



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Epidemiología y estudio de la dinámica poblacional en las infecciones por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

Daniel A. Vázquez Sánchez

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Tesis doctoral.
2023



**Epidemiología y estudio de la dinámica poblacional en las
infecciones por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina**



**Daniel Antonio
Vázquez Sánchez**

Epidemiología y estudio de la dinámica poblacional en las infecciones por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

Facultad de Medicina
Departamento de Patología
y Terapéutica Experimental

Tesis Doctoral
Daniel A. Vázquez Sánchez
Enero 2023



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

TESIS DOCTORAL

Facultad de Medicina – Campus de Bellvitge
Departamento de Patología y Terapéutica Experimental
Programa de doctorado en Medicina e Investigación Traslacional

**Epidemiología y estudio de la dinámica poblacional en
las infecciones por *Staphylococcus aureus*
resistente a meticilina**

Memoria de tesis doctoral presentada por
DANIEL ANTONIO VÁZQUEZ SÁNCHEZ
para optar al grado de doctor por la Universidad de Barcelona

Dirigida por:

Codirectora

M^a ÁNGELES DOMÍNGUEZ LUZÓN

Codirector

JORDI CÀMARA MAS

MD, PhD
Profesora agregada UB
CIBERINFEC – IDIBELL
Jefa del Servicio de Microbiología
Hospital Universitario de Bellvitge

MD, PhD
CIBERES – IDIBELL
Facultativo Especialista
Hospital Universitario de Bellvitge

Barcelona, Enero 2023





AUTORIZACIÓN DE LA PRESENTACIÓN DE LA TESIS

La Dra. M^a Ángeles Domínguez Luzón, profesora agregada del Departamento de patología y terapéutica experimental de la Universitat de Barcelona, investigadora principal del grupo de “Epidemiología de las Infecciones Bacterianas: Investigación de la Patogénesis y de las Bases Moleculares de la Resistencia a los Antibióticos” del Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge (IDIBELL) y jefa del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario de Bellvitge (Barcelona) con DNI 40891583K, y el Dr. Jordi Càmaras Mas, Facultativo especialista del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario de Bellvitge, responsable del Laboratorio de Epidemiología e investigador en el Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERes) con DNI 77787824F,

DECLARAN QUE:

La memoria de tesis presentada por **Daniel Antonio Vázquez Sánchez** con título “**Epidemiología y estudio de la dinámica poblacional en las infecciones por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina**”, ha sido realizada bajo su dirección y autorizan su depósito para ser defendida y juzgada por un tribunal.

L'Hospitalet de Llobregat, a 23 de enero de 2023.

Codirectora

Codirector

M^a Ángeles Domínguez Luzón

Jordi Càmaras Mas

DECLARACIÓN DE LA ORIGINALIDAD Y BUENAS PRÁCTICAS DE LA TESIS

La Dra. M^a Ángeles Domínguez Luzón, profesora agregada del Departamento de patología y terapéutica experimental de la Universitat de Barcelona, investigadora principal del grupo de “Epidemiología de las Infecciones Bacterianas: Investigación de la Patogénesis y de las Bases Moleculares de la Resistencia a los Antibióticos” del Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge (IDIBELL) y jefa del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario de Bellvitge (Barcelona) con DNI 40891583K, y el Dr. Jordi Càmaras Mas, Facultativo especialista del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario de Bellvitge, responsable del Laboratorio de Epidemiología e investigador en el Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERes) con DNI 77787824F,

DECLARAN QUE:

La tesis doctoral, con título “**Epidemiología y estudio de la dinámica poblacional en las infecciones por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina**”, es original, conteniendo resultados e información fruto de investigación propia, y que no contiene plagios de otras tesis, publicaciones o investigaciones de otros autores. Asimismo, confirman que se han seguido los códigos éticos y de buenas prácticas, para su elaboración.

Manifiestan que consienten que la memoria de tesis pueda ser sometida a procedimientos para la comprobación de su originalidad.

L'Hospitalet de Llobregat a 23 de enero de 2023.

Codirectora

Codirector

Doctorando

M^a Ángeles Domínguez Luzón

Jordi Càmaras Mas

Daniel A. Vázquez Sánchez

DECLARACIÓN DE AUTORIA DE LA TESIS

El doctorando Daniel Antonio Vázquez Sánchez, con DNI 47328889-H,

DECLARA QUE:

Es autor de la tesis doctoral titulada: “**Epidemiología y estudio de la dinámica poblacional en las infecciones por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina**”.

L'Hospitalet de Llobregat, a 23 de enero de 2023.

Autor

Daniel A. Vázquez Sánchez

A mis padres, que son mis héroes

***“No puedes volver atrás y cambiar el principio, pero puedes
empezar justo dónde estás y cambiar el final”***

(C.S. Lewis)

Las imágenes de la portada, contraportada y las diferentes secciones fueron creadas con DALL·E-2 y los vectores fueron obtenidos en Freepik.

Tabla de contenido

ABREVIACIONES Y ACRÓNIMOS	XIII
AGRADECIMIENTOS Y FINANCIACIÓN	XVIII
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA	XXVI
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> : ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS, TAXONOMÍA E IDENTIFICACIÓN.....	1
1.2. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LAS INFECCIONES CAUSADAS POR <i>S. AUREUS</i>	4
1.3. FACTORES DE VIRULENCIA	6
1.4. RESISTENCIA ANTIBIÓTICA EN <i>S. AUREUS</i>	9
1.4a. Antecedentes históricos	10
1.4b. Bases moleculares de la resistencia antibiótica en MRSA	13
i. Resistencia a β -lactámicos	13
ii. Resistencia a antibióticos no β -lactámicos.....	19
1.5. EPIDEMIOLOGÍA DEL MRSA.....	23
1.6. MÉTODOS DE TIPADO MOLECULAR	27
1.6a. Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE)	29
1.6b. <i>Multilocus sequence type</i> (MLST)	31
1.6c. <i>spa</i> -typing	34
1.6d. <i>SCCmec typing</i>	35
1.6e. Secuenciación del genoma completo (WGS)	36
1.7. PRINCIPALES CLONES MRSA DE RELEVANCIA	39
II. INTERÉS DEL ESTUDIO Y OBJETIVOS.....	47
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	55
3.1. CONTEXTO, MUESTRAS DEL ESTUDIO Y DEFINICIONES	55
3.2. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN MICROBIOLÓGICA	58
3.3. ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA	59
3.3a. Técnica de antibiograma por disco-difusión.....	59
3.3b. Técnica de antibiograma por microdilución	61
3.3c. Estudio de la actividad <i>in vitro</i> de antibióticos en combinación	62

3.4. TÉCNICAS DE TIPADO MOLECULAR	65
3.4a. Detección de la leucocidina de Pantón-Valentine (LPV) y estudio del polimorfismo del locus <i>agr</i> (<i>accessory gene regulator</i>)	65
3.4b. Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE)	67
3.4c. Otras técnicas de tipado molecular	69
3.4d. Secuenciación del genoma completo (WGS)	71
3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	74
IV. RESULTADOS	76
ESTUDIO 1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y MICROBIOLÓGICAS DE LAS INFECCIONES BACTERIÉMICAS CAUSADAS POR <i>S. AUREUS</i> RESISTENTE A METICILINA (MRSA)	79
A. HOSPITAL UNIVERSITARIO DE BELLVITGE (1990-2019)	79
A.1. Incidencia y características clínicas de los episodios de bacteriemia por MRSA	79
A.2. Epidemiología molecular de las bacteriemias causadas por MRSA	84
A.3. Concordancia entre los métodos de tipado molecular	89
A.4. Evolución y bases moleculares de la resistencia a los antimicrobianos.....	90
A.5. Linajes principales y características clínicas de los episodios de bacteriemia por MRSA ocurridos entre 2008 y 2019	95
B. OTROS HOSPITALES ESPAÑOLES (2014-2018)	97
B.1. Muestra de pacientes	97
B.2. Identificación y tipado molecular	97
B.3. Estudio de la sensibilidad antibiótica y detección de genes de resistencia antimicrobiana	99
ESTUDIO 2. EPIDEMIOLOGÍA DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> RESISTENTE A METICILINA EN PACIENTES ATENDIDOS EN CENTROS DE ATENCIÓN PRIMARIA DURANTE EL 2018.	104
ESTUDIO 3. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD <i>IN VITRO</i> DE CEFTAROLINA EN COMBINACIÓN CON DAPTOMICINA Y FOSFOMICINA FRENTE A MRSA.	108
V. DISCUSIÓN	113
VI. CONCLUSIONES	143
VII. BIBLIOGRAFÍA	147
VIII. ANEXOS	172

Abreviaciones y acrónimos

- AAC: Acetiltransferasa de aminoglucósidos.
- AAD: Adeniltransferasa de aminoglucósidos.
- ACME: Elemento móvil catabólico de la arginina.
- *agr*: Regulador génico accesorio principal del sistema de *quorum sensing*.
- ANT: Nucleotidiltransferasa de aminoglucósidos.
- APH: O-fosfotransferasa de aminoglucósidos.
- *arcABCD*: Genes de la vía de la arginina deiminasa.
- *arcC*: Gen de la carbamato quinasa. Gen MLST de *S. aureus*.
- *arlRS*: Regulón de genes de expresión de la cápsula.
- *aroE* – *S. aureus* Shikimato deshidrogenasa. Gen MLST de *S. aureus*.
- *aur* - Metaloproteasa aureolisina.
- Blal - Represor de β -lactamasa.
- BlaR1 - Proteína de membrana reguladora de la β -lactamasa.
- *blaZ* - Gen Z de la β -lactamasa.
- CA – *Community acquired*. Adquisición comunitaria.
- *catA* - Gen de la cloranfenicol acetiltransferasa.
- CC - Complejo clonal.
- *ccr* - Gen de la recombinasa del casete cromosómico.
- Cfr - Proteína de resistencia al cloranfenicol/florfenicol.
- *clfB* - Gen del factor de aglutinación B.
- *cls2* - Gen de la cardiolipina sintasa 2. Relacionado con susceptibilidad a la daptomicina.
- *cna* - Gen de la adhesina del colágeno.
- CO – *Community-onset*. Inicio comunitario de la infección.
- *coa* - Gen de la coagulasa.
- COMER - Elemento móvil de resistencia al cobre y al mercurio.
- CopL - Proteína de unión al cobre.
- *dfr* - Gen de resistencia estafilocócica al trimetoprim.
- dlv - Variante de doble locus.
- *erm* - Gen de la adenil-N-metiltransferasa metilasa resistente a la eritromicina.
- ETA, ETB - Toxinas exfoliativas.
- FnbA - Proteína A de unión a la fibronectina
- FnbB - Proteína B de unión a fibronectina

- *fosB* - Gen B de resistencia a la fosfomicina.
- *FusA* - Factor de elongación G. Relacionado con la resistencia al ácido fusídico.
- *fosC* - Gen de resistencia al ácido fusídico.
- *Geh* - Gen codificante de lipasa.
- *GdpP* – regulador de la c-di-AMP fosfodiesterasa.
- *glpF* - Gen facilitador de la captación de glicerol. Gen MLST de *S. aureus*.
- *GlpT* - Sistema de captación de L-a-glicerofosfato. Relacionado con el transporte de fosfomicina.
- *gmk* - Gen de la guanilato quinasa. Gen MLST de *S. aureus*.
- *GrlAB* - ADN topoisomerasa IV subunidad A y B.
- *GyrAB* - Subunidades A y B de la ADN girasa.
- *HA* – *Hospital-acquired*. Adquisición hospitalaria.
- *HCA* - *Healthcare-associated*. Asociada a la asistencia sanitaria.
- *Hla* - Hemolisina A. Alfa-toxina.
- *Hlb* - Hemolisina B. Toxina beta.
- *HO* – *Hospital-onset*. Inicio hospitalario de la infección.
- *linA* - Gen de resistencia a las lincosamidas.
- *ileRS* - Genes isoleucil-ARNt sintetasa/ligasa.
- *IS* - Secuencia de inserción.
- *LPV* (PVL) - Leucocidina de Panton-Valentine.
- *lukFS* - Genes de la leucocidina de Panton-Valentine.
- *MDR* - Multirresistente.
- *mecA* - Gen de la proteína de unión a penicilina PBP2a.
- *mecC* - Gen de la proteína de unión a penicilina PBP2c.
- *mecI/mecR* - Genes inhibidor y regulador de *mecA*.
- *MerR* - Proteína reguladora del operón de resistencia a mercurio.
- *MLSB* - Resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B.
- *Mph* - Fosfotransferasas de macrólidos.
- *MprF* – Fosfatidilglicerol-lisiltransferasa, factor de resistencia a múltiples péptidos. Relacionado con la susceptibilidad a la daptomicina.
- *MR* - Resistencia a la metilicina.
- *MRSA* (SARM) – *Staphylococcus aureus* resistente a la metilicina.
- *MsrA* - Bomba de eflujo dependiente de ATP resistente a macrólidos y estreptograminas.
- *MSSA* (SASM)- *S. aureus* sensible a la metilicina.

- *mupA* - Gen de resistencia a la mupirocina.
- *murA* - Gen de la UDP-N-acetilglucosamina 1-carboxiviniltransferasa.
- *norA* - gen de la bomba de flujo de quinolonas.
- NGS – *Next generation sequencing*.
- PBPs - proteínas de unión a la penicilina.
- PFGE - Electroforesis en gel de campo pulsado.
- *pgsA* - Gen CDP-diacylglicerol-glicerol-3-fosfato 3.
- PR - Patrón de resistencia.
- *pta* - Gen de la fosfato acetiltransferasa. Gen MLST de *S. aureus*.
- *qac* - Genes de resistencia a compuestos de amonio cuaternario.
- RpoB - Subunidad β de la ARN polimerasa.
- RpoC - Subunidad β' de la ARN polimerasa.
- *sarA* - Gen del regulador accesorio estafilocócico A.
- *sasG* - Gen de la proteína de superficie G.
- *SCCmec* - Casete cromosómico estafilocócico *mec*.
- *sdrCD* - Genes de las proteínas Sdr.
- Sea, Seb, Sec, Sed... Set - Enterotoxina estafilocócica a, b, c, d; hasta t.
- WGS - Secuenciación del genoma completo, *whole genome sequencing*.
- slv - Variante de locus único.
- Spa - Proteína A de unión a inmunoglobulina estafilocócica.
- *speG* - Gen de la espermina N(1) acetiltransferasa.
- *splABDF* - Genes de serina proteasas.
- *sspAB* - Genes de serina y cisteína proteasas estafilocócicas.
- *sspC* - Gen de la estafostatina B.
- ST - Secuenciotipo.
- *tet* - Gen de resistencia a la tetraciclina.
- *tpi* - Triosafofato isomerasa. Gen MLST de *S. aureus*.
- TSST-1 - Toxina-1 del síndrome de shock tóxico.
- UhpT - Transportador de hexosa fosfato. Relacionado con la susceptibilidad a la fosfomicina.
- Vga - Proteína de protección ribosomal tipo ABC-F Vga(B).
- *walkR/yycGF* - Genes sensores y reguladores de la proteína histidina quinasa.
- XDR - Resistencia extensa a los antibióticos.
- *yqiL* - Acetil coenzima acetil transferasa. Gen MLST de *S. aureus*.



AGRADECIMIENTOS Y FINANCIACIÓN

*"I'll be there for you, 'cause
you're there for me too"*
-The Rembrandts

Casi 7 años después de empezar como un estudiante de máster en el Hospital de Bellvitge, alcanzo el objetivo de presentar esta tesis doctoral. Quisiera dejar claro que este trabajo no hubiera sido posible sin la ayuda, el consejo, el apoyo, la participación, la implicación y la paciencia de muchas personas. Estoy seguro de que me dejo el nombre de alguna, pero quiero intentar acordarme de todas ellas aquí. Por todo ello, me gustaría agradecer:

A mi directora de tesis, la Dra. **M^a Ángeles Domínguez**, por su confianza depositada en mí para hacer este doctorado posible, y por todo lo que he llegado a aprender del *Staphylococcus aureus* y de la microbiología clínica gracias a ella. Gracias por contar conmigo en tantos proyectos, clases, prácticas y ensayos clínicos a lo largo de estos años que me han permitido aprender y crecer profesional, educativa y personalmente.

A mi director de tesis, el Dr. **Jordi Càmara**, sin él esta tesis no sería posible. Gracias por dedicarme tu tiempo a pesar de las dificultades que se nos han presentado en el camino. A pesar de defender tu propia tesis, obtener tu plaza en el hospital y participar en muchos otros estudios, siempre has tenido tiempo para guiarme, corregirme y aconsejarme con sabiduría y paciencia.

A la Dra. **Sara Martí**, quien fue mi tutora cuando empecé como un joven estudiante de Máster, y se ha convertido cuanto más la conozco en mi modelo de investigación a seguir y en una amiga. Gracias por todas esas charlas que me han ayudado a persistir y no rendirme, y por siempre creer en mí. Te admiro mucho, y sin ti, sé de sobras que no habría llegado a dónde estoy.

A la Dra. **Carmen Ardanuy**, de la cual he podido aprender y mejorar gracias a sus consejos y a su conocimiento. Gracias por hacer piña entre “recerca” y microbiología, por los bikinis especiales después de prácticas, por ser la mami del servicio, por alegrar la navidad con villancicos y los veranos con *lab-meetings* que no olvidaremos.

A la Dra. **Fe Tubau**, por todo lo que me ha enseñado sobre antibióticos, por las charlas de *píttusos*, consejos, y, sobre todo, por siempre tener una sonrisa y algo que cantar en el laboratorio.

A la Dra. **Dàmaris Berbel**, nuestra Hermione, la reina del MALDI, con quién compartí tantos nervios en el ECCMID de Ámsterdam y quien, aunque nunca llegó a estar en el mismo despacho, siempre ha estado muy presente ayudando, aconsejando o echando una mano.

A todo el **servicio de enfermedades infecciosas**, sobre todo a los Dres. **Sara Grillo**, **Guillermo Cuervo** y **Miquel Pujol**, por poner siempre fácil el compartir datos y conocimiento sobre la importancia del MRSA y la bacteriemia y contar conmigo para tantos proyectos.

A todo el servicio de microbiología. A los **técnicos** de rutina, por acogerme siempre tan bien, ya que he pasado gran parte de mi recorrido codo con codo junto a ellos, y me llevo muy buen recuerdo de todos. Sobre todo quería agradecer a **Cristina R**, **Dani R**, **Javi**, **Laura A**, **Laura H**, **Jesús T**, **Alicia**, **Lourdes**, **Omar**, **Matilde**, **Sira** y **Fernando** por ayudarme siempre que lo he necesitado, tener una sonrisa preparada al verme y convertir mi paso por el servicio en uno tan agradable. A la Dra. **Laura Calatayud**, Dr. **Jordi Niubó** y Dr. **Fernando Alcaide** por dejarme colaborar en sus proyectos y/o clases y permitirme recordar que la microbiología no se acaba en la bacteriología. A las Dras. **Dolors García**, **Mercé Aguilar**, **Eva Dopico** y **Josefina Ayats**, siempre amables conmigo y dispuestas a compartir sus conocimientos. También a **Graciela**, **Roberto** y **Oriol** quienes desde que llegaron nos contagiaron a todos su pasión por la micro y su alegría. Y a la Dra. **Josefina Liñares**, quien me abrió una ventana en una época en que las puertas se cerraban.

A **Manu**, **Guillem** y **Yanik** por ser mucho más que compañeros de trabajo. Habéis sido amigos y cómplices de aficiones y proyectos todos estos años y espero que por muchos más. Una simple mirada con ellos siempre ha bastado para alegrarme el día en el laboratorio. A **Lucia** y **Clara**, por ser tan buenas alumnas de “campo pulsados”, por tantas conversaciones en los re-

codos del servicio y por todos nuestros momentos fuera y dentro del hospital. A las “nuevas *resis*” **María, Alicia, Cata y Patri**, que, pese a que la pandemia no nos ha permitido vernos demasiado fuera del hospital, habéis alegrado muchos momentos dentro. Y también a todos los *resis* y ya no tan *resis* de otros servicios, que he podido conocer gracias a trabajar en este hospital y que han sido tan importantes fuera de él, **Ángel, Clara R., Núria, Zara, Mario, Fran** y muchas otras que sé que me llevo conmigo.

A todas mis compañeras de despacho, con las que he compartido momentos inolvidables. Sois sin duda los que habéis vivido más de cerca esta experiencia, mis buenos y malos momentos. Siempre ayudándonos de manera desinteresada y haciendo de un simple despacho, una familia. Gracias a la Dra. **Aida González-Díaz**, por tantos y tantos “jajas”, por ser mi *compi* de trabajo, de sopas, de viajes, de creaciones y la mejor de las amigas. Saber que estabas a mi lado cada día ha hecho esta etapa mucho más fácil. Siempre sabré cual es la mejor hora para ir a comer gracias a ti. A la Dra. **Anna Carrera**, con quién empecé esta aventura en el mundo del MRSA y, a pesar de ser tan diferentes por dentro y tan parecidos por fuera, siempre hemos sido un equipo para apoyarnos en nuestros altibajos. A **Irene, Lucía y Sara**, que llegaron las últimas, pero sin duda han hecho crecer la familia. Y a la Dra. **Sara Martí** de nuevo, por enseñarnos que se puede ser la mejor de las profesionales y la más bromista de las compañeras. Gracias a todas por haber compartido juntos triunfos y derrotas, alegrías y tristezas y por siempre ser un apoyo.

A los compis que ya no están en el laboratorio, pero han aportado su granito de arena. A la Dra. **Mariana Camoez**, que me descubrió el mundo del MRSA cuando era un estudiante y siempre ha sido fuente de inspiración y admiración por su constancia y de ánimos des de la distancia. A **Javi Moreno, Andreu Peiris** y al Dr. **Hisashi Shoji**, quienes me enseñaron que hasta el trabajo más tedioso puede ser divertido con buenos compañeros a tu lado. A la Dra. **Meritxell Cubero**, nuestra hermana mayor en el laboratorio, por ser tan buena compañera de trabajo y ayudarme siempre que hizo falta.

Por último, agradezco a quienes han estado, están y estarán siempre a mi lado, sin importar a dónde me lleve el camino. A mi gran familia, los **Vázquez**, que siempre me apoya y me anima en todo lo que me proponga. A mis amigos, los **Marsupis**, con quienes comparto tantísimas aventuras y que siguen celebrando mis logros y animándome en mis fracasos. A mis **compis del Grau de micro (μ)**, que son los que más entienden este período de mi vida y que siempre serán mi familia pase lo que pase. A **Sandra**, que llegó de manera inesperada a mi vida y me ha dado la fuerza que necesitaba, sobre todo en esta última y difícil etapa y por todo lo que ha hecho por mí. Gracias por ser de las personas con más predisposición a ayudar desinteresadamente que conozco, por tu paciencia y por convertirte en una parte imprescindible de mi vida. A mis hermanas **Ani** y **Carol** y a mi hermano **Iván**, que han estado ahí siempre, haciendo que hoy sea quién soy y apoyando a su “hermanito” pequeño todos estos años junto a sus familias. Y, por último, pero no menos importante, a **mis padres, Ana** y **Jose**, que han hecho todo lo posible para que llegase hasta aquí y les debo todo lo que tengo y todo lo que he conseguido. Gracias por creer en mí y por vuestras palabras de aliento y sinceridad en los momentos que las he necesitado. Porque, sin duda, **todo es por ellos y gracias a ellos**.

Agradecer al IDIBELL, al Hospital Universitari de Bellvitge, al programa CERCA y a la Generalitat de Catalunya por el soporte institucional.



Financiación

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias al contrato de investigación IDIBELL (Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge) mediante fondos de la **REIPI** (Red Española de Investigación en Patología Infecciosa, RD16/0016/0005), actualmente **CIBERINFEC** (Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Infecciosas, CIBERINFEC-CB21/13/00009).

Los trabajos que componen esta tesis han sido financiados por:

- **Fondos de Investigación en Salud.** Instituto de Salud Carlos III (ISCIII). Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades:
 - **PI16/01382:** Epidemiología y patogenia de las infecciones por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina: Estudio de la dinámica poblacional y de la persistencia bacteriana.
 - **PI12/01907:** Estudio aleatorizado, multicéntrico que compara la eficacia de la combinación de Daptomicina y Fosfomicina frente a la Daptomicina en monoterapia para el tratamiento de la bacteriemia por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina en pacientes hospitalizados.
- **Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias** (CIBERES). Grupo 19. CB06/06/0037.





PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

*"Todo parece imposible
hasta que se logra"*
- Nelson Mandela

Tesis en formato clásico con un artículo anexado (**anexo 1**).

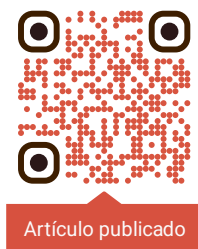
Publicación asociada a la tesis

- Daniel Antonio Vázquez-Sánchez, Sara Grillo, Anna Carrera-Salinas, Aida González-Díaz, Guillermo Cuervo, Inmaculada Grau, Mariana Camoez, Sara Martí, Dàmaris Berbel, Fe Tubau, Carmen Ardanuy, Miquel Pujol, Jordi Càmara, M^a Ángeles Domínguez. **Molecular epidemiology, antimicrobial susceptibility, and clinical features of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream infections over 30 years in Barcelona, Spain (1990–2019).**

Microorganisms. 2022 Dic; Vol.10(12):2401. doi:10.3390/microorganisms10122401

Factor de impacto: 4.926

2do cuartil en Microbiología (Journal Citation Report 2021)





INTRODUCCIÓN

*"El verdadero conocimiento es saber
la extensión de nuestra ignorancia"*
- Confucio

I. INTRODUCCIÓN

Staphylococcus aureus es un microorganismo de gran interés clínico por su capacidad para producir múltiples tipos de infecciones. Las más frecuentes son las infecciones de piel y partes blandas, bacteriemia de catéter o infecciones óseas asociadas a material protésico, pero también puede causar infecciones de elevada gravedad como son la endocarditis, la neumonía, la septicemia, o el síndrome de shock tóxico. Además, *S. aureus* también destaca por su potencial para producir brotes epidémicos intrahospitalarios y por su facilidad para la adquisición de mecanismos de resistencia a los antibióticos, como la resistencia a la familia de las penicilinas semisintéticas que da nombre al *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina o MRSA.

1.1. *Staphylococcus aureus*: Aspectos microbiológicos, taxonomía e identificación

Los estafilococos son una de las bacterias más ubicuas de la naturaleza, y son colonizadores de la piel tanto de humanos como de animales. Fueron descritos y clasificados como “micrococos” por Friedrich von Recklinghausen en 1871, pero no fue hasta la década de 1880 que Sir Alexander Ogston (que acuñó el nombre de “*Staphylococcus*”) y Louis Pasteur confirmaron que estos microorganismos tenían un rol patogénico en casos de sepsis y formación de abscesos¹.

El nombre de *Staphylococcus aureus* describe varias de las características de esta bacteria Gram-positiva: su morfología esférica de entre 0,5 y 1 μm de diámetro (del griego *kokkos*, grano); su distintiva disposición micros-

cópica en 'racimos de uva' (del griego, *staphylé*) (**Figura 1**), indicativa de su división celular en tres planos por fisión binaria; y por último, el color dorado (del latín *aureum*) que adquieren sus colonias al cultivarse en algunos medios sólidos debido a la producción de un pigmento carotenoide². En agar sangre las colonias crecen lisas, de un color blanco o amarillo opaco y pueden presentar todo tipo de hemólisis (lisis de los hematíes), aunque la β -hemólisis o hemólisis completa es la más habitual (**Figura 2**).

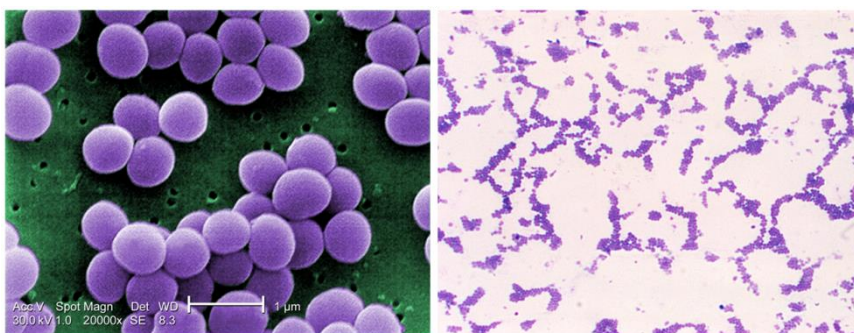


Figura 1. Morfología y agrupación microscópica de *Staphylococcus aureus*. Izquierda. Microscopia electrónica de barrido (SEM) a 20.000x aumentos y coloreada digitalmente de una cepa de *Staphylococcus aureus* tomada de cultivo por Janice Haney Carr. Derecha. Fotomicrografía a 320x aumentos de numerosas células cocoides Grampositivas en racimo por el Dr. Richard Facklam. Ambas imágenes modificadas han sido obtenidas de la librería de imágenes de salud pública (PHIL, <https://phil.cdc.gov>) del Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC).

