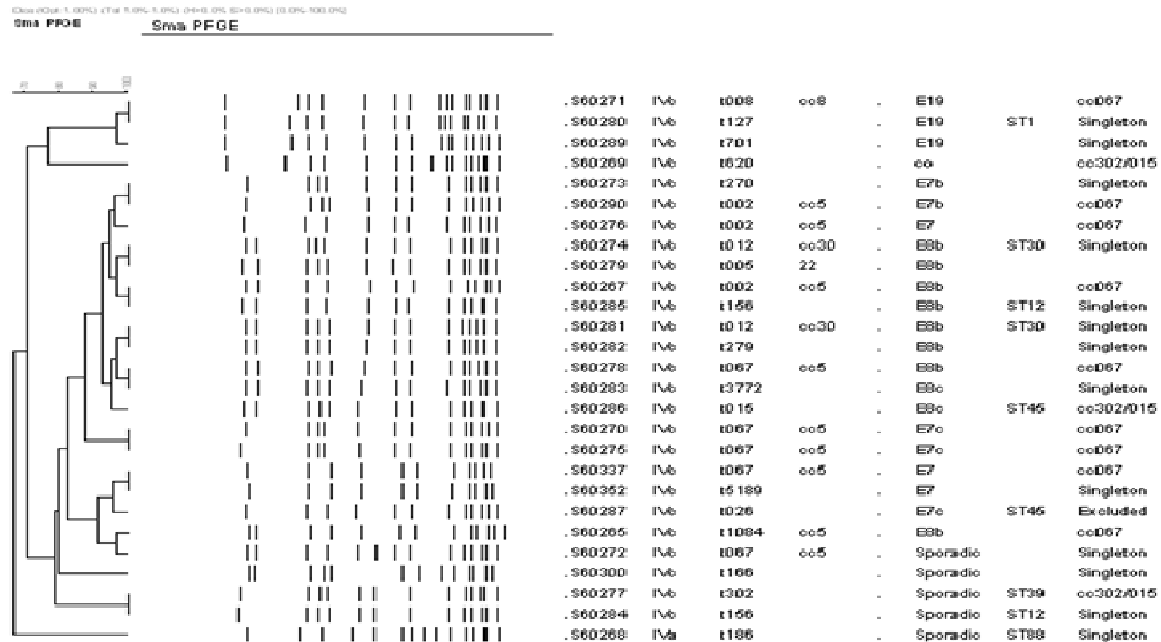
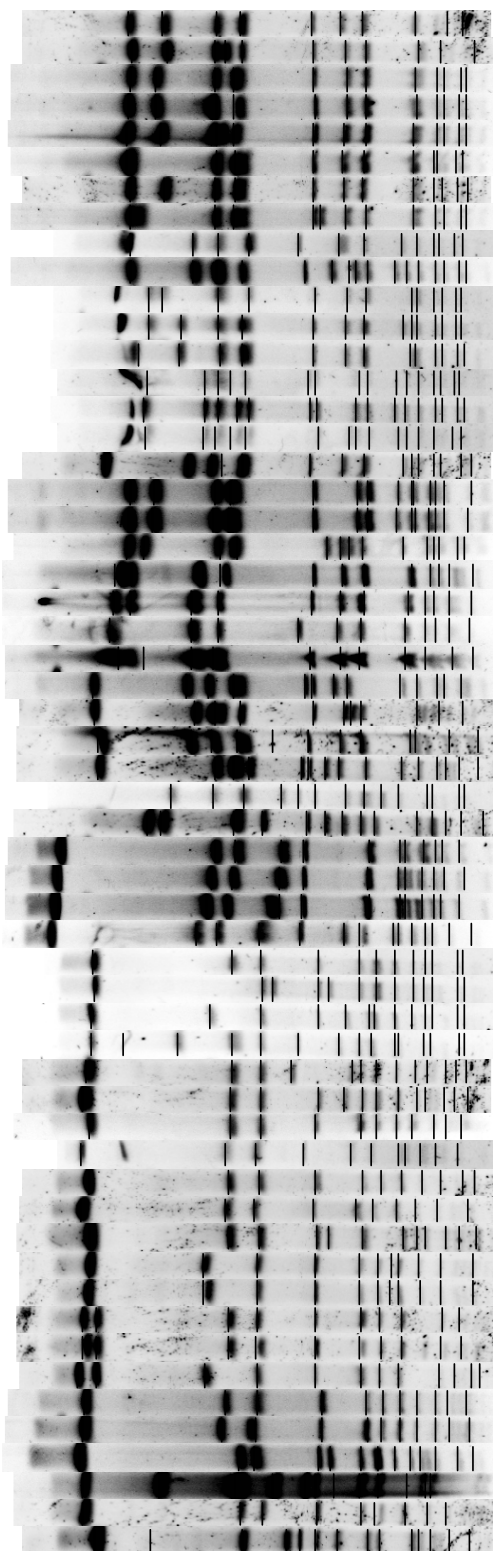
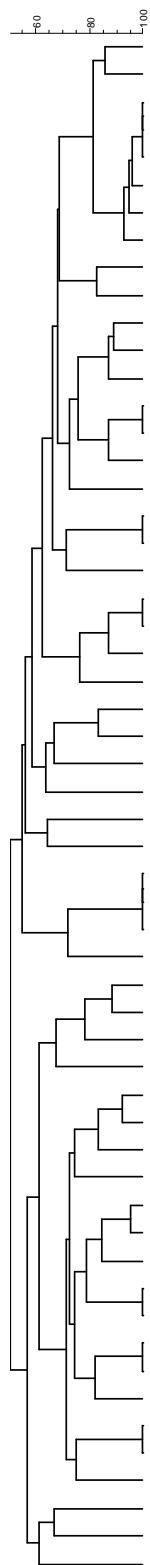


Figura 39. Dendrograma que mostra la relació grupal entre els diferents patrons descrits

Un cop feta la tipificació de les soques SARM, es va realitzar la mateixa tècnica de tipificació per les 90 soques SASM.

En primer lloc es va dur a terme la macrorestricció mitjançant l'enzim SmaI. Posteriorment, un cop obtingut el patró de bandes es va analitzar pel software InfoQuest Bioinformation, obtenint els següents dendrograms que mostren quina era la relació clonal entre soques.

Dice (Opt1.00%)(T of 1.0%-1.0%)(H=0.0% S=0.0%)[0.0%-100.0%]
Sma PFGE **Sma PFGE**

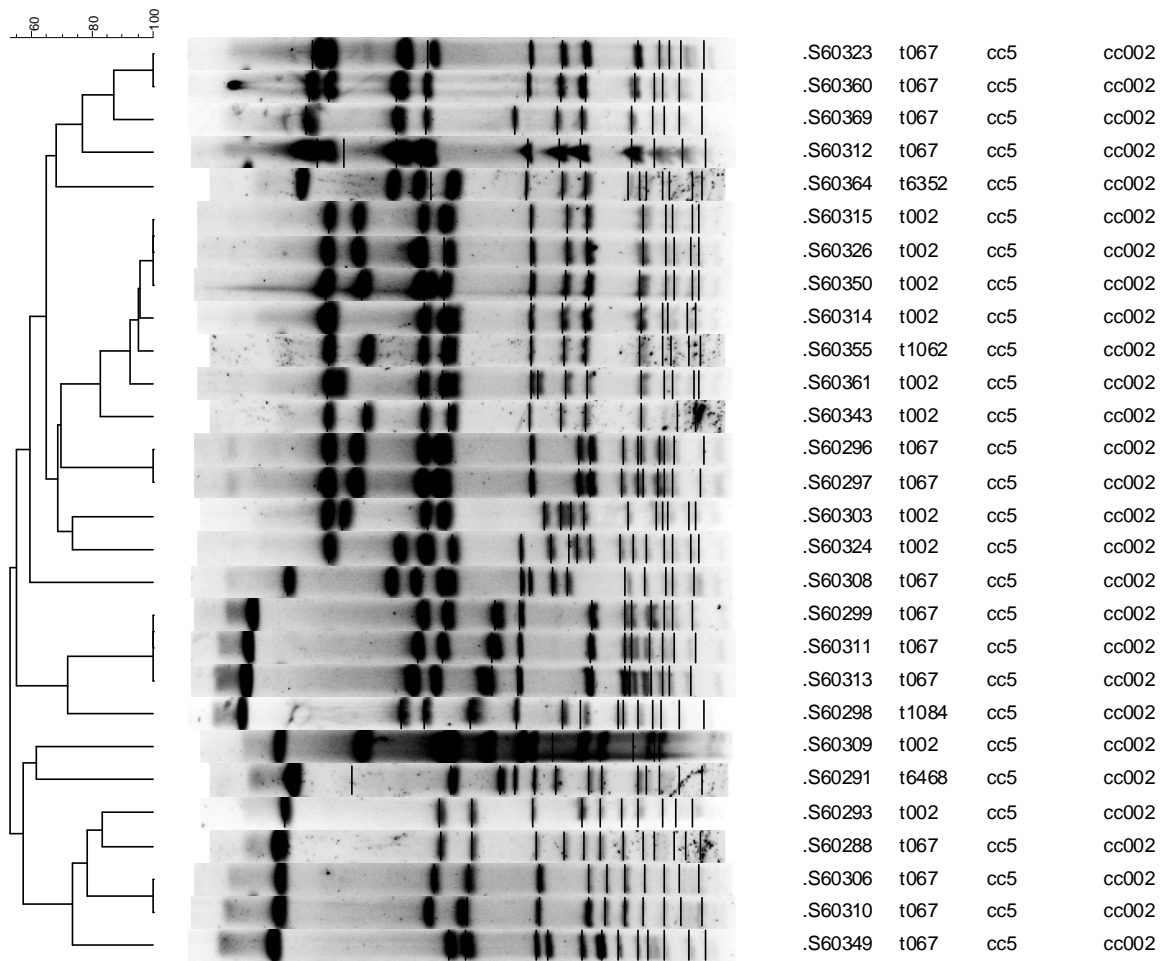


S60343	t002	cc5		cc002
S60339	t012	cc30	ST30	cc012
S60315	t002	cc5		cc002
S60326	t002	cc5		cc002
S60350	t002	cc5		cc002
S60314	t002	cc5		cc002
S60355	t1062	cc5		cc002
S60361	t002	cc5		cc002
S60342	t008	cc8		cc008
S60324	t002	cc5		cc002
S60307	t008	cc8		cc008
S60318	t008	cc8		cc008
S60325	t530	cc8		cc008
S60292	t008	cc8		cc008
S60357	t304	cc8		cc008
S60301	t008	cc08		cc008
S60364	t6352	cc5		cc002
S60296	t067	cc5		cc002
S60297	t067	cc5		cc002
S60303	t002	cc5		cc002
S60323	t067	cc5		cc002
S60360	t067	cc5		cc002
S60369	t067	cc5		cc002
S60312	t067	cc5		cc002
S60308	t067	cc5		cc002
S60347	t122	cc30		cc012
S60340	t6511	cc30		cc012
S60317	t1070	cc30		cc012
S60345	t166			Singleton
S60316	t6513	cc30		cc012
S60299	t067	cc5		cc002
S60311	t067	cc5		cc002
S60313	t067	cc5		cc002
S60298	t1084	cc5		cc002
S60332	t166			Singleton
S60333	t166			Singleton
S60344	t166			Singleton
S60378	t166			Singleton
S60321	t4816	cc8		cc008
S60288	t067	cc5		cc002
S60293	t002	cc5		cc002
S60305	t008	cc8		cc008
S60327	t012	cc30	ST30	cc012
S60373	t012	cc30	ST30	cc012
S60319	t122	cc30		cc012
S60381	t021	cc30		cc012
S60382	t021	cc30		cc012
S60365	t122	cc30		cc012
S60335	t122	cc30		cc012
S60376	t012	cc30	ST30	cc012
S60306	t067	cc5		cc002
S60310	t067	cc5		cc002
S60349	t067	cc5		cc002
S60309	t002	cc5		cc002
S60328	t6511	cc30		cc012
S60291	t6468	cc5		cc002

Dice (Opt:1.00%) (Tol:1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]

Sma PFGE

Sma PFGE



Dice (Opt:1.00%) (Tol:1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]

Sma PF Sma PFGE





Figura 40. Dendrograma que mostra la relació grupal entre els diferents patrons descrits

L'anàlisi dels dendrograms obtinguts mostra la poca relació clonal entre els SASM analitzats. Així doncs, ens indicava que la tipificació mitjançant PFGE no es recomanava per establir la relació clonal de les 90 soques SASM estudiades, en aquest cas la millor tècnica per establir aquesta relació va ser la tipificació per *spa* tipus, quedant classificades en *spa CC*.

Tipificació molecular mitjançant microarrays. *StaphyType* kit de Clondiag Chip Technologies

De les 118 soques estudiades per les tècniques de tipificació anteriorment descrites, es va realitzar la tipificació mitjançant microarrays en 102. L'anàlisi de les dades obtingudes en mostra els següents resultats.

La prevalença total de SARM mitjançant la detecció del gen *mecA* va ser del 26.5% (27/102).

Pel que fa a la distribució en funció dels Complexes Clonals (CC) s'observava un predomini del CC5 amb una prevalença del 38.2% (39/102), seguit del CC30 en un 21.6% (22/102) de les soques.

Complexes clonals	Freqüència	Percentatge (%)
CC5	39	38,2
CC30	22	21,6
CC8	10	9,8
CC15	7	6,9
CC45	6	5,9
CC25	5	4,9
CC22	3	2,9
CC398	2	2,0
CC1	1	1,0
CC10	1	1,0
CC12	1	1,0
CC121	1	1,0
CC188	1	1,0
CC6	1	1,0
CC7	1	1,0
CC88	1	1,0

Taula 4. Distribució segons CC de les soques tipades mitjançant microarrays

En la detecció dels diferents factors de virulència, implicats en la virulència i la presentació clínica de les infeccions per *S.aureus*, descrits prèviament, vàrem obtenir els següents resultats:

La prevalença dels gens que codifiquen per a l'expressió d'algunes de les MSCRAMM (*Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecular*) va mostrar la següent freqüència:

MSCRAMM	Presència gen	Percentatge
<i>FnBPA</i>	96	94,1
<i>FnBPB</i>	74	72,5
<i>ClfA</i>	94	92,2
<i>ClfB</i>	96	94,1
<i>SdrD</i>	97	95,1
<i>SdrC</i>	86	84,3
<i>Bbp</i>	81	79,4

Taula 5 .Freqüència gens codificants per MSCRAMM

Pel que fa a altres toxines com les hemolisines o citotoxines; alfa, beta, delta, gamma i leucocidina de Panton Valentine, es va poder detectar la presència dels gens codificants per la PVL, tres toxines exfoliatives (A, B i C), vuit enterotoxines (A a E, G a I), la toxina-1 del síndrome del shock tòxic (TSST-1) i les denominades toxines EDIN (Taula 6).

Toxines estafilocòcciques	Presència gen	Percentatge
PVL	3	2,9
ETAA	0	0
ETAB	0	0
ETAD	6	5,9
Enterotoxines	57	55,9
TSST-1	20	19,6
EDIN A	0	0
EDIN B	6	5,9
EDIN C	0	0

Taula 6 .Freqüència gens codificants per toxines estafilocòcciques.

En quant a la PVL només en un 2.9% (3/102) de les soques productores de bacterièmia es detectava la presència dels gens codificants.

Els gens codificants per les proteïnes d'acció antiinflamatòria com **CHIPS** (*Chemotaxis Inhibitory Protein of S. aureus*) i **SCIN** (*Staphylococcal complement inhibitor*) van estar presents en un 67.6% (69/102) i un 69.6% (71/102) respectivament de les soques. Cal tenir en compte que en 4 aïllaments no teníem les dades de CHIPS i de SCIN per ser una anàlisi fet inicialment en una versió del kit en la qual no es mesurava la presència d'aquests gens i en el cas de SCIN en 4 soques més l'anàlisi no va ser valorable.

Un altre factor que s'ha descrit implicat en la patogènia de les infeccions per *S.aureus* és l'element genètic mòbil denominat ACME (*Arginine Catabolic Mobile Element*), que s'ha descrit en clones causants d'infeccions de pells i parts toves en relació a la soca USA300. No s'ha observat la presència d'aquest element genètic en les soques procedents de bacterièmia que han estat analitzades.

La distribució dels perfils al·lèlics del sistema regulador *agr*, va mostrar una prevalença del *agrII* amb un 46.1% (47/102) (Taula 7).

Al·lel <i>agr</i>	Freqüència	Percentatge (%)
<i>agr I</i>	30	29,4
<i>agr II</i>	47	46,1
<i>agr III</i>	24	23,5
<i>agr IV</i>	1	1,0

Taula 7 .Distribució dels perfils al·lèlics *agr*

Si ens fixem en la distribució clonal únicament dels 28 aïllats de SARM, veiem com la variació és mínima amb un clar predomini del CC5 (23/27) amb un 85,2%, seguit del CC8 amb un 11.1% (3/27) i del CC88 amb un 3.7% (1/27). Si ens fixem en el perfil al·lèlic els 23 CC5 tenen l'*agrII*. El microarray ens ha permès fer una aproximació al ST en 5 casos, els 5 pertanyents al ST5 Aquestes bacterièmies per SARM, en un 74.1% (20/27) són d'origen nosocomial o nosohusial, sent la distribució clonal, 17 CC5, 2CC8, 1CC1. Mentre que el 25.9% (7/27) són d'origen comunitari, amb un predomini del CC5 amb 6 casos i 1 CC8.

En el posterior desenvolupament dels test fenotípics, es van incloure 18 soques procedents de pacients amb bacterièmia per *S.aureus*. La possible associació descrita entre l'expressió d'aquestes hemolisines i la presència de complicacions, va fer que es triés un subgrup de bacterièmies que havien presentat complicacions en la seva evolució i un altre que no n'havien desenvolupat. L'array de proteïnes ens va permetre determinar la concentració d'hemolisina α , i valorar si la seva expressió variava en funció de la soca o del CC. Pel que fa a aquestes 18 soques i en concordança amb els resultats publicats en soques testades d'altres centres, varem observar com els CC22, CC45 i CC30 mostraven una baixa o nula producció de hemolisina α , mentre que els CC5 i CC15 mostraven una producció variable (taula 8).