Actualmente, *S. aureus* pertenece al género *Staphylococcus*, junto a más de 50 especies y 28 subespecies según el listado oficial de nombres de procariotas en línea LPSN^{3,4}. Hasta 17 de estas especies son consideradas microbiota habitual de la piel y fosas nasales del ser humano, pero no todas tienen la misma capacidad patógena. De estas especies, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. capitis*, *S. haemolyticus* y *S. lugdunensis* son las que se asocian con más frecuencia a infecciones, muchas ellas de naturaleza oportu-

tunista⁵⁻⁷. El género *Staphylococcus* se diferencia fenotípicamente de otros Grampositivos como los *Enterococcus* y *Streptococcus*, principalmente por ser productor de catalasa, enzima que descompone los radicales tóxicos de peróxido de hidrógeno producidos por las células fagocíticas del sistema inmunitario. Además, los estafilococos son en general, bacterias mesófilas (34-37°C), inmóviles y no esporuladas, principalmente halotolerantes (15-17M NaCl), y a menudo no presentan cápsula o presentan una fina cápsula polisacárida mucoide². A su vez, la pared celular de *S. aureus* está formada por tres componentes principales: peptidoglicano, ácidos lipoteicoicos y proteína A¹.

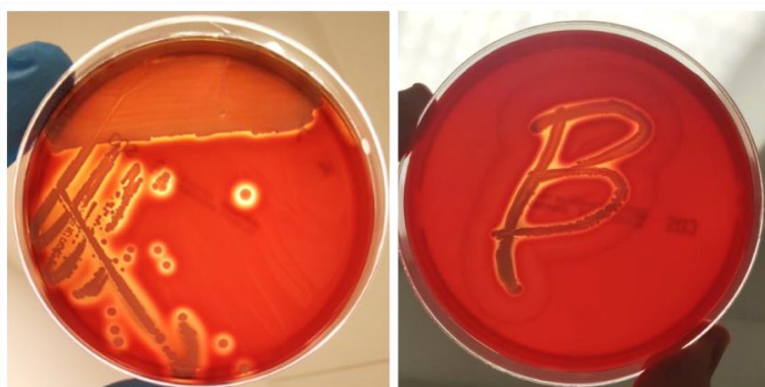


Figura 2. Crecimiento de *S. aureus* en placas de agar sangre de oveja (5%). Se observan colonias redondas, opacas y blanquecinas presentando β -hemólisis. Imágenes tomadas en el Servicio de Microbiología del Hospital de Bellvitge.

Existen varias pruebas fenotípicas para identificar aislamientos de *S. aureus*. Entre ellas, la detección de producción de coagulasa extracelular, *clumping factor* o factor de aglomeración y desoxirribonucleasa (DNasa) son las más habituales en el laboratorio⁸. En general, los estafilococos se clasifican en función de su capacidad de producir coagulasa libre, distinguiendo así entre estafilococos coagulasa negativos (ECN) y *S. aureus*, especie normal-

mente productora de coagulasa. Los métodos moleculares como la detección por PCR del gen codificante de la proteína A (*spa*) o la secuenciación del ARN ribosomal 16S se han usado durante años como métodos de referencia para la identificación de *S. aureus*². Sin embargo, durante la última década la tecnología de espectrometría de masas MALDI-TOF MS (espectrometría de masas por desorción/ionización láser asistida por matriz y detección de tiempo de vuelo) se ha impuesto cómo método rutinario para la identificación bacteriana debido a sus ventajas: rapidez en la obtención de resultados, precisión a nivel de especie, precio menor a los métodos moleculares y no requerimientos de personal especializado⁹.

1.2. Características clínicas de las infecciones causadas por

S. aureus

Se estima que cerca de un tercio de la población mundial está colonizada por *S. aureus* y un 1.5% por cepas MRSA^{10,11}. *S. aureus* se puede encontrar colonizando las fosas nasales humanas, pero también otras partes del cuerpo como la nasofaringe, la piel, el perineo, las ingles o las axilas¹². Se han descrito múltiples factores que favorecen la colonización por *S. aureus* como la obesidad, la diabetes mellitus, la infección por VIH, la hemodiálisis, distintos tipos de dermatitis, incluso el ser fumador, trabajador sanitario o convivir con otros portadores (humanos o ganado)¹²⁻¹⁴. Además, el hecho de ser portador es el paso clave para el desarrollo posterior de las infecciones asociadas a *S. aureus*^{1,15}, enumeradas en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Tipos de infecciones causadas por *S. aureus*.

Enfermedad por invasión directa de órganos	Enfermedad causada por exotoxinas
Infecciones de piel y partes blandas	Gastroenteritis (intoxicación alimentaria)
Foliculitis	Síndrome del shock tóxico
Carbuncos, Furúnculos	Síndrome estafilocócico de la piel escaldada
Celulitis	Enfermedad por bacteriemia
Impétigo	Sepsis y shock séptico
Mastitis	Foco metastásico
Infección de heridas quirúrgicas	(riñón, vejiga, hueso, pulmón, cerebro)
Infecciones musculoesqueléticas	Endocarditis infecciosa
Artritis séptica	(válvulas prostéticas, uso de drogas)
Osteomielitis	Infecciones por dispositivos
Abscesos musculares (psoas)	Catéter intravascular
Abscesos intramusculares (piomiositis)	Dispositivos ortopédicos
Infecciones del tracto respiratorio	Neumonía asociada a ventilación
Neumonía adquirida en la comunidad	Válvulas prostéticas
Neumonía nosocomial (incluye NAV)	Injertos vasculares
Empiema pleural	Instrumentación urológica

Tabla adaptada y modificada de Wasserman *et al.*¹⁵.

S. aureus es capaz de causar tanto infecciones de piel y partes blandas cuando estos tejidos se ven alterados (p.ej. abscesos, foliculitis, impétigo o infecciones de heridas quirúrgicas), infecciones causadas por toxinas (p.ej. el síndrome del shock tóxico, intoxicaciones alimentarias y síndrome de la piel escaldada) e incluso infecciones más graves (p.ej. la piomiositis, la osteomielitis, la neumonía, la endocarditis o la bacteriemia)^{1,15-18}. Además, las infecciones causadas por MRSA y asociadas al sistema sanitario, como la bacteriemia, suelen estar relacionadas con un coste sanitario mayor^{19,20}, una mayor dificultad en la elección de la antibioterapia empírica correcta, y una elevada mortalidad, hasta un 64% superior (mortalidad del 18%-29%)²¹ a las infecciones causadas por *S. aureus* sensible a meticilina (SASM o MSSA en inglés)^{20,22,23}.

De hecho, *S. aureus* se encuentra entre las etiologías más frecuentes de bacteriemia²⁴⁻²⁶, especialmente en el contexto de procedimientos invasivos y cuando hay dispositivos intravasculares involucrados. Los casos más habituales se dan por el uso y colonización de catéteres intravenosos, sondas uretrales, u otros dispositivos; por procedimientos quirúrgicos u odontológicos o por heridas sobreinfectadas. Además, la bacteriemia estafilocócica también puede derivar en la formación de abscesos metastásicos, endocarditis y osteomielitis vertebral^{24,26}. Sin embargo, la bacteriemia también puede ser asintomática y sin secuelas destacables en algunos casos^{24,27}. Dentro de los síntomas que pueden desarrollar los pacientes, los escalofríos, la fiebre persistente o los dolores gastrointestinales suelen indicar una posible septicemia o shock séptico hasta en un 40% de las bacteriemias significativas. Cabe destacar que tanto la sepsis como el shock séptico son respuestas sistémicas graves y potencialmente mortales^{24,26}.

1.3. Factores de virulencia

La capacidad de *S. aureus* para provocar un amplio rango de infecciones, así como su elevado poder patógeno se relaciona con los múltiples factores de virulencia que puede poseer. En la **Tabla 2** se resumen los principales genes de virulencia que se han descrito involucrados en la patogénesis de las infecciones causadas por *S. aureus*. Principalmente, se agrupan en factores de adhesión; evasión y modulación de la respuesta inmunitaria del huésped; de invasión de tejidos, y de persistencia en el huésped¹⁸.

Tabla 2. Principales genes de virulencia de *S. aureus*

Gen	Producto	Localización	Función
Cápsula			
cap5	Polisacárido capsular tipo 5	Cromosómica	Evasión de la fagocitosis
cap8	Polisacárido capsular tipo 8		
Adhesinas de superficie y MSCRAMMs			
cna	Proteína de unión a colágeno	Cromosómica	Unión a colágeno
clfA, clfB	Factor de aglomeración (Clumping factor)	Cromosómica	Agregación plaquetaria, previene la unión de células del sistema inmune al lugar de infección
ebp	Proteína de unión a elastina	Cromosómica	Promueve la colonización
fnbA, fnbB	Proteína de unión a fibronectina A y B	Cromosómica	Facilita la unión a los fagocitos
spa	Proteína A	Cromosómica	Prevención de la opsonización, unión a IgG
Citotoxinas			
hlg, hlb, hld, hlg	Hemolisina α, β, δ y γ	Cromosómica	Hemólisis de eritrocitos, invasión tisular, muerte de neutrófilos
lukS/F	Leucocidina de Pantón-Valentine	Bacteriófago φSa2	Formación de poros en células inmunitarias, necrosis de tejidos
Enzimas			
aur	Aureolisina (metaloproteasa)	Cromosómica	Propagación
coa	Estafilococoagulasa	Cromosómica	Formación de abscesos, bacteriemia letal
geh	Glicerol-éster hidrolasa	Cromosómica	Supervivencia en la piel
hysA	Hialuronidasa	Isla genómica vSaβ	Invasión tisular por disolución de matriz extracelular
lip	Lipasa		Supervivencia en la piel
nuc	Nucleasa	Cromosómica	Nutrición
plc	Fosfolipasa C	Cromosómica	Daño celular
scpA	Estafoína A (Cisteína proteasa)		Propagación, nutrición
splA-F	Serina proteasa	Cromosómica	Proteasa putativa
sspA	Serina proteasa V8	Cromosómica	Propagación, daño tisular
sspB	Estafoína B	Cromosómica	Propagación, daño tisular

Continuación de la Tabla 2.

Superantígenos (exotoxinas)			
<i>eta</i>	Exfoliatina A y B	Bacteriófago	Síndrome de la piel escaldada, impétigo
<i>etb</i>		Plásmido	
<i>sea</i>	Enterotoxina A	Bacteriófago Φs	Provocan síntomas de intoxicación alimentaria
<i>seb</i>	Enterotoxina B	SaPI3	
<i>sec</i>	Enterotoxina C	SaPI4	
<i>sed</i>	Enterotoxina D	Plásmido	
<i>tst-1</i>	Toxina del shock tóxico	SaPI1,2	Síndrome del shock tóxico, activación de células T
Moduladores del sistema inmune			
<i>adsA</i>	Adenosín sintasa A	Cromosómica	Amortiguación de la respuesta innata y adaptativa
<i>chp</i>	(CHIPS) Proteína inhibidora de quimiotaxis estafilocócica	Bacteriófago Φs	Señalización inflamatoria
<i>sak</i>	Estafiloquinasa	Bacteriófago Φs	Activador del plasminógeno, propagación, antiopsonización
<i>sbi</i>	Aglutinante estafilocócico de inmunoglobulina	Cromosómica	Evasión del complemento
<i>scn</i>	(SCIN) Inhibidor del complemento estafilocócico	Bacteriófago Φs	Evasión del complemento, resistencia al suero
Formación de biofilm			
<i>ica</i>	Proteínas de adhesión intercelular	Cromosómica	Adhesión entre bacterias y matriz extracelular
<i>sasG</i>	Proteína de superficie G	Cromosómica	Adhesión y agregación celular

Tabla adaptada de Turner *et al.*²⁸ y modificada según distintas fuentes^{1,14,17,18,29-31}. MSCRAMM, componentes de la superficie microbiana que reconocen moléculas adhesivas de la matriz; SaPI, isla de patogenicidad de *S. aureus*.

Entre los factores de virulencia de *S. aureus* destacan una gran variedad de toxinas y enzimas que pueden estar relacionadas con linajes específicos^{18,28,32}. Las proteasas, lipasas, hialuronidasas, nucleasas y hemolisinas (como la citotoxina α) favorecen la invasión de tejidos^{18,29}. Con respecto a las toxinas producidas por *S. aureus*, cabe destacar la leucocidina de Pantón-Valentine (LPV), una potente citotoxina compuesta por dos componentes

proteicos (LukS-PV y LukF-PV) codificada en el bacteriófago ϕ Sa2. La LPV causa la lisis de neutrófilos debido a la formación de poros en su membrana y está asociada a necrosis dérmica, infecciones de piel y partes blandas crónicas y a neumonías necrotizantes^{33,34}. En relación a las exoproteínas de mayor preocupación clínica están las enterotoxinas estafilocócicas causantes de intoxicación alimentaria con vómitos y diarrea (SEA, SEB, SEC; SED, SEE, SEG, SEH y SEI), las toxinas exfoliativas causantes del síndrome de la piel escaldada e impétigo en niños (ETA y ETB), y la toxina del síndrome de choque tóxico (TSST-1) que puede llegar a causar fallo multiorgánico, con consecuencias fatales^{1,18,35}.

Por otro lado, se ha descrito que la patogenicidad de *S. aureus* está modulada por mecanismos de percepción o quorum *sensing*^{36,37}. En este sentido, la presencia del gen *agrAC* (regulador accesorio) aumenta la patogenicidad y regula la expresión de varios genes de virulencia^{1,18,37,38}.

Otro aspecto que favorece la persistencia de *S. aureus* es la formación de biopelículas (biofilms), ya que contribuye significativamente a evadir a la inmunidad del huésped y entorpecer la eficacia de los agentes antimicrobianos^{18,39}.

1.4. Resistencia antibiótica en *S. aureus*

S. aureus puede mostrar una amplia variedad de mecanismos de resistencia a los antimicrobianos debido a la adquisición horizontal de elementos genéticos móviles o a través de mutaciones cromosómicas^{40–43}. Las cepas de *S. aureus*

resistente a meticilina (SARM, o MRSA en inglés) son resistentes a toda clase de antibióticos β -lactámicos, incluyendo las penicilinas, las penicilinas semi-sintéticas, los carbapenémicos y las cefalosporinas hasta la quinta generación. Esta resistencia se debe a la adquisición del gen *mecA* principalmente. Además de la resistencia a los β -lactámicos, una proporción significativa de los aislados de MRSA también son resistentes a otros grupos de antimicrobianos como las fluoroquinolonas, los aminoglucósidos y los macrólidos, limitando las opciones terapéuticas disponibles^{44,45}.

1.4a. Antecedentes históricos

El interés por el estudio de las infecciones causadas por *S. aureus* fue evidente desde principios del siglo XX, debido sobre todo a la presencia de casos de intoxicación alimentaria ocasionados por enterotoxinas secretadas por este microorganismo¹. Antes de la introducción de la penicilina, la tasa de mortalidad en infecciones sistémicas causadas por *S. aureus* era de un 80%⁴⁶. La introducción de la penicilina por parte de Alexander Fleming en la década de 1940 revolucionó el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Sin embargo, las primeras cepas de *S. aureus* resistente a penicilina se detectaron pronto, en 1948, debido a la producción de la enzima penicilinasa BlaZ (**Figura 3**). La resistencia a penicilina motivó el desarrollo de penicilinas semisintéticas como la oxacilina, la meticilina y las primeras generaciones de cefalosporinas, todas ellas resistentes a la degradación por BlaZ. No habían pasado ni dos años desde la implementación de estos antibióticos, cuando se describieron las primeras cepas de *S. aureus* resistente a meticilina en Gran Bretaña en 1961^{32,47-49}. Fue entonces cuando surgió el término MRSA. Los prime-

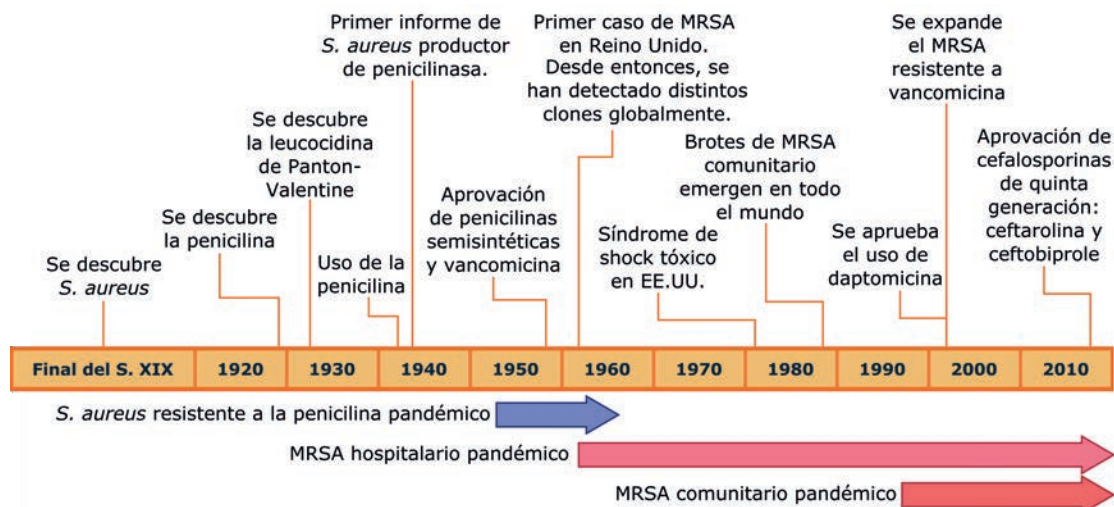


Figura 3. Cronología de la evolución de la resistencia de *S. aureus*. La duración de cada evento epidemiológico está indicada con la longitud de las flechas inferiores. Figura adaptada de Warmel *et al.* y McGuinness *et al.*^{30,51} y datos modificados según distintas fuentes^{1,30,51,236}.

ros MRSA se detectaron y aislaron en un mismo hospital, y compartían un perfil de resistencia común a penicilina, estreptomycin y tetraciclina, sugiriendo una relación entre ellos⁴⁸. No obstante, mediante secuenciación del genoma completo (*whole genome sequencing*, WGS), se ha sugerido que las primeras cepas de MRSA emergieron en los años 1940s, mucho antes de la introducción de las penicilinas semisintéticas al mercado. Se ha hipotetizado que el uso extensivo de la penicilina condujo al nacimiento del MRSA⁵⁰.

Durante los siguientes años, se detectaron más aislamientos de MRSA en otras regiones europeas, como Dinamarca, lo que resultó en el primer clon epidémico de MRSA del que hay constancia⁵⁰. A partir de entonces, el MRSA se volvió endémico en prácticamente todo el mundo, causando una mortalidad elevada como patógeno nosocomial^{2,30,51}. Décadas más tarde, se demostró que el gen *mecA* era el determinante molecular de la resistencia a la meti-

cilina. Este gen se adquiere a través de la transmisión de un elemento genético móvil: el casete cromosómico estafilocócico *mec* (SCC*mec*)⁵².

Cabe destacar que los términos MRSA o MSSA son imprecisos, ya que la meticilina no es un antibiótico que se siga empleando en el entorno hospitalario debido a sus efectos secundarios adversos^{53–55}. Aunque se ha utilizado durante muchos años para determinar la sensibilidad antibiótica de *S. aureus* a otros β -lactámicos, la oxacilina, la cloxacilina (1965) y la cefoxitina (1972) se utilizan actualmente para esta función, al igual que la detección del gen *mecA* por PCR o aglutinación^{56–59}. La definición de MRSA según el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC), incluye no sólo la resistencia de *S. aureus* a meticilina, sino también contra otras penicilinas semisintéticas de uso más común como la oxacilina y la amoxicilina (1972)⁶⁰.

El incremento en el uso y la diversidad de antibióticos usados a lo largo de los años ha generado una presión selectiva inevitable en MRSA, provocando como respuesta genética el aumento en el número y la variedad de tipos de resistencias a los antibióticos^{1,61–63}. En la década de los 90s (**Figura 3**), se tuvo constancia de las primeras cepas de *S. aureus* con sensibilidad reducida a vancomicina (también conocidos como *S. aureus* con resistencia intermedia a vancomicina, VISA) probablemente originados debido al aumento en el consumo de vancomicina desde principios de los 80s^{51,64}. El primer *S. aureus* resistente a vancomicina (VRSA) se detectó en 2002 por la introducción de un transposón (Tn1546), con origen en el género *Enterococcus*, que contenía el gen *vanA*⁵¹.

Los antibióticos aprobados para el tratamiento de las infecciones por MRSA varían según la indicación clínica. Actualmente, y en el caso de las bacteriemias, están principalmente indicadas por la FDA la vancomicina, la daptomicina (2003, contraindicada para el tratamiento de la neumonía ya que esta sustancia es inactivada por el surfactante pulmonar)^{65,66}, el linezolid (2000), a pesar de sus efectos neurotóxicos en terapias prolongadas⁶⁷; y la ceftarolina (2010), que como otras cefalosporinas, tiene un perfil de efectos secundarios favorable^{28,66,68}. Como cabría esperar, al igual que con otras familias de antibióticos, se han descubierto factores de resistencia a estos antibióticos de implementación más reciente⁶⁹⁻⁷⁴. Por otro lado, a pesar de la prevalencia y la gravedad de las infecciones por MRSA, hay relativamente pocos ensayos clínicos aleatorizados de alta calidad respecto a la eficacia de los tratamientos actuales²⁸.

1.4b. Bases moleculares de la resistencia antibiótica en MRSA

Además de la transferencia horizontal de genes de resistencia, existen otros mecanismos, como las mutaciones puntuales, que pueden conferir resistencia a los antibióticos de uso común contra el MRSA, como el linezolid, la daptomicina o las cefalosporinas de quinta generación^{71,72,75,76}.

i. Resistencia a β -lactámicos

Los β -lactámicos tienen como diana las proteínas de unión a la penicilina (*penicillin binding protein*, PBPs), involucradas en la síntesis de peptidoglicano, el componente estructural más abundante de la pared celular⁷⁷. La unión de los β -lactámicos a las PBP interfiere en la síntesis de peptidoglicano y la prolifera-

ración celular⁶¹. Sin embargo, la mayoría de *S.aureus* (>90%) son resistentes a la penicilina debido a la producción de una β -lactamasa BlaZ, una serina proteasa que hidroliza el anillo β -lactámico de la penicilina⁶¹. Por otro lado, las penicilinas semisintéticas como la oxacilina y la meticilina contienen un anillo β -lactámico que es resistente a la actividad de esta β -lactamasa. La adquisición del gen *mecA*, que codifica una PBP exógena de 78 kDa, denominada PBP2' o PBP2a, confiere resistencia a las penicilinas semisintéticas y resistencia cruzada a otros antibióticos β -lactámicos, incluidas las cefalosporinas⁷⁷⁻⁸⁰. Esta resistencia se debe a esta PBP adicional que, a diferencia de las PBPs endógenas de *S. aureus*, tiene una menor afinidad por estos compuestos^{77,80}. En consecuencia, gracias a la adquisición de la PBP2a, *S. aureus* puede evitar la inhibición de la síntesis de la pared celular mediada por los β -lactámicos^{40,43}.

Casete cromosómico estafilocócico (SCCmec)

El gen *mecA* está insertado en una isla de patogenicidad llamada SCCmec⁸¹, un elemento móvil típico del género *Staphylococcus*. El origen del SCCmec proviene de los ECN, y se inserta en la región 3' de *orfX* (metiltransferasa de ARN)^{50,77,82}. Hasta la fecha se desconoce si este elemento se insertó en la población del primer clon de MRSA como un hecho aislado o si se produjo en múltiples ocasiones a lo largo del tiempo^{50,62,77,83}. Se compone de dos elementos principales (**Figura 4**): el **complejo mec** que contiene el gen *mecA* u otras variantes (*mecB*, *mecC* o *mecD*), sus genes reguladores, intactos o deletados (*mecI* y *mecR1*), y el **complejo ccr**, compuesto de recombinasas del casete cromosómico (*ccr*), involucradas en la movilidad de

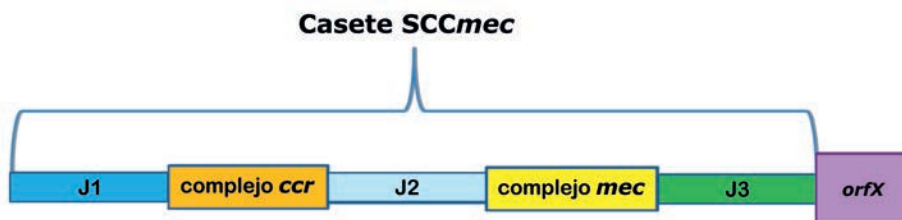


Figura 4. Representación esquemática de SCCmec modificada de Mlynarczyk-Bonikowska *et al.*⁸⁴. Se muestra la región *orfX* y los elementos principales del SCCmec, incluyendo el complejo *mec*, el complejo *ccr* y las regiones variables J1, J2 y J3.

la isla de patogenicidad (**Tabla 3**)⁵². El resto del SCCmec se compone de elementos no esenciales, como genes de resistencia a metales y antibióticos transportados por plásmidos y transposones, así como tres regiones de fun-

Tabla 3. Tipos de complejos *mec* y *ccr* en *Staphylococcus aureus*.

Clase de complejo <i>mec</i>	Estructura del complejo <i>mec</i>	Tipo de SCCmec
A	IS431 – <i>mecA</i> – <i>mecR1</i> – <i>mecI</i>	II, III, VIII, XIII, XIV
B	IS431 – <i>mecA</i> – Δ <i>mecR1</i> – Ψ IS1272	I, IV, VI
B2	IS431 – <i>mecA</i> – Tn4001 – Ψ IS1272	IV
C1	IS431→ – <i>mecA</i> – Δ <i>mecR1</i> – IS431→	VII, X
C2	IS431→ – <i>mecA</i> – Δ <i>mecR1</i> – IS431←	V, XI, XII
E	<i>blaZ</i> – <i>mecC</i> – <i>mecR1</i> – <i>mecI</i>	XI
Clase de complejo <i>ccr</i>	Genes <i>ccr</i>	Tipo de SCCmec
1	A1B1	I, IX
2	A2B2	II, IV
3	A3B3	III
4	A4B4	VI, VIII
5	C1	V, VII, XIV
7	A1B6	X
8	A1B3	XI
9	C2	XII, XIII

IS, secuencia de inserción; ↔, orientación del IS, Tn, transposón; Δ *mecR1*, regulador *mec* truncado; *blaZ*, gen β -lactamasa; Tn4001, contiene el gen bifuncional de resistencia aminoglucósidos *aacA-aphD*. Tabla adaptada de Mlynarczyk-Bonikowska *et al.*⁸⁴. e Ito *et al.*⁸¹.

cionalidad desconocida llamadas regiones J (“*joining regions*”). Además, el casete *SCCmec* puede favorecer la adquisición de mecanismos de resistencia a otros antimicrobianos⁸⁴, lo que facilita todavía más la capacidad de propagación de MRSA⁷⁷. Entre estos genes de resistencia se incluyen genes de resistencia a aminoglucósidos, macrólidos, lincosamidas, estreptograminas B y tetraciclinas⁸⁴.

Hasta la fecha se han descrito 14 tipos de estructuras de *SCCmec* en *S. aureus* (**Tabla 4**)^{84–87}. Se clasifican en función de las distintas combinaciones de complejos *mec* (del A al E), según la presencia o ausencia de genes

Tabla 4. Tipos de *SCCmec* en *Staphylococcus aureus* y año de primer aislamiento

Tipo de <i>SCCmec</i>	Aislamiento	Tamaño (kb)	Complejo <i>ccr</i>	Complejo <i>mec</i>	Otros elementos
I	Inglaterra; 1961	34,4	1	B	pUB110, Tn554,
II	Japón; 1981	53,0	2	A	SCCHg, ψ Tn554,
III	N. Zelanda; 1985	66,9	3	A	pT181
IV	EE.UU.; 1999	24,3	2	B	-
V	Australia; 1995	27,6	5	C2	<i>hsdR</i> , <i>hsdS</i> , <i>hsdM</i>
VI	Portugal; 1996	23,0	4	B	-
VII	Suecia; 2002	32,4	5	C1	<i>hsdR</i> , <i>hsdM</i>
VIII	Canadá; 2003	32,1	4	A	Tn554
IX	Tailandia; 2006	43,7	1	C2	<i>arsDARBC</i> , <i>cadDX</i>
X	Canadá; 2006	50,8	7	C1	<i>arsRBC</i> , <i>cadDX</i>
XI	Inglaterra; 2007	29,4	8	E	<i>arsRBC</i> , <i>cadDX</i>
XII	China; 2015	49,3	9	C2	<i>arsRBC</i> , <i>blaZ</i>
XIII	Dinamarca; 2018	29,2	9	A	Tn4001
XIV	Japón; 2014	81,5	5	A	ACME tipo II

Tabla adaptada de Mlynarczyk-Bonikowska *et al.*⁸⁴ y modificada según Ito *et al.*⁸¹. pUB110, plásmido (con *ant(4')*, resistencia a aminoglucósidos y *bleO*, resistencia a bleomicina); Tn554, transposon (con *ermA*, resistencia a MLS_S, *spc*, resistencia a espectomicina); ψ Tn554 (*cadBC*, resistencia a sales de cadmio); SCCHg, casete cromosómico (con *merRTAB*, resistencia a mercurio, IS431, Tn554, *ccrC*); *hsd*, genes endonucleasa/metilasa; *ars*, genes de resistencia a arseniato; ACME tipo II (*arcCBDA*, IS256).

reguladores, del tipo de gen *mec* (*mecA* o *mecC*) y de las variantes de *ccr* (*ccrAB* y *ccrC*) (**Figura 5**)^{62,77,88}. Algunos tipos de SCC*mec* también están clasificados en subtipos, como el SCC*mec* tipo IV, que tiene hasta 12 variantes según las regiones variables J o el SCC*mec*-la que difiere del SCC*mec*-I por la inserción del plásmido pUB110⁸¹.