En la determinació de la funcionalitat de l'operó *agr* d'aquestes 18 soques es va tenir en compte que vuit van presentar una bacterièmia complicada amb metàstasis sèptiques o shock sèptic, les altres 10 no van fer complicacions i en tres pacients es va documentar una positivitat dels hemocultiu a les 72 hores, per tant una bacterièmia persistent. D'aquestes 18, 17 (94.4%) eren SASM i 1 (5.6%) era SARM. Pel que fa a l'origen, 17 eren nosocomials i 1 de la comunitat. Cap dels pacients era portador de SARM.

L'anàlisi de les dades d' ***agr* CAMP assay** i **VLT** van mostrar que l'operó *agr* era funcional en 13 soques i 17 respectivament (72.2% i 94.4%), mostrant una concordança del 77.7% (14/17) (κ : 0.265; SE: 0.220). No es van trobar correlacions significatives entre la funcionalitat de l'operó *agr* i el desenvolupament de complicacions ni amb la bacterièmia persistent. La majoria de soques presenten un operó *agr* funcional i tampoc es van observar correlacions amb el patró de resistència, gens que codifiquen per factors de virulència, l' al·lel *agr* o les dades obtingudes de tipificació molecular (CC/MLST) (taula 8).

Nº soca	Complicacions	Expressió hemolisina α			Funcionalitat de l'operó <i>agr</i>		al·lel <i>agr</i>	Tipat array
		<i>hla</i> conc. ng/ml	<i>hla</i> array proteïnes	Hemòlisi	<i>agr</i> CAMP assay	VLT		
3306	si	0,00	Negatiu	+++	Positive	Positive	I	CC45-MSSA
3886	si	0,00	Negatiu	+++	Positive	Positive	I	CC22-MSSA
4293	si	6,98	POS ++	+++	Positive	Positive	III	CC5-MRSA-IV, Paediatric clone
4207	no	0,00	Negatiu	+++	Positive	Positive	III	ST34/42-MSSA
3995	si	0,00	Negatiu	++				CC45-MSSA
4077	si	7,79	POS ++	++	Negative	Positive	II	CC15-MSSA
4081	si	0,00	Negatiu	+++	Positive	Positive	I	CC45-MSSA
4084	si	1,37	POS +	+++	Positive	Positive	II	CC5-MSSA
4124	si	< 1.0	Positiu dèbil	-	Negative	Positive	II	CC5-MSSA
4035	no	1,72	POS +	-	Negative	Negative	I	ST72-MSSA
4032	no	0,00	Negatiu	+++	Positive	Positive	I	CC22-MSSA
3750	no	0,00	Negatiu	-	Positive	Positive	III	CC30-MSSA
3849	no	< 1.0	POS+++	+++	Positive	Positive	I	CC188-MSSA (PVL+)
3884	no	6,69	POS ++	+++	Positive	Positive	II	CC15-MSSA
4143	no	1,64	POS +	+++	Positive	Positive	III	CC30-MSSA
4145	no	0,00	Negatiu	-	Positive	Positive	III	CC30-MSSA
4172	no	0,00	Negatiu	+++	Negative	Positive	III	CC8-MSSA-SCCfus
4171	no	0,00	Negatiu	(+)	Negative	Positive	I	CC30-MSSA

Taula 8. Resultats test fenotípics *agr* CAMP assay i VLT.

Avaluació de diferents mètodes ràpids de identificació i determinació de la sensibilitat antibiòtica de *S. aureus* directament de l'hemocultiu positiu.

L'avaluació d'aquests mètodes es va realitzar en dos períodes diferents, en un primer moment es va iniciar l'avaluació comparant els mètodes convencionals amb la tècnica ***BinaxNow S.aureus/PBP 2a Test*** i posteriorment es van testar les altres dues tècniques ja descrites; ***MRSA/SA Blood Culture i MicroPhage MRSA/MSSA Blood Culture Test***.

Durant el primer període d'estudi es van processar un total de 181 flascons d'hemocultius positius, corresponents a 77 pacients. La tècnica *BinaxNow S. aureus* va identificar com *S.aureus* 129 flascons (71,3%), *Binax Now PBP 2a Test* va detectar 25 resistències a oxacil·lina, significat això un percentatge del 19,4% del total de *S.aureus* detectats; les 52 soques dels hemocultius positius restants, la tècnica de *BinaxNow S. aureus* va identificar-los com estafilococs coagulasa negativa. Només en un cas el resultat va ser invàlid, doncs no es va detectar la línia del control positiu (Figura 41).

La concordança de la tècnica *BinaxNow S. aureus* amb els mètodes de referència (determinació coagulasa lligada o *clumping* factor, coagulasa lliure o en tub, Vitek-2 Compact, Mueller-Hinton sal amb E-test de cloxacil·lina i disc de cefoxitina) va resultar del 100%.

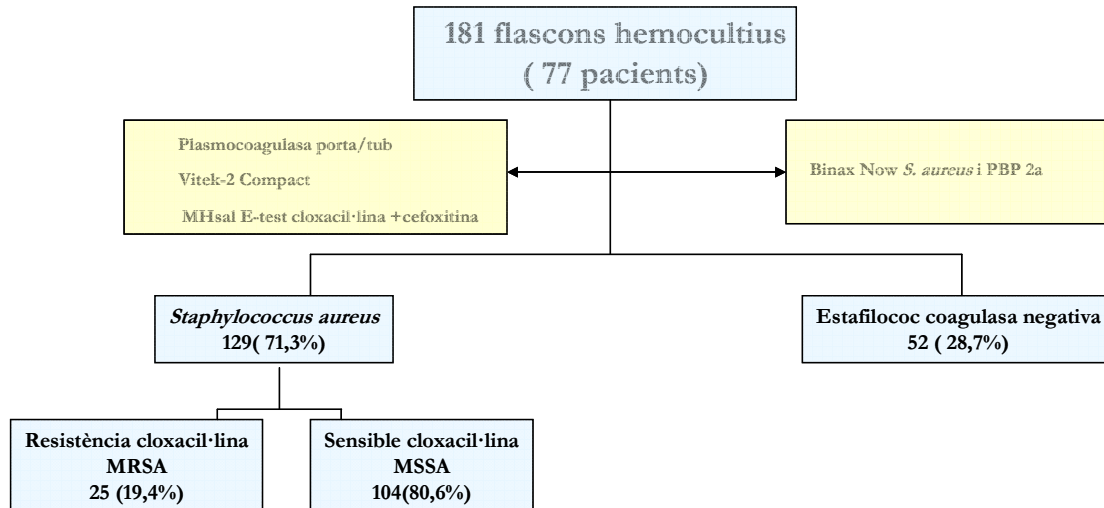


Figura 41 . Resum resultats primera fase de l'avaluació

En el segon període d'estudi es van afegir les tècniques anteriorment descrites (*GenomEra MRSA/SA Blood Culture i MicroPhage MRSA/MSSA Blood Culture Test*). Durant aquest període es van processar un total de 123 flascons que corresponien a 53 pacients, obtenint-se igualment una concordança del 100% entre les tècniques de referència i les tècniques *BinaxNow S. aureus/PBP 2a Test*, *GenomEra MRSA/SA Blood Culture*. Es van identificar com *S.aureus* 86 flascons (69,9%), *Binax Now PBP 2a Test i*

GenomEra MRSA/SA Blood Culture va reportar 20 resistències a oxacil·lina, significant això un percentatge del 23,25% dels *S.aureus* detectats.

Pel contrari amb la tècnica *MicroPhage MRSA/MSSA Blood Culture Test*, un cas va ser detectat com una soca sensible a la cloxacil·lina i posteriorment es va confirmar tant pels mètodes convencionals com per les altres dues tècniques que es tractava d'una soca resistent. Així doncs, *MicroPhage MRSA/MSSA Blood Culture* va presentar una sensibilitat del 99,2% i una especificitat del 100%.

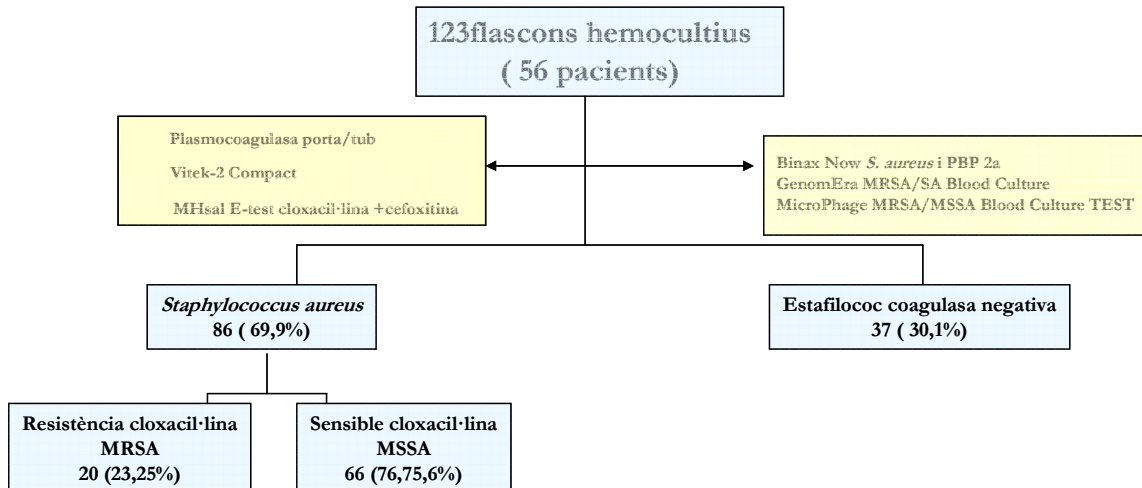


Figura 42. Resum resultats segona fase de l'avaluació

Els tres assajos avaluats van identificar 52 Estafilococs Coagulasa Negativa (CNS), 17 dels quals van ser resistents a la meticil·lina. Aquests aïllats corresponien a 23 pacients i, la distribució de les diferents espècies va ser, *Staphylococcus epidermidis* 17, *Staphylococcus haemolyticus* 1 i estafilococ coagulasa negatiu 1. En 8 casos es va considerar que aquest aïllament no tenia significació clínica. En un cas el resultat es va catalogar com discordant.

Per tal de realitzar la validació clínica es van recollir de manera prospectiva les dades dels tractaments antibiòtics empírics que rebien els malalts amb bacterièmia per *S.aureus* prèviament a rebre la informació microbiològica.

Posteriorment, es va comprovar l'actitud clínica derivada de la transmissió de la informació d'identificació i sensibilitat en base als resultats microbiològics.

Es van obtenir les dades d'un total de 53 pacients amb bacterièmia per *S.aureus* confirmada microbiològicament. (Taula 8)

Tractament empíric	nº
Amoxicil·lina-clavulànic sola o associada	5
Aminoglucòsid sol o associat	2
Cefalosporina 3ª generació sola o associada	12
Vancomicina sola o associada	12
Imipenem sol o associat	5
Linezolid sol o associat	2
Piper-tazobactam sola o associada	3
Quinolones	4
Cefazolina	1
Sense tractament	6
Desconegut	1

Taula 8. Recull dels tractaments antibiòtics empírics.

Un cop rebuda la informació microbiològica, l'adequació dels tractaments antibiòtics es va avaluar de la següent manera; instauració d'un tractament efectiu, ja que l'espectre antibiòtic no incloïa al microorganisme detectat, en 5 casos (5/53, 9.4%), canvi al tractament d'elecció en 31 casos (31/53, 58.5%) i inici de tractament antibiòtic en 5 casos (5/53, 9.4%)

En els 31 casos en els que la informació microbiològica va suposar un canvi al tractament d'efectiu, vam trobar dos casos de bacterièmia per SARM; un d'ells es va canviar a un glicopèptid, prèviament en tractament amb una cefalosporina de 3ª generació+ cloxacil·lina, i en l'altre, es va deixar el glicopèptid + aminoglucòsid retirant-se l'aztreonam. En els 29 casos amb bacterièmia per SASM; en 26 pacients es va canviar el tractament empíric per cloxacil·lina, en dos casos associada a rifampicina. En els altres tres casos es va iniciar tractament en dos amb trimetoprim-sulfametoxazol i en un amb glicopèptid per al·lèrgia a betalactàmics.

Pel que fa als 5 casos en els que es va canviar el tractament antibiòtic empíric per un d'efectiu podem detallar que un d'ells era una bacterièmia per un CNS que es va considerar que tenia significació clínica i es va afegir al Meropenem empíric un Glicopèptid.

En els altres quatre casos, dos d'ells eren bacterièmies per SARM en pacients que duïen tractament empíric amb cefalosporines de 3ª generació+quinolones. En un cas i en l'altre un aminoglicòsid. En ambdós malalts es va canviar el tractament inicial per un glicopèptid, ja que eren resistents. En els altres dos casos de bacterièmies per SASM es va canviar el tractament a cloxacil·lina en un cas i en l'altre per un glicopèptid, en ambdós malalts per resistència en els tractaments empírics que eren, un d'ells quinolones i l'altre ampicil·lina+gentamicina.

En els 5 casos en els que es va iniciar el tractament antibiòtic, només un d'ells presentava una bacterièmia per SARM i es va iniciar antibioteràpia dirigida amb un glicopèptid, en els 4 que presentaven una bacterièmia per SASM i es va iniciar cloxacil·lina en tots ells, afegint en un dels casos un aminoglucòsid i en un altre rifampicina.

En els 11 casos restants (11/53, 20.75%) el tractament antibiòtic empíric havia estat correcte i era el d'elecció.

En el context de l'avaluació de la tecnologia GenomEra CDX System pel diagnòstic de la bacterièmia per SARM, es va estudiar la fiabilitat d'aquesta tecnologia en la detecció precoç de portadors nasals de SARM directament a partir de la mostra d'exsudat nasal. Es va considerar indicació de realitzar la prova els següents casos: malalts que ingressaven a unitats de crítics, o que provenien d'altres hospitals o de centres de llarga estada (centres socio-sanitaris o residències), companys d'habitació d'un malalt infectat o colonitzat, pacients pre-quirúrgics amb risc epidemiològic de SARM o reingressos amb antecedents de SARM i amb estat de colonització desconegut.

Secundàriament, també es va avaluar l'impacte, tant en la instauració precoç de les mesures d'aïllament de contacte, com en la disminució de la transmissió horitzontal i la prevenció de brots.

Es van fer un total de 8 determinacions. Aquestes van incloure: quatre pacients procedents d'un altre centre o residència, en un cas el resultat de la detecció va ser negatiu i es va poder ingressar sense aïllament de contacte. Un pacient company d'un malalt amb una infecció per SARM, al qual es va poder retirar l'aïllament. En un altre cas, el malalt ingressava de manera programada per cirurgia de columna i tenia risc de colonització, degut a antecedents epidemiològics familiars (era cuidador de la seva esposa, portadora nasal de SARM); en aquest cas, la detecció va permetre canviar la pauta de profilaxis quirúrgica i procedir a l'aïllament de contacte. Per últim, en dos pacients amb antecedents de SARM que reingressaven, amb un sol frotis nasal de control negatiu, la negativitat de la detecció va permetre el seu ingrés sense aïllament.

Revisades les indicacions i les proves realitzades podem concloure;

La tècnica GenomEra CDX System permet la detecció de SARM en 50 minuts. Al no requerir personal especialment entrenat, es pot realitzar en horari de guàrdia. La tècnica molecular de cribatge ràpid permet reduir les mesures d'aïllament de contacte en els reingressos de malalts prèviament colonitzats, facilitant la gestió de llits en moments de màxima ocupació. La seva aplicació redueix el risc de colonització dels malalts que han estat en contacte amb casos de SARM i facilita el seu trasllat ràpid a una habitació o box sense aïllament. En cas d'aplicar aquesta prova en els controls posteriors al protocol de descolonització, permetria retirar l'aïllament de contacte 2-3 dies abans, reduint el impacte negatiu de les mesures d'aïllament i els costos.

Descripció de les característiques clíniques i epidemiològiques de les bacterièmies per *S. aureus* durant un període de 7 anys

La incidència de les bacterièmies per *S.aureus* observada en els últims anys al nostre centre, s'ha mantingut estable entre el 6-8% del total de les bacterièmies diagnosticades. Pel que fa a la incidència de bacterièmia per SARM respecte el total de bacterièmies per *S.aureus*, ha variat des del quasi 40% del període 83-97 fins el 25% del 2014 (Taula 9).

	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
nº bacterièmies totals	782	873	888	882	933	957	775	926	775	791	830	796	845
<i>S.aureus</i>	113	73	51	69	67	83	54	59	53	48	65	34	56
<i>S.aureus</i> SARM	14	24	20	22	14	21	11	22	15	19	14	13	14
Percentatge BSA/BT (%)	14,4	8,3	5,7	7,8	6,7	8,7	6,9	6,4	6,8	6,1	7,8	4,2	6,6
Percentatge BSARM/BSA (%)	12,3	32,8	39,2	31,9	20,9	25,3	20,4	37,3	28,3	39,6	20,3	38,2	25

BSA: bacterièmia per *S.aureus*

BT: bacterièmies totals

BSARM: bacterièmia per SARM

Taula 9 . Percentatge de bacterièmies per *S.aureus* i SARM

Durant el període d'estudi es van incloure un total de 293 pacients atesos als servei d'urgències, consultes externes o hospitalitzats amb bacterièmia documentada per *S.aureus*, durant un període de 7 anys (2002-2009). Pel que fa a les característiques demogràfiques i clíniques observades en la nostra població d'estudi i mostrades a la taula , caldria destacar les següents dades (taula 10).

La mitjana d'edat va ser de 61.27±18.1 anys. Es van diagnosticar 190 bacterièmies en homes, és a dir, un 64.8%. L'origen de la bacterièmia va ser en 171 casos nosocomial, representant un 58.4%, en 55 casos d'origen comunitari (18.8%) i en 67 (22.9%) relacionades amb l'assistència sanitària.

El 89% dels pacients presentaven comorbiditats associades, la més freqüent amb un 35.5% va ser la Neoplàsia, seguida de la Diabetis en un 30.4% dels casos , la Insuficiència renal crònica en un 15.7% , el tractament amb immunosupressors en el 14% i la MPOC en un 13.7%.

Un 25.9% dels pacients (76/293) amb bacterièmia van presentar complicacions, presentant-se clínicament en un 17.4% com shock sèptic, un 11.6% amb presència de metàstasis sèptiques i en un 6.1% amb endocarditis. La bacterièmia persistent es va produir en el 8.5% dels casos.

Varem observar que en el 145 bacterièmies (49.5%) el focus era erradicable.

Pel que fa als focus més freqüents es va observar que el 45.7% (134/293) tenien el seu origen en el catèter, el 8.5% (25/293) en la ferida quirúrgica i en el 7.5% (22/293) va ser una pneumònia. En un 16.9% (49/293) el focus de la bacterièmia era desconegut.

El percentatge de la resistència a la cloxacil·lina, tenint en compte les dades obtingudes per la determinació de la sensibilitat mitjançant el mètode de CMI, va ser del 20.5% (60 casos). De les bacterièmies per SARM, el 80% (48/60) van ser nosocomials i en 22 el focus de la bacterièmia era el catèter.

Característiques clíniques	nº (%)
Edat (DE)	61,27 (18,1)
Gènere	
Home	190 (64.8)
Dona	103 (35.2)
Servei Hospitalari	
Mèdic	198 (67.6)
Quirúrgic	57 (19.5)
Crítics	28 (9.6)
Pediatria	10 (3.4)
Origen	
Nosocomial	262 (89.4)
Comunitari	55 (18.8)
Relacionat AS	67 (22.9)
Malaltia de base	262 (89.4)
Diabetes	89 (30.4)
EPOC	40 (13.7)
Insuficiència cardíaca	38 (13.0)
Neoplasia	104 (35.5)
Insuficiència renal crònica	46 (15.7)
Cirrosis	29 (9.9)
VIH	16 (5.5)
SIDA	10 (3.4)
Neutropenia	22 (7.5)
Hemodiàlisi	19 (6.5)
Immunosupressors	41 (14.0)
Enolisme	18 (6.1)
Obesitat	9 (3.1)
ADVP	7 (2.4)
Risc malaltia base fatal o UF	123 (42.0)
Complicacions	76 (25.9)
Shock sèptic	51 (17.4)
Metàstasi sèptica	34 (11.6)
Endocarditis	18 (6.1)
Bacterièmia persistent	25 (8.5)
Resistència cloxacil·lina (SARM)	60 (20,5)

Taula 10. Característiques demogràfiques i clíniques. UF; *últimament fatal*

ES varen revisar de les dades clíniques i epidemiològiques d'aquests 293 pacients i es va definir la bacterièmia complicada com presència de metàstasis sèptiques en un focus diferent del primari, via hematògena (endocarditis, osteomielitis vertebral, accident cerebrovascular embòlic, embòlies sèptiques pulmonars o extensió local (tromboflebitis o abscessos) o presència de shock sèptic. El percentatge de complicacions en la població estudiada va ser del 25.95%, establint-se un model de regressió logística per la variable dicotòmica complicacions que es va definir com a variable resposta. També es van incloure variables predictores, tant de l'hostatger com del microorganisme, d'aquesta manera, es va poder arribar a concloure quins eren els factors rellevants associats al desenvolupament de complicacions. Només es van observar diferències significatives amb la variable hemocultiu positiu a les 72 hores del tractament (bacterièmia persistent). No es van trobar diferències significatives entre els pacients amb o sense factors de riscs de metàstasis sèptica: 9.3% vs 8.2%. Un 8% dels pacients que van rebre tractament inicial correcta van presentar bacterièmia persistent, per la qual cosa no s'explicaria la dificultat d'eliminació del microorganisme pel fet de no dur un tractament antibiòtic adequat. El 9.5% dels malalts neutropènics presenten un 9.5% de complicacions enfront a un 19.3% dels no neutropènics, fet que podria anar a favor de la persistència intracel·lular.

Finalment en l'anàlisi multivariant es van incloure les variables: obesitat, insuficiència renal crònica, edat, sexe, focus erradicable, sensibilitat a la cloxacil·lina, origen i tractament antibiòtic adequat. Es va establir que la obesitat i l'origen nosocomial presenten més risc de bacterièmia persistent, malgrat que ajustat a la resta de variables no son estadísticament significatives.

Determinació de l'impacte dels factors de virulència i les característiques moleculars de les soques en la presència de complicacions derivades de la bacterièmia per S. aureus.

De les 102 bacterièmies incloses en aquest estudi, 63 es varen produir en homes, és a dir, un 61.8%. La mitjana d'edat era de 57.28 (DE de 23.18) anys. L'origen de la bacterièmia va ser en 49 casos nosocomial, representant un 48%, en 24 casos d'origen comunitari (23.5%) i en 29 (28.4%) relacionades amb l'assistència sanitària.

Varem observar que en el 48% (49/102) de les bacterièmies el focus era erradicable, sent el focus d'origen en totes elles el catèter.

El 89.2% dels pacients presentaven comorbiditats associades, la més freqüent amb un 33.3% va ser la Neoplàsia, seguida de la Diabetis en un 31.4% dels casos, la Insuficiència renal crònica en un 18.6%, el tractament amb immunosupressors el 17.6% i la MPOC en un 13.7%.

El percentatge de pacients amb complicacions va ser del 40.2% (41/102). Es va establir la mateixa sistemàtica d'anàlisi que en el cas de la població de 293 pacients, i es va aplicar un model de regressió logística. En aquest model la variable dicotòmica *complicacions (si/no)* es va definir com a variable resposta i es van incloure les variables predictores, tant de l'hostatger com del microorganisme, per d'aquesta manera poder arribar a concloure quins eren els factors rellevants associats al desenvolupament de complicacions. Només es van observar diferències significatives amb la variable hemocultiu positiu a les 72 hores del tractament (bacterièmia persistent) igual que en el cas anterior ($p=0.043$).

D'altra banda, no es va observar cap associació entre la existència de bacterièmies persistents i la presència d'algunes proteïnes implicades en l'evasió immune com la CHIPS o SCIN o la presència de toxines estafilocòcciques com leucocidina de Pantón Valentine, toxines exfoliatives, enterotoxines i la toxina-1 del síndrome del shock tòxic (TSST-1).

La presència del gen *mecA* es va relacionar amb un augment del percentatge de bacterièmia persistent, encara que sense significació estadística. Així, el 15% dels pacients amb bacterièmia per SARM van fer una bacterièmia persistent, en contrast amb el 8% dels malalts amb bacterièmia per SASM, amb una $p=0.307$.

Segons els nostres resultats, l'absència d'una de les MSCRAMM, en concret la SdrD (*protein serin aspartat*), s'ha relacionat significativament amb la presència de bacterièmia persistent, de tal manera que 27.3% dels malalts amb bacterièmia persistent no tenen aquesta proteïna, en contrast amb el 8.1% dels pacients amb bacterièmia persistent que sí la tenen amb una $p=0.049$.

Tenint en compte les variables clíniques de l'hostatger, el 15.6% dels pacients amb DM feien bacterièmia persistent, mentre que només ho feien el 7.1% que no tenien DM ($p=0.181$). Es va observar una associació estadísticament significativa entre la bacterièmia persistent i la Insuficiència Renal Crònica, en el sentit de que el 26.3% d'aquests pacients varen presentar bacterièmia

persistent, respecte a només el 6% dels que no tenien aquesta patologia de base ($p=0.07$). El 22% dels pacients amb tractament immunosupressor presentaven bacterièmia persistent enfront del 7.1% dels pacients que no en prenen ($p=0.051$).

Un 8.6% dels pacients que van rebre un tractament adequat des de l'inici van presentar bacterièmia persistent, enfront el 22.2% dels que no el duien ($p=0.4$).

Finalment, a l'anàlisi multivariant es van incloure en un *primer model* les següents variables: presència del gen *mecA*, *sdrD*, insuficiència renal crònica, tractament immunosupressors i el tractament antibiòtic adequat. Es va observar que la presència del gen *mecA* i el tractament immunosupressor augmentaven els risc de bacterièmia persistent, tot i que no de forma significativa. D'altra banda, es va demostrar que l'absència de la *sdrD* és un factor de risc per a desenvolupar bacterièmia persistent amb una $p= 0.052$.

En un segon model de anàlisi, excloent la variable *sdrD* i la insuficiència renal crònica, es va establir que el tractament immunosupressor seguia relacionant-se amb la bacterièmia persistent, però la resta de variables perdien significació.

Al realitzar l'anàlisi mitjançant una eina estadística descrita recentment i denominada **genome-wide association study** (<http://www.danielwilson.me.uk/virulogenomics.html>), per identificar la possible associació entre els gens detectats en aquestes soques i la bacterièmia persistent, no es va trobar cap associació significativa.

Objectiu 2. Estudi de l'epidemiologia i aspectes clínics de la infecció de pell i parts toves per *S. aureus* a la població pediàtrica i adulta

Estudi dels factors de virulència i tipificació molecular de les soques causants d'infecció de pell i parts toves en aquesta població

Durant el **primer període d'estudi**, del Gener de 2008 a Maig del 2011, es van recollir un total de 45 mostres, corresponents a 45 pacients menors de 18 anys amb una infecció de pells o parts toves (IPPT), u osteoarticular, amb cultiu positiu per *S.aureus* d'origen comunitari. Això va representar un 9.5% dels 474 aïllaments de *S.aureus* durant el mateix període de temps i amb les mateixes característiques clíniques.

Tipificació mol·lecular de les soques SASM

La tipificació molecular mitjançant microarray **StaphyType kit** d'aquestes soques ens va permetre confirmar que en 35 d'elles, un 77.8% no detectava el gen *mecA* i per tant, no s'observava resistència a cloxacil·lina.

L'estudi genotípic ens va permetre detectar la presència dels gens que codifiquen per PVL en 25 dels 35, és a dir, en un 71.4% dels SASM, tot i què en 2 d'ells la detecció pel mètode fenotípic mitjançant **Lateral Flow Assay** va resultar negativa.

Pel que fa als resultats de tipificació mol·lecular es va assignar els 35 aïllaments a diferents complexes clonals; el clon predominant va ser CC30-MSSA ($n=6$), CC121 ($n=6$) i CC22-MSSA ($n=5$). La resta van mostrar una elevada variabilitat clonal (2 CC152, 2 CC8, 2 CC45, 2 CC1 i una soca assignada a cada un dels següents CC; CC80, ST49, ST34, ST72, ST2479, CC188, CC15, CC5, CC6 i CC707).

Aquest assaig també ens permet detectar el al·lel del sistema regulador més conegut i estudiat denominat **accessory gene regulator (agr)**. Així de l'estudi del tipus de **agr** de les 35 SASM es va veure que 15 d'elles pertanyien al *agr* I, 12 al *agr* III, 4 al *agr* II i 4 *agr* IV.

Tipificació mol·lecular de les soques SARM

La tipificació mol·lecular va detectar la presència del gen *mecA* 10 d'elles, un 22.2%. Això ens donava una incidència de SARM del 22.2%. La detecció genotípica ens va permetre detectar la presència dels gens que codifiquen per PVL en els 10 casos, és a dir, un 100% de les nostres soques SARM eren pvl+ i en totes elles la detecció pel mètode fenotípic mitjançant **Lateral Flow Assay** va resultar positiva.

Pel que fa als resultats de tipificació mol·lecular es va assignar els 10 aïllaments a una mateixa clona CC8- ST8 *SCCmec* tipus IV. El subtipat del tipus *SCCmec* tipus IV realitzat al Centro Nacional de

Microbiologia ens va conformar que les 10 soques pertanyien al SCCmec tipus IVc. L'al·lel del sistema regulador *agr* de les 10 soques SARM va el *agr* I. Totes ells havien perdut el element mòbil ACME.

Característiques mol·leculars (<i>StaphyType kit</i>)	CA-SARM (n=10)	CA-SASM (n=35)
Detecció PVL positiva	10 (100%)	25 (71,4%)
<i>agr</i> tipus		
I	10 (100%)	15 (42,8%)
II	0	4 (11,1%)
III	0	12 (33,3%)
IV	0	4 (11,1%)
cc8 / ST8	10	0
cc30	0	6
cc22	0	5
cc121	0	4
cc152	0	2
cc8	0	2
cc1/cc45/cc152	0	2
cc80/cc1/ST-49/ST72/cc707/ST-2479/cc188/cc5/cc6	0	1

Taula 11. Resum de característiques moleculars

Durant el **segon període d'estudi**, dins del projecte Europeu "**Prevalence of *S.aureus* among patients presenting with skin and soft tissue infections**". A multi-centre pilot study in Europe. **European Society Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID)**", del Març de 2015 a Juny del 2015, es van recollir un total de 32 soques, corresponents a pacients nens i adults amb infecció de pells o parts toves (IPPT), osteomielitis o infeccions articulars amb cultiu positiu per *S.aureus* d'origen comunitari que consultaven al servei d'urgències.

La prevalença total de SARM va ser del 12.5% (4/32). Corresponents al Complexe Clonal (CC): 1- CC 8/SARM IV/ACME negatiu, 2- CC 88/ SARM IV, 3- CC 001/ ST573/772, 4- CC V/VI.

Pel que fa als aïllats SASM pertanyien als cc; 1 CC001 (ST573/772), 1 CC121, 4 CC15, 1CC188, 5 CC188 CC22, 2 CC25, 1 CC30 (PVL+), 2 CC30, 3 CC30 (ST34/42), 3 CC45, 1 CC5, 1 CC5 IV/VI, 1 CC59, 3 CC8, 1 CC8 (MRSA IV) ACME negative, 1 CC88 (MRSA IV), 1 CC9.

En 9 casos es va trobar una PVL positiva (28.1%). Tres casos corresponien a malalts SARM amb diferents cc: 1- CC 8/SARM IV/ACME negatiu, 2- CC 88/ SARM IV, 3- CC 001/ ST573/772. Sis casos corresponents a SASM pertanyents als CC : 2 al CC 22, CC 15, CC 8, CC 30, CC 121

Descriure les característiques clíniques i epidemiològiques de les infeccions de pell i parts toves en aquesta població

Les característiques clíniques d'aquestes infeccions recollides durant el **primer període** son les següents i es recullen la taula en funció si es tractava de un SASM o SARM.

Característiques clíniques i epidemiològiques dels malalts amb aïllament de SASM

Trenta cinc del total de mostres recollides van correspondre a aïllaments per SASM, un 77.8%. Pel que fa a la resta de sensibilitat antibiòtica, vam observar resistència a quinolones en 4 soques, a macròlids en 3, gentamicina en 5 i trimetropin-sulfametoxazol en 1. Pel que fa als Macròlids no es va observar l'existència d'un fenotip MLSB induïble a clindamicina i tampoc en cap cas l'heteroresistència a glicopèptids, o resistència a mupirocina.

Trenta tres pacients van ser homes, un 65.7%. La mitjana d'edat va ser de 79.6 mesos (3-244). Pel que fa a l'origen geogràfic; 11 nens eren d'origen espanyol (31.4%), 4 originaris de l'Índia, 3 de Guinea Equatorial i 1 d'Equador, Kazakhstan, Marroc, Santo Domingo i Uruguai. Només en un cas no varem saber d'on provenia. Pel que fa a la malaltia de base, en 2 casos existia l'antecedent de varicel·la, un cas amb anèmia ferropènica, un síndrome de Aarskog i un síndrome de Arnold-Chiari. Quan a la localització es va descriure molta variabilitat, sense observar-ne una agrupació rellevant.

Es van classificar les infeccions en quatre grups segons la seva manifestació clínica, així en 2 casos (5.7%) es va observar una infecció superficial (fol·liculitis), 3 (65.7%) associades a abscessos, 6 (17.1%) amb cel·lulitis i 4 (11.4%) amb osteomielitis/bursitis.

Dels 35 pacients, 12 van requerir ingrés hospitalari, un 34.3% i en 24 (68.6%) dels casos es va necessitar fer drenatge o incisió de la lesió.

Característiques clíniques i epidemiològiques dels malalts amb aïllament de SARM

Les 10 infeccions restants, que representaven un 22.2% del total van ser causades per CA-SARM. Característicament 9 d'aquestes soques eren sensibles a la resta d'antibiòtics no betalactàmics testats, i només en un cas es va descriure una resistència a gentamicina.

Sis pacients eren homes, un 60%. La mitjana d'edat va ser de 72.6 mesos (6-214). Pel que fa a l'origen geogràfic; 5 nens eren d'origen espanyol (54.5%), 4 d'Equador i en un cas tampoc varem saber quin era el seu origen geogràfic. Es va observar un cas de pacient monorré i un altre amb antecedents de varicel·la prèvia.

Cap dels casos es va relacionar amb l'assistència sanitària. Es va realitzar l'estudi de colonització nasal per SARM en 6 casos i només en un d'ells va resultar positiu. Es tractava del nen monorré, tot i que com ja s'ha comentat no es trobar cap registre d'ingressos previs.

Si ens fixàvem en la distribució en funció de les manifestacions clíniques, en 3 casos (30%) es va observar una infecció superficial (fol·liculitis), 5 (50%) associades a abscessos i 2 (20%) amb cel·lulitis. Només 2 pacients van requerir d'ingrés hospitalari i en 8 casos va ser necessari un drenatge o incisió de la lesió (80%).

Pel que fa al tractament previ, 4 nens portaven tractament empíric amb amoxicil·lina-clavulànic i els 6 restants amb cefalosporines de primera generació. En cinc casos no es va canviar a un tractament antibiòtic efectiu, tot i això van presentar una evolució favorable, destacant que en 4 dels 5 es va realitzar el drenatge de la lesió. En els 5 casos en els que el tractament antibiòtic va ser dirigit, en 4 d'ells es va passar a trimetropim-sulfametoxazol i en un d'ells a claritromicina.

Característiques clíniques	CA-SARM (n=10)	CA-SASM (n=35)
Edat (mesos)		
Mitjana (Rang)	72,6 (6-214)	79,6(3-244)
Gènere		
Dona	6 (60%)	23 (65,7%)
Home	4 (40%)	12 (34,3%)
Tipus d'infecció		
Fol·liculitis	3 (30%)	2 (5,7%)
Cel·lulitis	2 (20%)	6 (17,1%)
Abscés	5 (50%)	23 (65,7%)
Osteomielitis	0	4 (11,4%)
Incisió /Drenatge	8 (80%)	24 (68,6%)
Ingrés hospitalari	2 (20%)	12 (34,2%)

Taula 12. Resum de característiques clíniques i epidemiològiques

Les característiques clíniques recollides en el **segon període** segons eren SASM o SARM varen les següents.