Cefalosporinas de quinta generación

En la actualidad, la frecuencia de aislados de *S. aureus* resistentes a las cefalosporinas de quinta generación ceftobiprole o ceftarolina — antibióticos con actividad frente a MRSA^{89,90} — es anecdótica en nuestro entorno. A pesar de ello, cuando se analizaron cepas MRSA previas a la comercialización de la ceftarolina se comprobó que ya existían cepas resistentes. Esto sugiere que el uso inadecuado de otros antibióticos β -lactámicos puede provocar resistencia cruzada a ceftarolina, como pasó con la detección de MRSA previo a la implementación de la meticilina⁵⁰. También se ha demostrado que las bacterias pueden persistir en concentraciones terapéuticas de ceftarolina si han sido expuestas previamente a ella⁸⁹. La resistencia a las cefalosporinas de quinta generación se describe principalmente asociada a alteraciones en la PBP2a pero también se han descrito mutaciones asociadas a altos niveles de resistencia en los genes *pbp2*, *pbp3*, *pbp4* y *gdpP*^{84,89,91}.

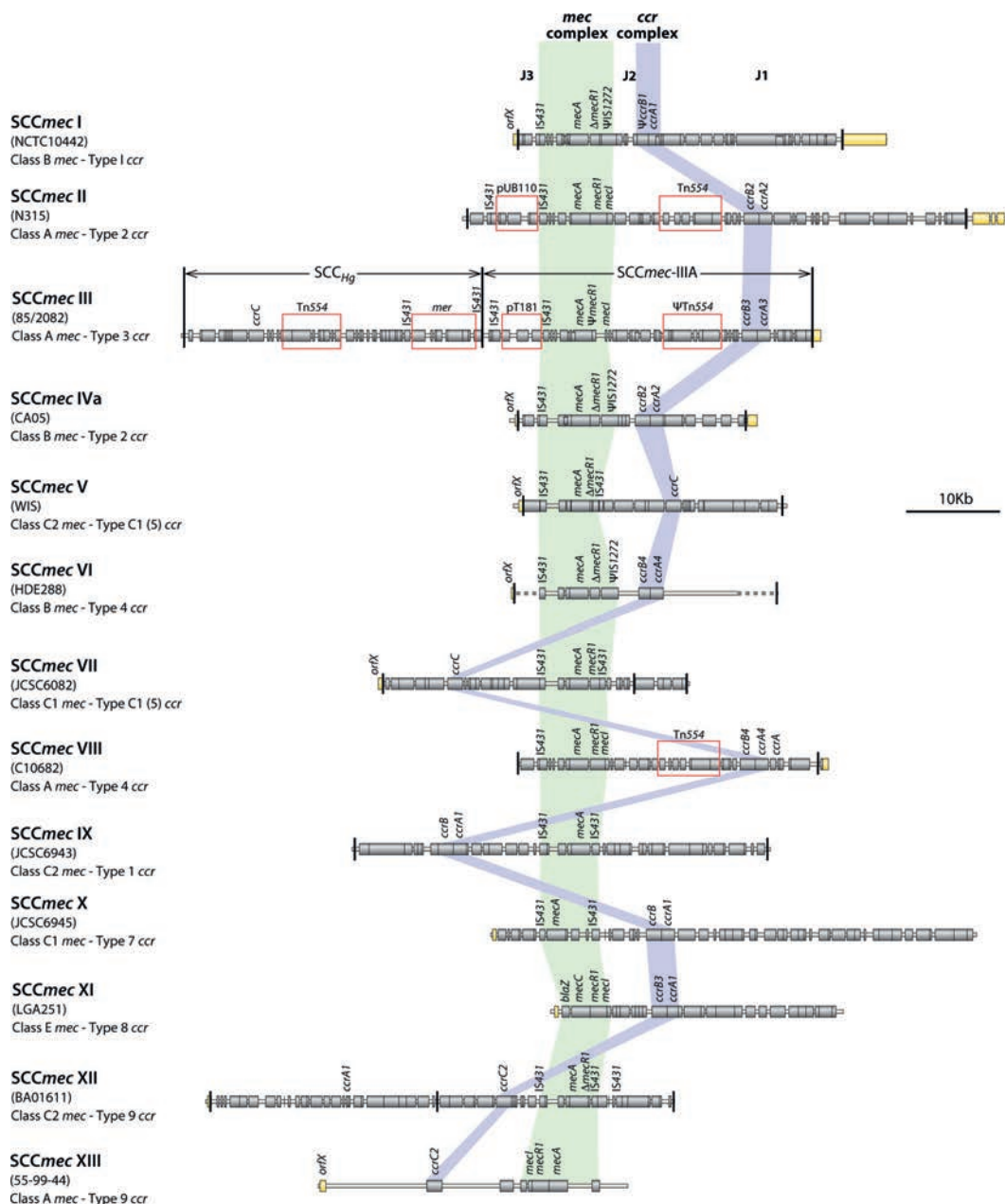


Figura 5. Diagrama de 13 de los 14 tipos de SCCmec notificados hasta la fecha (SCCmec I a XIII). Figura original de Lakhundi *et al.*⁸⁶. El complejo *mec* está indicado por el sombreado verde, el complejo *ccr* por el sombreado azul, y las *joining regions* J1, J2 y J3 sin sombreado. También se indican los elementos más importantes de las regiones J, como los transposones y los plásmidos. Los distintos tipos de SCCmec se deben a las distintas combinaciones de los complejos *mec* y *ccr*, así como la posición relativa de éstos en el casete.

ii. Resistencia a antibióticos no β -lactámicos

Los genes de resistencia antibiótica asociados a elementos genéticos móviles descritos con más frecuencia en MRSA se exponen en la **Tabla 5**. Todos ellos son ejemplos de genes transportados en plásmidos y/o transposones y que se pueden encontrar tanto en MRSA como MSSA^{28,92}. Además, la resistencia antibiótica suele estar ligada a resistencia a desinfectantes o a metales pesados (como los amonios cuaternarios, mercurio o cadmio), reflejando la presión selectiva que ha ejercido el ambiente hospitalario en la evolución de MRSA^{28,63,93}.

Tabla 5. Principales elementos genómicos de resistencia antibiótica en MRSA.

Gen	Producto	Localización	Resistencia
<i>blaZ</i>	β -lactamasa	Plásmido/Transposón	Penicilinas
<i>mecA</i>	PBP2a	SCC <i>mec</i>	Meticilina
<i>aacA-aphD</i>	Proteína bifuncional AAC-APH	Transposón	Aminoglucósidos
<i>aadD</i>	Aminoglucósido adeniltransferasa	Plásmido, SCC <i>mec</i>	
<i>ant(4')</i>	O-nucleotidiltransferasa 4'	Plásmido, SCC <i>mec</i>	
<i>ant(9)</i>	O-nucleotidiltransferasa 9	Transposón	
<i>ermA</i>	Metilasa de ARNr	Transposón	Macrólidos, lincosamidas y estreptograminas
<i>ermC</i>		Plásmido	
<i>dfrA, dfrK</i>	Dihidrofolato reductasa	Plásmido	Trimetoprim
<i>catA</i>	Cloranfenicol acetiltransferasa	Plásmido	Cloranfenicol
<i>ileS</i>	Isoleucil-ARNt sintetasa	Plásmido	Mupirocina
<i>tetK</i>	Proteína de resistencia a tetraciclina	Plásmido	Tetraciclinas
<i>tetM</i>		Transposón	
<i>bleO</i>	Proteína de unión a bleomicina	Plásmido, SCC <i>mec</i>	Bleomicina
<i>qacA</i>	Bomba de expulsión de antisépticos	Plásmido	Amonios cuaternarios

Tabla adaptada de Malachowa *et al.*⁹² y modificada según datos obtenidos en Turner *et al.*²⁸

Fluoroquinolonas

Las fluoroquinolonas son fármacos bactericidas que inhiben la actividad de la topoisomerasa II (girasa) y la topoisomerasa IV, enzimas responsables de la espiralización del ADN⁹⁴.

La resistencia a fluoroquinolonas en *S. aureus* se debe principalmente a mutaciones en los genes *gyrA* y *gyrB* de la topoisomerasa II, y en los genes *parC* (*grlA*) y *parE* (*grlB*) de la topoisomerasa IV. La sobreproducción de bombas de expulsión (NorA, NorB, NorC) también se han asociado a un bajo nivel de resistencia^{84,95,96}.

Aminoglucósidos

Los aminoglucósidos son antibióticos bactericidas que inhiben la síntesis proteica debido a su interferencia con la subunidad 30S del ribosoma⁸⁴. La resistencia a aminoglucósidos se debe principalmente a la presencia de tres tipos de transferasas (acetiltransferasas, fosfotransferasas y nucleotidiltransferasas) que modifican las moléculas de los aminoglucósidos. En *S. aureus* los enzimas que se describen con más frecuencia son AAC(6')-APH(2''), que confiere resistencia a gentamicina, tobramicina y amikacina y ANT(4')(4''), que confiere resistencia a tobramicina y amikacina. Por otro lado, aunque menos frecuentes, la resistencia a aminoglucósidos también puede ser causada por la alteración del transporte de los antibióticos dentro de la célula bacteriana, un mecanismo que se observa con mayor frecuencia en las *small colony variants* (SCV) o en infecciones asociadas a la formación de biofilm^{84,97,98}.

Macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B

El grupo de macrólidos, lincosamidas y estreptograminas B (MLS_B) presentan el mismo mecanismo de acción contra el dominio V del 23S ARNr, en la subunidad 50S del ribosoma^{84,99}.

La modificación enzimática de la diana de este grupo de antibióticos por parte de enzimas Erm (genes *erm*, *erythromycin ribosome methylase*) es el mecanismo de resistencia a MLS_B más común. Estas enzimas generan resistencia a todos los MLS_B por la dimetilación de la adenina 2058 del 23S. Este mecanismo de resistencia se puede expresar de manera constitutiva, en cuyo caso las cepas muestran resistencia a todos los MLS_B (fenotipo cMLS_B), o de manera inducida (fenotipo iMLS_B), detectándose fenotípicamente con la presencia de un inductor como puede ser la eritromicina.

La resistencia a MLS_B puede generarse por la presencia de bombas de expulsión como las proteínas ABC Msr(A) y Vga(A), de enzimas inactivadoras de MLS_B como la fosfotransferasa de macrólidos Mph(C), o mutaciones del ARNr 23S y/o de las proteínas ribosomales¹⁰⁰.

Otras familias de antibióticos

La **tetraciclina** inhibe la síntesis proteica al interferir en la subunidad 30S del ribosoma. Los dos mecanismos de resistencia a estos antibióticos más frecuentes en *S. aureus* incluyen la eliminación activa del antibiótico desde el interior de la célula mediante bombas de expulsión (genes *tet(K)* o *tet(L)*) y la protección ribosomal (genes *tet(M)* o *tet(O)*). La presencia de los genes *tet(L)* y *tet(M)* son los que se describen más frecuentemente en cepas MRSA en la bibliografía, aunque depende de la población y la región geográfica^{96,101}.

La **mupirocina** se usa para la descolonización nasal de profesionales sanitarios y pacientes portadores de *S. aureus*. Este tratamiento nasal en

combinación con lavados de la piel con clorhexidina contribuye a la reducción de la frecuencia de transmisión cruzada y en consecuencia de las infecciones causadas por *S. aureus*¹⁰². La mupirocina inhibe la síntesis proteica mediante la inactivación de la isoleucina-ARNt sintetasa. El gen *mupA* (*ileS2*) codifica para otra isoleucina-ARNt sintetasa resistente a la mupirocina¹⁰³.

La **rifampicina** inhibe la transcripción, interfiriendo con la subunidad *rpoB* de la ARN polimerasa. La resistencia a rifampicina en *S. aureus* está asociada a mutaciones en el gen *rpoB*^{104–106}.

La **fosfomicina** es un inhibidor de la enzima MurA, afectando así al proceso de síntesis del peptidoglicano^{28,107}. La metaloenzima FosB es la única producida en bacterias Grampositivas que modifica a la fosfomicina¹⁰⁸. Además, sustituciones en MurA o los sistemas de transporte UhpT y GlpT, también se han asociado a resistencia a fosfomicina¹⁰⁷.

El **trimetoprim** se usa en combinación con **sulfametoxazol** (cotrimoxazol) actuando de forma sinérgica al inhibir enzimas que intervienen en la síntesis del ácido fólico (dihidropteroato sintetasa y dihidrofolato reductasa). La resistencia a cotrimoxazol en *S. aureus* se puede deber a mutaciones en estos genes o a la adquisición de genes *dfrA*, *dfrB*, *dfrK* y *dfrG* que codifican por dihidrofolato reductasas^{28,109}.

El **linezolid** es uno de los antibióticos de más relevancia contra MRSA. Se trata de una oxazolidinona aprobada en el año 2000 que actúa en el ribosoma, en el mismo punto de acción que el cloranfenicol y las lincosamidas. A pesar de que la resistencia a linezolid en aislados clínicos es alta-

mente infrecuente, se han publicado informes de cepas de MRSA que han adquirido plásmidos que codifican para el determinante de resistencia a clo-ranfenicol, lincosamidas y linezolid Cfr⁴³. El determinante de resistencia transferible a oxazolidinonas y fenicoles Optra ha sido descrito desde 2018 en estafilococos coagulasa-negativos y también en casos aislados de *S. aureus*^{84,110}.

La **daptomicina** es un antibiótico lipopéptido cíclico que actúa sobre la membrana citoplasmática de *S. aureus*. El proceso de agregación de la daptomicina a la membrana es un proceso dependiente de Ca²⁺, que conduce a la formación de poros, provocando la muerte celular⁷⁵. Los mecanismos que conducen a sensibilidad reducida y/o resistencia a daptomicina se describen relacionados con mutaciones en el gen *mprF* que codifica la lisil-fosfatidilglicerol sintetasa, el operón *dltABCD* responsable de la unión de la D-alanina a los ácidos teicoicos en la pared celular, los genes reguladores *vraSR* y *clpP*, la subunidad *rpoC* de la ARN polimerasa, el transportador ABC *vraG*, la peptidasa *spsB*, o el sensor de histidina quinasa *yycG* (también llamado *walk* o *vick*), entre otros^{43,74,111}.

1.5.Epidemiología del MRSA

Los primeros aislados de MRSA se identificaron a principios de los 60 en Reino Unido, pero las infecciones fueron poco frecuentes hasta la década de los 80s¹¹². Desde entonces, y sobre todo, a partir de la década de los 90s, aumentó su papel como patógeno nosocomial, notificándose con frecuencia brotes en todo el mundo. En la actualidad se considera un patógeno de im-

portancia sanitaria a nivel mundial¹¹³⁻¹¹⁶. Por otro lado, hasta prácticamente finales de los 90s (**Figura 3**) se consideró al MRSA como una amenaza principalmente asociada a los hospitales (adquisición hospitalaria o *hospital-acquisition*, HA-MRSA). Posteriormente se empezaron a detectar cepas MRSA en individuos que no habían tenido contacto previo con el sistema sanitario (origen asociado a la comunidad o *community-associated*, CA-MRSA)^{117,118}. Curiosamente, uno de los primeros casos de CA-MRSA del que se tiene constancia se notificó en 1993 en población aborigen de una parte remota de Australia, sin centros sanitarios cercanos¹¹⁹. En paralelo también se establecieron los centros de larga estancia como reservorios importantes de MRSA apareciendo así un nuevo concepto de MRSA asociado al sistema sanitario y no sólo al ambiente hospitalario (*healthcare-associated*, HCA-MRSA)¹²⁰. Clásicamente se han descrito características clínicas asociadas a un tipo u otro de MRSA. Por ejemplo, las cepas de HA-MRSA se encontraban asociadas a hospedadores inmunodeprimidos o con enfermedades de base, causando infecciones nosocomiales, mientras que las cepas CA-MRSA podían causar infecciones en población sana, siendo en estos casos las infecciones de piel y partes blandas las más frecuentes¹⁸. Por otra parte, en los años 90 las diferencias genotípicas y fenotípicas (como la resistencia a varias familias concretas de antibióticos) permitían clasificar a los MRSA según su procedencia comunitaria o nosocomial. Sin embargo, estas diferencias se han ido diluyendo a lo largo de los años, demostrando que ambos grupos pueden invadir el nicho epidemiológico del otro, como se ha visto en varias ocasiones con el clon USA300^{28,121}.

Se estima que los aislamientos clínicos de MRSA representan de media un 25% de los aislamientos totales de *S. aureus*, dependiendo del área geográfica, con tasas de resistencia a meticilina desde un 1% en Islandia y países escandinavos, hasta más de un 50% en países como Rumanía, o en partes de Asia y Sudamérica (**Figura 6**)¹²². En Europa la prevalencia de MRSA aumentó hasta principios de la década de los 2000s, y desde entonces se ha observado una prevalencia constante e incluso decreciente^{123,124}. Este descenso generalizado de los clones de MRSA endémicos en el sistema sanitario, ha ido en paralelo con un aumento de MRSA en animales destinados a la producción alimentaria, como los cerdos, ganado bovino y aves de corral¹⁴. A estas cepas de MRSA asociadas al

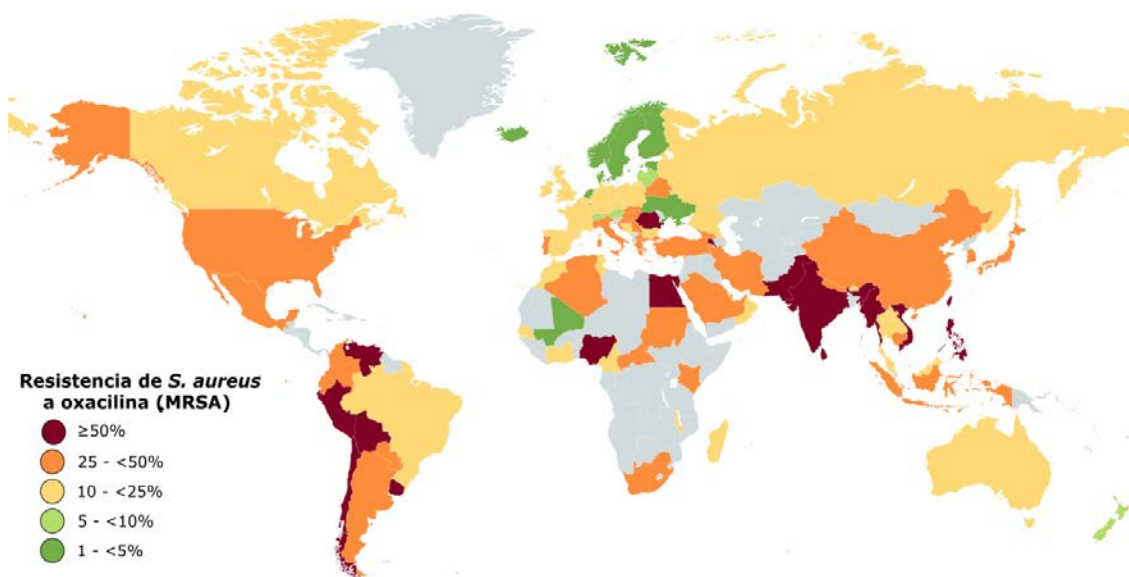


Figura 6. Prevalencia global de MRSA en 2019. Se muestra el porcentaje de aislamientos de *S. aureus* resistentes a oxacilina (equivalente a MRSA). Los porcentajes representados han sido obtenidos del One Health Trust Center for Disease Dynamics, Economics and Policy (OHT-CDDEP) Resistance Map¹²³ y completados desde el European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)¹²⁴, el Central Asian and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance (CAESAR)³¹¹ y el Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS)³¹². Figura realizada mediante <https://www.mapchart.net>.

ganado se los denomina LA-MRSA (*livestock-associated*) y están habitualmente asociadas a genotipos característicos, como por ejemplo el complejo clonal 398 (CC398) en el ganado porcino^{125–127}. A pesar de que estas cepas pueden llegar a causar infecciones en humanos, sobretudo entre profesionales en contacto con animales, la frecuencia de LA-MRSA sigue siendo poco común en la población general^{127–129}.

Existen diversos clones de MRSA que se han propagado a nivel global (**Figura 7**). La definición de clon se aplica a las bacterias que derivan de un progenitor común como parte de una cadena de replicación directa¹³⁰. La relación clonal (elevada similitud genotípica y fenotípica) entre dos aislados de la misma especie se puede detectar en el laboratorio mediante pruebas como la electroforesis en gel en campo pulsado (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*, PFGE)¹³¹ o el *multilocus sequence typing* (MLST)⁵⁵. En el caso del MLST, los secuenciotipos (STs) obtenidos se pueden agrupar también en complejos clonales (CCs) por su similitud alélica¹³². Estas herramientas permiten la vigi-

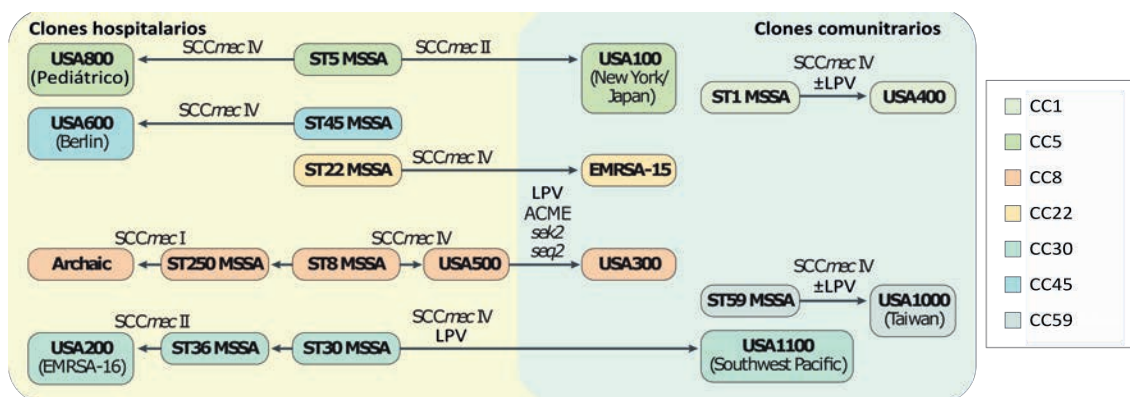


Figura 7. Clones de MRSA más frecuentes. ST, secuenciotipo; CC, complejo clonal; SCCmec, cassette cromosómico estafilocócico *mec*; ACME, elemento móvil de resistencia a arginina; EMRSA, MRSA epidémico; LPV, leucocidina de Pantón-Valentine; *sek2* y *seq2* son genes codificantes de enterotoxinas estafilocócicas. Figura adaptada y modificada de Lee *et al.*⁵⁵.

lancia de los distintos clones de *S. aureus* a lo largo del tiempo y también la vigilancia de su distribución geográfica. Además, los distintos STs se asocian a la adquisición de un tipo concreto de SCCmec (del I al XIV)^{32,133} de forma que el tipo de casete representa una herramienta adicional de tipado y que se suele incluir en la denominación del clon (p.ej. CC8 ST8-IV). Por otro lado, algunos clones de especial interés se denominan comúnmente con un nombre propio, muchas veces derivado del país donde se describió por primera vez (p.ej. clon Ibérico¹¹², clon Taiwán o clon de Nueva York/Japón), o por su origen epidemiológico (p.ej. clon Pediátrico)³². Por último, también existen otras nomenclaturas usadas en ciertos países. Por ejemplo, en EE.UU. se han nombrado clásicamente los clones de MRSA como “USA” seguido de un número basado en análisis de PFGE (p.ej. USA100, USA300 ó USA500). En cambio, en Reino Unido se etiqueta a los distintos clones como EMRSA o MRSA epidémico (p.ej. EMRSA-15). Así pues, un mismo clon puede tener varias nomenclaturas, tomando de ejemplo al clon Pediátrico, también se le puede denominar como CC5 ST5-IV o USA800¹³⁴.

1.6.Métodos de tipado molecular

Existen varios métodos para el tipado molecular y la clasificación de *S. aureus*, incluyendo la detección de marcadores genéticos o la clasificación de alelos. En función del objetivo que se defina, es necesario aplicar uno o varios de estos métodos (**Tabla 6**). En los casos en los que la rapidez es importante para contener un brote local, los métodos basados en PCR pueden ser una

opción a tener en cuenta. Si el objetivo es el tipado de clones de varias ubicaciones geográficas, el PFGE ha sido considerado el “*gold standard*” duran-

Tabla 6. Principales técnicas de caracterización molecular de *S. aureus*.

Técnica	Metodología	Ventajas	Desventajas
Electroforesis en gel en campo pulsado (PFGE)	Se fragmenta el ADN con enzimas de restricción específicas. Estos fragmentos se separan por un campo eléctrico que cambia de dirección periódicamente ¹³¹ .	Altamente discriminatoria, ampliamente disponible y relativamente económica.	Laborioso, técnicamente delicado, problemas de reproducibilidad entre laboratorios, poco adecuado para epidemiología a nivel global o a largo plazo ¹³⁵ .
MLST	Comparación de una región variable de siete genes conservados. Los alelos de cada gene se definen en una base de datos internacional y la combinación específica de alelos recibe el nombre de ST (<i>sequencetype</i>) ¹³² .	Muy discriminatoria y reproducible. Adecuada para epidemiología a nivel global o a largo plazo.	Técnica laboriosa y precio moderado de la secuenciación Sanger.
Tipado del gen <i>spa</i>	Análisis y secuenciación de las repeticiones polimórficas de secuencia corta (24bp) del gen <i>spa</i> . Las secuencias se pueden comparar con una base de datos internacional ¹³⁶ .	Adecuado para investigar brotes epidémicos de manera rápida ¹³⁷ .	Precio moderado de la secuenciación Sanger.
Tipado del SCCmec	Técnica en la que se asigna a cada cepa un tipo de SCCmec basado en la PCR de los alotipos de los genes <i>ccr</i> y <i>mecA</i> que conforman la estructura de SCCmec.	Más barato que el MLST o WGS.	Exclusivo de MRSA. Dificultad para detectar nuevos tipos de SCCmec.
Tipado del gen <i>agr</i>	Amplificación del fragmento hipervariable de <i>agr</i> .	Específico. Accesible. Aporta información sobre virulencia ^{138,139} .	Poco poder diferenciador.
Microarray	Hibridación con genes del cromosoma bacteriano.	Información sobre muchos genes a la vez. Rapidez y fácil de usar.	Falsos negativos, perfiles de expresión génica incompletos. Hibridación cruzada. No detecta mutaciones.
Secuenciación del genoma completo (WGS)	Análisis de la secuencia completa del genoma bacteriano que permite el estudio completo y simultáneo de variantes de un único nucleótido (SNP), mecanismo de resistencia, factores de virulencia, tipado y relaciones filogenética.	Preciso y altamente discriminatorio. Incluye todos los genes de resistencia y virulencia (entre otros).	Precio elevado. El análisis requiere de experiencia y conocimiento por parte de un bioinformático.

Tabla adaptada de Silva *et al.*⁴⁹ y modificada según Turner *et al.*²⁸. MLST, *multilocus sequence typing*; SCCmec, casete cromosómico estafilocócico *mec*; *agr*, regulador de gen accesorio.

te muchos años, al ser un enfoque más sólido que permite la comparación intra- e inter-laboratorios, pero con inconvenientes debido a las condiciones de la electroforesis o a la concentración de ADN. Otros métodos como el MLST y los *microarrays*, permiten una tipificación más precisa, y los resultados obtenidos son igualmente comparables. Sin embargo, todos estos méto-

dos tienen inconvenientes, como la necesidad de contar con personal especializado y el elevado precio en algunos casos, de forma que el laboratorio debe incorporar los métodos necesarios acorde a sus recursos.

Desde los 2000s, el conocimiento sobre la población de MRSA y su evolución ha dado un salto enorme gracias al avance tecnológico. De esta manera los clones más dominantes están bajo vigilancia y se les puede asociar con características patogénicas, diseminación, e incluso identificar marcadores para nuevos agentes terapéuticos¹⁴⁰. Tras el tipado de miles de cepas de MRSA de distintos orígenes geográficos, se ha comprobado que la mayoría de países cuentan con un número de linajes de MRSA limitado, siendo muchos de ellos epidémicos a nivel global^{140,141}.

1.6a. Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE)

El tipado mediante la enzima de restricción *SmaI* y posterior electroforesis en campo pulsado PFGE ha sido considerado muchos años como el “*gold standard*” para el tipado de MRSA debido a su poder discriminatorio y reproducibilidad.

Las principales limitaciones de esta técnica son el largo intervalo de tiempo que transcurre hasta que se obtienen los resultados, los protocolos técnicamente exigentes y laboriosos, el coste de los reactivos y la necesidad de un equipo especializado. En ocasiones la imagen puede carecer de suficiente poder de resolución para discriminar aquellas bandas que difieren en poco de tamaño. Además, aunque la PFGE genera un número limitado de

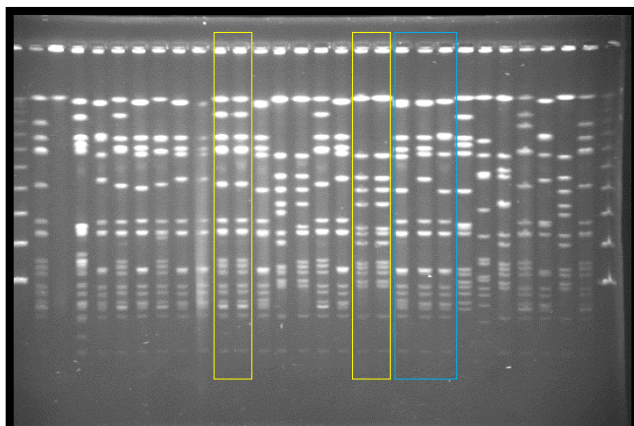


Figura 8. Ejemplo de electroforesis en gel por campo pulsado de 28 cepas de MRSA, y marcadores de tamaño molecular a ambos extremos. Los cuadros amarillos señalan pares de patrones indistinguibles y el cuadros azul, patrones con más de dos bandas de diferencia. El gel fue teñido con bromuro de etidio durante 30 minutos y la foto realizada en el Servicio de Microbiología del HUB.

bandas de gel (**Figura 8**), pueden generarse problemas de interpretación cuando las bandas son muy similares. Esto es especialmente relevante en los casos de estudios inter-laboratorio, ya que pequeñas diferencias en las condiciones de electroforesis (temperatura, soluciones utilizadas, equipo de electroforesis, etc) pueden alterar los resultados al afectar a la distancia recorrida por cada banda. Por tanto, pueden existir diferencias en los patrones obtenidos en diferentes geles y en diferentes laboratorios, limitando las posibilidades de extrapolación de los resultados.