Característiques clíniques i epidemiològiques SASM

Vint-i-vuit del total de mostres recollides van correspondre a aïllaments per SASM, un 87.5%. Pel que fa a la resta de sensibilitat antibiòtica, varem observar resistència a macròlids en 2 casos, tobramicina sola en 2 i a tots els aminoglucòsids en 1 cas. Pel que fa als macròlids no es va observar l'existència d'un fenotip MLS_B induïble a clindamicina i tampoc en cap cas l'heteroresistència a glicopèptids, però sí un cas de resistència a mupirocina.

Dinou pacients van ser homes, un 67.8%, i setze menors de 18 anys (16/28: 57.14%). En aquest període no es va mirar l'origen geogràfic del pacient.

Pel que fa a la malaltia de base, es van reportar després de la revisió de les històries clíniques diferents patologies de base concomitants, entre elles casos de diabetis, hipertensió arterial, algunes malalties autoimmunes, un cas de cirrosi i una neoplàsia prostàtica en un dels casos. Quan a la localització es va reportar molta variabilitat, sense observar-se una agrupació rellevant.

Es van classificar les infeccions en quatre grups segons la seva manifestació clínica, així en 7 casos (25%) es va observar una infecció superficial (fol·liculitis/paroníquia), 5 (18%) associades a abscessos, 7 (25%) amb cel·lulitis i 1 (3.5%) amb osteomielitis/bursitis. En els 8 (28.5%) casos restants les manifestacions clíniques van ser altres. En 21 casos (75%) era el primer episodi i en els 7 restants la clínica era recurrent.

Pel que fa al tractament previ, 9 pacients tenien antecedents de tractament antibiòtic empíric abans de consultar al servei d'urgències i en 4 casos referien haver pres tractament durant el mes previ. Dels 28 pacients, en 15 (53.6%) casos es va necessitar fer drenatge o incisió de la lesió.

Característiques clíniques i epidemiològiques SARM

Les 4 infeccions restants, que representaven un 12.5% del total van ser causades per CA-SARM.

Característicament només una d'aquestes soques era sensible a la resta d'antibiòtics no betalactàmics testats, en les altres tres es va descriure resistència a macròlids i a aminoglucòsids

Tres pacients eren dones, un 75%. Dos majors de 18 anys (50%) i en ambdós casos es tractava de pacients amb diabetis. En quan a la localització dues afectaven a extremitats inferior, en forma d'infecció superficial una i l'altre com osteomielitis, una al cap i un altre amb abscessos múltiples a l'abdomen

En 3 casos (75%) era el primer episodi i en el quart es tractava d'una recurrència clínica. Pel que fa al tractament previ, només 1 pacient tenia antecedents de tractament antibiòtic empíric abans de consultar al servei d'urgències i en 2 casos referien haver pres tractament durant el mes previ. Dels 4 pacients, en 4 (50%) casos es va necessitar fer drenatge o incisió de la lesió, sent aquests els que es van presentar com osteomielitis i abscessos abdominals i corresponien als dos pacients adults diagnosticats de diabetis.

Determinar el impacte dels factors de virulència i les característiques moleculars de les soques en la presentació clínica de la infecció cutània

La presència de certs factors de virulència en algunes soques de *S.aureus* s'ha relacionat amb la gravetat i l'evolució clínica. La tipificació molecular de les soques incloses en el nostre estudi, permetrà estudiar quin ha estat l'impacte clínic en funció de la presència o absència d'aquests gens. Així en el **primer període** d'estudi en el que es van recollir 45 soques productores d'IPPT, es van classificar com CA-SARM 10 aïllaments, totes elles mostraven la presència dels gens que codifiquen per la PVL i totes elles es van incloure dins la mateixa clona CC8-ST8 *SCCmec* tipus IVc. Pel que fa a les soques SASM es va observar la presència de la PVL en un 71.4% (25/35).

Si ens fixem en les CA-SARM *pvl+*, en només un cas la lesió cutània presentava necrosi, es tractava d'una pacient originària d'Equador, sense antecedents de malaltia de base associada i amb un abscess cutani a la cuixa. Va ser necessari realitzar el drenatge de la lesió, tot i tractament antibiòtic amb cefadroxilo i va presentar una evolució favorable, sense necessitat d'ingrés hospitalari. Com antecedent epidemiològic a destacar, el pare de la nena explicava episodis d'abscessos cutanis de repetició. Pel que fa a la resta de les 9 soques CA-SARM *pvl+* que no presentaven lesió amb necrosi, 7 d'elles van requerir un drenatge de la lesió i en dos casos es va necessitar ingrés hospitalari.

En l'estudi d'altres factors de virulència, cap de les 10 CA-SARM *pvl+* va mostrar la presència de l'element genètic mòbil (ACME).

Pel que fa a les 35 soques CA-SASM, la presència de necrosi es va observar en només en un cas de CA-SASM *pvl-*. Es tractava d'un nen d'origen espanyol amb un abscess gluti que es va drenar, sense patologia de base i que va presentar una bona evolució, sense ingrés hospitalari.

Analitzant la presència d'altres factors implicats en la patogènia de les infeccions per *S.aureus*, com poden ser la proteïna amb acció immunomoduladora CHIPS, la toxina de la síndrome del shock tòxic (TSST-1), algunes enterotoxines, les toxines exfoliatives i algunes proteïnes de superfície implicades en l'adhesió MSCRAMM (*cna*, *clfa*, *Fnb*) no s'ha observat cap associació entre la presència o absència d'alguna d'elles amb una determinada presentació clínica.

En el **segon període** d'estudi en el que es van recollir 32 soques productores d'IPPT, 4 d'elles van ser **CA-SARM** i 3 d'elles mostraven la presència de la PVL, només en un dels casos va ser necessari drenatge. Les manifestacions clíniques d'aquests tres casos varen ser diferents, en un cas es van reportar abscessos abdominals múltiples, un altre com un abscess al cap recurrent i l'altre un impetigen.

Pel que fa a les **28 CA-SASM**, 6 mostraven la presència de la PVL, pel contrari en cap d'elles es detectava la presència de CHIPS i TSST-1.

La manifestació clínica més freqüent dels 6 CA-SASM *pv*+ va ser l'abscess en 5 casos i 3 d'ells van requerir drenatge de la lesió. Ni la localització de la lesió ni el fet de tractar-se d'infeccions recurrents, o de ser el primer episodi, mostraven cap predomini.

Les 22 CA-SASM *pv*-, un 50% (11/22) va requerir drenatge. Es van diagnosticar dos casos de primer episodi de cel·lulitis necrotitzant, ambdues de localització al peu, en una d'elles s'associava ETAD i en l'altre TSST-1. En 4 soques es va detectar la presència de toxines exfoliatives (2ETAA i 2 ETAD) i en 5 d'elles la presència de TSST-1. Pel que fa a les manifestacions clíniques de les altres no va detectar cap associació significativa.

Durant el mateix període de temps, es va realitzar el tipat molecular mitjançant array de soques CA-SARM de pacients que havien consultat al Centre d'Atenció Primària. El 30% d'aquestes pertanyien a la soca USA300-ST8-SCC*mec* IVc productora de la Leucocidina de Pantón Valentine i sense l'element genètic mòbil ACME.

Objectiu 1. Estudi de l'epidemiologia, diagnòstic i aspectes clínics de la bacterièmia per *Staphylococcus aureus*

Actualment, *S.aureus* és un dels microorganismes amb més rellevància epidemiològica i clínica. Tot i l'elevat nombre d'estudis publicats, continua sent un repte l'estudi de la patogènia de les infeccions que causa, i les implicacions dels factors dependents de l'hostatger i del microorganisme, tant en les manifestacions clíniques com en l'evolució. Actualment, l'augment de l'esperança de vida i de comorbiditats associades en aquests malalts, junt amb la reorientació del sistema sanitari amb la creació de l'atenció a domicili, hospitals de dia, centres socio-sanitaris, cirurgia major ambulatoria, fa que sigui difícil trobar el límit entre l'hospital i la comunitat. De fet, aquests malalts reingressaran de forma repetida i estaran sotmesos a múltiples tractaments antibiòtics. Això junt amb la constant variació de les clones predominants i els canvis en el seu perfil de sensibilitat, fa que sigui de gran interès, el coneixement de l'epidemiologia de les soques de *S.aureus*, que produeixen infeccions en el nostre medi. Conèixer aquestes dades ens permetrà entendre quina és la dinàmica d'aparició d'algunes clones i la seva disseminació i comparar-la amb la d'altres àrees geogràfiques.

D'altra banda, serà de gran interès veure si existeix alguna relació entre les característiques microbiològiques i moleculars del microorganisme i el seu comportament clínic.

1.1. Estudi dels factors de virulència i tipificació molecular de les soques causants de bacterièmia per *S. aureus* de diferents orígens.

La fagotipia com a tècnica de tipificació es va començar a utilitzar als anys 40 a Anglaterra, i des d'aleshores s'ha utilitzat en centres de referència en estudis de vigilància epidemiològica.

En l'anàlisi dels resultats obtinguts del fagotipat de les soques SARM procedents de malalts amb bacterièmia del nostre centre, trobem que el fagotip predominant és el Fagotip III, representant un 17.85%, fet que es correlaciona amb l'últim estudi nacional multicèntric, on aquest fagotip representava el 20% (211) i amb d'altres estudis europeus com el de Cristiano *et al* (212), Winsiewska *et al* (213) i Mehndiratta *et al* (214). En un estudi Israelità es descriu que el 96% dels aïllats sensibles als fags del grup III eren SARM (215). En aquests estudis de vigilància epidemiològica com el de Cristiano *et al* (212) i Kareiviene *et al* (216) que incloïen tant soques SASM com soques SARM, descriuen que el fagogrup II només el trobaven en les soques SASM. En la nostra població d'estudi, el fagotip II representa el 6.6% dels SASM (6/90), és a dir, el trobem en 6 de les 39 soques SASM que es van poder tipificar. D'altra banda, la proporció de soques SARM classificades com "no tipables" en la nostra sèrie és del 37.5%, inferior a la descrita en un estudi multicèntric espanyol en el que es van tipificar 2.144 soques SARM, de les quals 60% dels quals eren "no tipables" (211) o el 56.2% reportat per Kareiviene *et al* (216). Tot i el menor percentatge de "no tipables" en la nostra

mostra, que es podria explicar pel limitat número de soques, es tracta d'una tècnica amb poc poder discriminatiu i que només estaria indicat utilitzar com a mètode de cribratge inicial.

En els últims anys, han aparegut diferents tècniques de tipificació molecular que ens permeten classificar les soques de *S.aureus*. Entre elles, l'electroforesi en camp polsant (PFGE), és considerada el "gold estàndard" en l'epidemiologia local. D'altra banda, *spa typing* en combinació amb l'anàlisi BURP s'ha convertit en l'eina de primera línia en la tipificació epidemiològica rutinària. Tècniques com el MLST i determinació SCCmec tipus es consideren mètodes de referència per a definir les clones de *S.aureus*

L'anàlisi del PFGE de les 28 soques SARM del nostre estudi ens mostra la presència de 7 genotips diferents, tots ell descrits en estudis previs (211) i que inclouen els dos clons predominants d'origen nosocomial (E7 i E8) i un clon adquisició comunitària. Si comparem la prevalença amb l'últim estudi multicèntric espanyol, observem que en un 61.8% pertanyen als tipus E7 i E8, similar al 52.5% observat per Vindel *et al* (211). L'electroforesi en camp polsant ha estat considerada com una tècnica amb elevat poder discriminatiu i molt vàlida per la tipificació de *S.aureus*, tot i això s'ha posat en dubte la seva aplicació en estudis epidemiològics longitudinals, a causa de l'alt grau de variació genètica que s'ha anat observant en els clons pandèmics al llarg de la història evolutiva. Aquest fet no s'ha posat de manifest en el nostre anàlisi ni en les dades observades per Vindel *et al* (211), ja que les clones predominants a Espanya s'han mantingut estables des del 1996 (211). D'altra banda, podem destacar la presència de 3 soques pertanyents a la clona E19, descrita per primera vegada per Vindel *et al* i la no presència de la denominada clona Ibèrica o genotip I, que va ser el predominant als anys 90, però que ha anat desapareixent.

La utilització de la seqüenciació d'un gen de la proteïna A o ***spa typing*** en el tipat de les soques SASM i SARM ha permès tenir a l'abast una tècnica reproducible entre laboratoris i una base de dades universal que recull dades procedents de diferents laboratoris i països.

En l'anàlisi de les soques de HUGTIP veiem com els *spa* tipus predominants són el t067 i el t002, tant pel que fa a les soques SASM com SARM. El ***spa t067*** representa un 14.4% dels SASM i un 17.85% de les SARM, aquesta elevada freqüència coincideix amb les dades espanyoles ja publicades (217) i pel contrari contrasta amb les dades obtingudes de la <http://spa.ridom.de/spa-t067.shtml> on el *spa* tipus t067 mostra una freqüència global del 0.81%. En el cas del ***spa t002***, la freqüència global és del 6.95%, mentre que en el nostre estudi és del 12.22% en les SASM i del 10.71% de les SARM. L'elevada freqüència d'aquests dos *spa* tipus, limita la utilitat d'aquesta tècnica per l'estudi de l'epidemiologia local, i fa necessària la utilització de l'electroforesi en camp polsant per poder discriminar entre diferents clones. Si comparem el perfil de PFGE i els *spa* tipus obtinguts en les 28 soques SARM, les clones E7 i E8 mostren una elevada varietat *spa* tipus, però el 32.14% pertanyen al mateix CC BURP (CC067) tal com ja s'havia descrit. D'altra banda diferents perfils de PFGE poden

compartir un mateix *spa* tipus, indicant la possible existència d'una recombinació genètica, igual que hi ha soques esporàdiques que s'agrupen dins un mateix *spa* tipus, reforçant encara més la idea de l'elevat poder discriminatiu del PFGE.

En conclusió, l'elevat nombre de soques "no tipables" mitjançant Fagotipia ha mostrat el seu poc poder discriminatiu, utilitzant-se com a mètode d'screening inicial en estudis de vigilància epidemiològica.

Una limitació del nostre estudi és que al no tenir les dades de la tipificació mitjançant MLST no es pot demostrar la correlació entre aquest i el tipat obtingut a través de la combinació PFGE més l'assignació per CCBURP, capaç de preveure el eBURST CC en aïllats de SARM.

En la descripció del SCCmec de les soques SARM únicament es va detectar el tipus SCCmecIV. Aquest és el subtipus més freqüent entre els clons majoritaris, però també ho és en els esporàdics i en la clona comunitària. Aquest fet suggereix una elevada transferència i persistència entre soques. Dins el tipus IV, el subtipat ens va permetre saber que 27/28 SARM tenien el subtipus SCCmecIVc. Només en un cas varem tenir subtipus IVa, a diferència d'alguns estudis americans on es mostra una prevalença molt més elevada (218), en una clona de CA-SARM (ST8-SCCmecIVa-pvI+) productora de la majoria d'infeccions de pell i parts toves o en l'últim multicèntric espanyol, on representava el 70.1%. Així doncs, la caracterització del tipus de SCCmec va mostrar una baixa capacitat de discriminació.

Pel que fa a la detecció de la PVL, la seva baixa freqüència està en concordança amb la observada en la bibliografia en aquest tipus d'infeccions (33).

1.2. Avaluació de diferents mètodes ràpids d'identificació i determinació de la sensibilitat antibiòtica de *S. aureus*, directament de l'hemocultiu positiu.

L'elevada morbimortalitat a la que s'associen les infeccions invasives per *S. aureus* i en particular de la sèpsia, ha fet necessari intentar optimitzar tant les tècniques de diagnòstic microbiològic, com el maneig clínic, millorant d'aquesta manera el pronòstic d'aquestes infeccions (165, 174). En aquesta línia, un tractament antibiòtic adequat de manera precoç millora molt el pronòstic a curt i llarg termini. Els tres assajos avaluats en aquesta tesi amb l'objectiu d'aconseguir una instauració precoç del tractament antibiòtic d'elecció, demostren una elevada sensibilitat i especificat respecte els mètodes de referència. La seva aplicació a la rutina diària seria del tot fiable. No obstant, hi ha algunes consideracions a nivell metodològic que cal destacar. És important assenyalar que el sistema **BinaxNow** és un prova immunocromatogràfica ràpida, amb anticossos policlonals que reconeixen una proteïna específica de *S. aureus*. **GenomEra MRSA/SA** és un test basat en la detecció dels àcids nucleics i **MicroPhage** utilitza el creixement dels bacteriòfags com a marcador de la presència de SARM. Mentre les dues primeres tècniques ens ofereixen la possibilitat d'obtenir el resultat en una hora, **MicroPhage** en requereix 6 h, això s'explica pel temps de creixement del cultiu del bacteriòfag.

La utilitat clínica d'aquestes proves ràpides ofereix la possibilitat d'ajustar el tractament antibiòtic en un curt període de temps. En el nostre estudi només el 20% (11/53) dels pacients duïen un tractament inicial correcte, per tant, l'aplicació d'aquests mètodes va fer augmentar de manera significativa la proporció de tractaments correctes en les primeres 24 hores d'inici de l'episodi.

Com a conclusió, les tres tècniques avaluades són fiables per a la detecció directa de *S. aureus* i el seu patró de resistència a la meticil·lina, directament de l'hemocultiu positiu. No obstant això, el mètode basat en la detecció dels àcid nucleics, GenomEra MRSA/SA, és més simple, pràctic i ràpid. Són necessaris més estudis per poder avaluar el impacte clínic real d'aquestes proves ràpides i la seva capacitat de generar canvis en el maneig i l'evolució dels pacients amb bacterièmia per *S. aureus*

1.3. Descripció de les característiques clíniques i epidemiològiques de les bacterièmies per *S. aureus* durant un període de 7 anys.

Com es va descriure en un informe previ (referència), on es van revisar les bacterièmies en el nostre hospital durant el període del 1983 al 1997, es va observar un ressorgiment de les bacterièmies causades per cocs grampositius, probablement atribuïble a l'augment de la instrumentalització dels malalts, al coincidir amb l'època de la SIDA amb major nombre de ADVP i segurament també a la utilització d'antibiòtics de ampli espectre enfront gramnegatius. En el període revisat actualment, que comprèn les bacterièmies en pacients adults entre els anys 2002-2014 s'observa, en canvi, un augment de les bacterièmies per gramnegatius. Tot i això, la incidència de la bacterièmia per *S.aureus* s'ha mantingut estable entre el 6-8% del total de les bacterièmies diagnosticades. Pel que fa a la incidència de bacterièmia per SARM respecte el total de bacterièmies per *S.aureus*, ha variat des del quasi 40% dels període 83-97 fins al 25% al 2014.

Pel que fa a les dades clíniques dels pacients amb bacterièmia per *S.aureus* durant el nostre període d'estudi, el 58.4% van ser d'adquisició nosocomial (171/293), el 22.9% (67/293) relacionades amb l'assistència sanitària i només el 18.8% (55/293) d'origen comunitari. Atès que *S. aureus* és l'agent etiològic més freqüent de les bacterièmies de focus en el catèter perifèric, aquests percentatges poden variar segons els centres i les diferents mesures de control de la infecció nosocomial que apliquin

Es van diagnosticar un total de 60 bacterièmies per SARM, representant un 20.5% del total de bacterièmies, un percentatge inferior al 30 % descrit per Gasch *et al* (174). El 80% (48/60) d'aquestes eren d'origen nosocomial o nosohusial i només el 20% (12/60) semblaven d'origen comunitari. Aquestes dades contrasten amb les observades per Millan *et al* (219) en un estudi on es van incloure 64 episodis de bacterièmia per SARM, de les quals un 21 (33%) es van considerar comunitàries, 12 es van acabar relacionant amb l'assistència sanitària, 4 provenien de centres de llarga estada, i de les 9

restants no es va poder obtenir informació clínica, però al fer l'estudi epidemiològic es van correlacionar amb les soques nosocomials.

En l'estudi de les dades clíniques dels 12 pacients amb bacterièmia per CA-SARM, s'observà que el focus en dos casos era una cel·lulitis, en 3 respiratori, en 2 úlceres de decúbit, una endocarditis i les altres 4 es van considerar primàries. En 11 d'aquests pacients (91.6%) es va trobar associada alguna malaltia de base. Només en 5 d'aquestes soques es va fer l'estudi epidemiològic mitjançant array, 4 es van incloure dins el CC5, el més prevalent, però no es va poder determinar si existia una correlació epidemiològica amb les soques nosocomials.

Analitzant els resultats de les bacterièmies d'origen nosocomial 171/293, el 60.8 (104/171) pertanyien a serveis mèdics, això podria explicar-se per l'elevada comorbiditat associada un 94.23% (98/104) o per l'elevat percentatge de bacterièmies de focus en el catèter, 61/104 que representen el 58.65%, en concordança a estudis prèviament publicats (220, 221). De les 61 bacterièmies de focus en el catèter, 29 casos eren malalts portadors de un catèter central, 30 duïen un catèter perifèric i en els 2 restants no es va trobar la localització.

Actualment, *S. aureus* és la primera causa d'endocarditis, tant en vàlvula nativa com en pacients amb dispositius intravasculars (222). La incidència d'endocarditis per *S.aureus* es troba al voltant del 30%, fet que es reflexa tant en estudis internacionals (149, 223) com en el nostre medi, on representa el 25% de les EI (162).

En el nostre estudi, es varen diagnosticar un total de 18 endocarditis (6.1%); d'aquestes, un 88.9% (2/18) varen ser causades per SASM. Encara que la freqüència va ser superior en el cas de SASM, no es va trobar significació estadística, segurament degut al baix número de casos.

1.4. Impacte dels factors de virulència i les característiques moleculars de les soques en la presència de complicacions derivades de la bacterièmia per *S. aureus*.

En l'estudi de l'impacte dels diferents factors de virulència en la mala evolució de la bacterièmia, es va veure com el percentatge de pacients amb complicacions era del 40.2% (41/102). Aquesta es definia com la presència de metàstasis sèptiques en un focus diferent del primari, via hematògena (endocarditis, osteomielitis vertebral, accident cerebrovascular embòlic, embòlies sèptiques pulmonars o extensió local (tromboflebitis o abscessos) o presència de shock sèptic. Després de l'anàlisi estadístic es va veure que l'única variable associada a desenvolupar complicacions era la bacterièmia persistent, descrit també per Fowler *et al* (150) en l'estudi de 724 bacterièmies, amb una taxa de complicacions del 43%.

No es va trobar cap associació entre la presència d'alguna de les toxines estafilocòcciques o proteïnes implicades en l'evasió immune amb la major presència de complicacions, ni tampoc amb el desenvolupament de bacterièmia persistent. Això posa de manifest el fet que, detectar la presència o

absència d'un gen no és tant important com poder arribar a demostrar la seva expressió gènica durant el procés infecciós. Per això, s'han desenvolupat tècniques de biologia molecular mitjançant RT-PCR per l'estudi d'expressió de determinats factors de virulència i estudis recents descriuen mètodes alternatius per l'estudi fenotípic de determinats factors de regulació, destacant un test de lisis de vesícules(209) per valorar la funcionalitat de l'operó *agr* i l'expressió de la δ -toxina. D'altra banda, la nova versió del array *StaphyType* kit (Alere Technologies) ha introduït la detecció d'algunes proteïnes, com la proteïna A estafilocòccica, PBP2a, enterotoxines A i B, TSST-1, hemolisines alfa i beta i PVL (224).

El sistema regulador *agr* és un operó que coordina l'expressió de vies metabòliques i l'expressió de certs factors de virulència. Alguns estudis han relacionat la mortalitat de la bacterièmia per SARM amb el subtipus ***agr II*** (207). No obstant, en la nostra població no es va observar associació entre aquest subtipus i una mala evolució del pacient.

Objectiu 2. Estudi de l'epidemiologia i aspectes clínics de la infecció de pell i parts toves per *S. aureus* a la població pediàtrica

El segon objectiu principal d'aquesta tesi va ser determinar les característiques clíniques, microbiològiques i moleculars de les infeccions de pell i parts toves en el nostre entorn, i relacionar-les amb la gravetat i l'evolució clínica, posant especial èmfasi en aquelles causades per CA-SARM.

A l'any 2000, el Centre de Control i Prevenció de les malalties infeccioses del EUA(CDC), va definir una infecció per CA-SARM com l'aïllament d'una soca SARM en un pacient que ve la comunitat o fa menys 48 hores de la seva hospitalització o sense factors de risc per SARM nosocomial (hemodiàlisi, cirurgia, prèvia, centre de llarga estada, presència dispositius externs). El primer cas es va reportar a les poblacions indígenes a Austràlia als anys 90 (123). A Estats Units, l'any 1999 es van notificar quatre casos de CA-SARM en nens residents a Minnesota, els quals van morir i aquest fet va revelar la potencial severitat d'aquestes infeccions (225). En els anys posteriors ja ha quedat clarament reportada l'elevada incidència d'aquests aïllaments als EEUU (226, 227). Al continent Europeu també es van anar descrivint brots per aquestes soques (228). Els primers documentats a Espanya van ser a l'any 2006 a l'hospital 12 Octubre de Madrid (229). Des d'aleshores hi han hagut diverses publicacions en el nostre país de sèries de casos, sobretot en adults joves i nens, molts d'ells provinents del continent Sud-americà. El primer estudi realitzat de forma prospectiva per analitzar la situació de les infeccions per CA-SARM al nostre país en població pediàtrica, es va realitzar al 2007 per Daskalali *et al* (230), mostrant una prevalença del 13%. La prevalença d'aquestes soques en el nostre estudi és d'un 22.2% (10/45), tenint en compte que es tractava només de pacients que consultaven al servei d'urgències i en cap cas de l'atenció primària. Com a característiques moleculars d'aquestes soques podem destacar la presència de l'element genètic *SCCmec* de tipus IV, molt més petit que els altres subtipus, fet que sembla ser essencial per la seva emergència i disseminació (231). Aquests CA-SARM també s'han associat a la presència d'un gen que codifica per la Leucidina de Pantón-Valentine, la qual s'ha considerat que estava relacionada en part amb l'augment de la virulència d'aquestes soques. Actualment, les cinc clones de CA-SARM que circulen mundialment són: ST1-IV (USA 400), ST8-IVa (USA300), ST30-IV (Pacífic/Oceania), ST-59-IV i V (USA1000, Taiwan) i ST-80 (Europea). La variant USA300 ST8-*SCCmec* IVa és molt freqüent als EEUU, però una variant d'aquesta soca ST8-*SCCmec* IVc es va establir a Sudamèrica. Característicament aquesta variant ha perdut la illa genòmica denominada *arginine catabolic mobile element* (ACME) (232). Tots els casos CA-SARM del nostre primer estudi van ser produïts per la variant de la USA300-ST8-*SCCmec* IV, totes tenien el subtipus *SCCmec* IVc (subtipat al Centro Nacional de Microbiologia) i totes havien perdut l'ACME. La nacionalitat d'aquests nens era, en 5 casos d'origen espanyol (54.5%) i 4 d'Equador, fet que contrasta amb la hipòtesi inicial segons la qual el predomini d'aquesta clona es

relacionava amb la immigració (107, 122). Altres estudis realitzats més tard (104) observaven com la clona USA300 ST8-SCCmecIVc i ACME negatiu era la més freqüent i la majoria de pacients eren de nacionalitat espanyola, fet que suggeria la propagació dins de l'estat espanyol d'aquestes soques. És interessant remarcar, que la considerada "clona Europea" ST80 no s'ha descrit en cap cas.

Des de la descripció de brots d'infeccions severes necrotitzants causades per aquestes soques de CA-SARM, sobretot en pacients sense factors de risc predisponents, hi ha la hipòtesi de la possible associació entre alguns factors de virulència i la gravetat de les manifestacions clíniques. El paper real de la PVL en aquestes infeccions segueix sent un tema de controvèrsia, arran dels resultats obtinguts tant en estudis clínic com experimentals (23, 25, 29, 233). En els pacients de la nostra sèrie amb infecció per CA-SARM, la presència d'aquesta leucocidina no ha representat una major gravetat clínica ni una evolució desfavorable. En 5 dels pacients en els que es va observar la formació d'un abscess, tot i que el tractament antibiòtic era inadequat, van presentar una evolució favorable. Aquest fet es correlaciona amb la idea que el tractament d'elecció per als abscessos cutanis, independentment de la seva sensibilitat antibiòtica, és la incisió i drenatge, i els antibiòtics proporcionen poc o cap benefici en la majoria dels casos (De Leo). D'altra banda i com alguns estudis ja han descrit, l'elevada prevalença de la PVL en aquestes soques CA-SARM fa més difícil valorar quin és el seu paper real en la patogènia de la infecció. La necrosi estava present només en 1 cas dels CA-MRSA i aquesta va requerir de drenatge. En relació als CA-MSSA 24 (68.6%) que van necessitar incisió o drenatge, en 19 d'elles es va demostrar la presència de la PVL, tot i que no es va poder establir una relació estadísticament significativa ($p=0.134$). Altres estudis espanyols relacionen la presència de PVL amb una major freqüència de necessitat de drenatge (230).

Conclusions: La nostra població d'estudi, mostra una elevada variabilitat geogràfica, tant en els pacients amb infeccions per SARM com per SARM. Les manifestacions clíniques son lleus, sense complicacions, tant en aïllats SARM com SARM. La detecció de la Leucocidina de Pantón Valentine es va associar amb una major formació d'abscessos, però no amb la gravetat de les manifestacions clíniques.

Pel que fa al segon període d'estudi, dins del projecte Europeu "**Prevalence of *S.aureus* among patients presenting with skin and soft tissue infections**". A multi-centre pilot study in Europe. **European Society Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID)**", en el qual es van incloure pacients adults (15/32: 46.87%), la prevalença de les IPPT per CA-SARM va disminuir fins al 12.5%, fet que podria explicar-se per la major prevalença d'aquest tipus d'infecció en la població pediàtrica i adults joves sense patologia de base. Aquesta dada s'acosta al 12.8% de prevalença global que trobem en el projecte Europeu, on s'inclouïen soques de CA-SARM causants de IPPT de 6

països europeus. En aquest estudi es mostren prevalences des del 0% a UK, fins al 27.3% a Grècia, seguida de Rumania amb un 27.1% i d'Espanya amb el 12.5%, tal com s'ha mencionat. En el nostre cas varem detectar la presència de la PVL en 9 casos (28.1%), tres eren SARM i en cap cas pertanyent a la variant de la clona USA300 ST8-SCCmec IVc /ACME. En les soques estudiades en el nostre centre, a diferència dels resultats obtinguts a partir de l'estudi de les soques provinents dels 6 països, no es va observar una associació significativa entre la presència de PVL i CA-SARM. En cap cas es va descriure la presència d'alguna soca pertanyent a la clona ST8-SCCmec IVc. Pel que fa a la clona predominant europea, CA-MRSA ST80 (t044), no es va descriure cap cas en la nostra sèrie, encara que va ser la més freqüent a França i Grècia amb un 66.7% de tots els CA-SARM. Tenint en compte les manifestacions clíniques i sense poder disposar de dades clíniques dels malalts de la resta de països, podríem destacar el menor percentatge d'abscessos en la nostra mostra (18.7% vs 29.3%) ,en les fol·liculitis (15.6 vs 28.75) i en osteomielitis (14.4% vs 3.5%). En canvi s'observa una major prevalença de cel·lulitis (10.3% vs 15.6%) i fascitis necrotitzant (1.1% vs 6%).

Conclusió: La prevalença de SARM(12.8%) és una mica superior al 12.5% global observat en l'estudi multicèntric europeu que engloba 6 països. No es va detectar cap soca de la clona ST8-SCCmec IVc. Es va detectar un augment en la presència de cel·lulitis i fascitis necrotitzant en la nostra mostra, respecte al total de les 174 soques de l'estudi.

Conclusions

Objectiu 1. Estudi de l'epidemiologia, diagnòstic i aspectes clínics de la bacterièmia per *Staphylococcus aureus*

- L'elevat nombre de soques "no tipables" mitjançant Fagotipia ha mostrat el seu poc poder discriminatiu, pel que es recomanaria únicament el seu ús com a mètode d'screening inicial en estudis de vigilància epidemiològica.
- L'elevada similitud de les clones de *Staphylococcus aureus* circulants en el nostre medi, fa necessari l'ús combinat de les tècniques d'electroforesi en camp polsant (PFGE) i *spa* typing per augmentar el poder discriminatiu i la capacitat de tipatge molecular en els estudis epidemiològics de prevalença o longitudinals, alhora que permet millorar la comparació entre laboratoris.
- Les tècniques avaluades: *BinaxNow S.aureus/PBP 2a Test*, *GenomEra MRSA/SA Blood Culture* i *MicroPhage MRSA/MSSA Blood Culture Test* han resultat fiables per a la detecció directa de *S. aureus* i el seu patró de resistència a la meticil·lina directament de l'hemocultiu positiu. No obstant això, el mètode basat en la detecció dels àcid nucleics, *GenomEra MRSA/SA Blood Culture*, és més simple, pràctic i ràpid. Tot i que són necessaris més estudis per poder avaluar el impacte clínic real, s'ha observat la seva capacitat de generar canvis en el maneig i l'evolució dels pacients amb bacterièmia per *S. aureus*
- L'origen més freqüent de la bacterièmia per *Staphylococcus aureus* en el nostre entorn és nosocomial amb el focus d'origen en el catèter i amb elevada presència de comorbiditats. La prevalença de la bacterièmia per *Staphylococcus aureus* resistent a la meticil·lina (SARM) és del 20.5%, associada a l'origen nosocomial o nosohusial i d'origen en el catèter. Una quarta part dels casos desenvolupen una bacterièmia complicada. Es va observar la bacterièmia persistent en un 8.5% dels casos.
- La presència o absència del gen que codifica per un determinat factor de virulència no s'ha pogut associar amb la gravetat de les manifestacions clíniques, posant de manifest la necessitat de desenvolupar mètodes de detecció fenotípica d'alguns factors de regulació i altres mètodes moleculars per la detecció de l'expressió gènica d'algunes proteïnes.

Objectiu 2. Estudi de l'epidemiologia i aspectes clínics de la infecció de pell i parts toves per *S. aureus* a la població pediàtrica

- Les infeccions de pells i parts toves causades per *Staphylococcus aureus* resistent a la meticil·lina d'origen comunitari (CA-SARM) en el nostre medi son relativament freqüents (10-20%). Una de les clones predominants és la USA300-ST8-SCCmec IVc productora de la Leucocidina de Panton Valentine i sense l'element genètic mòbil ACME .
- L'elevada variabilitat geogràfica dels pacients fa que no es pugui establir una relació entre la clonalitat de les soques i la nacionalitat.
- En tots els casos les manifestacions clíniques de les infeccions son lleus i sense complicacions, tot i que sovint es va requerir drenatge. La presència de la Leucocidina de Panton Valentine, observada en una elevada freqüència, tant en aïllats SASM com SARM, no s'ha associat a major gravetat a la nostra sèrie.

Establir l'associació entre les característiques clíniques de l'hostatger, el tipat molecular del microorganisme i l'estudi de l'expressió dels seus factors de virulència i dels sistemes de regulació, hauria de permetre formular un algoritme que ens ajudi a predir la presentació clínica i l'evolució de les infeccions per *Staphylococcus aureus*.