A pesar de estos inconvenientes, la PFGE sigue siendo una técnica útil para la caracterización de brotes y se ha utilizado ampliamente para la comprensión de la epidemiología de las cepas de MRSA tanto endémicas como epidémicas. De hecho, debido a que muchos de los clones de interés en MRSA pertenecen a unos pocos secuenciotipos por MLST, la PFGE se ha seguido utilizando rutinariamente como herramienta clave para la tipificación

molecular. En estos casos, los criterios de análisis de datos desarrollados por Tenover *et al.* han sido la base de muchos estudios¹³¹.

1.6b. Multilocus sequence type (MLST)

El MLST (*multiple locus sequence typing*) es un método de tipificación ampliamente utilizado. Consiste en la secuenciación de un conjunto de siete *loci* (posiciones) genéticos específicos del genoma de *S. aureus* y la comparación de los resultados obtenidos con una base de datos de referencia para determinar el secuenciotipo (ST). Concretamente, los genes que se amplifican para el MLST de *S. aureus* son: carbamato quinasa (*arcC*), una enzima que interviene en el metabolismo de los aminoácidos en la bacteria; shikimato deshidrogenasa (*aroE*), una enzima que participa en la síntesis de diversos compuestos orgánicos esenciales; la glicerol quinasa (*glpF*) y guanilato quinasa (*gmk*), enzimas que intervienen en la producción de energía; fosfato acetiltransferasa (*pta*), enzima que participa en la síntesis de fosfatidilcolina, un componente esencial de las membranas celulares; fosfato triosa-isomerasa (*tpi*), que interviene en el metabolismo de los carbohidratos y por último acetiltransferasa acetil coA (*yqi*), una enzima que también participa en la producción de energía.

La secuenciación Sanger se ha utilizado habitualmente para la obtención de fragmentos relativamente cortos (~1 kb), siendo una técnica óptima para la caracterización de los genes que conforman el MLST y el *spa-typing*. Es un método de secuenciación de ADN que se basa en la amplificación del fragmento de interés mediante la técnica de PCR y la adición de dideoxinucleóti-

dos marcados con fluorescencia (**Figura 9**). Los dideoxinucleótidos son nucleótidos que una vez incorporados a la cadena en formación, no permiten la incorporación de nuevos nucleótidos lo que provoca que la síntesis se detenga en ese punto. Los fragmentos de ADN resultantes se separan mediante electroforesis capilar y su secuencia se determina mediante un detector de fluorescencia. Esta técnica permite determinar la secuencia de bases nucleotídicas de un fragmento de ADN de interés con alta precisión y resolución.

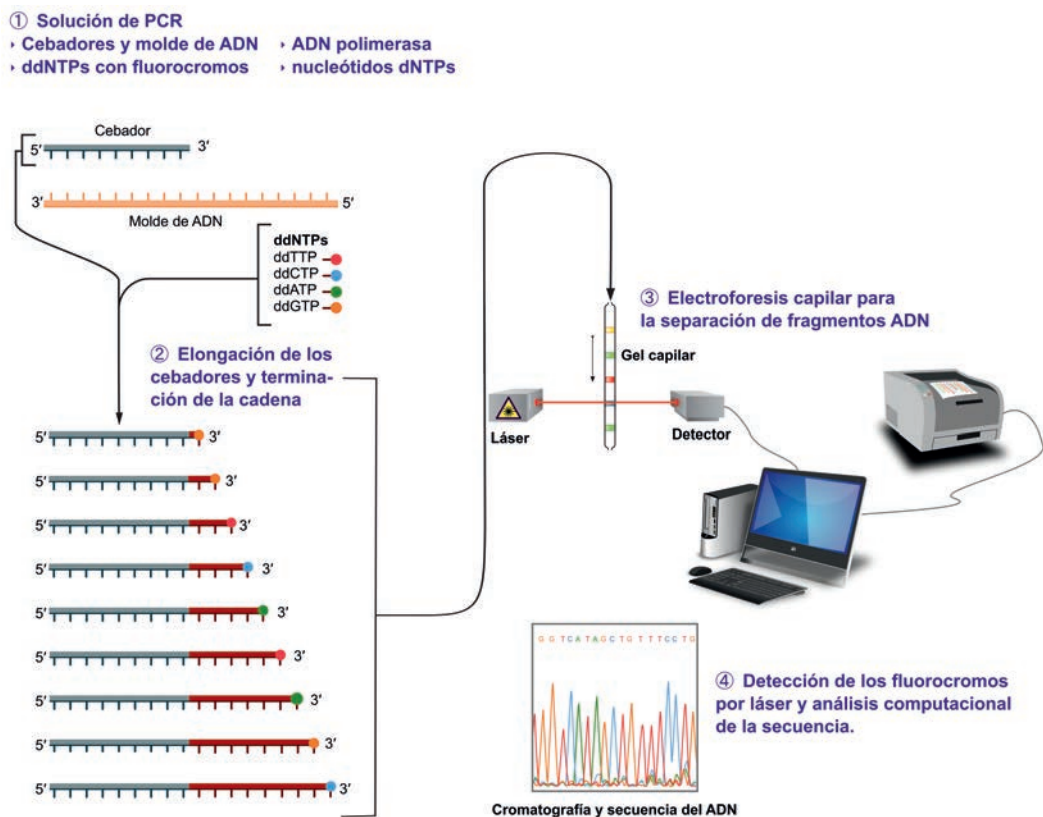


Figura 9. Diagrama del método de secuenciación de ADN por terminación de cadena o Sanger. 1) El cebador hibrida con la secuencia. 2) Se agregan reactivos al cebador y al molde de ADN (ADN polimerasa, nucleótidos dNTP y una pequeña cantidad de dideoxinucleótidos (ddNTPs) marcados con fluoróforos. 3) Los productos de PCR se separan en un gel capilar de un solo carril, donde un sistema de captación de imágenes lee las bandas resultantes. 4) Se almacenan y analizan computacionalmente los datos de las secuencias obtenidas. Imagen modificada y adaptada de <https://commons.wikimedia.org/wiki/User:Estevezj>.

Desde el año 2000 los linajes de MRSA se han definido en términos de ST (secuenciotipos), dando pie por primera vez a un lenguaje inequívoco, generalizado, común y universal para el MRSA¹³². Además, la aplicación de MLST al estudio de las poblaciones clonales ha proporcionado importantes conocimientos sobre la estructura de la población de MRSA^{32,135,142}. Por un lado, ha conseguido validar identificaciones de *S. aureus* obtenidas previamente por PFGE, y por otro, confirmar que los clones pandémicos de MRSA pertenecen principalmente a unos pocos linajes genéticos (**Figura 10**).

El principal inconveniente del MLST es su coste y el equipo necesario para su ejecución. Esto hace improbable su uso como técnica para el estudio de brotes en centros modestos y ha limitado su uso a estudios de epidemio-

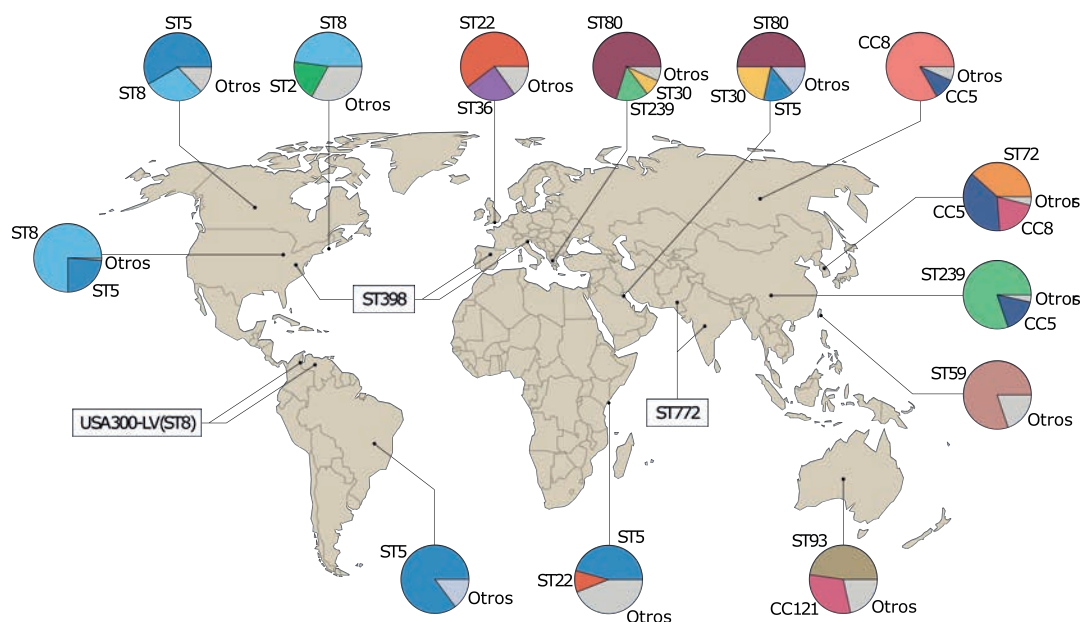


Figura 10. Distribución global de clones de MRSA. El mapa resume la distribución de las cepas principales de MRSA en cada región basándose en estudios recogidos en Turner *et al.*²⁸. ST, secuenciotipo; LV, variante latinoamericana del clon USA300.

logía global. Otro obstáculo importante para su uso generalizado es la importancia de obtener datos de secuencia de alta calidad de los siete alelos. Por último, como se ha descrito previamente, el hecho de que muchos de los clones de interés de *S. aureus* pertenezcan a unos pocos secuenciotipos limita su capacidad de resolución, siendo necesario complementar el MLST con métodos de tipado adicionales. A pesar de ello, debido a su reproducibilidad, estandarización, y facilidad de interpretación, el MLST ha sido una opción popular, que ha permitido la monitorización del MRSA a nivel mundial durante décadas^{132,143,144}.

1.6c. *spa*-typing

El poder discriminatorio de la secuenciación de la proteína A (gen *spa*), se sitúa entre el del PFGE y el del MLST^{145,146}. La secuencia de aminoácidos de la proteína A es altamente variable entre diferentes cepas. El *spa*-typing implica la amplificación del gen *spa* mediante PCR y posterior secuenciación. Los resultados se comparan con una base de datos de secuencias conocidas. Es una herramienta rentable (se centra en una única diana genética), rápida y tiene una excelente reproducibilidad. No obstante, la tipificación del gen *spa* tiene sus propios inconvenientes. El principal es que se basa en el análisis de un solo *locus*, que puede fácilmente clasificar de forma errónea a determinados *spa*-tipos debido a cambios genéticos que conduzcan a fenómenos de homoplasia. De esta forma, aun siendo una herramienta útil es poco precisa si se utiliza de forma aislada y se suele combinar con otros métodos (MLST o SCCmec)¹⁴⁷.

1.6d. SCCmec typing

En la actualidad no existe ningún método de PCR que pueda identificar fácilmente todos los tipos y subtipos de SCCmec existentes. A pesar de las muchas metodologías descritas, el principal reto sigue siendo un diseño de cebadores (*primers*) que permita englobar todos los tipos de casetes. En general, la tipificación de SCCmec mediante PCR-multiplex se limita a los tipos I a VI de SCCmec. Por lo tanto, debido al creciente número de tipos de SCCmec (incluidos los tipos VII a XIV), la identificación y clasificación del SCCmec mediante PCR es dificultosa, y en la actualidad su uso es limitado.

A pesar de ello, hay características asociadas a determinados casetes que pueden ayudar a la identificación clonal. Por ejemplo, el casete tipo XI es el único en el que no se detecta el gen *mecA* sino que contiene el gen *mecC*, asociado habitualmente a cepas LA-MRSA^{49,55}. Los casetes tipo I, II y III son de los más grandes (junto con el X y XIV), confieren resistencia a varias clases de antibióticos y se detectan habitualmente en HO-MRSA^{32,148}. Los SCC más pequeños como los tipos IV y V son frecuentemente detectados en CA-MRSA, como el USA300 o el USA400 (CC1), pero también en HO-MRSA epidémicos como el ST22-IV, ST45-IV y ST5-IV (**Figura 7**)^{32,149}.

La secuenciación del genoma completo ha contribuido a revelar la estructura completa de los elementos SCCmec que se encuentran no solo en MRSA sino también en otros *Staphylococcus*. En la actualidad se continúa actualizando la nomenclatura de SCCmec, estandarizada por el *International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome*

Elements (IWG-SCC, <http://www.sccmec.org>). Sin embargo, gracias a la aparición de nuevas herramientas bioinformáticas en línea (como el *SCCmecFinder*) asociadas al uso de WGS, se ha generalizado la tipificación del elemento *SCCmec*, así como la detección y clasificación de nuevos *SCCmec* en aislamientos de origen animal o aislamientos de otras especies de *Staphylococcus*^{85,150}.

1.6e. Secuenciación del genoma completo (WGS)

Existen varias metodologías para realizar la WGS. La secuenciación de segunda generación o NGS (*Next Generation Sequencing*) utiliza una técnica llamada "secuenciación por fragmentación" para segmentar el ADN de forma controlada y luego secuenciar los fragmentos simultáneamente (**Figura 11**). La secuenciación se puede realizar por síntesis, que es el método más habitual (Illumina, Ion Torrent) o por ligación (SOLiD), obteniendo un tamaño en las lecturas o *reads* entre 100 y 400 pares de bases (bp)¹⁵¹. Illumina es la tecnología más utilizada actualmente, debido a su larga trayectoria, el número de plataformas disponibles (NovaSeq, HiSeq, NextSeq y MiSeq) y la compatibilidad entre ellas^{152–154}. Por otro lado, existen dos tecnologías de tercera generación que permiten la secuenciación de lecturas largas: la secuenciación de una sola molécula a tiempo real (PacBio) y la secuenciación por nanoporos (Oxford Nanopore)¹⁵⁴. Las lecturas largas pueden tener un tamaño superior a 10 kb, y pueden mejorar el ensamblaje *de novo* y permitir un mapeo de los contigs más preciso^{155,156}. Sin embargo, la principal limitación de esta tecnología es la baja precisión de los *reads* (~15% de tasa de error), lo que hace que habitualmente se combinen las tecnologías de

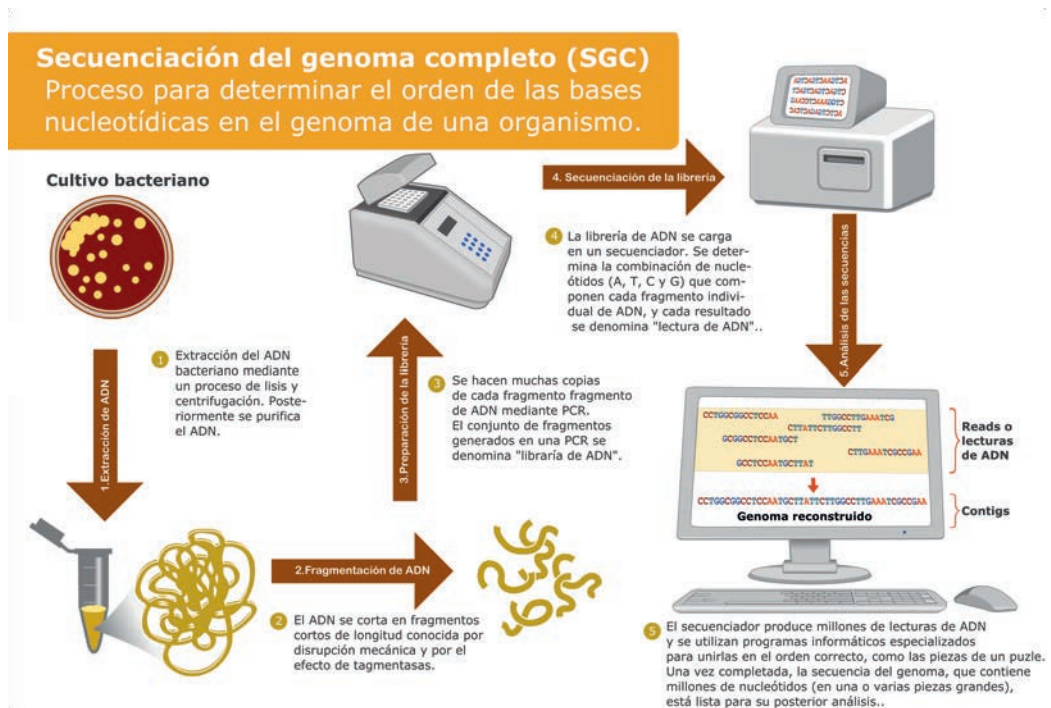


Figura 11. Diagrama del proceso de secuenciación del genoma completo. Imágenes modificadas del Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC, <https://www.cdc.gov/>).

Illumina y Nanopore para obtener datos de calidad y genomas cerrados (genomas completos, sin huecos entre las regiones ensambladas).

En los últimos años, la implementación de WGS ha permitido un estudio exhaustivo de la evolución genética de las poblaciones de MRSA¹⁴⁰, ya que permite un análisis completo de su diversidad genómica. Aunque es una técnica más costosa que la tradicional secuenciación Sanger, ofrece un gran beneficio en términos de información obtenida, ya que tiene la capacidad de generar millones de lecturas y obtener datos sobre prácticamente todo el genoma de la bacteria, siendo una herramienta extremadamente útil para fines epidemiológicos. En este sentido, la NGS también permite analizar en

profundidad el **pangenoma**: conjunto total de genes de todas las cepas de una especie o de una colección^{157,158}. El genoma de *S. aureus* tiene un tamaño aproximado de 2,8 Mbp¹⁵⁹ que contiene unos 2800 genes de promedio y se puede dividir entre un genoma central o *core*, formado por aquellos genes compartidos por los genomas de todas las cepas de la especie analizadas; y el genoma accesorio, constituido por todos aquellos genes únicos, presentes en solo algunos representantes de la selección^{157,158}. Hasta el 20% del genoma accesorio de *S. aureus* consiste en elementos genéticos móviles (MGE), que varían sustancialmente entre los distintos clones. Aunque no son imprescindibles para la bacteria, pueden conferir ventajas específicas como la adaptación a distintos nichos ecológicos, la resistencia a los antibióticos y la capacidad de colonizar nuevos hospedadores^{140,157,160}.

Con la WGS, el reto principal no es la obtención de los datos de secuenciación, sino el análisis rápido de estos mismos datos para poder extraer información relevante. Esta información debe permitir, idealmente, comparar directamente los resultados obtenidos con los métodos de tipificación tradicionales, como el PFGE y el MLST, y se debe almacenar en una base de datos de acceso público. Es necesario resaltar que, como ya se ha comentado, las lecturas de NGS pueden ser cortas (tecnología Illumina), lo que complica el ensamblaje *de novo*¹⁵⁶. Por esta razón, el término "secuencia del genoma completo" se refiere al genoma de la bacteria representado en *contigs*, segmentos de ADN superpuestos que juntos representan una región consenso, con huecos entre las regiones ensambladas.

Aunque los costes asociados a la NGS siguen disminuyendo, el flujo de trabajo sigue siendo lento y el análisis de los resultados requiere de recursos informáticos y personal entrenado por lo que su aplicación en la vigilancia clínica rutinaria se limita a unos pocos laboratorios. Por lo tanto, la disponibilidad de programas bioinformáticos que permitan un análisis rápido y sencillo de los datos es esencial para expandir el uso de la tecnología WGS en la tipificación de microorganismos y en la vigilancia epidemiológica.

Si bien en la actualidad no existe ningún método de tipificación ideal, la WGS es la herramienta con el potencial de discriminación más alto¹⁶¹, pudiendo detectar incluso diferencias de un único nucleótido^{153,162}. De hecho, los métodos basados en WGS y SNP (polimorfismo de un único nucleótido) superan a todos los métodos utilizados previamente en la clasificación, caracterización y evolución de MRSA¹³⁵. Con la reducción de costos y el avance del software bioinformático, la WGS se ha convertido en la herramienta de tipificación de referencia, al menos en los países industrializados.

1.7. Principales clones MRSA de relevancia

Alrededor del 90% de los genomas de MRSA conocidos se pueden clasificar en diez linajes con prevalencia en humanos y muchos otros linajes menores (**Tabla 7**)^{140,163}. Los más habituales en el ámbito hospitalario occidental son el CC1, CC5, CC8, CC22, CC30 y CC45^{32,84,96,134}, cada uno de ellos con una distribución geográfica diferente (**Figura 10**). También existen algunos clones exitosos de MRSA comunitario como pueden ser el CC59, CC80 y el CC239^{96,164,165}.

Durante los 10 años posteriores a la aparición oficial de MRSA (desde 1960 hasta 1970), las infecciones por MRSA en Europa, (tasas inferiores al 2%), se limitaron a brotes hospitalarios causados principalmente por el llamado clon arcaico¹⁶⁶. Esta cepa ST250 (**Figura 7, Tabla 7**), perteneciente al CC8 y portadora de SCCmec tipo I (SCCmec-I), fue sustituida por cinco linajes

Tabla 7. Clones de MRSA más habituales según su adquisición.

CC	Clon	Tipo de spa	agr	LPV	Otros nombres
Clones de MRSA de adquisición comunitaria					
1	ST1-IV/V	t125; t127; t128; t175; t273; t558; t1178; t1272; t1274; t1784; t5388	3	+/-	USA400; MW2; WA MRSA 1/45, 1/57; PFGE-1I; cMRSA; USA400 ORSA IV
	ST772-V	t345; t345; t657; t1839; t3387; t5414; t10795	2	+	Bengal Bay Clone; WA MRSA 60
5	ST5-IV/IV+ SCCfus/V/VI	t001; t002; t003; t311; t450; t1277; t2460	2	+	Peadiatric; Maltese; USA800; HDE288; Portuguese peadia- tric
8	ST8-IV	t008; t024; t064; t068; t112; t121; t451; t622; t1476	1	+/-	USA300; CMRSA10; PFGE-B; CA-MRSA/J
8/72	ST72-IV/V	t126; t148; t324; t537; t664	1	-	USA700 ORSA IV
15	ST15-IV	t084/t085	2	+	
22	ST22-IV/V	t005; t022; t032; t223; t310; t891; t1276	1	+/-	UK EMRSA-15, Barnim; PFGE- B
30	ST30-IV	t019; t021; t318; t975; t1273	3	+	Oceania Southwest Pacific; Uruguayan 6; Mexican; USA1100; Southwest Pacific; PFGE-N; HKU-100
45	ST45-IV/V	t004/t026/t040	1	-	PFGE-E USA1000; HKU200; Western Australia MRSA-9
59	ST59-IV/V/VII	t163; t172; t216; t316; t437; t528; t976; t3523	1	+/-	Asian-Pacific, PFGE-A, West- ern Australia MRSA-24
80	ST80-IV	t044; t131; t359; t376; t639; t1199; t1200; t1201; t1206	3	+/-	European; PFGE-G2; cMRSA

Tabla 7. Continuación.

CC	Clon	Tipo de spa	agr	Otros nombres
Clones de MRSA de adquisición hospitalaria				
5	ST5-I/II	t001; t002; t003; t214; t242; t311; t586; t2460	2	UK EMRSA-3; Southern German MRSA, Rhine Hesse MRSA, Cordobes/Chilean; PFGE-C; Geraldine; Pediatric; New York/Japan; USA100, CMRSA2; GISA Rhine Hesse MRSA, EMRSA-3, New York
	ST225-II	t003; t014; t151, t1282; t1623		
	ST228-I	t001; t023		Southern German MRSA, Rhine Hesse MRSA, EMRSA-3
8	ST8-II/IV Spa	t008; t064; t068; t190	1	Irish-1; UK EMRSA-2/-6/; USA500 ORSA IV, USA500 ORSA II, ST8 ORSA I, ST8 ORSA IV, ST8 ORSA III
	ST247-I ST250-I	t008; t051; t052; t054 t008		Iberian, UK EMRSA-5/-7/-17; PFGE-A; ST247 ORSA I
	ST250-I	t008; t194; t292	1/4	Archaic, ST250 ORSA I; EMRSA-8
22	ST22-III/IV/V	t022; t032; t223	1/2	UK EMRSA-10, Hannover MRSA PFGE-B
30	ST30-I	t018; t019; t037; t268; t318 t018;	3	EMRSA-16, USA200 ORSA II
	ST36-II	t018; t268		UK EMRSA-16; USA200; CMRSA4/8/9
45	ST45-II/IV	t004; t015; t026; t038; t445	1/4	USA600; CMRSA1; Berlin MRSA; USA600 ORSA II; USA600 ORSA IV
89	ST89-II	t3520	3	-
Clones de MRSA de adquisición ganadera				
1	ST1-IVa	t125; t127; t128; t1178	3	USA400
5	ST5-IV	t002; t003; t311, t099; t100; t193; t411; t464, t526, t587	2	PFGE-I
9	ST9-III/IV/V/XII/IV+XII	t800; t899; t1334, t1430; t2315; t2700; t3446; t4132; t4358; t4794; t13493;	2	GER-MRSA-ST9, CHN-MRSA-ST9
398	ST398-IV/V/VII	t011; t034; t571; t1197; t1250; t1255; t1451; t1456; t1928; t2510	1	LA-MRSA CC398, GER-MRSA-ST398, CHN-MRSA-ST398

Tabla adaptada de Mlynarczyk-Bonikowska⁸⁴. CC, complejo clonal; MLST, *multilocus sequence typing*; ST, secuenciotipo; ST-SCCmec; Spa, proteína A de *S. aureus*; Agr, gen accesorio regulador; LPV, leucocidina de Pantón-Valentine; +/-, algunas variantes son productoras de LPV.

principales de MRSA en la década de 1980¹⁶⁷. Aunque los factores que hacen que un clon de MRSA sea epidémico en el ámbito sanitario se desconocen, la resistencia a antibióticos usados habitualmente parece tener un papel relevante, como se ha demostrado con las fluoroquinolonas^{140,166}.

El primer clon que sustituyó en relevancia epidemiológica al ST250-I, fue el ST247-I (clon Ibérico), también perteneciente al CC8. Este clon fue detectado por primera vez en Dinamarca en 1964 y fue causante de un gran número de brotes hospitalarios en los 1990s en Europa^{23,32,112,168}. En España, este clon ST247-I fue sustituido durante la primera década del 2000^{50,169} por cepas del CC5^{23,106,168,170,171}, que engloba varios ST estrechamente relacionados con el ST5, el ST125 y ST146. Más recientemente, cepas de otros complejos clonales como el CC22 (EMRSA-15) y del CC8 no relacionados con el clon Ibérico, ST8, con *SCCmec*-IV y perfiles de resistencia más sensibles a antibióticos han aumentado de forma progresiva^{32,134,164,172–174}.

Con respecto a los clones CA-MRSA, se corresponden a cepas de MRSA que han evolucionado independientemente de los clones de MRSA hospitalarios. En su mayoría son portadores de *SCCmec* de clase IV, más pequeños y potencialmente más móviles¹⁷⁵, y también del bacteriófago que codifica *PV-lukSF*^{176,177}. En Estados Unidos son la mayor causa de infección de piel y partes blandas desde el 2000, debido sobre todo al clon CA-MRSA USA300¹⁷⁸. Si bien los brotes causados por CA-MRSA se han descrito en entornos específicos asociados a contacto estrecho (escuelas, equipos deportivos, centros penitenciarios, etc), estos pacientes también pueden acabar ingresados en el hospital por lo que las cepas CA-MRSA tienen el potencial

de acabar siendo importantes también en los hospitales. Como ejemplos de esta situación cabe citar el clon CC8 USA300 en América, el CC80 en Europa o el CC59 en Asia^{32,140,179}. Normalmente estas cepas CA-MRSA suelen ser más virulentas, en parte debido a la presencia del bacteriófago que codifica para la LPV^{17,142}.

El clon epidémico USA300 es uno de los clones CA-MRSA que se ha estudiado con más detalle. Este clon, originalmente típico de Norte América (USA300-NAE), es portador del elemento móvil catabólico de arginina (AC-ME) cuyo origen viene de la transferencia horizontal desde *S. epidermidis*^{176,180,181}. Este MGE consiste en una isla genética de grupos de genes que confieren una mayor habilidad a *S. aureus* de colonizar la piel, como el operón *arc* (sistema de arginina-deiminasa) y el grupo *opp-3* (transportador ABC). La adquisición de este elemento móvil puede potenciar la invasión bacteriana mediante la disrupción de la barrera dérmica y la formación de biofilm (el gen regulador *speG*). Se ha descrito que el éxito en la diseminación y virulencia del USA300 en el entorno comunitario de Estados Unidos tiene relación con la presencia de ACME en su genoma, pero los resultados no son concluyentes^{18,181,182}.