Referències Bibliogràfiques

1. Speziale P, Pietrocola G, Foster TJ, and Geoghegan JA. Protein-based biofilm matrices in *Staphylococci*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2014;4(171).
2. Foster TJ, Geoghegan JA, Ganesh VK, and Hook M. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Microbiol*. 2014;12(1):49-62.
3. Hair PS, Echague CG, Sholl AM, Watkins JA, Geoghegan JA, et al. Clumping factor A interaction with complement factor I increases C3b cleavage on the bacterial surface of *Staphylococcus aureus* and decreases complement-mediated phagocytosis. *Infect Immun*. 2010;78(4):1717-27.
4. Dinges MM, Orwin PM, and Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev*. 2000;13(1):16-34, table of contents.
5. Foster TJ. Immune evasion by staphylococci. *Nat Rev Microbiol*. 2005;3(12):948-58.
6. Ferens WA, and Bohach GA. Persistence of *Staphylococcus aureus* on mucosal membranes: superantigens and internalization by host cells. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 2000;135(3):225-30.
7. Berube BJ, and Bubeck Wardenburg J. *Staphylococcus aureus* alpha-toxin: nearly a century of intrigue. *Toxins*. 2013;5(6):1140-66.
8. Vandenesch F, Lina G, and Henry T. *Staphylococcus aureus* Hemolysins, bi-component Leukocidins, and Cytolytic Peptides: A Redundant Arsenal of Membrane-Damaging Virulence Factors? *Front Cell Infect Microbiol*. 2012;2(12).
9. Otto M. *Staphylococcus aureus* toxins. *Current opinion in microbiology*. 2014;17(32-7).
10. Colin DA, Mazurier I, Sire S, and Finck-Barbançon V. Interaction of the two components of leukocidin from *Staphylococcus aureus* with human polymorphonuclear leukocyte membranes: sequential binding and subsequent activation. *Infect Immun*. 1994;62(8):3184-8.
11. Jayasinghe L, and Bayley H. The leukocidin pore: evidence for an octamer with four LukF subunits and four LukS subunits alternating around a central axis. *Protein science : a publication of the Protein Society*. 2005;14(10):2550-61.
12. Morinaga N, Kaihou Y, and Noda M. Purification, cloning and characterization of variant LukE-LukD with strong leukocidal activity of staphylococcal bi-component leukotoxin family. *Microbiology and immunology*. 2003;47(1):81-90.
13. Gravet A, Colin DA, Keller D, Girardot R, Monteil H, et al. Characterization of a novel structural member, LukE-LukD, of the bi-component staphylococcal leucotoxins family. *FEBS letters*. 1998;436(2):202-8.
14. Gravet A, Couppie P, Meunier O, Clyti E, Moreau B, et al. *Staphylococcus aureus* isolated in cases of impetigo produces both epidermolysin A or B and LukE-LukD in 78% of 131 retrospective and prospective cases. *J Clin Microbiol*. 2001;39(12):4349-56.
15. Gravet A, Rondeau M, Harf-Monteil C, Grunenberger F, Monteil H, et al. Predominant *Staphylococcus aureus* isolated from antibiotic-associated diarrhea is clinically relevant and produces enterotoxin A and the bicomponent toxin LukE-lukD. *J Clin Microbiol*. 1999;37(12):4012-9.
16. Shukla SK, Karow ME, Brady JM, Stemper ME, Kislow J, et al. Virulence genes and genotypic associations in nasal carriage, community-associated methicillin-susceptible and methicillin-resistant USA400 *Staphylococcus aureus* isolates. *J Clin Microbiol*. 2010;48(10):3582-92.
17. Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, Lina G, Nimmo GR, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerging infectious diseases*. 2003;9(8):978-84.
18. Naimi TS, LeDell KH, Como-Sabetti K, Borchardt SM, Boxrud DJ, et al. Comparison of community- and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2003;290(22):2976-84.
19. Bae IG, Tonthat GT, Stryjewski ME, Rude TH, Reilly LF, et al. Presence of genes encoding the panton-valentine leukocidin exotoxin is not the primary determinant of outcome in patients with complicated skin and skin structure infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: results of a multinational trial. *J Clin Microbiol*. 2009;47(12):3952-7.

20. Kaneko J, Kimura T, Narita S, Tomita T, and Kamio Y. Complete nucleotide sequence and molecular characterization of the temperate staphylococcal bacteriophage phiPVL carrying Panton-Valentine leukocidin genes. *Gene*. 1998;215(1):57-67.
21. Loffler B, Hussain M, Grundmeier M, Bruck M, Holzinger D, et al. *Staphylococcus aureus* panton-valentine leukocidin is a very potent cytotoxic factor for human neutrophils. *PLoS Pathog*. 2010;6(1):e1000715.
22. Spaan AN, Schiepers A, de Haas CJ, van Hooijdonk DD, Badiou C, et al. Differential Interaction of the Staphylococcal Toxins Panton-Valentine Leukocidin and gamma-Hemolysin CB with Human C5a Receptors. *J Immunol*. 2015;195(3):1034-43.
23. Bubeck Wardenburg J, Palazzolo-Ballance AM, Otto M, Schneewind O, and DeLeo FR. Panton-Valentine leukocidin is not a virulence determinant in murine models of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease. *J Infect Dis*. 2008;198(8):1166-70.
24. Labandeira-Rey M, Couzon F, Boisset S, Brown EL, Bes M, et al. *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia. *Science*. 2007;315(5815):1130-3.
25. Lipinska U, Hermans K, Meulemans L, Dumitrescu O, Badiou C, et al. Panton-Valentine leukocidin does play a role in the early stage of *Staphylococcus aureus* skin infections: a rabbit model. *PLoS One*. 2011;6(8):e22864.
26. Kobayashi SD, Malachowa N, Whitney AR, Braughton KR, Gardner DJ, et al. Comparative analysis of USA300 virulence determinants in a rabbit model of skin and soft tissue infection. *J Infect Dis*. 2011;204(6):937-41.
27. Diep BA, Palazzolo-Ballance AM, Tattevin P, Basuino L, Braughton KR, et al. Contribution of Panton-Valentine leukocidin in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *PLoS One*. 2008;3(9):e3198.
28. Cremieux AC, Dumitrescu O, Lina G, Vallee C, Cote JF, et al. Panton-valentine leukocidin enhances the severity of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* rabbit osteomyelitis. *PLoS One*. 2009;4(9):e7204.
29. Diep BA, Chan L, Tattevin P, Kajikawa O, Martin TR, et al. Polymorphonuclear leukocytes mediate *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin-induced lung inflammation and injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(12):5587-92.
30. Kuehnert MJ, Kruszon-Moran D, Hill HA, McQuillan G, McAllister SK, et al. Prevalence of *Staphylococcus aureus* nasal colonization in the United States, 2001-2002. *J Infect Dis*. 2006;193(2):172-9.
31. Megevand C, Gervais A, Heininger U, Berger C, Aebi C, et al. Molecular epidemiology of the nasal colonization by methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in Swiss children. *Clin Microbiol Infect*. 2010;16(9):1414-20.
32. Monecke S, Luedicke C, Slickers P, and Ehricht R. Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* in asymptomatic carriers. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2009;28(9):1159-65.
33. Ellington MJ, Hope R, Ganner M, Ganner M, East C, et al. Is Panton-Valentine leucocidin associated with the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* bacteraemia in the UK? *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2007;60(2):402-5.
34. Peschel A, and Otto M. Phenol-soluble modulins and staphylococcal infection. *Nat Rev Microbiol*. 2013;11(10):667-73.
35. Grumann D, Nubel U, and Broker BM. *Staphylococcus aureus* toxins--their functions and genetics. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2014;21(583-92).
36. Gonzalez DJ, Okumura CY, Hollands A, Kersten R, Akong-Moore K, et al. Novel phenol-soluble modulin derivatives in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* identified through imaging mass spectrometry. *J Biol Chem*. 2012;287(17):13889-98.
37. Chatterjee SS, Joo HS, Duong AC, Dieringer TD, Tan VY, et al. Essential *Staphylococcus aureus* toxin export system. *Nat Med*. 2013;19(3):364-7.
38. Otto M. Basis of virulence in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Annual review of microbiology*. 2010;64(143-62).

39. Kretschmer D, Gleske AK, Rautenberg M, Wang R, Koberle M, et al. Human formyl peptide receptor 2 senses highly pathogenic *Staphylococcus aureus*. *Cell Host Microbe*. 2010;7(6):463-73.
40. Chatterjee SS, and Otto M. How can *Staphylococcus aureus* phenol-soluble modulins be targeted to inhibit infection? *Future microbiology*. 2013;8(6):693-6.
41. Sugai M, Enomoto T, Hashimoto K, Matsumoto K, Matsuo Y, et al. A novel epidermal cell differentiation inhibitor (EDIN): purification and characterization from *Staphylococcus aureus*. *Biochemical and biophysical research communications*. 1990;173(1):92-8.
42. Wilde C, Chhatwal GS, Schmalzing G, Aktories K, and Just I. A novel C3-like ADP-ribosyltransferase from *Staphylococcus aureus* modifying RhoE and Rnd3. *J Biol Chem*. 2001;276(12):9537-42.
43. Yamaguchi T, Hayashi T, Takami H, Ohnishi M, Murata T, et al. Complete nucleotide sequence of a *Staphylococcus aureus* exfoliative toxin B plasmid and identification of a novel ADP-ribosyltransferase, EDIN-C. *Infect Immun*. 2001;69(12):7760-71.
44. Courjon J, Munro P, Benito Y, Visvikis O, Bouchiat C, et al. EDIN-B Promotes the Translocation of *Staphylococcus aureus* to the Bloodstream in the Course of Pneumonia. *Toxins*. 2015;7(10):4131-42.
45. Lemichez E, Gonzalez-Rodriguez D, Bassereau P, and Brochard-Wyart F. Transcellular tunnel dynamics: Control of cellular dewetting by actomyosin contractility and I-BAR proteins. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*. 2013;105(3):109-17.
46. Munro P, Benchetrit M, Nahori MA, Stefani C, Clement R, et al. The *Staphylococcus aureus* epidermal cell differentiation inhibitor toxin promotes formation of infection foci in a mouse model of bacteremia. *Infect Immun*. 2010;78(8):3404-11.
47. Bardeel BW, and Strijp JA. Molecular battle between host and bacterium: recognition in innate immunity. *J Mol Recognit*. 2011;24(6):1077-86.
48. Rooijackers SH, van Kessel KP, and van Strijp JA. *Staphylococcal* innate immune evasion. *Trends Microbiol*. 2005;13(12):596-601.
49. Spaan AN, Surewaard BG, Nijland R, and van Strijp JA. Neutrophils versus *Staphylococcus aureus*: a biological tug of war. *Annual review of microbiology*. 2013;67(629-50).
50. van Wamel WJ, Rooijackers SH, Ruyken M, van Kessel KP, and van Strijp JA. The innate immune modulators staphylococcal complement inhibitor and chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* are located on beta-hemolysin-converting bacteriophages. *J Bacteriol*. 2006;188(4):1310-5.
51. Prat C, Bestebroer J, de Haas CJ, van Strijp JA, and van Kessel KP. A new staphylococcal anti-inflammatory protein that antagonizes the formyl peptide receptor-like 1. *J Immunol*. 2006;177(11):8017-26.
52. Prat C, Haas PJ, Bestebroer J, de Haas CJ, van Strijp JA, et al. A homolog of formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) inhibitor from *Staphylococcus aureus* (FPRL1 inhibitory protein) that inhibits FPRL1 and FPR. *J Immunol*. 2009;183(10):6569-78.
53. Jongerius I, Kohl J, Pandey MK, Ruyken M, van Kessel KP, et al. Staphylococcal complement evasion by various convertase-blocking molecules. *J Exp Med*. 2007;204(10):2461-71.
54. de Haas CJ, Veldkamp KE, Peschel A, Weerkamp F, Van Wamel WJ, et al. Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus*, a bacterial antiinflammatory agent. *J Exp Med*. 2004;199(5):687-95.
55. Fraser JD, and Proft T. The bacterial superantigen and superantigen-like proteins. *Immunological reviews*. 2008;225(226-43).
56. Benson MA, Lilo S, Wasserman GA, Thoendel M, Smith A, et al. *Staphylococcus aureus* regulates the expression and production of the staphylococcal superantigen-like secreted proteins in a Rot-dependent manner. *Molecular microbiology*. 2011;81(3):659-75.
57. Jarraud S, Mougel C, Thioulouse J, Lina G, Meugnier H, et al. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. *Infect Immun*. 2002;70(2):631-41.
58. Queck SY, Jameson-Lee M, Villaruz AE, Bach TH, Khan BA, et al. RNAlII-independent target gene control by the agr quorum-sensing system: insight into the evolution of virulence regulation in *Staphylococcus aureus*. *Mol Cell*. 2008;32(1):150-8.

59. Otto M. Quorum-sensing control in Staphylococci -- a target for antimicrobial drug therapy? *FEMS microbiology letters*. 2004;241(2):135-41.
60. Wright CT, Stocks RM, Armstrong DL, Arnold SR, and Gould HJ. Pediatric mediastinitis as a complication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* retropharyngeal abscess. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2008;134(4):408-13.
61. Novick RP. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Molecular microbiology*. 2003;48(6):1429-49.
62. Yarwood JM, and Schlievert PM. Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. *The Journal of clinical investigation*. 2003;112(11):1620-5.
63. Cheung AL, Bayer AS, Zhang G, Gresham H, and Xiong YQ. Regulation of virulence determinants in vitro and in vivo in *Staphylococcus aureus*. *FEMS immunology and medical microbiology*. 2004;40(1):1-9.
64. Novick RP, and Jiang D. The staphylococcal saeRS system coordinates environmental signals with agr quorum sensing. *Microbiology*. 2003;149(Pt 10):2709-17.
65. Lorenz U, Huttinger C, Schafer T, Ziebuhr W, Thiede A, et al. The alternative sigma factor sigma B of *Staphylococcus aureus* modulates virulence in experimental central venous catheter-related infections. *Microbes Infect*. 2008;10(3):217-23.
66. Mitchell G, Fugere A, Pepin Gaudreau K, Brouillette E, Frost EH, et al. SigB Is a Dominant Regulator of Virulence in *Staphylococcus aureus* Small-Colony Variants. *PLoS One*. 2013;8(5):e65018.
67. Bischoff M, Entenza JM, and Giachino P. Influence of a functional sigB operon on the global regulators sar and agr in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 2001;183(17):5171-9.
68. Krynski S, Becla E, and Samet A. [Changes in the antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* and their significance in the treatment of staphylococcal diseases]. *Wiadomosci lekarskie*. 1966;19(23):1875-8.
69. Shittu AO, and Lin J. Antimicrobial susceptibility patterns and characterization of clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in KwaZulu-Natal province, South Africa. *BMC Infect Dis*. 2006;6(125).
70. Williams RE, and Rippon JE. Bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of hygiene*. 1952;50(3):320-53.
71. Leopold SR, Goering RV, Witten A, Harmsen D, and Mellmann A. Bacterial whole-genome sequencing revisited: portable, scalable, and standardized analysis for typing and detection of virulence and antibiotic resistance genes. *J Clin Microbiol*. 2014;52(7):2365-70.
72. Seifert H, Schulze A, Baginski R, and Pulverer G. Comparison of four different methods for epidemiologic typing of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol*. 1994;32(7):1816-9.
73. van Belkum A, van Leeuwen W, Kluytmans J, and Verbrugh H. Molecular nosocomial epidemiology: high speed typing of microbial pathogens by arbitrary primed polymerase chain reaction assays. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1995;16(11):658-66.
74. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*. 1995;33(9):2233-9.
75. Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic acids research*. 1995;23(21):4407-14.
76. Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, and Spratt BG. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 2000;38(3):1008-15.
77. Harmsen D, Claus H, Witte W, Rothganger J, Claus H, et al. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management. *J Clin Microbiol*. 2003;41(12):5442-8.
78. Strommenger B, Bräulke C, Heuck D, Schmidt C, Pasemann B, et al. spa Typing of *Staphylococcus aureus* as a frontline tool in epidemiological typing. *J Clin Microbiol*. 2008;46(2):574-81.
79. Mellmann A, Weniger T, Berssenbrugge C, Rothganger J, Sammeth M, et al. Based Upon Repeat Pattern (BURP): an algorithm to characterize the long-term evolution of *Staphylococcus aureus* populations based on spa polymorphisms. *BMC Microbiol*. 2007;7(98).

80. Ito T, Katayama Y, and Hiramatsu K. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43(6):1449-58.
81. Katayama Y, Ito T, and Hiramatsu K. Genetic organization of the chromosome region surrounding *mecA* in clinical staphylococcal strains: role of IS431-mediated *mecI* deletion in expression of resistance in *mecA*-carrying, low-level methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(7):1955-63.
82. International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome E. Classification of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*): guidelines for reporting novel SCC*mec* elements. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(12):4961-7.
83. Zhang K, McClure JA, Elsayed S, Louie T, and Conly JM. Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome *mec* types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 2005;43(10):5026-33.
84. Tenover FC, Arbeit RD, and Goering RV. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1997;18(6):426-39.
85. Koser CU, Ellington MJ, and Peacock SJ. Whole-genome sequencing to control antimicrobial resistance. *Trends in genetics : TIG.* 2014;30(9):401-7.
86. Kwong JC, McCallum N, Sintchenko V, and Howden BP. Whole genome sequencing in clinical and public health microbiology. *Pathology.* 2015;47(3):199-210.
87. Hasman H, Saputra D, Sicheritz-Ponten T, Lund O, Svendsen CA, et al. Rapid whole-genome sequencing for detection and characterization of microorganisms directly from clinical samples. *J Clin Microbiol.* 2014;52(1):139-46.
88. Cuevas O, Cercenado E, Goyanes MJ, Vindel A, Trincado P, et al. [*Staphylococcus spp.* in Spain: present situation and evolution of antimicrobial resistance (1986-2006)]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2008;26(5):269-77.
89. Kirby WM. Extraction of a Highly Potent Penicillin Inactivator from Penicillin Resistant Staphylococci. *Science.* 1944;99(2579):452-3.
90. Barber M. Methicillin-resistant staphylococci. *J Clin Pathol.* 1961;14(385-93).
91. Gomes AR, Westh H, and de Lencastre H. Origins and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonal lineages. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(10):3237-44.
92. Trallero EP, Arenzana JG, Castaneda AA, and Grisolia LP. Unusual multiresistant *Staphylococcus aureus* in a newborn nursery. *American journal of diseases of children.* 1981;135(8):689-92.
93. Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *The Journal of antimicrobial chemotherapy.* 1997;40(1):135-6.
94. Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, Kawasaki S, Hosoda Y, et al. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet.* 1997;350(9092):1670-3.
95. Centers for Disease C, and Prevention. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin--United States, 2002. *MMWR Morbidity and mortality weekly report.* 2002;51(26):565-7.
96. Meka VG, and Gold HS. Antimicrobial resistance to linezolid. *Clin Infect Dis.* 2004;39(7):1010-5.
97. David MZ, and Daum RS. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23(3):616-87.
98. Otter JA, and French GL. Molecular epidemiology of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *The Lancet Infectious diseases.* 2010;10(4):227-39.
99. Rolo J, Miragaia M, Turlej-Rogacka A, Empel J, Bouchami O, et al. High genetic diversity among community-associated *Staphylococcus aureus* in Europe: results from a multicenter study. *PLoS One.* 2012;7(4):e34768.

100. Saravolatz LD, Pohlod DJ, and Arking LM. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: a new source for nosocomial outbreaks. *Annals of internal medicine*. 1982;97(3):325-9.
101. Herold BC, Immergluck LC, Maranan MC, Lauderdale DS, Gaskin RE, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children with no identified predisposing risk. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 1998;279(8):593-8.
102. Tenover FC, McDougal LK, Goering RV, Killgore G, Projan SJ, et al. Characterization of a strain of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* widely disseminated in the United States. *J Clin Microbiol*. 2006;44(1):108-18.
103. Cuevas O, Cercenado E, Vindel A, Guinea J, Sanchez-Conde M, et al. Evolution of the antimicrobial resistance of *Staphylococcus spp.* in Spain: five nationwide prevalence studies, 1986 to 2002. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(11):4240-5.
104. Blanco R, Tristan A, Ezpeleta G, Larsen AR, Bes M, et al. Molecular epidemiology of Pantone-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus* in Spain: emergence of the USA300 clone in an autochthonous population. *J Clin Microbiol*. 2011;49(1):433-6.
105. Broseta A, Chaves F, Rojo P, and Otero JR. Emergence of a single clone of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in southern Madrid children. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2006;24(1):31-5.
106. Canas-Pedrosa AM, Vindel A, Artiles F, Colino E, and Lafarga B. Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of Pantone-Valentine leukocidin-positive community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from Gran Canaria (Canary Islands, Spain). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012;74(4):432-4.
107. Manzur A, Dominguez AM, Pujol M, Gonzalez MP, Limon E, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: an emerging threat in Spain. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14(4):377-80.
108. Katayama Y, Ito T, and Hiramatsu K. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(6):1549-55.
109. Chambers HF. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emerging infectious diseases*. 2001;7(2):178-82.
110. Deurenberg RH, and Stobberingh EE. The molecular evolution of hospital- and community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Current molecular medicine*. 2009;9(2):100-15.
111. Cercenado E, and Ruiz de Gopegui E. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008;26 Suppl 13(19-24).
112. Nimmo GR, and Coombs GW. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Australia. *Int J Antimicrob Agents*. 2008;31(5):401-10.
113. Larsen AR, Bocher S, Stegger M, Goering R, Pallesen LV, et al. Epidemiology of European community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonal complex 80 type IV strains isolated in Denmark from 1993 to 2004. *J Clin Microbiol*. 2008;46(1):62-8.
114. Larsson AK, Gustafsson E, Johansson PJ, Odenholt I, Petersson AC, et al. Epidemiology of MRSA in southern Sweden: strong relation to foreign country of origin, health care abroad and foreign travel. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014;33(1):61-8.
115. Ben Nejma M, Mastouri M, Bel Hadj Jrad B, and Nour M. Characterization of ST80 Pantone-Valentine leukocidin-positive community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone in Tunisia. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013;77(1):20-4.
116. Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, Fournet JC, Lina G, et al. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Pantone-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet*. 2002;359(9308):753-9.
117. Diep BA, Stone GG, Basuino L, Graber CJ, Miller A, et al. The arginine catabolic mobile element and staphylococcal chromosomal cassette mec linkage: convergence of virulence and resistance in the USA300 clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis*. 2008;197(11):1523-30.

118. Montgomery CP, Boyle-Vavra S, and Daum RS. The arginine catabolic mobile element is not associated with enhanced virulence in experimental invasive disease caused by the community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 genetic background. *Infect Immun*. 2009;77(7):2650-6.
119. Diep BA, Gill SR, Chang RF, Phan TH, Chen JH, et al. Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*. 2006;367(9512):731-9.
120. Alvarez CA, Barrientes OJ, Leal AL, Contreras GA, Barrero L, et al. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Colombia. *Emerging infectious diseases*. 2006;12(12):2000-1.
121. Escobar JA, Marquez-Ortiz RA, Alvarez-Olmos MI, Leal AL, Castro BE, et al. Detection of a new community genotype methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone that is unrelated to the USA300 clone and that causes pediatric infections in Colombia. *J Clin Microbiol*. 2013;51(2):661-4.
122. Cercenado E, Cuevas O, Marin M, Bouza E, Trincado P, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Madrid, Spain: transcontinental importation and polyclonal emergence of Panton-Valentine leukocidin-positive isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008;61(2):143-9.
123. Udo EE, Pearman JW, and Grubb WB. Genetic analysis of community isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Western Australia. *The Journal of hospital infection*. 1993;25(2):97-108.
124. Casado-Verrier B, Gomez-Fernandez C, Pano-Pardo JR, Gomez-Gil R, Mingorance-Cruz J, et al. Community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* skin and soft tissue infections in Madrid: prevalence study. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2012;30(6):300-6.
125. Johnson JK, Khoie T, Shurland S, Kreisel K, Stine OC, et al. Skin and soft tissue infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 clone. *Emerging infectious diseases*. 2007;13(8):1195-200.
126. Tristan A, Bes M, Meugnier H, Lina G, Bozdogan B, et al. Global distribution of Panton-Valentine leukocidin--positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, 2006. *Emerging infectious diseases*. 2007;13(4):594-600.
127. Brook I, and Gober AE. Bacteriology of spontaneously draining acute otitis media in children before and after the introduction of pneumococcal vaccination. *Pediatr Infect Dis J*. 2009;28(7):640-2.
128. Rubinstein E, Kollef MH, and Nathwani D. Pneumonia caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis*. 2008;46 Suppl 5(S378-85).
129. Clerc O, Prod'hom G, Greub G, Zanetti G, and Senn L. Adult native septic arthritis: a review of 10 years of experience and lessons for empirical antibiotic therapy. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2011;66(5):1168-73.
130. Mathews CJ, Weston VC, Jones A, Field M, and Coakley G. Bacterial septic arthritis in adults. *Lancet*. 2010;375(9717):846-55.
131. Munoz-Egea MC, Blanco A, Fernandez-Roblas R, Gadea I, Garcia-Canete J, et al. Clinical and microbiological characteristics of patients with septic arthritis: A hospital-based study. *Journal of orthopaedics*. 2014;11(2):87-90.
132. Okano T, Enokida M, Otsuki R, Hagino H, and Teshima R. Recent trends in adult-onset septic arthritis of the knee and hip: retrospective analysis of patients treated during the past 50 years. *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy*. 2011;17(5):666-70.
133. Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, and Fowler VG, Jr. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev*. 2015;28(3):603-61.
134. Margaretten ME, Kohlwes J, Moore D, and Bent S. Does this adult patient have septic arthritis? *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2007;297(13):1478-88.

135. Waldvogel FA, Medoff G, and Swartz MN. Osteomyelitis: a review of clinical features, therapeutic considerations and unusual aspects. *N Engl J Med*. 1970;282(4):198-206.
136. Jensen AG, Espersen F, Skinhoj P, and Frimodt-Moller N. Bacteremic *Staphylococcus aureus* spondylitis. *Arch Intern Med*. 1998;158(5):509-17.
137. Hutchinson C, Hanger C, Wilkinson T, Sainsbury R, and Pithie A. Spontaneous spinal infections in older people. *Intern Med J*. 2009;39(12):845-8.
138. Kehrer M, Pedersen C, Jensen TG, and Lassen AT. Increasing incidence of pyogenic spondylodiscitis: a 14-year population-based study. *The Journal of infection*. 2014;68(4):313-20.
139. Sendi P, and Proctor RA. *Staphylococcus aureus* as an intracellular pathogen: the role of small colony variants. *Trends Microbiol*. 2009;17(2):54-8.
140. Kalinka J, Hachmeister M, Geraci J, Sordelli D, Hansen U, et al. *Staphylococcus aureus* isolates from chronic osteomyelitis are characterized by high host cell invasion and intracellular adaptation, but still induce inflammation. *Int J Med Microbiol*. 2014;304(8):1038-49.
141. von Eiff C. *Staphylococcus aureus* small colony variants: a challenge to microbiologists and clinicians. *Int J Antimicrob Agents*. 2008;31(6):507-10.
142. Berbari EF, Hanssen AD, Duffy MC, Steckelberg JM, Ilstrup DM, et al. Risk factors for prosthetic joint infection: case-control study. *Clin Infect Dis*. 1998;27(5):1247-54.
143. Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, et al. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol*. 1999;37(6):1771-6.
144. Ariza J, Euba G, and Murillo O. [Orthopedic device-related infections]. *Enferm Infec Microbiol Clin*. 2008;26(6):380-90.
145. Laupland KB, Lyytikainen O, Sogaard M, Kennedy KJ, Knudsen JD, et al. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus* bloodstream infection: a multinational population-based surveillance study. *Clin Microbiol Infect*. 2013;19(5):465-71.
146. Turnidge JD, Kotsanas D, Munckhof W, Roberts S, Bennett CM, et al. *Staphylococcus aureus* bacteraemia: a major cause of mortality in Australia and New Zealand. *The Medical journal of Australia*. 2009;191(7):368-73.
147. Fluit AC, Jones ME, Schmitz FJ, Acar J, Gupta R, et al. Antimicrobial susceptibility and frequency of occurrence of clinical blood isolates in Europe from the SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997 and 1998. *Clin Infect Dis*. 2000;30(3):454-60.
148. Khatib R, Saeed S, Sharma M, Riederer K, Fakih MG, et al. Impact of initial antibiotic choice and delayed appropriate treatment on the outcome of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2006;25(3):181-5.
149. Fowler VG, Jr., Miro JM, Hoen B, Cabell CH, Abrutyn E, et al. *Staphylococcus aureus* endocarditis: a consequence of medical progress. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2005;293(24):3012-21.
150. Fowler VG, Jr., Olsen MK, Corey GR, Woods CW, Cabell CH, et al. Clinical identifiers of complicated *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Arch Intern Med*. 2003;163(17):2066-72.
151. de Kraker ME, Wolkewitz M, Davey PG, Koller W, Berger J, et al. Clinical impact of antimicrobial resistance in European hospitals: excess mortality and length of hospital stay related to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(4):1598-605.
152. Ibrahim EH, Sherman G, Ward S, Fraser VJ, and Kollef MH. The influence of inadequate antimicrobial treatment of bloodstream infections on patient outcomes in the ICU setting. *Chest*. 2000;118(1):146-55.
153. O'Keefe KM, Wilk MM, Leech JM, Murphy AG, Laabei M, et al. Manipulation of Autophagy in Phagocytes Facilitates *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infection. *Infect Immun*. 2015;83(9):3445-57.
154. Oliveira DC, and de Lencastre H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the mec element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(7):2155-61.

155. Orscheln RC, Hunstad DA, Fritz SA, Loughman JA, Mitchell K, et al. Contribution of genetically restricted, methicillin-susceptible strains to the ongoing epidemic of community-acquired *Staphylococcus aureus* infections. *Clin Infect Dis*. 2009;49(4):536-42.
156. Otter JA, and French GL. The emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a London teaching hospital, 2000-2006. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14(7):670-6.
157. Oviedo-Boyso J, Cortes-Vieyra R, Huante-Mendoza A, Yu HB, Valdez-Alarcon JJ, et al. The phosphoinositide-3-kinase-Akt signaling pathway is important for *Staphylococcus aureus* internalization by endothelial cells. *Infect Immun*. 2011;79(11):4569-77.
158. Parker D, and Prince A. Immunopathogenesis of *Staphylococcus aureus* pulmonary infection. *Semin Immunopathol*. 2012;34(2):281-97.
159. Rodriguez-Bano J, Millan AB, Dominguez MA, Borraz C, Gonzalez MP, et al. Impact of inappropriate empirical therapy for sepsis due to health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Journal of infection*. 2009;58(2):131-7.
160. Miller CE, Batra R, Cooper BS, Patel AK, Klein J, et al. An association between bacterial genotype combined with a high-vancomycin minimum inhibitory concentration and risk of endocarditis in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream infection. *Clin Infect Dis*. 2012;54(5):591-600.
161. Soriano A, Marco F, Martinez JA, Pisos E, Almela M, et al. Influence of vancomycin minimum inhibitory concentration on the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Infect Dis*. 2008;46(2):193-200.
162. Fernandez-Hidalgo N, and Almirante B. [Infective endocarditis in the XXI century: epidemiological, therapeutic, and prognosis changes]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2012;30(7):394-406.
163. Vesga O, Groeschel MC, Otten MF, Brar DW, Vann JM, et al. *Staphylococcus aureus* small colony variants are induced by the endothelial cell intracellular milieu. *J Infect Dis*. 1996;173(3):739-42.
164. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med*. 1998;339(8):520-32.
165. Gudiol F, Aguado JM, Almirante B, Bouza E, Cercenado E, et al. Diagnosis and treatment of bacteremia and endocarditis due to *Staphylococcus aureus*. A clinical guideline from the Spanish Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (SEIMC). *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2015;33(9):625 e1- e23.
166. Pankey GA, and Sabath LD. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections. *Clin Infect Dis*. 2004;38(6):864-70.
167. Jacqueline C, Broquet A, Roquilly A, Davieau M, Caillon J, et al. Linezolid dampens neutrophil-mediated inflammation in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-induced pneumonia and protects the lung of associated damages. *J Infect Dis*. 2014;210(5):814-23.
168. Wunderink RG, Rello J, Cammarata SK, Croos-Dabrera RV, and Kollef MH. Linezolid vs vancomycin: analysis of two double-blind studies of patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nosocomial pneumonia. *Chest*. 2003;124(5):1789-97.
169. Martinez-Olondris P, Rigol M, Soy D, Guerrero L, Agusti C, et al. Efficacy of linezolid compared to vancomycin in an experimental model of pneumonia induced by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in ventilated pigs. *Crit Care Med*. 2012;40(1):162-8.
170. Silverman JA, Mortin LI, Vanpraagh AD, Li T, and Alder J. Inhibition of daptomycin by pulmonary surfactant: in vitro modeling and clinical impact. *J Infect Dis*. 2005;191(12):2149-52.
171. Byren I, Rege S, Campanaro E, Yankelev S, Anastasiou D, et al. Randomized controlled trial of the safety and efficacy of Daptomycin versus standard-of-care therapy for management of patients with osteomyelitis associated with prosthetic devices undergoing two-stage revision arthroplasty. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(11):5626-32.
172. Rao N, Ziran BH, Hall RA, and Santa ER. Successful treatment of chronic bone and joint infections with oral linezolid. *Clinical orthopaedics and related research*. 2004(427):67-71.

173. Peel TN, Buising KL, Dowsey MM, Aboltins CA, Daffy JR, et al. Outcome of debridement and retention in prosthetic joint infections by methicillin-resistant staphylococci, with special reference to rifampin and fusidic acid combination therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(1):350-5.
174. Gasch O, Camoez M, Dominguez MA, Padilla B, Pintado V, et al. Predictive factors for early mortality among patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *The Journal of antimicrobial chemotherapy.* 2013;68(6):1423-30.
175. Fries BL, Licitra C, Crespo A, Akhter K, Busowski MT, et al. Infectious diseases consultation and the management of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Infect Dis.* 2014;58(4):598-9.
176. Robinson JO, Pozzi-Langhi S, Phillips M, Pearson JC, Christiansen KJ, et al. Formal infectious diseases consultation is associated with decreased mortality in *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012;31(9):2421-8.
177. Chong YP, Moon SM, Bang KM, Park HJ, Park SY, et al. Treatment duration for uncomplicated *Staphylococcus aureus* bacteremia to prevent relapse: analysis of a prospective observational cohort study. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(3):1150-6.
178. Thwaites GE, and Gant V. Are bloodstream leukocytes Trojan Horses for the metastasis of *Staphylococcus aureus*? *Nat Rev Microbiol.* 2011;9(3):215-22.
179. Recsei P, Kreiswirth B, O'Reilly M, Schlievert P, Gruss A, et al. Regulation of exoprotein gene expression in *Staphylococcus aureus* by agar. *Molecular & general genetics : MGG.* 1986;202(1):58-61.
180. Gray B, Hall P, and Gresham H. Targeting agr- and agr-Like quorum sensing systems for development of common therapeutics to treat multiple gram-positive bacterial infections. *Sensors.* 2013;13(4):5130-66.
181. Khan BA, Yeh AJ, Cheung GY, and Otto M. Investigational therapies targeting quorum-sensing for the treatment of *Staphylococcus aureus* infections. *Expert opinion on investigational drugs.* 2015;24(5):689-704.
182. Kernodle DS, McGraw PA, Barg NL, Menzies BE, Voladri RK, et al. Growth of *Staphylococcus aureus* with nafcillin in vitro induces alpha-toxin production and increases the lethal activity of sterile broth filtrates in a murine model. *J Infect Dis.* 1995;172(2):410-9.
183. Ohlsen K, Ziebuhr W, Koller KP, Hell W, Wichelhaus TA, et al. Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on alpha-toxin (hla) gene expression of methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42(11):2817-23.
184. Dumitrescu O, Boisset S, Badiou C, Bes M, Benito Y, et al. Effect of antibiotics on *Staphylococcus aureus* producing Panton-Valentine leukocidin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(4):1515-9.
185. Otto MP, Martin E, Badiou C, Lebrun S, Bes M, et al. Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on virulence factor expression by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy.* 2013;68(7):1524-32.
186. Rudkin JK, Laabei M, Edwards AM, Joo HS, Otto M, et al. Oxacillin alters the toxin expression profile of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(2):1100-7.
187. Ferreras M, Hoper F, Dalla Serra M, Colin DA, Prevost G, et al. The interaction of *Staphylococcus aureus* bi-component gamma-hemolysins and leucocidins with cells and lipid membranes. *Biochimica et biophysica acta.* 1998;1414(1-2):108-26.
188. Hastings PJ, Rosenberg SM, and Slack A. Antibiotic-induced lateral transfer of antibiotic resistance. *Trends Microbiol.* 2004;12(9):401-4.
189. Goerke C, Koller J, and Wolz C. Ciprofloxacin and trimethoprim cause phage induction and virulence modulation in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(1):171-7.
190. Maiques E, Ubeda C, Campoy S, Salvador N, Lasa I, et al. beta-lactam antibiotics induce the SOS response and horizontal transfer of virulence factors in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 2006;188(7):2726-9.