Paralelamente, en Sudamérica, un clon CA-MRSA epidémico se identificó desde 2005 como el clon comunitario más prevalente, el USA300 variante latinoamericana o sudamericana, llamado también USA300-LV o USA300-SAE¹⁴⁹. Estas cepas llevan otro elemento móvil denominado COMER (elemento móvil de resistencia a cobre y mercurio) que parece sustituir al ACME de los USA300-NAE¹⁸³. Esta resistencia al cobre puede estar también

presente en algunos tipos de elemento ACME y parece aumentar la supervivencia de estas cepas a las partículas de cobre de los macrófagos^{181,183}.



INTERÉS DEL ESTUDIO Y OBJETIVOS

*"La meta no es ser exitoso,
sino ser útil" - Albert Einstein*

II. Interés del estudio y objetivos

Uno de los problemas de salud de más relevancia a nivel global es el de las infecciones por bacterias resistentes a los antibióticos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) junto al Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) consideran a los patógenos resistentes a los antibióticos como una de las amenazas inminentes para la salud humana¹¹³. Según el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades Europeo (ECDC), cada año se producen 33.000 muertes en la Unión Europea debido a infecciones por bacterias resistentes a antibióticos adquiridas en el ambiente hospitalario y comunitario, representando un coste directo e indirecto estimado de más de 1.500 millones de dólares anuales^{113,184}. Algunas bacterias han adquirido resistencia a la mayoría de los antibióticos disponibles, complicando así el tratamiento de las infecciones que ocasionan. Además, el uso inadecuado de antibióticos de amplio espectro viene a veces dado por la falta de métodos de diagnóstico rápidos para identificar genes de resistencia antibiótica¹⁸⁵. Esto justificaría una vigilancia a nivel global para controlar la expansión de estas bacterias, así como la investigación sobre los mecanismos subyacentes a la resistencia a los antimicrobianos y a la patogénesis.

El listado de microorganismos llamado ESKAPE^{186,187} (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp), recoge las especies patógenas de más relevancia por su potencial de presentar resistencia a múltiples antibióticos¹¹³. En ese sentido, *S. aureus* destaca por la adquisición de

mecanismos de resistencia a casi todos los antibióticos empleados para su tratamiento, como los β -lactámicos, los glicopéptidos y las oxazolidinonas⁸⁴. MRSA a su vez, es uno de los patógenos resistentes más relevante, con una amplia distribución y asociado a infecciones hospitalarias, comunitarias e incluso ganaderas. También destaca su gran plasticidad genética, que le permite adaptarse a condiciones ambientales diversas, su capacidad patogénica y la frecuente combinación de resistencias a otros grupos de antibióticos¹²⁴.

A pesar de que los porcentajes de MRSA tienden a disminuir en Europa desde hace unos años, la infección por este microorganismo sigue siendo una causa importante de bacteriemia, asociada a elevada morbilidad y mortalidad, y con peor pronóstico que los procesos infecciosos causados por MSSA^{20,45,184}. Concretamente en España, según datos del ECDC, el porcentaje de resistencia a meticilina entre los aislados de *S. aureus* en 2021 fue del 24,2%¹⁸⁸.

La mayoría de infecciones por MRSA, tanto de origen hospitalario como de origen comunitario, están causadas por cepas pertenecientes a un número limitado de linajes genéticos⁸⁴. En los últimos 30 años hemos detectado varios reemplazamientos clonales en el ámbito hospitalario, como el que ocurrió a finales de los 90 con la sustitución gradual del clon Ibérico (CC8, ST247) por cepas pertenecientes al CC5. Incluso clones como el USA300 o el LA-MRSA CC398 de origen típicamente comunitario han sido descritos causando infecciones en pacientes ingresados en hospitales. Por el contrario,

también se han descrito linajes genéticos típicamente hospitalarios como causa de infección en la comunidad.

La accesibilidad durante la última década a técnicas de secuenciación del genoma completo de los microorganismos y la disminución de su coste económico, han cambiado la perspectiva de los estudios epidemiológicos y de la tipificación molecular^{153,189}. Esta tecnología ofrece la posibilidad de analizar genomas completos con un nivel de discriminación de unos pocos nucleótidos y establecer relaciones genéticas con una precisión inalcanzable por técnicas moleculares clásicas. Con una única técnica, se puede obtener una gran cantidad de información para el estudio de genes relacionados con la resistencia antibiótica, la producción de toxinas, la adherencia bacteriana y estudios de elementos móviles y fijos.

Por ello, esta tesis doctoral pretende analizar la epidemiología de las infecciones por MRSA y las características clínicas de la infección bacteriémica; la dinámica poblacional de los clones de MRSA y su evolución en el tiempo y, por último, la base molecular de la resistencia a los antibióticos en MRSA, mediante la incorporación de tecnologías de secuenciación del genoma completo.

OBJETIVO 1.- Analizar las características clínicas y microbiológicas de las infecciones bacteriémicas causadas por *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) en el Hospital de Bellvitge (1990-2019)* y en otros hospitales españoles (2014-2018):

- 1.1. Describir la incidencia de la infección y las características clínicas de los episodios de bacteriemia.
- 1.2. Estudiar la diversidad clonal de las cepas de MRSA.
- 1.3. Describir los perfiles de resistencia antibiótica asociados a cada grupo clonal y analizar las bases moleculares de la resistencia.

OBJETIVO 2.- Estudiar las características microbiológicas de los aislamientos de MRSA que causan infección en pacientes atendidos en centros de asistencia primaria:

- 2.1. Analizar la diversidad clonal de los aislamientos clínicos.
- 2.2. Determinar el origen de la adquisición de la infección por MRSA.
- 2.3. Estudiar la sensibilidad antibiótica y la presencia de los genes codificantes para la leucocidina de Panton-Valentine.

OBJETIVO 3.- Estudiar la sensibilidad antibiótica de los distintos clones de MRSA a distintos antibióticos antiestafilocócicos y su actividad combinada *in vitro*.

- 3.1. Determinar la concentración mínima inhibitoria de daptomicina, ceftarolina y fosfomicina frente a diferentes clones de MRSA.
- 3.2. Evaluar la actividad *in vitro* de la combinación de ceftarolina con daptomicina o con fosfomicina.

* Objetivo correspondiente al artículo publicado (**anexo 1**).



MATERIALES Y MÉTODOS

*"Nuestra recompensa se encuentra
en el esfuerzo y no en el resultado"*
-Ghandi

III. Materiales y métodos

3.1. Contexto, muestras del estudio y definiciones

Para la elaboración de esta tesis se estudiaron tres colecciones distintas de MRSA:

Colección 1. Se incluyeron 819 episodios de bacteriemia por MRSA en pacientes admitidos en el Hospital de Bellvitge (HUB) entre 1990 y 2019 (**objetivo 1**), de los cuales se recuperaron datos clínicos de 784 de los episodios y 702 aislados de MRSA. El HUB es un hospital terciario para pacientes adultos, con más de 700 camas y localizado en el Área Metropolitana de Barcelona. Para este estudio, se consideró únicamente el primer aislamiento de cada paciente por año. Los datos demográficos y clínicos de los pacientes, incluyendo la edad, sexo, adquisición de la bacteriemia, foco de infección, y la mortalidad a 30 días fueron recogidos prospectivamente en una base de datos. Se calculó el índice de comorbilidad de Charlson (ICC) en todos los episodios con datos clínicos. Complementariamente, 20 aislados fueron seleccionados y analizados para el **objetivo 3**.

Colección 2. Colección de 155 aislamientos de MRSA causantes de bacteriemia en pacientes ingresados en 18 hospitales españoles participantes en un estudio clínico multicéntrico aleatorio de fase 3 (**Tabla 8**)⁶⁶. Las muestras fueron recogidas en cada centro y enviadas al HUB prospectivamente entre enero de 2014 y enero de 2018 (**objetivo 1**). Este estudio multicéntrico fue diseñado para comparar el tratamiento de la bacteriemia por MRSA con daptomicina más fosfomicina y con daptomicina en monoterapia. Se incluye-

ron para el estudio a los pacientes adultos con bacteriemia por MRSA con 1 ó más hemocultivos positivos y con síntomas y signos de infección. Los datos de sensibilidad antibiótica fueron adjuntados con el envío de la cepa por parte de cada centro a nuestro laboratorio y recomprobados por microdilución.

Tabla 8. Hospitales participantes en el estudio multicéntrico BACSARM⁶⁶ y número de muestras recogidas por cada centro.

Centros hospitalarios participantes	Provincia, CC.AA.	Nº de muestras
Hospital Universitario Lucus Augusti (HLA)	Lugo, Galicia	12
Hospital Universitario Gregorio Marañón (HGM)	CC.AA. de Madrid	4
Hospital Universitario Ramón y Cajal (HRC)	CC.AA. de Madrid	10
Hospital Universitario 12 de octubre (HDO)	CC.AA. de Madrid	9
Hospital Universitario de Cruces (HC)	Bizkaia, País Vasco	11
Hospital Universitario Virgen de las Nieves (HVN)	Granada, Andalucía	3
Hospital Universitario Virgen de la Macarena (HVM)	Sevilla, Andalucía	4
Hospital Universitari Son Espases (HSE)	Islas Baleares	3
Hospital Universitari Joan XXIII (HJXXIII)	Tarragona, Cataluña	6
Hospital Universitari Arnau de Vilanova (HAV)	Lleida, Cataluña	5
Hospital Universitari Mútua Terrassa (HMT)	Barcelona, Cataluña	9
Hospital de Terrassa (HTB)	Barcelona, Cataluña	4
Hospital Universitari Parc Taulí (HPT)	Barcelona, Cataluña	8
Hospital del Mar (HMB)	Barcelona, Cataluña	8
Hospital Vall d'Hebrón (HVH)	Barcelona, Cataluña	12
Hospital Santa Creu i Sant Pau (HSP)	Barcelona, Cataluña	8
Hospital Clínic de Barcelona (HCB)	Barcelona, Cataluña	8
Hospital Universitari de Bellvitge (HUB)	Barcelona, Cataluña	31

CC.AA., comunidad autónoma

Colección 3. Colección de 216 aislamientos de MRSA procedentes de muestras clínicas de pacientes atendidos en centros de atención primaria (**objetivo 2**). Se recogieron de forma prospectiva todos los aislamientos de MRSA obtenidos en el Laboratori Clínic de l'Hospitalet, que proceden de pa-

cientes atendidos en 60 centros de atención primaria (área Metropolitana Sur de Barcelona) durante el año 2018. Se consideró sólo el primer aislamiento de cada paciente. Los datos clínicos y demográficos de los pacientes se recogieron de forma prospectiva, incluyendo el sexo, edad, ingreso hospitalario reciente, residencia temporal o permanente en un centro para pacientes crónicos o geriátricos, tratamiento antibiótico reciente, origen de la infección y la adquisición de ésta.

Definiciones: Un episodio de bacteriemia causada por MRSA se consideró como uno o más hemocultivos positivos para MRSA en pacientes con signos y síntomas compatibles con infección. Únicamente el primer episodio por paciente y año fue considerado. Los episodios de infecciones bacteriémicas se clasificaron en tres categorías según el inicio de la infección: bacteriemia con inicio hospitalario asociado al ambiente sanitario (*hospital-onset healthcare-associated*, HO-HCA), con inicio en la comunidad asociado al ambiente sanitario (*community-onset healthcare-related*, CO-HCA) o asociado a la comunidad (*community-acquired*, CA); de acuerdo a los criterios de Friedman *et al.*¹⁹⁰ y siguiendo la terminología utilizada en la literatura reciente sobre bacteriemias por MRSA¹⁹⁰. Resumiendo, los episodios ocurridos ≥ 48 horas después de la hospitalización y sin signos ni síntomas de infección en el momento de admisión se consideraron HO-HCA. Los episodios que ocurrieron dentro de las primeras 48h de admisión se consideraron CO-HCA o CA, dependiendo de si el paciente había tenido contacto con el sistema sanitario o no, respectivamente.

3.2. Aislamiento e identificación microbiológica

Todos los aislamientos se identificaron como *S. aureus* y criopreservaron en TSB (caldo de triptona y soja) con 15% de glicerol, a -80°C. Los aislamientos de la **colección 1** procedentes de muestras clínicas de hemocultivos entre 1990 y 2012 fueron identificados mediante métodos convencionales: test de aglutinación específica, crecimiento en agar manitol hipersalino, producción de DNasa y de coagulasa.

Las **colecciones 1** (retrospectiva y prospectivamente a partir de 2012), **2** y **3** se identificaron mediante espectrometría de masas, MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight*, Bruker). Para ello se descongelaron y cultivaron las muestras clínicas en placas de agar Columbia y se incubaron a 37°C durante 18-24h. Una o dos colonias del medio de agar se transfirieron de manera aséptica a una placa metálica de 96 pocillos. Se añadió una solución matriz (ácido α -ciano-4-hidroxicinámico) que ayuda a ionizar las proteínas bacterianas. Tras secarse la matriz en la placa, ésta se colocó en el espectrómetro de masas MALDI-TOF, equipado con un láser de 337nm. Se obtuvo un espectro de las proteínas bacterianas en función de su masa-carga, permitiendo la identificación de las bacterias al comparar los resultados obtenidos con una base de datos de espectros bacterianos conocidos.

3.3. Estudio de la sensibilidad antibiótica

3.3a. Técnica de antibiograma por disco-difusión

El antibiograma por disco-difusión (DD), disco-placa o test de Kirby-Bauer consiste en la dispensación de discos de papel impregnados con una cantidad determinada de los diferentes antibióticos a examinar, en la superficie de una placa de Petri con agar Müller-Hinton (MH). El medio MH no es selectivo ni diferencial, permite la difusión de los antibióticos por su baja proporción de agar y contiene almidón que evita que las toxinas que puedan liberar las bacterias interfieran con los antibióticos. Previamente se inocula la placa MH con *S. aureus* a una concentración 0,5 en la escala de turbidez McFarland (equivalente a una densidad celular de 1.5×10^8 ufc/ml). Para ello se cogen varias colonias con un asa, se disuelven en suero fisiológico o TSB, se agita con un agitador vórtex durante 20 segundos y se ajusta el inóculo mediante la lectura en un turbidímetro. Al entrar en contacto el disco impregnado de antibiótico con el agar, el compuesto difunde por el agar de una manera radial (por la forma del disco) y creando un gradiente de concentración.

Transcurridas 24h a 37°C de incubación, se observan las zonas de inhibición de crecimiento alrededor de cada disco. Tras medir el diámetro en milímetros de la zona de inhibición para cada disco con un pie de rey o con el sistema automatizado ADAGIO (Bio-rad, **Figura 12**), se compara esta lectura con las guías estandarizadas internacionales para el estudio de la sensibilidad antibiótica: CLSI (Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio)¹⁹¹ y EUCAST (Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana)¹⁹² (**Tabla 9**). En caso de aparecer colonias dentro de la zona de inhibición, se volvieron a



Figura 12. Sistema ADAGIO™ (Bio-Rad) es un dispositivo de imágenes automatizado que sirve para leer e interpretar automáticamente los resultados de los antibiogramas por disco-difusión (*derecha*). Tanto la interpretación de los resultados como los discos siguen las pautas y recomendaciones de EUCAST y/o CLSI. Imagen obtenida y modificada de <http://bio-rad.com>.

identificar las colonias y a realizar el ensayo de sensibilidad antimicrobiana para descartar cultivos mixtos o contaminaciones.

Tabla 9. Zonas de diámetro de inhibición y puntos de corte de CMI para *S. aureus*.

Antimicrobiano	Diámetro inhibición (mm)		Puntos de corte de CMI (mg/L)	
	S ≥	R <	S ≤	R >
Ácido fusídico	24 / 24	24 / -	1 / -	1 / -
Cefoxitina	22	22	>4 equivale a MRSA	
Ciprofloxacino	50 / 21	21 / 15	0,001 / 1	1 / 2-4
Clindamicina	22 / 21	22 / 14*	0,25 / 0,5	0.25 / 2-4
Cloranfenicol	18 / 18	18 / 12	8 / 8	8 / 16-32
Cotrimoxazol**	17 / 16	14 / 10	2/38 / 2/38	4/76 / 4/76
Eritromicina	21 / 23	18 / 13	1 / 0,5	2 / 8
Fosfomicina	No aplicable		32 / -	32 / -
Gentamicina	18 / 15	18 / 12	2 / 4	2 / 8-16
Linezolid	21 / 21	21 / 20	4 / 4	4 / 8
Oxacilina	20	20	NA	NA
Penicilina	26 / 29	26 / 28	0,125 / 0,12	0,125 / 0,25
Rifampicina	26 / 20	26 / 16	0,06 / 1	0,06/4
Teicoplanina	No aplicable		2 / 8	2 / 16-32
Tetraciclina	22 / 19	19 / 14	1 / 4	2 / 8-16
Tobramicina	18 / -	18 / -	2 / -	2 / -
Vancomicina	No aplicable		2 / 2	2 / 16
Ceftarolina	20 / 25	17 / 24	1 / 1	2 / 8
Daptomicina	No aplicable		1 / 1	1 / -

Valores correspondientes a las guías EUCAST (izquierda) y a CLSI (derecha)^{191,192}.

*Resistencia inducida a clindamicina puede ser detectada por la actividad antagonista de agentes macrólidos como la eritromicina. Toda cepa resistente a oxacilina se reporta como resistente a penicilina y meticilina. S, sensibilidad; R, resistencia; CMI, concentración mínima inhibitoria; cotrimoxazol, trimetoprim-sulfametoxazol.

Para las **colecciones 1, y 3** se estudiaron por DD la sensibilidad (S) o resistencia (R) a: ácido fusídico (FUS), cefoxitina (FOX), ciprofloxacino (CIP), clindamicina (CLI), cloranfenicol (CLO), cotrimoxazol (SXT), eritromicina (ERI), fosfomicina (FOS), gentamicina (GEN), linezolid (LZD), mupirocina (MUP), oxacilina (OXA), penicilina (PEN), rifampicina (RIF), teicoplanina (TEI), tetraciclina (TET), tobramicina (TOB) y vancomicina (VAN). En el caso de la **colección 1**, se realizó de manera rutinaria en el Servicio de Microbiología del HUB. Para la **colección 2**, se estudiaron por DD la sensibilidad a CLO y TOB.

3.3b. Técnica de antibiograma por microdilución

El estudio de la resistencia antibiótica en *S. aureus* se realizó mediante el método de microdilución utilizando dos sistemas diferentes: MicroScan (Beckman Coulter) y Sensititre (Thermofisher).

El sistema MicroScan se utiliza rutinariamente en el Servicio de Microbiología del HUB y combina pruebas enzimáticas y bioquímicas para la identificación bacteriana, junto con una serie de diluciones de antibióticos para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de cada uno de ellos. En cambio, el sistema Sensititre solo determina la CMI de una serie de antibióticos mediante el panel ESTENF2 (Sensititre, Izasa), en el caso de *S. aureus*. Ambos sistemas dispensan en sus respectivos paneles una suspensión ajustada de microorganismo a 0.5 McFarland, de manera automatizada. Los paneles se dejan 18h a 37°C.

La CMI en este caso se define como la menor concentración capaz de inhibir el crecimiento visible de bacterias. Para evaluar el crecimiento bacte-

riano en cada una de las diluciones de antimicrobiano, se utilizó el sistema de lectura automatizado MicroScan para los paneles de MicroScan y lectura visual para los paneles de Sensititre. La lectura se realizó a las 18 horas de incubación a 37°C.

Los antibióticos testados por microdilución (Sensititre) para la **colección 2** (y las muestras de la **colección 1** seleccionadas para WGS, y para el **objetivo 3**) fueron: FOX, ceftarolina (CTL), CIP, CLI, CLO, SXT, DAP, ERI, FOS, GEN, LZD, MUP, OXA, PEN, RIF, TEI, TET y VAN.

3.3c. Estudio de la actividad *in vitro* de antibióticos en combinación

Para determinar la actividad de ceftarolina con daptomicina y en paralelo, también de ceftarolina con fosfomicina (**objetivo 3**), se utilizó la técnica de superposición (*overlapping*) de tiras de gradiente (E-test) para cada una de las cepas de MRSA seleccionadas ($n = 20$). En todos los casos se realizó por duplicado para asegurar la lectura correcta de las CMI.

Antibiograma por E-test: Como en el método de disco-difusión, para el método de E-test se aplicó un inóculo de *S. aureus* en TSB equivalente a una turbidez 0.5 McFarland sobre la superficie de una placa de agar MH. Una vez inoculada la placa, se secó el exceso de líquido y se dejó a temperatura ambiente hasta que la superficie del agar estuviera seca. Se colocaron dos tiras de E-test sobre la superficie del agar para el antibiótico A (ceftarolina) y dos tiras del antibiótico B (daptomicina o fosfomicina) como indica la **figura 13**. Estas tiras de E-test de papel incorporan un gradiente marcado de concentra-

ción del antimicrobiano, normalmente equivalente a 15 diluciones marcadas en la tira por serigrafía, que difunde por el agar.

Se dejaron difundir los antibióticos por el agar inoculado durante 1 hora a temperatura ambiente. Se marcó la disposición de las tiras inferiores con rotulador en el reverso de la placa y se retiraron con la ayuda de un bisturí. Seguidamente, se colocó una tira del antibiótico A en la huella que dejó en el agar el antibiótico B y una tira del antibiótico B en la huella del antibiótico A; teniendo cuidado de que coincidieran en una proporción 1:1. Se dejaron incubar las placas a 37°C durante 18 horas.

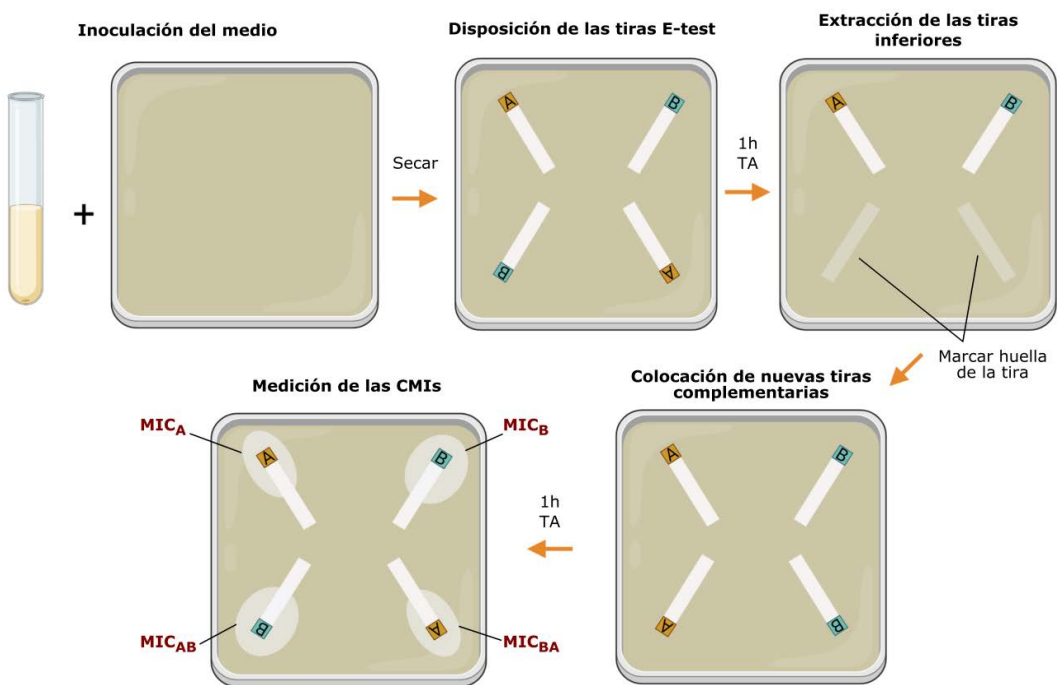


Figura 13. Descripción gráfica del método de solapamiento de tiras E-test para la determinación de sinergias antibióticas. Antibiótico A, ceftarolina; antibiótico B, daptomicina o fosfomicina; TA, temperatura ambiente; CMI, concentración mínima inhibitoria; MIC_A , CMI del antibiótico A en solitario; MIC_B , CMI del antibiótico B en solitario; MIC_{AB} , CMI del antibiótico A en presencia del antibiótico B; MIC_{BA} , CMI del antibiótico B en presencia del antibiótico A. Figura realizada con www.biorender.com.

Lectura de la proporción CMI:CMI¹⁹³: Tras la incubación se observó la aparición de una zona de inhibición elipsoidal en el agar. El punto en que el extremo de la zona de inhibición coincide con una graduación de la tira, es el que marca el valor de CMI por este método. Se determinaron las CMIs de ceftarolina, daptomicina y fosfomicina mediante la lectura de los E-test superiores y para cada una de las combinaciones de los antibióticos por la lectura de los E-test inferiores. Una vez conocidos estos valores, se calculó el índice de la concentración inhibitoria fraccional (ICIF) y se interpretó el tipo de respuesta que da cada combinación:

Cálculo del índice CIF: $ICIF = (CMI^{AB}/CMI^A) + (CMI^{BA}/CMI^B)$,

(las siglas están definidas en el pie de la **figura 13**).

Interpretación: Según el resultado del cálculo del ICIF se puede obtener uno de estos efectos:

- **Efecto sinérgico.** $ICIF \leq 0,5$. Interacción positiva en la que la suma de la actividad de los antibióticos es significativamente mayor que la actividad esperada para cada uno por separado.
- **Efecto aditivo:** $ICIF > 0,5$ y ≤ 1 . Los efectos de cada antibiótico se suman sin estar potenciados entre ellos.
- **Efecto indiferente:** $ICIF > 1$ y ≤ 4 . Ausencia de interacción.
- **Efecto antagonista:** $ICIF > 4$. El efecto de la combinación es significativamente menor que el efecto de cada compuesto por separado.

3.4. Técnicas de tipado molecular

3.4a. Detección de la leucocidina de Panton-Valentine (LPV) y estudio del polimorfismo del locus *agr* (*accessory gene regulator*)

Para detectar la presencia de LPV y el polimorfismo (tipo 1 a 4) del gen *agr* en muestras clínicas de MRSA, se utilizó la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa). El procedimiento general consiste en extraer el ADN de colonias de MRSA seleccionadas utilizando uno de estos dos métodos:

- A) Método de lisis: resuspender varias colonias en 100 µl de tampón ST (compuesto de 6mM Tris-HCl (pH 8), 1 M NaCl, 0.1 M EDTA (pH 8), 0.2% Desoxicolato sódico, 0.5% N-laurilsarcosinato sódico) y lisozima (1 µg/ml) durante 60 minutos a 37°C y 5 minutos a 95°C. A continuación, diluir 5 microlitros del lisado bacteriano en 495 microlitros de tampón TE (compuesto de 10mM Tris-HCl (pH 8), 1mM EDTA (pH 8)).
- B) Fundir durante 15 minutos a 70°C un disco de agarosa con ADN preparado según el protocolo descrito en el apartado **3.4b**.

Tabla 10. Condiciones de la amplificación de *lukFS* y polimorfismos de *agr*¹³⁹.

Fases de la PCR		lukFS		Agr I-IV	
Desnaturalización inicial		12' 95°C		9' 15" 95°C	
Desnaturalización		45" 95°C	x30	45" 95°C	x35
Hibridación	Ciclos	45" 55°C		1' 53°C	
Elongación		1' 72°C		1' 65°C	
Extensión final		2' 72°C		10' 65°C	

Tras la extracción, se lleva a cabo la PCR con los cebadores específicos (Tabla 10) de *lukS* y *lukF* o diferentes alelos de *agr*. La muestra de ADN se combina con los cebadores, la ADN *MyTaq* polimerasa, nucleótidos de

ADN, MgCl₂, agua libre de ADN y tampón específico (MyTaq). Las condiciones de la PCR siguieron las recomendaciones del protocolo de PCR pertinente y descrito en referencias previas^{139,194}, que incluyen el número de ciclos, las temperaturas y tiempos de las etapas de desnaturalización, hibridación y extensión del ADN (**Tabla 11**). La PCR se realiza en un termociclador que permite controlar la temperatura y el tiempo de cada etapa del procedimiento:

Tabla 11. Cebadores utilizados para la amplificación de *lukFS* y polimorfismos de *agr*^{139,194}.

Gen	Cebador	Secuencia (5' – 3')	Tamaño (bp)
<i>lukFS</i> -PV	luk-PV-1	ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA	433
	luk-PV-2	GCATCAAATGTATTGGATAGCAAAAGC	
<i>agr</i>	agr-1	ATGCACATGGTGACATGC	-
<i>agr-1</i>	agr1-2	GTCACAAGTACTATAAGCTGCGAT	439
<i>agr-2</i>	agr2-2	TATTACTAATTGAAAAGTGCCATAGC	572
<i>agr-3</i>	agr3-2	GTAATGTAATAGCTTGTATAATAATACCCAG	321
<i>agr-4</i>	agr4-2	CGATAATGCCGTAATACCCG	657

Una vez finalizada la PCR, se analiza el ADN amplificado en un gel de agarosa (Ecogen) al 1%, y las moléculas amplificadas se separan por tamaño mediante electroforesis (1h, 5V/cm). Para visualizar si hay banda de ADN, se tiñe el gel con SYBRsafe (ThermoFisher), que se une de forma específica al ADN, y se visualiza en un transiluminador con luz UV.

3.4b. Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE)

Se caracterizaron todas las cepas disponibles de las **colecciones 1** ($n = 702$), **2** ($n = 155$) y **3** ($n = 216$).

Extracción del ADN cromosómico: Primeramente, se realiza una suspensión bacteriana homogénea con colonias de cultivo de MRSA reciente en agar sangre (37°C, 18-24h) en 200 µl de tampón PIV [Tris-HCl 0.01M (pH 8); NaCl 1M]. Se mide la turbidez de la suspensión mediante un turbidímetro y se ajusta entre 0.6-0.7 UNT (unidades nefelométricas de turbidez). La suspensión obtenida se mezcla a partes iguales (150 µl – 150 µl) en tampón PIV con una suspensión de agarosa de bajo punto de fusión al 1.5% previamente fundida con ayuda de un termobloque a 75°C).

Se dispensan sobre un soporte de plástico (previamente esterilizado con alcohol 70%) envuelto en Parafilm (**Figura 14**), gotas de 20 µl de la mezcla de células bacterianas con agarosa. Las gotas se colocan suficientemente separadas para que no se unan entre ellas. Sobre las gotas se coloca un portaobjetos, haciendo que al solidificarse estas gotas queden en forma de discos. Los discos de cada muestra se incuban posteriormente a 37°C durante 5h en tubos de 5 ml con una solución de lisis compuesta por 1ml de tampón



Figura 14. A la izquierda se pueden observar los soportes donde se prepararán los discos de ADN-agarosa. Al centro, se observan los discos solidificados y a la derecha, los pasos de lavado de los discos con TE. Fotografía realizadas en el Servicio de Microbiología del Hospital de Bellvitge.

ST [6mM Tris-HCl (pH 8); 1M NaCl; 0.1M EDTA (pH 8)] con 50µl de Bridj [0.5% Bridj-58], 50 µl de RNAsa [50 µg/ml], 2 µl de lisozima [100 µg/ml] y lisostafina [50 µg/ml]. A continuación, los discos de agarosa se tratan durante un mínimo de 18h a 50°C bañados en 1ml de solución ES [EDTA 0.5M pH 9 y N-laurilsarcosinato sódico 1%] con proteinasa-K [1mg/ml]. Finalmente se decanta la solución de lisis y se lavan los discos en intervalos de 30 minutos con agitación orbital suave, un mínimo de 4 ocasiones, en 2-3 ml de tampón TE [Tris-HCl 10mM con EDTA 1mM]. Los discos se conservan a 4°C.

Digestión del ADN y PFGE: Se añade un disco de agarosa con ADN de *S. aureus* a un tubo Eppendorf de 1.5 ml con 40 µl de solución de restricción [2 µl de la enzima de restricción *Sma*I (20 Unidades, New England-Biolabs), 4 µl de tampón y 35.5 µl de agua libre de ADN]. Se incuban los tubos Eppendorf a 37°C entre 6 y 18h usando un termobloque. Se añade un disco en cada una de las puntas de un peine que formará los pocillos en el gel, además de un disco de marcador de peso molecular. Se coloca el peine con los discos en un molde y se vierte la mezcla para un gel de agarosa al 1% (1 gr) en 7.5 ml de tampón TBE 10X [0.5mM Tris-borato, 0.2mM EDTA (pH 8.5) y agua destilada] y 142.5 ml de agua destilada. Cuando el gel se ha solidificado se retira el peine y se introduce el gen en el aparato CHEF-DR II (Bio-Rad) con 2L de tampón TBE 0.5X (100 ml de TBE 10X con 1900 ml de agua destilada). Las condiciones para la electroforesis fueron: 18h a 14°C, con pulsos distribuidos linealmente de 1 a 30 segundos y un voltaje constante de 6 V/cm en un ángulo de 120°. Transcurridas las 18h, se tiñe el gel con una solución

de bromuro de etidio (0.5 µg/ml) durante 30min y se fotografía con la ayuda de un transiluminador de luz UV.

Para los genomas de MRSA que no se digirieron con *SmaI*, se utilizó la enzima de restricción *ApaI* (en casos de cepas de CC1 y CC398).

Interpretación de los patrones de bandas: siguiendo los criterios establecidos por Tenover *et al.*¹³⁰ y actualizados por van Belkum *et al.*¹³¹, se consideraron pulsotipos distintos a aquellos patrones que presentaban hasta tres bandas de diferencia. A cada patrón se le asignó una letra (A, B, C, D...), seguido de un número (A1, A2, A3...). Se asignaron subtipos a los patrones que difieren entre tres y cuatro bandas (p.ej. A1.1.). Los aislamientos con cinco o más bandas de diferencia en sus patrones se asignaron a pulsotipos distintos.

3.4c. Otras técnicas de tipado molecular

Para cumplir con el **objetivo 1** de este estudio, se realizaron diferentes técnicas moleculares que complementaron al PFGE para identificar a los diferentes clones. Al menos una cepa de cada patrón de PFGE ($n = 328$) fue caracterizada por MLST (secuenciación de siete genes conservados de *S. aureus*), tipado *spa* (técnica de secuenciación del gen codificante de la proteína de superficie A) y tipado del *SCCmec*. La extracción del ADN se realizó como en el apartado **3.4a**.

MLST: Para realizar el MLST, se realizó la PCR para amplificar cada uno de los genes *arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi* e *yqi* en ambos sentidos complementarios. Los cebadores específicos de cada gen y las condiciones

de la PCR están indicadas en la **Tabla 12**¹⁹⁵. Tras comprobar la amplificación de cada gen en un gel de agarosa 1% como en el apartado **3.4a**, los productos de PCR se purificaron con el kit QIAquick PCR purification (Qiagen, Hilten, Alemania) y se enviaron a MacroGen Inc. <http://dna.macrogen.com> (Corea del Sur) para la realización de la secuenciación Sanger.

Tabla 12a. Cebadores utilizados para la amplificación de los siete genes para el MLST¹⁹⁵.

Gen	Cebador	Secuencia (5' – 3')	Tamaño (bp)
<i>arcC</i>	<i>arcC</i> -Up	TTGATTCACCAGCGCGTATTGTC	456
	<i>arcC</i> -Dw	AGGTATCTGCTTCAATCAGCG	
<i>aroE</i>	<i>aroE</i> -Up	ATCGGAAATCCTATTTACATTTC	456
	<i>aroE</i> -Dw	GGTGTTGTATTAATAACGATATC	
<i>glpF</i>	<i>glpF</i> -Up	CTAGGAACTGCAATCTTAATCC	465
	<i>glpF</i> -Dw	TGGTAAATCGCATGTCCAATTC	
<i>gmk</i>	<i>gmk</i> -Up	ATCGTTTTATCGGGACCATC	429
	<i>gmk</i> -Dw	TCATTAACCTACAACGTAATCGTA	
<i>pta</i>	<i>pta</i> -Up	GTAAAAATCGTATTACCTGAAGG	474
	<i>pta</i> -Dw	GACCCCTTTTGTGAAAAGCTTAA	
<i>tpi</i>	<i>tpi</i> -Up	TCGTTCACTCTGAACGTCGTGAA	402
	<i>tpi</i> -Dw	TTTGCACCTTCTAACAATTGTAC	
<i>yqiL</i>	<i>yqiL</i> -Up	CAGCATACAGGACACCTATTGGC	516
	<i>yqiL</i> -Dw	CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC	

Tabla 12b. Condiciones de la PCR de los siete genes para el MLST¹⁹⁵.

Fases de la PCR	Tiempo/Temperatura	Ciclos
Desnaturalización inicial	9'15" 95°C	X35
Desnaturalización	45" 95°C	
Hibridación	45" 55°C	
Elongación	1' 72°C	
Extensión final	10' 72°C	

Las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos internacional PubMLST (<http://pubmlst.org>)¹³² para obtener los alelos de cada uno de los siete genes, y dar de alta nuevos ST o alelos en caso necesario.

Tipado *spa* y SCCmec: Las técnicas de *spa*-typing y de SCCmec-typing se realizaron en trabajos previos del HUB^{127,170} siguiendo el protocolo de Hallin *et al.*¹³⁶ y PCR multiplex de McClure *et al.*¹⁹⁶ respectivamente.

3.4d. Secuenciación del genoma completo (WGS)

Se realizó la WGS en 238 cepas, de las cuales 114 pertenecían a la **colección 1** y 153 pertenecientes a la **colección 2**, 29 de ellas en común al ser muestras de MRSA causante de bacteriemia en el HUB. El proceso de WGS implica varios pasos, incluyendo la extracción, purificación y cuantificación del ADN, la preparación de la librería de ADN y la secuenciación en sí.

Extracción y cuantificación del ADN: Tras un cultivo bacteriano en agar Columbia (37°C, 18-24h), se seleccionaron entre una y dos colonias que se inocularon en caldo TSB e incubaron a 37°C durante 4 horas. Para el aisla-



Figura 15. Esquema de la metodología de extracción de ADN mediante el kit QIAmp DNA Mini (Qia-gen). Figura realizada con www.biorender.com.

Protocolo de purificación de ADN mediante bolas magnéticas



Figura 16. Esquema de la metodología de purificación de ADN mediante las bolas magnéticas AMPure XP (Beckman) y un soporte magnético de para placas de 96 pocillos (ThermoFisher). Figura realizada con www.biorender.com.

miento del ADN de MRSA se utilizó el kit QIAmp DNA Mini (Qiagen, Hilden, Alemania), siguiendo el protocolo de centrifugaciones en columna proporcionado por el kit (**Figura 15**). Se obtuvieron 200 μ l de volumen de elución. Para la purificación del ADN se aplicaron *beads* (bolas) magnéticas AMPure XP (Beckman, California, EE.UU.), que mediante su unión al ADN, permiten purificar la extracción al aplicar un soporte magnético para placas de 96 pocillos (**Figura 16**). Para la cuantificación se utilizaron los fluorímetros Quantus™ y Qubit™ (Promega, WI, EE.UU.). Se ajustaron todos los extractos a 0.2 ng/ μ l.

Preparación de librerías y secuenciación: Se utilizó el kit Nextera XT DNA Prep (Illumina, San Diego, California, EE.UU.) para preparar las librerías genómicas. Las librerías se enviaron a MacroGen Inc. (Corea del Sur), donde utilizaron una plataforma Illumina MySeq (2x300bp).

Ensamblaje y anotación: Las secuencias se ensamblaron mediante el *pipeline* INNUca v4.2 (github.com/B-UMMI/INNUca) con parámetros por defecto y se anotaron con Prokka v1.12¹⁹⁷.

Análisis *in silico*: Se obtuvieron los datos de *spa*-tipo, SCCmec-tipo y MLST mediante las herramientas en línea del Centro para la Epidemiología Genómi-

ca (CEG, <https://www.genomicepidemiology.org>): *spa*Typer 1.0, *SCCmec*Finder 1.2 y el *MLST*-Finder 2.0 respectivamente^{85,143,198}. Se determinaron los *spa*-tipos, tipo de *SCCmec* y *MLST* subiendo la secuencia apareada del genoma a las bases de datos en línea del Centro para la Epidemiología Genómica (CEG): *spa*-Typer¹⁹⁹, *SCCmec*-Finder⁸⁵ y el *MLST*-Finder¹⁴³ respectivamente.

Los *contigs* se alinearon con los elementos *ACME* (*arginine catabolic mobile element*) y *COMER* (*copper and mercury resistance mobile element*) previamente caracterizados en las cepas de MRSA USA300 FRP3757 (número de acceso de GenBank CP000255) y la cepa CA12 (número de acceso de GenBank CP007672), respectivamente, usando el software BLAST en el programa Geneious R9 (Biomatter).

Análisis filogenético: se construyó un alineamiento genómico completo usando Snippy 3.1 (github.com/tseemann/snippy) y el genoma de referencia *S. aureus* NCTC8325 (número de acceso CP00253.1). Posteriormente, se utilizó el programa Gubbins v2.3.4. para la predicción y eliminación de regiones recombinantes. Se construyó un árbol filogenético con RAxML-NG²⁰⁰ que se visualizó mediante Microreact²⁰¹.

Análisis del pangenoma: se llevó a cabo un análisis pangenómico mediante el programa Roary²⁰², con un porcentaje mínimo de identidad del 80% para BLASTp.

Detección de genes de resistencia: los genes asociados a resistencias transferibles fueron examinados con la base de datos ResFinder 4.1²⁰³.

Análisis de mutaciones puntuales: el análisis de mutaciones en genes asociados a resistencia antibiótica (*mecA*, *mprF*, *gyrA*, *gyrB*, *griA*, *griB*, *pbp2*, *pbp4*, *rpoB*, *rpoC*, *murA*, *glpT*, *uhpT*, *dfrB* y *ileS2*) se realizó con el programa Geneious R9 (Biomatters) usando el genoma de referencia *S. aureus* COL (número de acceso CP000046).

Se puede consultar la **tabla suplementaria 1** del artículo publicado (**anexo 1**) con el listado de aislamientos secuenciados y su caracterización *in silico* incluidos en el **estudio 1A**, aquí: <https://acortar.link/TOzmEU>. Los *reads* se depositaron en el Archivo de Nucleótidos Europeo (ENA) con el número de acceso del estudio PRJEB54086.

3.5. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron mediante el software GraphPad Prism 5.01. Se utilizó la prueba exacta de Fisher (de dos colas) o un t-test no emparejado cuando correspondía y se consideraron estadísticamente significativos los valores de $p \leq 0,05$.

Para el **objetivo 1.1.**, las tasas de incidencia de bacteriemia por MRSA y MSSA en el HUB se calcularon utilizando el número total de estancias hospitalarias (100.000 días-paciente) como denominador. Para el análisis, el estudio se dividió en cinco períodos: 1990–1995, 1996–2001, 2002–2007, 2008–2013 y 2014–2019.



RESULTADOS

*"El trabajo que nunca se empieza
es el que tarda más en realizarse"*
– J.R.R Tolkien

Los resultados de esta tesis se han organizado según los objetivos como se indica a continuación:

OBJETIVO 1. Analizar las características clínicas y microbiológicas de las infecciones bacteriémicas causadas por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) en hospitales.

ESTUDIO 1A* – Características clínicas y microbiológicas de las infecciones bacteriémicas causadas por MRSA en el Hospital Universitario de Bellvitge (1990-2019).

Objetivo 1.1. Describir la incidencia de la infección y las características clínicas de los episodios de bacteriemia.

Objetivo 1.2. Estudiar la diversidad clonal de las cepas de MRSA.

Objetivo 1.3. Describir los perfiles de resistencia antibiótica asociados a cada grupo clonal y analizar las bases moleculares de la resistencia.

* Estudio correspondiente al artículo publicado (**anexo 1**).

ESTUDIO 1B – Características clínicas y microbiológicas de las infecciones bacteriémicas causadas por MRSA en hospitales españoles (2014-2018).

Objetivo 1.2. Estudiar la diversidad clonal de las cepas de MRSA.

Objetivo 1.3. Describir los perfiles de resistencia antibiótica asociados a cada grupo clonal y analizar las bases moleculares de la resistencia.

OBJETIVO 2.- Estudiar las características microbiológicas de los aislamientos de MRSA que causan infección en pacientes atendidos en centros de asistencia primaria:

ESTUDIO 2 – Epidemiología de MRSA en pacientes atendidos en centros de atención primaria durante el 2018.

Objetivo 2.1: Analizar la diversidad clonal de los aislamientos clínicos.

Objetivo 2.2: Determinar el origen de la adquisición de la infección por MRSA.

Objetivo 2.3: Estudiar la sensibilidad antibiótica y la presencia de los genes codificantes para la leucocidina de Panton-Valentine.

OBJETIVO 3.- Estudiar la sensibilidad antibiótica de los distintos clones de MRSA a distintos antibióticos antiestafilocócicos y su actividad combinada *in vitro*.

ESTUDIO 3 – Estudio de la actividad *in vitro* de ceftarolina en combinación con daptomicina y fosfomicina frente a MRSA.

Objetivo 2.1: Determinar la concentración mínima inhibitoria de daptomicina, ceftarolina y fosfomicina frente a diferentes clones de MRSA.

Objetivo 2.1: Evaluar la actividad *in vitro* de la combinación de ceftarolina con daptomicina o con fosfomicina.

ESTUDIO 1. Características clínicas y microbiológicas de las infecciones bacteriémicas causadas por *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA)

A. HOSPITAL UNIVERSITARIO DE BELLVITGE (1990-2019)

A.1. Incidencia y características clínicas de los episodios de bacteriemia por MRSA

De 1990 a 2019, se detectaron 3544 episodios de bacteriemia por *S. aureus* sensible a meticilina (MSSA) y 819 de MRSA (**Figura 17**). La incidencia de la bacteriemia por *S. aureus* aumentó de 45,3 episodios por 100.000 pacientes-día en el primer periodo del estudio (1990–1995) a 60,3 en el último periodo (2014–2019). La incidencia de bacteriemia, tanto por MSSA como por MRSA fue aumentando hasta alcanzar un máximo en 2002–2007 (**Figura 17**). El porcentaje global de resistencia a meticilina entre los *S. aureus* que causaron bacteriemia osciló entre el 15% y el 23%, con el porcentaje más alto en 2002–2007, coincidiendo con un pico de incidencia de infección por *S. aureus* (63,5 episodios por 100.000 pacientes-día).

Se recogieron las características clínicas de 784 episodios de infección por MRSA (**Tabla 13**). La mediana de edad de los pacientes fue aumentando a lo largo del estudio, de 60 en el periodo 1990-1995 a 71 años en el periodo 2014-2019. Lo mismo ocurrió con la proporción de mujeres, que pasó del 25% en 1990-1995 al 46% en 2014-2019. La proporción de pacientes con índice de comorbilidad de Charlson (ICC) >2 aumentó del 10% en 1990–1995 al 94% en 2014–2019. Se observó un aumento de la mortalidad a 30 días

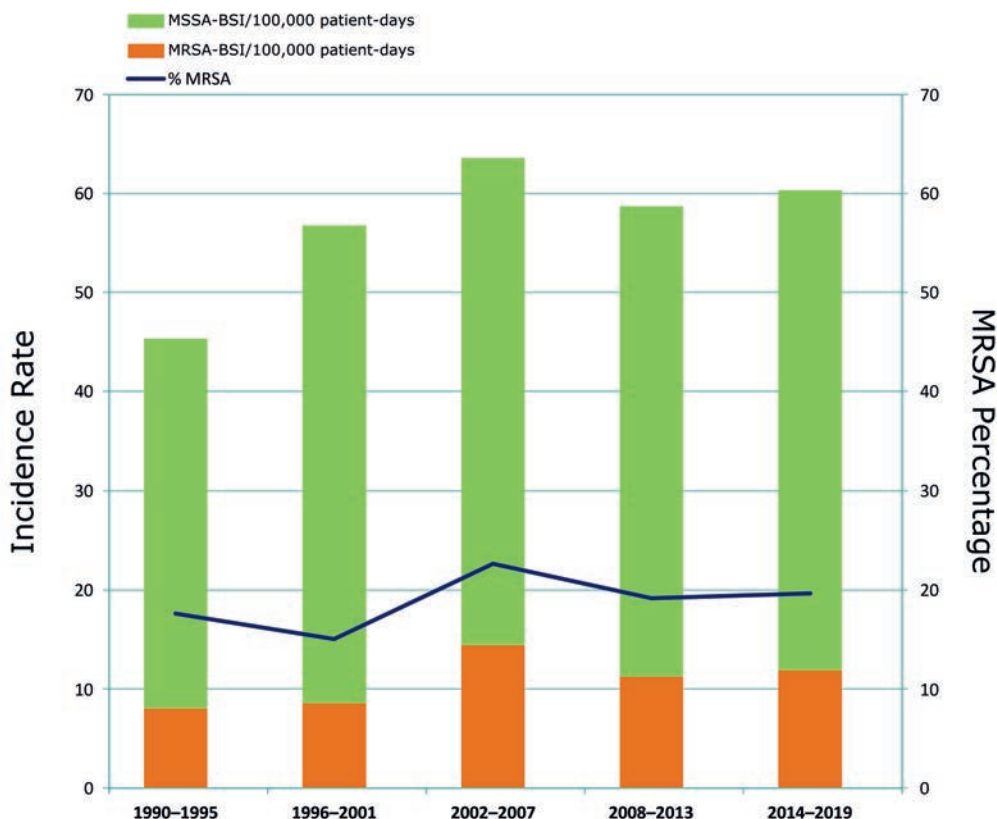


Figura 17. Evolución de las bacteriemias por MSSA y MRSA durante el periodo de estudio. En las barras se muestra la tasa de incidencia de bacteriemias por MSSA y MRSA (episodios por 100.000 pacientes-día). La línea azul muestra el porcentaje de aislados resistentes a la meticilina. BSI, *bloodstream infection*.

después de 2008, con tasas del 28-29% registradas de 1990 a 2001 y del 36-38% entre 2008 y 2019. En cuanto a la adquisición de la infección por MRSA, la proporción de episodios de bacteriemia de origen hospitalario (HO-HCA, *hospital-onset healthcare associated*) disminuyó del 91% al 26%, mientras que los episodios de bacteriemia de origen comunitario asociados al sistema sanitario (CO-HCA, *community-onset healthcare-associated*) aumentaron del 9% al 60% entre el primer (1990-1995) y el último período (2014-2019). La infección de adquisición comunitaria (CA), no asociada a la asistencia sanitaria,

surgió en 2002–2007 y fue aumentando progresivamente, representando el 14% de bacteriemias por MRSA en el último período (2014–2019). Respecto al origen de la infección, se observó una reducción significativa en la proporción de bacteriemias relacionadas con catéter a lo largo del tiempo (del 57%

Tabla 13. Características clínicas y demográficas por periodos de los episodios de bacteriemia por MRSA. La tabla muestra el número total de episodios y el porcentaje (entre paréntesis).

		Periodos				
		1990–1995	1996–2001	2002–2007	2008–2013	2014–2019
Nº de episodios		137	142	207	149	149
Sexo mujer		34 (25)	38 (27)	76 (37)	62 (42)	68 (46)*
Edad, media $\pm$ DE		60,2 $\pm$ 18,9	68,3 $\pm$ 16,3	70,2 $\pm$ 14,9	70,1 $\pm$ 14,1	71,2 $\pm$ 14,5
(rango)		(22-94)	(23-99)	(24-98)	(27-94)	(19-85)*
Adquisición						
	HO-HCA	124 (91)	113 (80)	98 (47)	70 (47)	39 (26)*
	CO-HCA	13 (9)	29 (20)	107 (52)	71 (48)	89 (60)*
	CA	0 (0)	0 (0)	2 (1)	8 (5)	21 (14)*
Foco de la infección						
	Catéter	78 (57)	71 (50)	62 (30)	35 (24)	30 (20)*
	Piel y partes blandas	8 (6)	12 (8)	34 (16)	20 (13)	29 (20)*
	Tracto respiratorio	1 (1)	14 (10)	17 (8)	17 (11)	24 (16)*
	Urinario	2 (1)	5 (4)	22 (11)	21 (14)	12 (8)*
	Osteoarticular	4 (3)	5 (4)	12 (6)	11 (7)	13 (9)*
	Endocarditis	5 (3)	3 (2)	4 (2)	4 (3)	11 (7)
	Otros orígenes [‡]	16 (12)	22 (15)	35 (17)	13 (9)	10 (7)
	Foco desconocido	23 (17)	10 (7)	21 (10)	28 (19)	20 (13)
ICC	>2	13 (10)	20 (25)	92 (49)	117 (82)	140 (94)*
	$\geq$ 5	7 (6)	3 (4)	33 (18)	94 (66)	112 (75)*
	No disponible	13	61	21	7	0
Mortalidad a 30 días		39 (28)	41 (29)	57 (28)	57 (38)	54 (36)

‡ Otros orígenes: biliar, pericardio, sistema nervioso central. * Diferencias estadísticamente significativas entre los periodos 1990–1995 y 2014–2019 ($p < 0,05$). DE, desviación estándar; PPB, piel y partes blandas; ICC, índice de comorbilidad de Charlson; HO-HCA, inicio hospitalario; adquisición asociada al sistema sanitario; CO-HCA, inicio comunitario, adquisición asociada al sistema sanitario; CA, adquisición comunitaria.

en 1990-1995 al 20% en 2014-2019). En el último período, los focos de infección más frecuentes de los episodios de bacteriemia HO-HCA fueron el tracto respiratorio (13/39) y el catéter vascular (11/39), mientras que en los CO-HCA fueron principalmente el catéter vascular (19/89) y las infecciones de piel y partes blandas (IPPB) (17/89). El origen más frecuente de los episodios adquiridos en la comunidad (CA) fueron las IPPB (9/21) y foco desconocido (4/21) (**Tabla 14**).

Tabla 14. Origen de las bacteriemias por MRSA según su adquisición y foco de infección. La tabla muestra el número total de episodios y su porcentaje (en paréntesis).

Foco de infección	Periodos															
	1990 – 1995			1996 – 2001			2002 – 2007			2008 – 2013			2014 – 2019			
	<i>n</i> = 137			<i>n</i> = 142			<i>n</i> = 207			<i>n</i> = 149			<i>n</i> = 149			
	HO-HCA	CO-HCA		HO-HCA	CO-HCA		HO-HCA	CO-HCA	CA	HO-HCA	CO-HCA	CA	HO-HCA	CO-HCA	CA	
Catéter vascular	124 (91)	13 (9)		113 (80)	29 (20)		98 (47)	107 (52)	2 (1)	70 (47)	71 (48)	8 (5)	39 (26)	89 (60)	21 (14)	
Endocarditis	74 (54)	4 (3)		65 (46)	6 (4)		33 (16)	29 (14)	-	25 (17)	9 (6)	1 (1)	11 (7)	19 (13)	-	
Osteoarticular	5 (4)	-		1 (1)	2 (1)		1 (0.5)	3 (1)	-	2 (1)	1 (1)	1 (1)	2 (1)	7 (5)	2 (1)	
Tracto respiratorio	1 (1)	3 (2)		2 (1)	3 (2)		4 (2)	8 (4)	-	5 (3)	6 (4)	-	2 (1)	11 (7)	-	
PPB	1 (1)	-		11 (8)	3 (2)		10 (5)	7 (3)	-	5 (3)	12 (8)	-	13 (9)	9 (6)	2 (1)	
Urinario	7 (5)	1 (1)		5 (4)	7 (5)		9 (4)	23 (11)	2 (1)	7 (5)	13 (9)	-	3 (2)	17 (11)	9 (6)	
Otros orígenes†	-	2 (1)		3 (2)	2 (1)		9 (4)	13 (6)	-	5 (3)	13 (9)	3 (2)	1 (1)	9 (6)	2 (1)	
Foco Desconocido	14 (10)	-		16 (11)	2 (1)		18 (9)	9 (4)	-	8 (5)	3 (2)	1 (1)	2 (1)	6 (4)	2 (1)	
	22 (16)	3 (2)		10 (7)	4 (3)		14 (7)	15 (7)	-	13 (9)	14 (9)	2 (1)	5 (3)	11 (7)	4 (3)	

+ Otros orígenes: biliar, pericardio, sistema nervioso central, PPB, piel y partes blandas; HO-HCA, inicio hospitalario, adquisición asociada al sistema sanitario; CO-HCA, inicio comunitario, adquisición asociada al sistema sanitario; CA, adquisición comunitaria.