191. Vaudaux PE, Monzillo V, Francois P, Lew DP, Foster TJ, et al. Introduction of the mec element (methicillin resistance) into *Staphylococcus aureus* alters in vitro functional activities of fibrinogen and fibronectin adhesins. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42(3):564-70.
192. Krut O, Utermohlen O, Schlossherr X, and Kronke M. Strain-specific association of cytotoxic activity and virulence of clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Infect Immun.* 2003;71(5):2716-23.
193. Brouillette E, Martinez A, Boyll BJ, Allen NE, and Malouin F. Persistence of a *Staphylococcus aureus* small-colony variant under antibiotic pressure in vivo. *FEMS immunology and medical microbiology.* 2004;41(1):35-41.
194. Blair JE, and Williams RE. Phage typing of staphylococci. *Bulletin of the World Health Organization.* 1961;24(6):771-84.
195. Lina G, Piemont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, et al. Involvement of Pantone-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis.* 1999;29(5):1128-32.
196. Strommenger B, Kettlitz C, Werner G, and Witte W. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 2003;41(9):4089-94.
197. Monecke S, Muller E, Buchler J, Stieber B, and Ehrlich R. *Staphylococcus aureus* In Vitro Secretion of Alpha Toxin (hla) Correlates with the Affiliation to Clonal Complexes. *PLoS One.* 2014;9(6):e100427.
198. Rauch S, DeDent AC, Kim HK, Bubeck-Wardenburg J, Missiakas DM, et al. Abscess formation and alpha-hemolysin induced toxicity in a mouse model of *Staphylococcus aureus* peritoneal infection. *Infect Immun.* 2012;80(10):3721-32.
199. Sharma-Kuinkel BK, Wu Y, Tabor DE, Mok H, Sellman BR, et al. Characterization of alpha-toxin hla gene variants, alpha-toxin expression levels, and levels of antibody to alpha-toxin in hemodialysis and postsurgical patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia. *J Clin Microbiol.* 2015;53(1):227-36.
200. Monecke S, Muller E, Buechler J, Rejman J, Stieber B, et al. Rapid detection of Pantone-Valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus* cultures by use of a lateral flow assay based on monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol.* 2013;51(2):487-95.
201. Stulik L, Malafa S, Hudcova J, Rouha H, Henics BZ, et al. Alpha-Hemolysin activity of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* predicts ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014;190(10):1139-48.
202. Novick RP, and Geisinger E. Quorum sensing in *staphylococci*. *Annual review of genetics.* 2008;42(541-64).
203. Geisinger E, Chen J, and Novick RP. Allele-dependent differences in quorum-sensing dynamics result in variant expression of virulence genes in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 2012;194(11):2854-64.
204. Wang R, Braughton KR, Kretschmer D, Bach TH, Queck SY, et al. Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. *Nat Med.* 2007;13(12):1510-4.
205. Sakoulas G, Eliopoulos GM, Moellering RC, Jr., Wennersten C, Venkataraman L, et al. Accessory gene regulator (agr) locus in geographically diverse *Staphylococcus aureus* isolates with reduced susceptibility to vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(5):1492-502.
206. Fowler VG, Jr., Sakoulas G, McIntyre LM, Meka VG, Arbeit RD, et al. Persistent bacteremia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection is associated with agr dysfunction and low-level in vitro resistance to thrombin-induced platelet microbicidal protein. *J Infect Dis.* 2004;190(6):1140-9.
207. Schweizer ML, Furuno JP, Sakoulas G, Johnson JK, Harris AD, et al. Increased mortality with accessory gene regulator (agr) dysfunction in *Staphylococcus aureus* among bacteremic patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(3):1082-7.
208. Traber KE, Lee E, Benson S, Corrigan R, Cantera M, et al. agr function in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Microbiology.* 2008;154(Pt 8):2265-74.

209. Laabei M, Jamieson WD, Massey RC, and Jenkins AT. *Staphylococcus aureus* interaction with phospholipid vesicles: a new method to accurately determine accessory gene regulator (agr) activity. *PLoS One*. 2014;9(1):e87270.
210. Murdoch DR, and Greenlees RL. Rapid identification of *Staphylococcus aureus* from BacT/ALERT blood culture bottles by direct Gram stain characteristics. *J Clin Pathol*. 2004;57(2):199-201.
211. Vindel A, Trincado P, Gomez E, Cabrera R, Boquete T, et al. Prevalence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Spanish hospitals between 1996 and 2002. *J Clin Microbiol*. 2006;44(1):266-70.
212. Cristino JM, Fernandes ML, Garcia T, Serrano N, and Salgado MJ. [The diversity of *Staphylococcus aureus* strains isolated in a Lisbon hospital over a 4-year period]. *Acta medica portuguesa*. 1999;12(4-6):169-76.
213. Wisniewska K, Szewczyk A, Piechowicz L, Bronk M, Samet A, et al. The use of spa and phage typing for characterization of clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the University Clinical Center in Gdansk, Poland. *Folia microbiologica*. 2012;57(3):243-9.
214. Mehndiratta PL, Gur R, Saini S, and Bhalla P. *Staphylococcus aureus* phage types and their correlation to antibiotic resistance. *Indian journal of pathology & microbiology*. 2010;53(4):738-41.
215. Samra Z, Gadba R, and Ofir O. Antibiotic susceptibility and phage typing of methicillin-resistant and -sensitive *Staphylococcus aureus* clinical isolates at three periods during 1991-1997. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2001;20(6):425-7.
216. Kareiviene V, Pavilionis A, Sinkute G, Liegiute S, and Gailiene G. *Staphylococcus aureus* resistance to antibiotics and spread of phage types. *Medicina*. 2006;42(4):332-9.
217. Vindel A, Cuevas O, Cercenado E, Marcos C, Bautista V, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Spain: molecular epidemiology and utility of different typing methods. *J Clin Microbiol*. 2009;47(6):1620-7.
218. Abdel-Haq N, Al-Tatari H, Chearskul P, Salimnia H, Asmar BI, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in hospitalized children: correlation of molecular analysis with clinical presentation and antibiotic susceptibility testing (ABST) results. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2009;28(5):547-51.
219. Millan AB, Dominguez MA, Borraz C, Gonzalez MP, Almirante B, et al. [Community-onset and nosocomial bacteremia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Spanish hospitals]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010;28(6):336-41.
220. Asensio A, Canton R, Vaque J, Rossello J, and Arribas JL. [Etiology of hospital-acquired infections in Spanish hospitals (EPINE, 1990-1999)]. *Med Clin (Barc)*. 2002;118(19):725-30.
221. Riu M, Chiarello P, Terradas R, Sala M, Castells X, et al. [Economic impact of nosocomial bacteraemia. A comparison of three calculation methods]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2015.
222. Gudiol F, Aguado JM, Pascual A, Pujol M, Almirante B, et al. Consensus document for the treatment of bacteremia and endocarditis caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009;27(2):105-15.
223. Miro JM, Anguera I, Cabell CH, Chen AY, Stafford JA, et al. *Staphylococcus aureus* native valve infective endocarditis: report of 566 episodes from the International Collaboration on Endocarditis Merged Database. *Clin Infect Dis*. 2005;41(4):507-14.
224. Ehricht R, Müller E, Stieber B, Baier V, Weicherding D, et al. *24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. Barcelona; 2014.
225. From the Centers for Disease Control and Prevention. Four pediatric deaths from community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*--Minnesota and North Dakota, 1997-1999. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 1999;282(12):1123-5.
226. Dietrich DW, Auld DB, and Mermel LA. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in southern New England children. *Pediatrics*. 2004;113(4):e347-52.
227. Shapiro A, Raman S, Johnson M, and Piehl M. Community-acquired MRSA infections in North Carolina children: prevalence, antibiotic sensitivities, and risk factors. *North Carolina medical journal*. 2009;70(2):102-7.

228. Tavares A, Miragaia M, Rolo J, Coelho C, de Lencastre H, et al. High prevalence of hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the community in Portugal: evidence for the blurring of community-hospital boundaries. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2013;32(10):1269-83.
229. Broseta A, Chaves F, Rojo P, and Otero JR. [Emergence of a single clone of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in southern Madrid children]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2006;24(1):31-5.
230. Daskalaki M, Rojo P, Marin-Ferrer M, Barrios M, Otero JR, et al. Pantone-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus* skin and soft tissue infections among children in an emergency department in Madrid, Spain. *Clin Microbiol Infect*. 2010;16(1):74-7.
231. Hiramatsu K, Katayama Y, Yuzawa H, and Ito T. Molecular genetics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol*. 2002;292(2):67-74.
232. Reyes J, Rincon S, Diaz L, Panesso D, Contreras GA, et al. Dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 sequence type 8 lineage in Latin America. *Clin Infect Dis*. 2009;49(12):1861-7.
233. Tong SY, Chen LF, and Fowler VG, Jr. Colonization, pathogenicity, host susceptibility, and therapeutics for *Staphylococcus aureus*: what is the clinical relevance? *Semin Immunopathol*. 2012;34(2):185-200.

Projectes relacionats amb aquesta tesi:

- **Contrato de formación en investigación post-formación especializada. Río Hortega. Instituto de Salud Carlos III (ISCIII).** Expedient **CM07/00168**
- **Projecte SEPAR 054/2011.** Títol: *Infecciones respiratorias graves por Staphylococcus aureus: implicación clínica de nuevos factores de virulencia y estudio de las relaciones huésped-microorganismo.* IP: C.Prat
- **Projecte Fondo Investigación Sanitaria (FIS) PI13/01418.** Títol: *Caracterización del ciclo de vida intracelular de Staphylococcus aureus. Implicaciones en la evolución y el tratamiento de las infecciones estafilocócicas.* IP: C.Prat
- **European Society of Clinical Microbiology and Infectious Disease (ESCMID).** Estudi STTI-ESGS . Títol: *Prevalence of S.aureus among patients presenting with skin and soft tissue infections". A multi-centre pilot study in Europe"* IP: F.Vandenesh
- **CIBER de Enfermedades Respiratorias (CIBERES).** Programa Corporativo Nuevas Dianas Terapéuticas.

Col·laboracions amb centres externs

- Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III (ISCIII). Servicio Bacteriología. Infecciones Intrahospitalarias. A.Vindel.
- Servicio Microbiología. Hospital Universitario Gregorio Marañón. Madrid. E.Cercenado
- Clondiag GmbH, Jena, Germany. Institute for Medical Microbiology and Hygiene, Technical University of Dresden. (Articles Annexe). R. Enricht, S.Monecke.
- University of Bath (Department of Biology & Biochemistry). M. Laabei.
- Nuffield Department of Medicine, Experimental Medicine Division, University of Oxford, John Radcliffe Hospital. Wellcome Trust Centre for Human Genetics, University of Oxford. Daniel Wilson.

Congressos Internacionals

Títol: *Emergence of a methicillin-resistant Staphylococcus aureus USA300 clone Licking arginine catabolic Mobile element, in Spain*

Autors: Molinos S., Ehricht R., Giménez M., Monecke S., Rodrigo C., Prat C., Sopena N., Ausina V.

Congrés: 19th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). **Lloc:** Helsinki, Finlàndia, del 16 al 19 de maig de 2009

Títol: *Outcome of Staphylococcus aureus Bacteriemia: Role of Clinical and Microbiological Factors.*

Autors: Sopena N., Benítez R., Molinos S., Giménez M., Quesada MD., Mateu L., Pedro-Botet ML.

Congrés: 50th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). **Lloc:** Boston, EE.UU., del 12 al 15 de Setembre de 2010

Títol: *Evaluation of three rapid methods to identify Staphylococcus aureus and determine cloxacillin susceptibility directly from positive blood culture.*

Autors: Molinos S., Quesada MD., Mateu L., Colomer M., Rodrigo C., Gimenez M.

Congrés: 52th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). **Lloc:** San Francisco, California, del 9 al 11 de Setembre de 2012

Títol: *Lower respiratory tract infection by Staphylococcus aureus in an intensive care unit: genotypical characterization.*

Autors: Gomes-Fernandes M., Lacom a., Molinos S., Giménez M., García Oliver I., Mesalles E., Arméstar F., Rodrigo C., Quesada MD., Prat C.

Congrés: 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). **Lloc:** Barcelona, Espanya, del 10 al 13 de Maig de 2014

Títol: *Clinical and microbiological characterization of lower respiratory tract infection by Staphylococcus aureus in an intensive care unit.*

Autors: Gomes-Fernandes M., Arméstar-Rodríguez F., Mesalles E., Benveniste-Pérez E., Martínez-de la Gran I., Lacom a., Molinos S., Giménez M., Pagán N., Klamburg J., Prat C.

Congrés: 27th Annual Congress of European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). **Lloc:** Barcelona, Espanya, del 27 de Setembre al 1 de Octubre de 2014

Títol: *Persistence of staphylococcus aureus in lower respiratory tract in patients undergoing mechanical ventilation.*

Autors: Lacom a., Gomes-Fernandes M., Mesalles E., Arméstar F., Villar R., Casas I., Molinos S., Giménez M., Ausina A., Prat C.

Congrés: 25th International Congress of the European Respiratory Society (ERS). **Lloc:** Amsterdam RAI, Europaplein 22. Amsterdam, the Netherlands

Congresos Nacionals

Títol: *Características y factores pronósticos de las bacteriemias por Staphylococcus aureus en un Hospital Universitario.*

Autors: Fernández G., Sopena N., Giménez M., Molinos S., Pedro-Botet ML., Matas L., Sabrià M., Ausina V.

Congrés: XII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). **Lloc:** Valencia, 10 al 13 de Maig de 2006

Títol: *Emergencia de un nuevo clon de Staphylococcus aureus resistente a meticilina USA300 que carece de Arginine Catabolic Mobile Element (ACME), en España.*

Autors: Molinos S., Giménez M., Rodrigo C., Quesada MD., Prat C., Sopena N., Ramírez A., Ausina V.

Congrés: XIII Reunión de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). **Lloc:** Sevilla, 3 al 5 de Juny de 2009

Títol: *Bacteriemia por Staphylococcus aureus de origen comunitario y nosocomial relacionada con la asistencia sanitaria. Características epidemiológicas y pronósticas.*

Autors: Benítez R., Sopena N., Molinos S., Giménez M., Pedro-Botet ML., Mateu L., Sabrià M.

Congrés: XIV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). **Lloc:** Barcelona, Espanya, del 19 al 22 de Maig de 2010

Títol: *Bacteriemia por Staphylococcus aureus complicada. Implicación de los factores de virulencia de la cepa.*

Autors: Molinos S., Benítez R., Giménez M., Sopena N., Quesada MD., Prat C., Ausina V.

Congrés: XIV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). **Lloc:** Barcelona, España, del 19 al 22 de Maig de 2010

Títol: *Evaluación de la fiabilidad de BinaxNow S. aureus/PBP'2^a.*

Autors: Colomer MC., Jordà M., Carrasco M., Hernández J., Fuentes E., Pagán N., Molinos S.

Congrés: X Congrés Català de Ciències de Laboratori Clínic. **Lloc:** Manresa, Barcelona, Espanya, del 1 al 3 de Març de 2012

Títol: *Aislamiento y persistencia de Staphylococcus aureus en el tracto respiratorio.*

Autors: Gomes M., Lacoma A., Molinos S., Giménez M., García Oliver I., Mesalles E., Arméstar F., Rodrigo C., Quesada MD., Prat C.

Congrés: 46^º Congreso Nacional de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR). **Lloc:** Barcelona, de 14 al 17 de Juny de 2013

Títol: *Actividad del compuesto seconeolitsina en cepas clínicas de Staphylococcus aureus.*

Autors: Villar R., Gomes M., Lacoma A., Molinos S., Ausina V., González de la Campa A., Prat C.

Congrés: 7as Jornadas de Formación del CIBERES. **Lloc:** Valladolid, Espanya, 16 i 17 de octubre de 2014

Títol: *Caracterización clínica y microbiológica de la infección del tracto respiratorio inferior por Staphylococcus aureus en una unidad de cuidados intensivos (UCI).*

Autors: Gomes-Fernandes M., Lacoma A., Arméstar F., Mesalles E., Molinos S., Giménez M., Pagán N., Ausina V., Prat C.

Congrés: 7as Jornadas de Formación del CIBERES. **Lloc:** Valladolid, Espanya, 16 i 17 de octubre de 2014

Títol: *Caracterització del cicle de vida intracel·lular de Staphylococcus aureus: implicacions clíniques en el maneig de les infeccions estafilocòccies.*

Autors: Prat C., Lacoma A., Molinos S., Giménez M., Gomes M., Villar R., Domínguez J., Pagán N., Ausina V.

Congrés: 1a Jornada d'Innovació a l' Institut Català de la Salut. **Lloc:** Barcelona, Espanya, 5 de març de 2015

Títol: *Eficàcia d'una estratègia basada en un conjunt de mesures per a la disminució de la bacterièmia de focus en el catèter d'origen nosocomial.*

Autors: Giménez M., Caraballo M., Raya R., Ribas M., Quesada MD., Molinos S., Ausina V.

Congrés: 1a Jornada d'Innovació a l' Institut Català de la Salut. **Lloc:** Barcelona, Espanya, 5 de març de 2015

Títol: *Factores relacionados con la persistencia de Staphylococcus aureus en el tracto respiratorio inferior en pacientes sometidos a ventilación mecánica*

Autors: Gomes-Fernandes M., Lacoma A., Mesalles E., Arméstar F., Villar R., Casas I., Molinos S., Giménez M., Ausina V., Prat C.

Congrés: 48º Congreso Nacional de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR). **Lloc:** Gran Canaria, España, del 5 al 8 de Juny de 2015

Títol: *Efecto de la seconalitsina sobre la DNA topoisomerasa I de Staphylococcus aureus*

Autors: Villar-Hernández R., Tirado-Vélez JM., Gomes M., Lacoma A., Molinos S., Ausina V., G. de la Campa A., Prat C.

Congrés: 48º Congreso Nacional de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR). **Lloc:** Gran Canaria, España, del 5 al 8 de Juny de 2015