A.2. Epidemiología molecular de las bacteriemias causadas por MRSA

Un total de 702/784 aislados (90%) estaban disponibles para los estudios moleculares. Cinco genotipos principales representaron el 96% (675/702) de la población de MRSA (**Figura 18**). Los aislados del clon ibérico CC8 ST247 portadores de un elemento *SCCmec* tipo Ia (162/702, ST247-Ia¹¹²), fueron predominantes hasta 1999, asociados a un perfil MDR que incluía resistencia a aminoglucósidos, fluoroquinolonas, lincosamidas, macrólidos, rifampicina y tetraciclinas. El clon CC5 ST228-I (72/702, clon del sur de Alemania) fue prevalente entre 2002 y 2009 y también mostró un perfil de multirresistencia a macrólidos, aminoglucósidos, fluoroquinolonas y rifampicina. Los aislados del CC5 con un *SCCmec*-IV (279/702, Clon Pediátrico) surgieron en 1997 y aumentaron rápidamente hasta convertirse en el clon más frecuente de 2001 a 2015. Los aislados de este clon mostraron diferentes STs (principalmente ST125 y ST146) y variados perfiles de resistencia (PR). El segundo linaje más frecuente fue el CC8 ST8-IV (120/702), que surgió en 2000 y actualmente es la primera causa de bacteriemias por MRSA. Al igual que el CC5-IV, este linaje incluía aislados con diversos PR, la mayoría de los cuales mostraban resistencia a tobramicina y ciprofloxacino. Un subconjunto de aislados ST8-IV (18/120) fue positivo para la LPV. Seis de estos aislados estaban relacionados con el clon USA300-NAE, con el elemento móvil ACME y *SCCmec*-IVa y ocho relacionados con el clon USA300-SAE, asociado con el elemento CO-MER y *SCCmec*-IVc. El clon endémico más

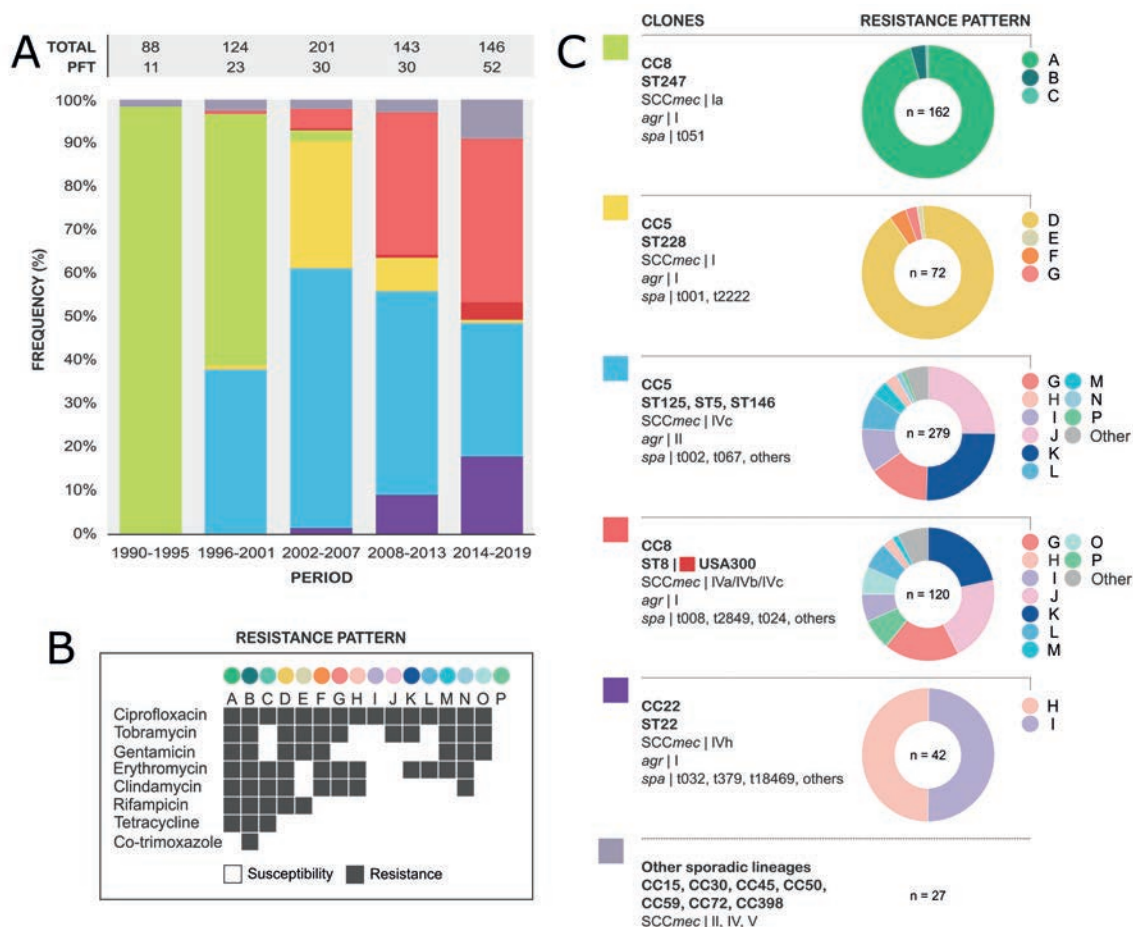


Figura 18. Evolución de los clones de MRSA causantes de bacteriemia y patrones de resistencia a los antimicrobianos. A) Distribución y frecuencia de los linajes de MRSA causante de bacteriemia por periodos. El número total de aislados de MRSA causante de bacteriemia y los diferentes tipos de patrón de PFGE en cada periodo se muestran sobre las barras. Los clones están representados por barras coloreadas en A) y por cuadrados coloreados en C). **B)** Perfiles de resistencia de las cepas de MRSA causante de bacteriemia. **C)** Caracterización molecular de los principales clones y sus perfiles de resistencia. El perfil de resistencia de los clones principales está representado por puntos coloreados en B) y C). Otros perfiles de resistencia menores ($n < 5$) se muestran como "Otros" (Other). CC, complejo clonal; PFT, pulsotipos de campo pulsado; SCCmec, casete cromosómico estafilocócico mec; spa-typing tipo de spa; ST, secuenciotipo; agr, gen accesorio regulador Agr.

reciente, CC22 ST22-IVh (42/702, UK-EMRSA-15), ha incrementado en frecuencia desde su aparición en 2007 y se asocia de manera uniforme a la resistencia a la ciprofloxacino y aproximadamente la mitad de aislados a resistencia a macrólidos y lincosamidas.

La **figura 19** muestra la composición del pangenoma del conjunto de aislados secuenciados del **estudio 1A**. Con el análisis del pangenoma (**Figura 20**) se detectó un conjunto de 3778 genes, muchos de ellos ($n=1679$, 44%) compartidos por todos los genomas (genes *core*), 322 genes en el 95-99% de los genomas (genes *soft-core*), 821 genes en el 15-94% (*shell*) y 956 genes en <15% de los genomas (genes *cloud*). El árbol filogenético muestra cuatro grandes CC: CC5, CC8, CC72 y CC22. Cuando se examinó cada CC por separado, se observaron diferencias en las secuencias genéticas, siendo el CC72 el que presentaba la mayor cantidad de genes distintos ($n=3255$) - aunque sólo contenía cuatro muestras y el CC22 el más pequeño ($n=2617$). El CC8 y el CC5 tenían las proporciones más bajas de genoma *core* total (67% y 69% respectivamente), mostrando una mayor variabilidad genética que otros CC; mientras que CC22 era genéticamente más homogéneo. Los clones CC8 ST8 y CC5 Pediátrico tenían más genes accesorios por genoma que los clones CC5 ST228 o CC8 ST247.

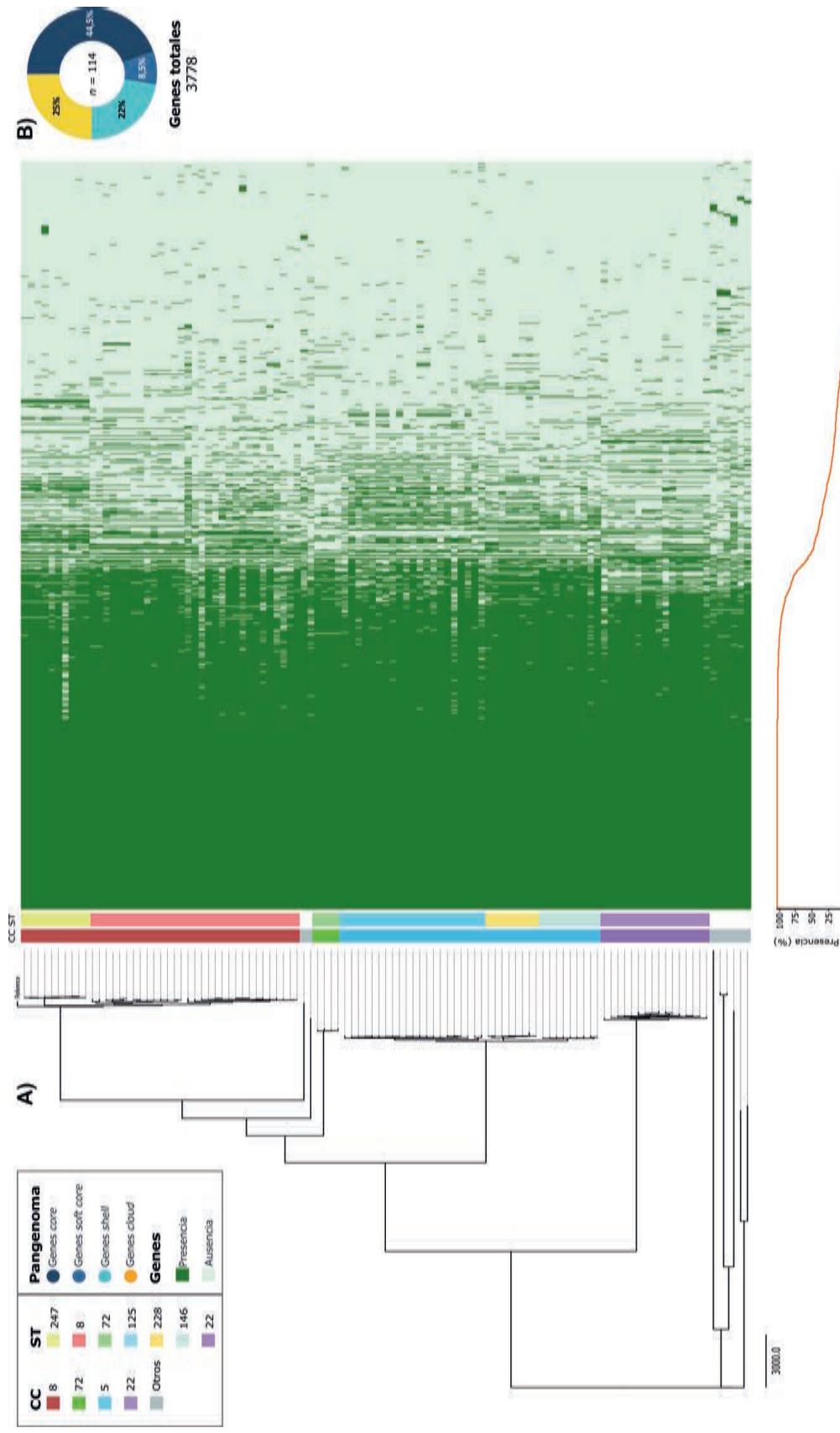


Figura 19. Análisis del pangenoma de MRSA bacteriómico en el HUB. A) Árbol filogenético basado en core-SNP, genes detectados y agrupación por CC y ST. B) Los genes se clasificaron según su presencia en los 114 genomas analizados como: "Core" si estaban presentes en $\geq 99\%$ de las muestras, "Soft-core" entre 95 y 99%, "Shell" entre 15 y 95% y "Cloud" en $< 15\%$. El gráfico de rosquilla muestra las proporciones de distribución de los genes core, shell y cloud por el conjunto total de genomas y el número total de genes debajo. CC, complejo clonal; ST, secuenciación.

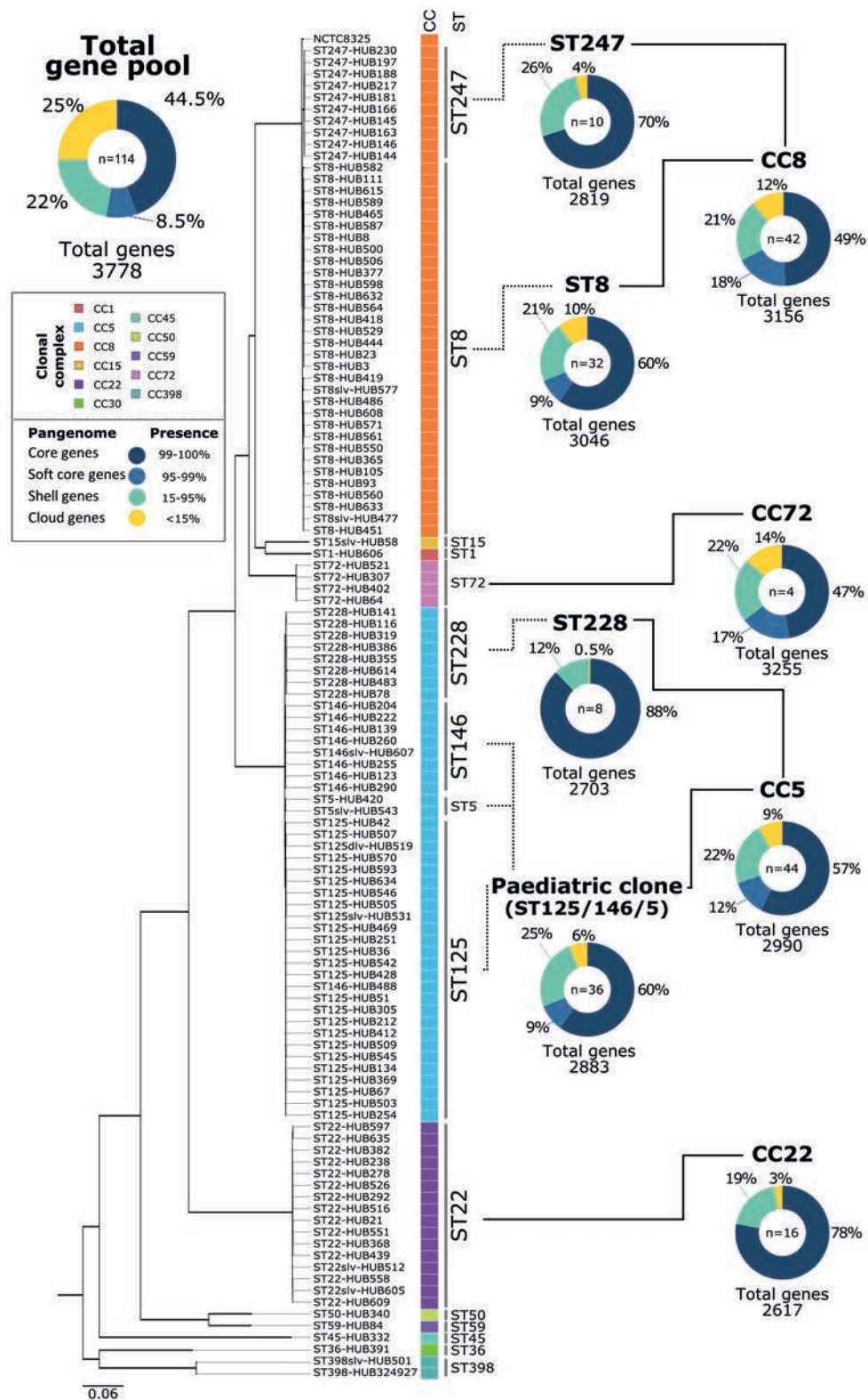


Figura 20. Análisis del pangenoma. Los genes se clasificaron según su presencia en los 114 genomas analizados como: "Core" si estaban presentes en $\geq 99\%$ de las muestras, "Soft-core" entre 95 y 99%, "Shell" entre 15 y 95% y "Cloud" en $<15\%$. Los gráficos de rosquilla muestran las proporciones de distribución de los genes *core*, *shell* y *cloud* por ST, por CC y por el conjunto total de genes, con el número total de aislados de cada grupo en el centro del gráfico y el número total de genes debajo de cada gráfico.

A.3. Concordancia entre los métodos de tipado molecular

De los 702 aislamientos de MRSA de la colección 1 que se sometieron a PFGE, 248 de ellos (35%) habían sido tipados mediante *spa-typing*, MLST y *SCCmec typing* en trabajos previos del HUB^{23,106,171}. La concordancia entre la caracterización por *spa-typing* y PFGE fue del 86% (214/248). Se identificaron tres nuevos perfiles de *spa-type* y 31 (12,5%) fueron considerados erróneos tras la comprobación mediante WGS.

Se evaluó la concordancia entre los métodos de tipado estándar y la tipificación basada en WGS: de los 114 aislamientos de la **colección 1** secuenciados (**Figura 21**), 93 (82%) fueron clasificados con éxito a nivel de CC mediante PFGE, 14 (12%) no se identificaron con precisión y siete aislamien-

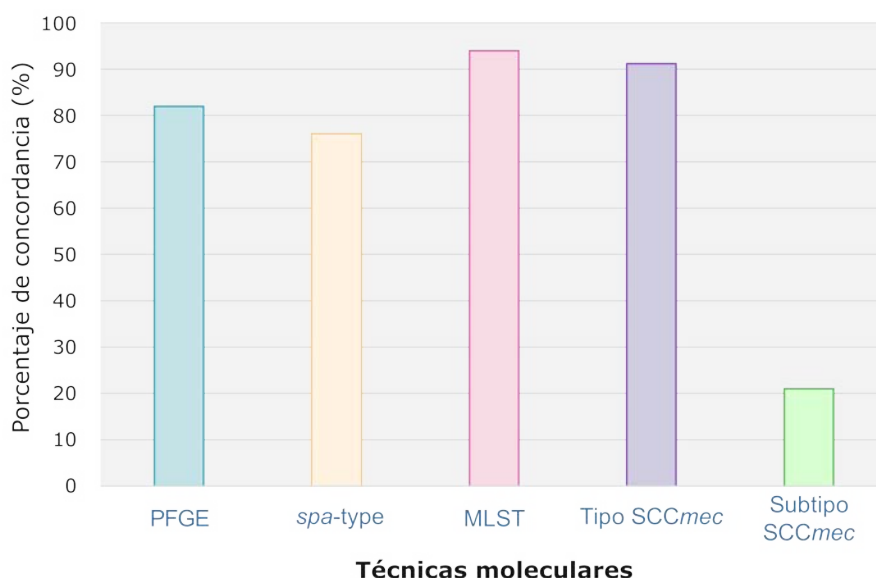


Figura 21. Percentage de homología entre los resultados de caracterización de MRSA por técnicas de tipado estándar y su comprobación por NGS. PFGE, electroforesis de campo pulsado; *spa*-tipo, tipado de la proteína A; MLST, *multilocus sequence type*; *SCCmec*, casete cromosómico estafilocócico.

tos (6%) no se pudieron clasificar debido a patrones de PFGE desconocidos o por pertenecer al clon LA-MRSA CC398 (no tipable por Smal). Mediante MLST, 107 (94%) aislamientos se clasificaron correctamente, mientras que un 6% de los resultados no concordaron con los de WGS debido a que por WGS se obtuvieron mejores secuencias y se identificaron nuevos ST.

Entre los aislamientos secuenciados, 75 se habían tipado previamente mediante *spa*-typing, un 76% fueron clasificadas correctamente, un 21% incorrectamente y un 3% no pudieron ser clasificados mediante WGS debido a que las repeticiones del gen *spa* se ensablaron en más de un *contig*. El SCC-*mec* fue analizado en 68 muestras por PCR con un 91% de éxito. Solo se obtuvo el subtipo del SCC*mec* de un 21%.

A.4. Evolución y bases moleculares de la resistencia a los antimicrobianos

La evolución de las tasas de resistencia a los antimicrobianos a lo largo del tiempo se muestra en la **figura 22**. La desaparición de genotipos con perfiles de resistencia a un elevado número de antibióticos, como los clones ST247-la y ST228-I, ha causado un descenso de las tasas de resistencia a la mayoría de los antimicrobianos. Sólo ciprofloxacino, tobramicina y eritromicina mostraron porcentajes de resistencia superiores al 50% en el último periodo. Todos los aislados fueron sensibles a la vancomicina y el linezolid.

La **figura 23** resume la similitud genética y los principales determinantes de resistencia de las cepas de MRSA causantes de bacteriemia secuen

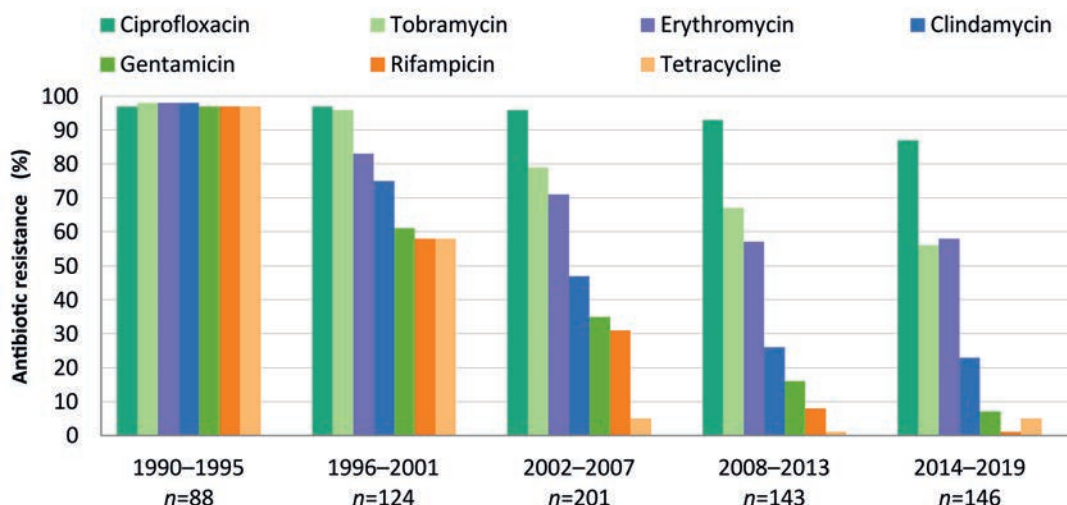


Figura 22. Evolución de las tasas de resistencia a los antimicrobianos por periodos. Solo se muestran los antimicrobianos con tasas de resistencia superiores al 5%. Todas las disminuciones en el porcentaje de resistencia a los antibióticos fueron estadísticamente significativas ($p < 0,01$) al comparar el primer periodo (1990–1995) y el último (2014–2019).

ciadas mediante WGS. A continuación, se describen los mecanismos de resistencia más destacados y su asociación con los distintos clones:

Fluoroquinolonas. Las CMI más elevadas de ciprofloxacino (CMI >2 mg/L) se asociaron con sustituciones en las regiones determinantes de la resistencia a quinolonas (QRDR) de la ADN girasa GyrA (S84L/V, S85P y E88K) y de la topoisomerasa IV GrIA (S80F/Y, S81P y E84K/G). Una cepa del CC398 tenía una mutación de primer nivel en GrIA-S80F (CMI = 2mg/L). No se encontró ninguna sustitución aminoacídica relevante en GyrB ni en GrIB.

Aminoglucósidos. Se detectó resistencia a los aminoglucósidos en todos los clones excepto en el CC22. La resistencia se asoció con la presencia de enzimas modificadoras de aminoglucósidos como la proteína bifuncional AAC(6')-Ie-APH(2'')-Ia (resistencia a gentamicina y tobramicina) y ANT(4')-Ia (resistencia a tobramicina).

Macrólidos y lincosamidas. Los genes *mph(C)* y *msr(A)* se encontraron en 32 de 67 cepas resistentes a la eritromicina. El fenotipo MLS_B (resistencia a la eritromicina, clindamicina y estreptogramina B) se observó en 35 aislamientos, asociados a los genes *erm(A)* (detectado sobre todo en los clones ST247-Ia y ST228-I) y *erm(C)* (detectado sobre todo en CC22). Un único aislado ST8, además de *erm(A)* también portaba el gen *linA*.

Rifampicina. La resistencia a la rifampicina se asoció con alteraciones en RpoB, presentes sólo en los clones ST247-Ia (H481N más S529L y/o D471G) y ST228-I (H481N). No se encontraron cambios en RpoC.

Tetraciclinas. Entre las 15 cepas resistentes a las tetraciclinas, 11 portaban los genes *tet(M)*, tres *tet(K)* y una cepa del CC398 albergaba ambos genes.

Cloranfenicol. Siete cepas ST125 eran resistentes al cloranfenicol y portaban el gen *catA*.

Fosfomicina. Dos cepas resistentes a la fosfomicina presentaban cambios en UhpT (E235STOP o G170STOP) y seis portaban el gen *fosB*. No se encontraron alteraciones en MurA o GlpT. En dos aislados ST228 resistentes a fosfomicina (CMI >32 µg/ml) no se encontraron determinantes genéticos descritos en asociación a esta resistencia.

Mupirocina. Cuatro aislados mostraron un alto nivel de resistencia a la mupirocina y la presencia del gen *mupA*.

Trimetoprim-sulfametoxazol. Dos aislados resistentes eran portadores de los genes *dfrC* y *dfrG*. No se encontraron mutaciones en el gen *dfrB*. Otra cepa CC398 tenía el gen *dfrK*, relacionado con un plásmido ST398²⁰⁴, pero era sensible al cotrimoxazol.

Ácido fusídico. Solo un aislado mostró resistencia a este antibiótico (gen *fusC*).

Ceftarolina. La resistencia a la ceftarolina (CMI ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$) se asoció a cambios en la PBP2a (N146K, $n = 4$ o E239K, $n = 2$) en ocho cepas ST228-I. Dos cepas USA300-SAE también mostraron resistencia a la ceftarolina (CMI = 4 $\mu\text{g/ml}$), pero no se encontraron cambios en la PBP2a, la PBP2 ni en la PBP4.

Daptomicina. Se encontraron cambios en MprF (T345I y L826F) en dos cepas CC22-IV resistentes a la daptomicina.

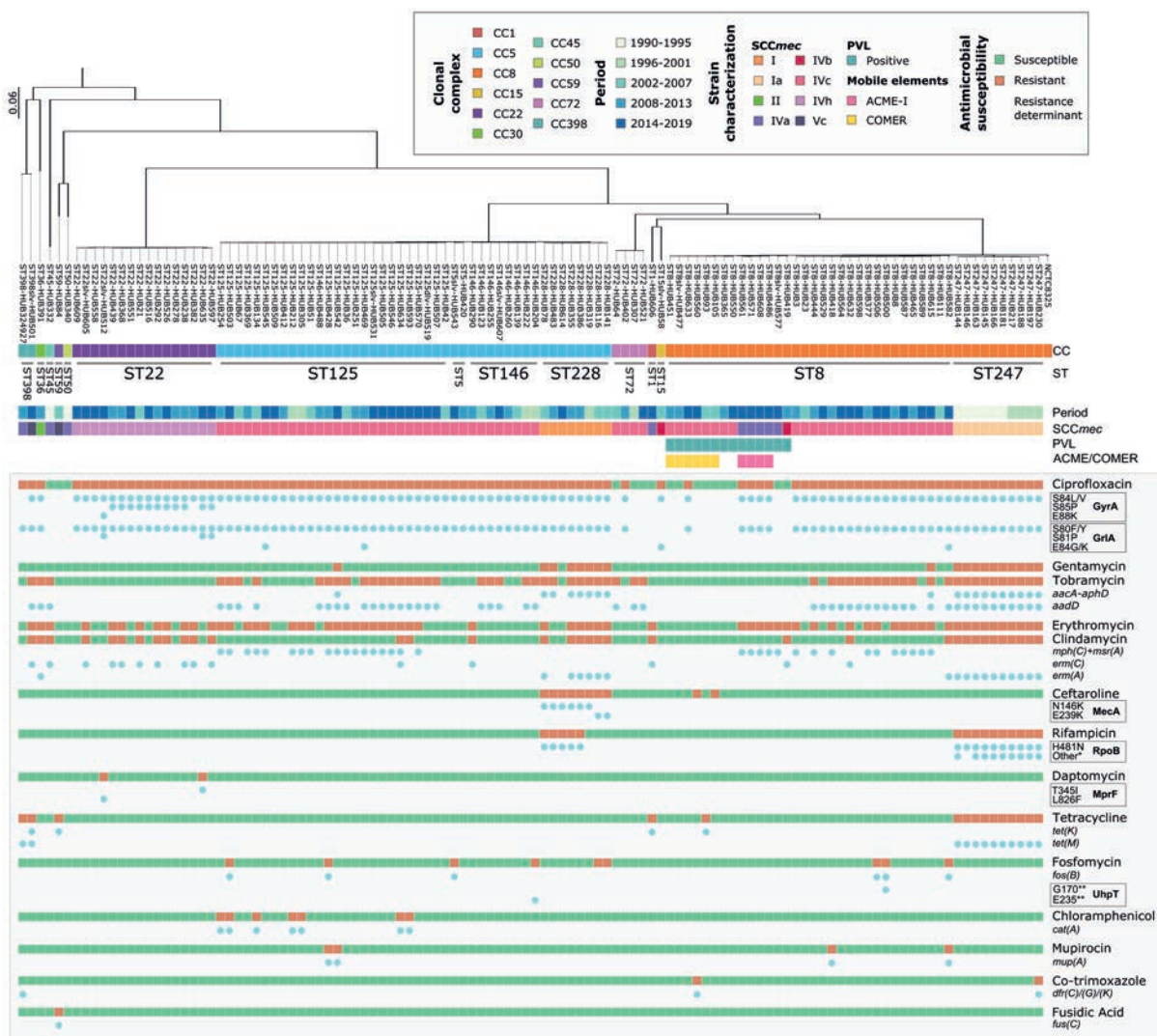


Figura 23. Árbol filogenético basado en el ensamblaje de *core*-SNP, complejo clonal, periodo, resistencia a antibióticos y los mecanismos moleculares asociados. Las barras de colores indican el periodo y las características de la cepa (CC, *SCCmec*, PVL y elementos móviles ACME/COMER). En la zona sombreada en gris, los cuadrados coloreados representan la resistencia a los antimicrobianos (en rojo) y la sensibilidad (en verde) para cada grupo de antibióticos y siguiendo los puntos de corte del CLSI¹⁹¹, seguidos de círculos azules cuando se detectó uno de los determinantes de resistencia indicados a la derecha. *Otras alteraciones de RpoB: D471G/Y y S529L. ** Indica un codón STOP. CC, complejo clonal; ST, secuenciotipo; *SCCmec*, casete cromosómico estafilocócico *mec*; PVL, leucocidina de Pantón-Valentine; ACME, elemento móvil catabólico de arginina; COMER, elemento móvil de resistencia al cobre y al mercurio.

A.5. Linajes principales y características clínicas de los episodios de bacteriemia por MRSA ocurridos entre 2008 y 2019

Se compararon los datos demográficos y clínicos de los episodios de bacteriemia causados por aislados de MRSA de los linajes más prevalentes (CC5-IV, CC8-IV y CC22-IV) desde 2008 hasta 2019, período en el que coexistieron estos genotipos (**Tabla 15**). En general, los episodios causados por estos tres clones fueron similares en cuanto a características demográficas y clínicas. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a edad, sexo, ICC o mortalidad a 30 días entre los clones. No obstante, los episodios de bacteriemia causados por los clones CC8-IV y CC22-IV tenían su origen en la infección de las vías respiratorias inferiores con mayor frecuencia que los causados por CC5-IV (frecuencias del 17%, 21% y 9% respectivamente).

Tabla 15. Comparación de las características clínicas de los tres clones mayoritarios durante el periodo 2008- 2019. Porcentajes en paréntesis.

Periodo 2008–20019	Total n=260	CC5 Pediátrico n=112	CC8-ST8 n=109	CC22 n=39	P-valor CC5 vs ST8	P-valor CC22 vs CC5	P-valor CC22 vs ST8
Características [n (%)]							
Edad [media±DE; (rango)]	71,2±13,7 (19-98)	71,1±12,7 (31-94)	71,4±71,4 (19-98)	71,13±11,1 (39-86)	0,89	0,99	0,93
Sexo, mujer	112 (43)	51 (46)	44 (40)	17 (44)	0,49	0,854	0,851
Foco de infección							
Catéter vascular	61 (23)	29 (26)	23 (21)	9 (23)	0,431	0,832	0,822
IPPB	45 (17)	21 (19)	18 (17)	6 (15)	0,726	0,809	-
Urinario	27 (10)	15 (13)	9 (8)	3 (8)	0,281	0,407	-
Osteoarticular	23 (9)	11 (10)	11 (10)	1 (3)	-	0,188	0,184
Tracto respiratorio	37 (14)	10 (9)	19 (17)	8 (21)	0,074	0,082	0,638
Endocarditis	14 (5)	7 (6)	5 (5)	2 (5)	0,768	-	-
Otros	14 (5)	6 (5)	8 (7)	-	0,591	0,339	0,111
Desconocido	39 (15)	13 (12)	16 (15)	10 (26)	0,553	0,067	0,143
Adquisición							
CA	24 (9)	5 (4)	16 (15)	3 (8)	0,011	0,426	0,403
CO-HCA	142 (55)	62 (55)	60 (55)	20 (51)	-	0,711	0,711
HO-HCA	94 (36)	45 (40)	33 (30)	16 (41)	0,159	-	0,239
ICC							
>2	233 (91)	101 (91)	96 (90)	36 (97)	0,669	-	0,562
≥5	137 (54)	48 (43)	60 (56)	29 (78)	0,081	0,0008	0,038
No disponible	4	1	1	2	-	0,164	0,171
Mortalidad a 30 días	99 (38)	41 (37)	44 (40)	14 (36)	0,583	-	0,704

‡ Otros orígenes: biliar, pericardio, sistema nervioso central, DE, desviación estándar, IPPB, infección de piel y partes blandas; HO-HCA, inicio hospitalario, adquisición asociada al sistema sanitario; CO-HCA, inicio comunitario, adquisición asociada al sistema sanitario; CA, adquisición comunitaria; ICC, índice de comorbilidad de Charlson. Los P-valores en negrita indican que son estadísticamente significativos.

B. OTROS HOSPITALES ESPAÑOLES (2014–2018)

B.1. Muestra de pacientes

Para el siguiente estudio se recogieron y estudiaron 155 aislamientos de MRSA causantes de bacteriemia en adultos en 18 hospitales españoles durante el periodo de 2014 a 2018, a través de un estudio multicéntrico realizado en el contexto de la REIPI (Red Española de Investigación en Patología Infecciosa). Este estudio multicéntrico fue diseñado como un ensayo clínico aleatorizado de fase 3 para comparar los resultados del tratamiento con daptomicina en solitario o con daptomicina más fosfomicina de la bacteriemia por MRSA ⁶⁶. Los aislamientos de MRSA fueron prospectivamente enviados al Servicio de Microbiología del HUB. La incidencia de MRSA en España durante esos años fue del 24,7% ^{124,188}.

B.2. Identificación y tipado molecular

Se recibieron un total de 192 cepas de MRSA, que fueron identificadas mediante MALDI-TOF y se estudió la sensibilidad antibiótica mediante microdilución. De estas cepas, 155 se correspondían con el primer hemocultivo realizado al paciente, el resto eran cepas provenientes de infección persistente, obtenidas a los tres ó siete días tras el inicio del tratamiento específico anti-MRSA.

Como muestra la **figura 24**, los aislamientos se clasificaron en cinco grupos mayoritarios según su perfil de PFGE y análisis *in silico* por WGS (ST, *spa*-tipo, *SCCmec* y LPV): CC5-IV clon Pediátrico (49%, *n* = 76), CC8 ST8-IV

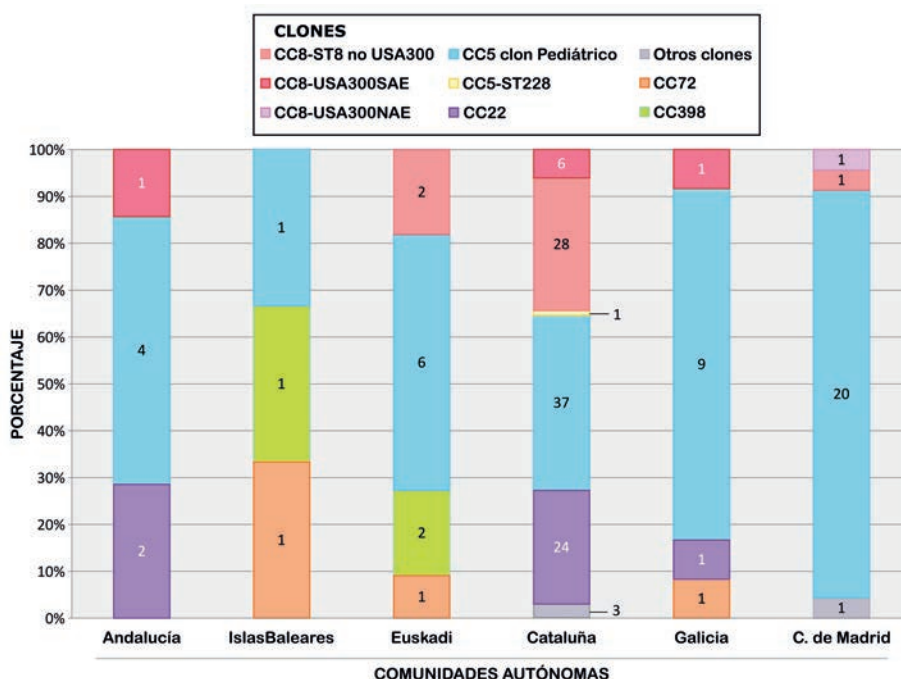


Figura 24. Distribución y frecuencia de los linajes de MRSA causantes de bacteriemia por Comunidad Autónoma. Otros perfiles de resistencia menores ($n < 3$) se muestran como "Otros clones". CC, complejo clonal; ST, secuenciotipo.

no USA300 (22%, $n = 34$), CC22-IV (17%, $n = 27$), USA300-SAE (5%, $n = 8$) y otros clones en menor presencia: CC72 ($n = 3$), CC398 ($n = 3$), CC1, CC30, CC45, CC5-ST228-I, CC88 y USA300-NAE ($n = 1$). Se detectó la presencia del clon CC5 Pediátrico en el 94% (17/18) de los hospitales participantes, seguidos del clon CC8 ST8 no USA300 (67%, 12/18), el clon CC22-IV (61%, 11/18) y el clon USA300-SAE (33% 6/18). Asimismo, durante el estudio se identificaron por primera vez seis nuevos perfiles de ST correspondientes a los siguientes grupos clonales: CC5 (ST7423, ST7456, ST7458), CC22 (ST7424), CC398 (ST7455) y CC8 (ST7459).

Tras el análisis molecular de estos aislados, se observó la presencia del elemento móvil COMER en ocho cepas de USA300-SAE y del elemento

ACME tipo I en una cepa de USA300-NAE. Todos los aislados tipo USA300 (USA300-NAE y USA300-SAE) eran portadores de los genes para la producción de la LPV *lukFS*. Además, dos cepas de ST8-IV (no USA300) también portaban los genes *lukFS* (ACME y COMER negativos). Cabe destacar que se detectó el gen *speG*, normalmente asociado al elemento ACME en 24 aislamientos del CC5 ST125-IV.

El SCCmec más frecuente en todo el **estudio 1** fue el de tipo IV, presente en más del 90% de los aislamientos secuenciados, tanto en clones esporádicos como endémicos. Los SCCmec tipo I y II, asociados a multirresistencia, fueron anecdóticamente detectados.

B.3. Estudio de la sensibilidad antibiótica y detección de genes de resistencia antimicrobiana

La **tabla 16** muestra el porcentaje de resistencia a los diferentes antimicrobianos estudiados mediante microdilución en cada clon de MRSA detectado. Todas las cepas enviadas se confirmaron como MRSA, resistentes a penicilina, cefoxitina y oxacilina, y sensibles a vancomicina, teicoplanina, linezolid, y cotrimoxazol. Los porcentajes de resistencia más elevados fueron a ciprofloxacino (88%), eritromicina (57%) y tobramicina (49%).

Tabla 16. Porcentajes de resistencia antibiótica en los clones de MRSA.

CLONES	PORCENTAJE DE RESISTENCIA (%)												
	CIP ≥2	ERI >4	TOB >2	CLI >2	FOS ≥32	GEN ≥8	MUP >256	CPT 2 ≥4		TET >8	CLO >8	FUS >1	DAP >2
CC5 clon Pediátrico (n=77)	99	60	62	16	13	6	6	4	1	1	6	3	-
CC8 ST8-IVc (n=31)	90	74	77	19	6	6	10	-	-	-	-	3	-
CC22 (n=27)	100	52	-	52	4	-	-	22	-	-	-	-	7
ST72 (n=3)	-	33	33	33	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CC398 (n=3)	67	33	67	33	-	67	-	-	-	100	-	-	-
USA300SAE (n=8)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Otros clones (n=6)	50	66	16	33	16	16	16	-	33	-	-	-	-
Total (n=155)	88	57	49	23	9	6	6	6	1	4	3	2	1

CMI, concentración mínima inhibitoria por CLSI¹⁹¹ (µg/ml); CC, complejo clonal; ST, secuenciotipo. Las siglas de cada antibiótico están definidas en el apartado 3.3b. de Materiales y Métodos.

En la **figura 25** se muestran los determinantes de resistencia de los aislamientos de MRSA del estudio multicéntrico ($n = 153$):

Resistencia a fluoroquinolonas: Las 133 cepas con CMIs más elevadas a CIP (>2 µg/ml) presentaban mutaciones en GyrA (S63L, S84L/V, S85P y E88G/K) y GrlA (S80F/Y, S81P y E84G/K). Tres cepas mostraron una CMI = 2 µg/ml para ciprofloxacino y presentaban una única substitución en ParC (S80F).

Resistencia a macrólidos y lincosamidas: Más de a mitad de aislados resistentes a eritromicina (59 de 87) presentaban los genes *msr(A)* y *mph(C)*. De las 36 cepas resistentes tanto a eritromicina como a clindamicina, 33 presentaban el gen *erm(C)*, tres el gen *erm(A)*, y una de ellas presentó también el gen *linA*.



Figura 25. (Siguiente página)

Figura 25. Principales determinantes genéticos de resistencia antibiotica en los aislamientos de MRSA causante de bacteriemia en hospitals españoles secuenciados ($n = 153$). Se indica el complejo clonal (CC) de cada aislamiento, el número de muestras que comparten un perfil de resistencia, la sensibilidad (verde), resistencia (marrón) u otras especificaciones (gris) para cada antibiótico, así como las concentraciones mínimas inhibitorias de cada antibiótico.

Resistencia a aminoglucósidos: De entre los 74 aislamientos resistentes a aminoglucósidos, diez fueron resistentes tanto a gentamicina como a tobramicina y debido a la presencia del gen codificante de AAC(6')-Ie-APH(2'')-Ia. Cuatro de estos también presentaban el gen *aadD* (*ant(4')-Ia*). Los 64 aislados restantes fueron resistentes a tobramicina debido a la presencia del gen *aadD*.

Resistencia a fosfomicina: En 10 de 14 aislados resistentes a fosfomicina se encontró el gen *fosB*, en dos cepas se encontraron sustituciones en GlpT (W282STOP y W355STOP). En los dos aislados restantes no se encontraron cambios asociados a resistencia a fosfomicina en MurA, GlpT ni UhpT.

Resistencia a ceftarolina: dos cepas del CC5 (ST228 y clon Pediátrico) fueron resistentes a ceftarolina, debido a la presencia de una substitución (N146K) en la PBP2a.

Resistencia a daptomicina: Una cepa resistente a daptomicina (CMI ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$) presentó una substitución en MprF (T345I), mientras que en otra cepa resistente (CMI = 2) no se encontraron mutaciones en los determinantes genéticos descritos en asociación a resistencia (*mprF*, *walkG*, o *dltA*).

Resistencia a cloranfenicol: Cuatro cepas ST125-IV fueron resistentes a cloranfenicol y presentaron el gen *catA*.

Resistencia a tetraciclina: Seis cepas resistentes, tres de ellas del complejo clonal CC398 y dos del tipo CA-MRSA (una USA300 y una del complejo clonal CC1). Dos presentaron el gen *tet(K)* junto al gen *tet(M)*; una el gen *tet(M)* junto al gen *tet(L)*; dos el gen *tet(K)* y una el gen *tet(M)*.

Resistencia a ácido fusídico: Tres cepas fueron resistentes (CMI >16 µg/ml) y presentaron *fusC*.

Resistencia a rifampicina: El único aislamiento, de ST228-I, presentó una mutación en *rpoB* (H481N).

Resistencia a cotrimoxazol: A pesar de no encontrar ningún aislamiento con resistencia fenotípica a trimetoprim-sulfametoxazol, cuatro portaban marcadores genéticos relacionados con la resistencia a este antibiótico: *dfrC* ($n = 2$), *dfrG* ($n = 1$) y *dfrK* ($n = 1$).

Mupirocina: Nueve cepas resistentes (CMI > 256 µg/ml) presentaron el gen *mupA*.

ESTUDIO 2. Epidemiología de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en pacientes atendidos en centros de atención primaria durante el 2018.

Durante el 2018 se obtuvieron 1150 aislamientos de *S. aureus* en el laboratorio de microbiología (Laboratori Clínic de l'Hospitalet) que recibía muestras de

Tabla 17. Características clínicas de los pacientes según la adquisición de la infección por MRSA.

Características Clínicas		Adquisición		p-valor
		Ámbito sanitario	Comunitaria	
		n (%)	n (%)	
Pacientes estudiados		184 (85,2)	32 (14,8)	-
Sexo	Mujer	99 (53,8)	15 (46,9)	ns
	Hombre	85 (46,2)	17 (53,1)	
Edad	≤65	38 (20,7)	27 (53,1)	<0,001
	>65	146 (79,3)	5 (15,6)	
Ingreso hospitalario reciente*		37 (20,1)	-	-
Residencias Crónicas Geriátricos	Temporal*	4 (2,2)	-	-
	Permanente	56 (30,4)	-	-
Tratamiento antibiótico reciente**		98 (53,3)	22 (68,7)	ns
Origen muestra	PPB	168 (91,3)	27 (84,4)	ns
	Orinas	13 (7,1)	2 (6,2)	ns
	Otros†	3 (1,6)	3 (9,4)	0,04

* Durante los últimos tres meses. ** Durante el último mes. † Otros orígenes: nasal, vaginal o esputo. PPB, piel y partes blandas; ns, no significativo.

pacientes con infección atendidos en distintos centros de asistencia primaria de la región sanitaria *Gerencia Territorial Metropolitana Sud* en la provincia de Barcelona. Entre estas muestras el porcentaje de resistencia a meticilina fue del 28,4% (327/1150). Los 327 aislamientos de MRSA enviados se obtuvieron de 216 pacientes, la mayoría procedentes de muestras de piel y partes blandas (90%; $n = 195$) como se muestra en la **tabla 17**.

El 56% de los pacientes había recibido tratamiento antibiótico en el mes previo a la recepción de la muestra. El 18,0% había estado hospitalizado en los 3 meses anteriores y el 27,0% residía en una residencia geriátrica, centros de alta dependencia o de cuidados crónicos. La mayoría de las cepas (85,2%; $n = 184$) se clasificaron como CO-HCA-MRSA, mientras que el 14,8% ($n = 32$) se clasificaron como CA-MRSA. Se clasificaron las cepas mediante PFGE. La mayoría de las cepas CO-HCA-MRSA (82,6%; $n = 152$) pertenecieron a clones endémicos hospitalarios incluidos dentro del CC8 (49,4%; $n = 90$) y del CC5 (33,7%; $n = 62$). Por el contrario, el clon más frecuente entre los aislamientos CA-MRSA fue el clon USA300 (50%; $n=16$) (ver **Figura 26**). Con respecto al clon USA300, los patrones de PFGE asociadas a la variante USA300-NAE fueron mayoritarios entre las cepas HCA-MRSA, mientras que la mayoría de las cepas CA-MRSA se asociaron con la variante USA300-SAE. El gen de la producción de la LPV se detectó mediante PCR en el 78% ($n = 25$) de los aislados CA-MRSA y en el 8,7% ($n = 16$) de los aislados HCA-MRSA. Todas las cepas USA300 fueron LPV positivas.

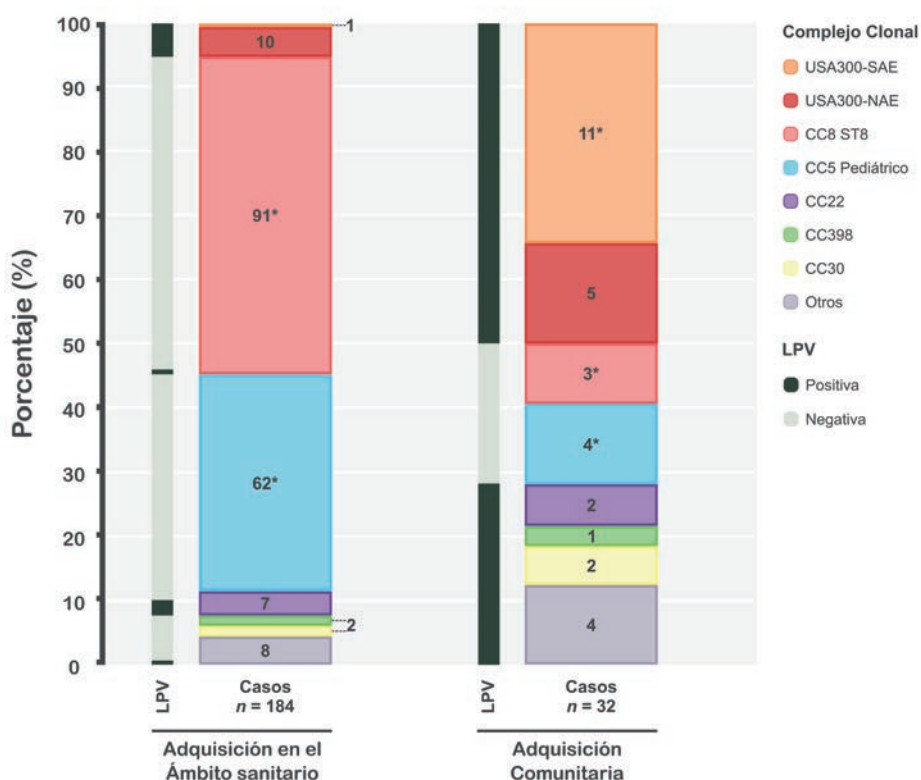


Figura 26. Distribución de los clones de MRSA según la relación del paciente con el sistema sanitario. Las barras verdes indican el porcentaje de detección de LPV en cada clon * Indica significación estadística ($p < 0,01$). CC, complejo clonal; ST, secuenciotipo; NAE, clon USA300 epidémico norteamericano; SAE, clon USA300 epidémico suramericano; LPV, leucocidina de Pantón-Valentine.

En cuanto a la resistencia a antibióticos, la tasa de resistencia a fluoroquinolonas y a aminoglucósidos fue significativamente superior en las cepas CO-HCA-MRSA ($p = 0,0001$). Se observó que el 90% de los aislamientos CO-HCA-MRSA eran resistentes a CIP, el 68% a TOB, el 49% a ERI, el 21% a CLI y el 9% a GEN. En el caso de los aislamientos CA-MRSA, estos porcentajes fueron del 31% para CIP y ERI, 19% para TOB, 9% para CLI y 6% para GEN. Todos los aislamientos fueron sensibles a ácido fusídico, cotrimoxazol, linezolid, teicoplanina y vancomicina (**Figura 27**).

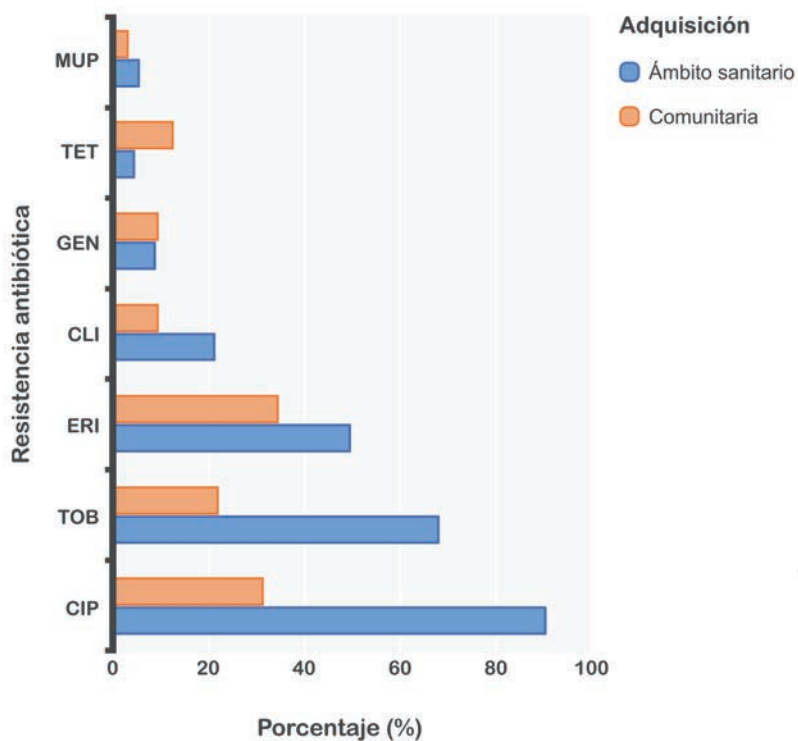


Figura 27. Porcentajes de resistencia a antibióticos entre los aislamientos de MRSA de adquisición comunitaria (naranja) y adquisición extrahospitalaria (azul).

ESTUDIO 3. Estudio de la actividad *in vitro* de ceftarolina en combinación con daptomicina y fosfomicina frente a MRSA.

Se seleccionaron 20 aislamientos de MRSA causante de bacteriemia y caracterizados de la **colección 1**, de pacientes atendidos en el HUB entre 1990 y 2019. Estas muestras estaban tipadas por PFGE y secuenciadas mediante WGS. Los aislamientos seleccionados pertenecían a 6 clones diferentes (**Tabla 18**): CC5 ST125/146-IVc, "clon Pediátrico" ($n = 5$); CC22 ST22-Vh ($n = 5$); CC5 ST228-I ($n = 4$); CC8-ST8-IVc ($n = 3$); CC8 ST8-IVa, "USA300-NAE" ($n = 1$); CC8 ST247-I, "clon Ibérico" ($n = 1$) y CC398 ST3207-Vc, LA-MRSA ($n = 1$).

Los rangos de CMI de los aislamientos estudiados fueron los siguientes: CPT 0,38 a ≥ 4 mg/L, DAP 0,064 a ≥ 2 mg/L y FOS 0,064 a >1024 mg/L. Dos aislamientos pertenecientes al clon CC22 mostraron resistencia a la DAP (CMI ≥ 2 mg/L) con sustituciones en MprF [T345I ($n = 1$) o L826F ($n = 1$)]. Todos los aislados CC5 ST228-I mostraron CMI elevadas (>2 mg/L) a CPT debido a sustituciones en la PBP2a: N146K ($n = 2$) o E239K ($n = 2$). En cuanto a la FOS, cinco aislados presentaron resistencia (CMI > 32 $\mu\text{g/ml}$), tres de ellos con el gen *fosB*. En otro de los aislados se detectó una delección de la guanina 509G, generando un codón STOP (G170STOP) y en un aislado ST228 no se detectó ningún determinante de resistencia descrito.

Se calculó el índice de concentración inhibitoria fraccional (ICIF) para cada combinación mediante el método de solapamiento de E-test (**Tabla 18**, **Figura 28**). En concreto, se observó un efecto sinérgico en el 40% (5/20) de las cepas con la combinación de CPT+DAP, y en ninguna de las cepas con la

Tabla 18. Cálculo del índice de la concentración inhibitoria fraccional de las combinaciones de ceftarolina con daptomicina o fosfomicina en cada aislado de MRSA.

CC	ST	<i>spa</i>	SCCmec	CPT CMI	DAP CMI	FOS CMI	CPT+DAP	ICIF	CPT+FOS	ICIF
5	125	t1006	IVc	0,75	0,38	64	Sinergia	0,4	Adición	0,9
5	125	t067	IVc	0,5	0,75	1	Sinergia	0,3	Indiferencia	1,1
5	125	t067	IVc	0,75	0,38	2	Adición	0,7	Indiferencia	1,1
5	125	t002	IVc	0,5	0,25	1024	Adición	0,6	Indiferencia	1
5	146	t067	IVc	0,5	0,25	64	Adición	0,6	Indiferencia	1,3
5	228	t2222	I	4	0,38	0,75	Sinergia	0,4	Indiferencia	1
5	228	t2222	I	4	0,75	96	Adición	0,7	Adición	0,8
5	228	t001	I	4	1	1,5	Adición	0,9	Adición	0,7
5	228	t001	I	2	0,25	16	Adición	0,6	Adición	0,6
8	247	t051	Ia	0,5	0,75	2	Adición	0,8	Indiferencia	1,1
8	8	t008	IVc	0,75	0,5	1024	Sinergia	0,2	Indiferencia	1
8	8	t2849	IVc	0,5	0,5	1	Sinergia	0,3	Indiferencia	1,1
8	8	t2849	IVc	0,5	0,25	2	Adición	0,5	Adición	0,9
8	8	t008	IVa	0,5	0,5	3	Adición	0,6	Indiferencia	1,5
22	22	t2107	IVh	1	2	0,064	Adición	0,9	Adición	1
22	22	t18469	IVh	1	4	0,064	Adición	0,9	Adición	1
22	22	t1036	IVh	0,75	0,064	12	Indiferencia	1	Adición	0,8
22	22	t379	IVh	1	0,38	0,064	Adición	0,7	Indiferencia	1,5
22	22	unknown	IVh	1	0,125	0,5	Adición	0,8	Adición	0,5
398	3207	t1451	Vc	<0,5	0,5	0,064	Adición	0,9	Adición	1

CMI, concentración mínima inhibitoria; CPT, ceftarolina; DAP, daptomicina; FOS, fosfomicina; ICIF, índice de la concentración inhibitoria fraccional.

combinación de CPT+FOS. Además, con la combinación CPT+DAP se observó un efecto aditivo en el 70% (14/20) de los aislados y en solo uno de los aislados se detectó una actividad indiferente. Por último, la combinación de CPT+FOS presentó un efecto indiferente en el 50% (10/20) y un efecto aditivo en la otra mitad (10/20). Ninguna combinación dio un efecto antagónico.

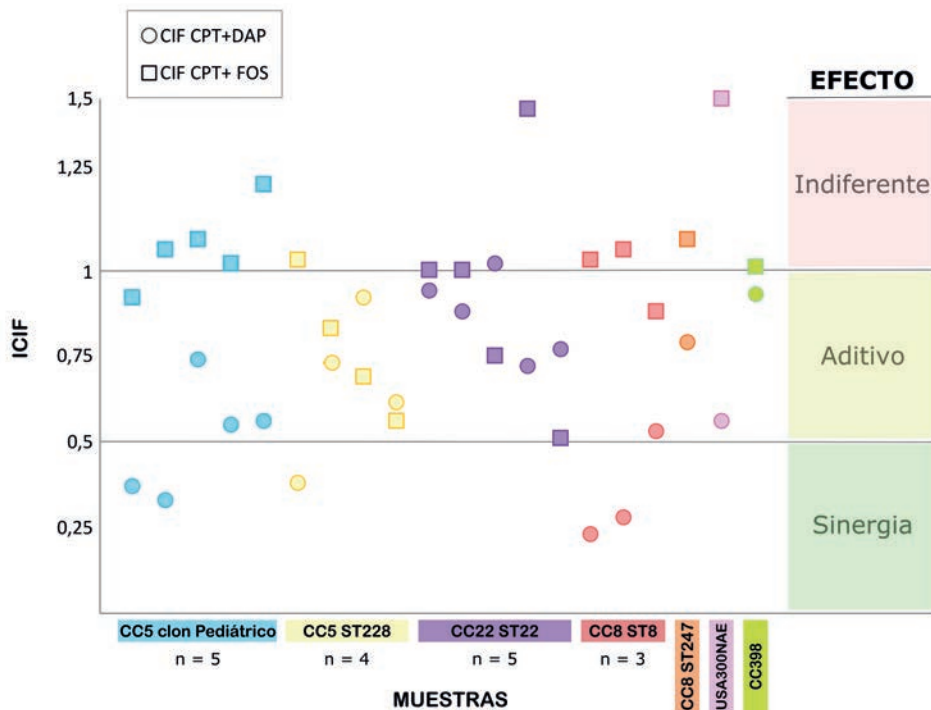


Figura 28. Representación del efecto antimicrobiano de la combinación de antibióticos según el índice de la concentración inhibitora fraccional (ICIF). Se muestran los valores CIF de la combinación de ceftarolina y fosfomicina (cuadrados) y de ceftarolina con daptomicina (círculos) de cada muestra, agrupadas por sus características clonales. Se consideró cada efecto como: sinérgico ($\text{CIF} \leq 0,5$); aditivo ($0,5 < \text{CIF} \leq 1$) e indiferente ($\text{CIF} > 1$ y ≤ 4). CC, complejo clonal; ST, secuenciotipo; CPT, ceftarolina; FOS, fosfomicina; DAP, daptomicina

DISCUSIÓN



"Claro que lo entiendo. Incluso un niño de cinco años podría entenderlo. ¡Que me traigan un niño de cinco años!"
-Groucho Marx

V. Discusión

Los resultados presentados en esta tesis describen la epidemiología molecular de la población de MRSA causante de bacteriemia en el Hospital Universitario de Bellvitge (HUB) y en otros hospitales españoles, así como en una selección de aislamientos de MRSA causantes de infección en pacientes comunitarios. A lo largo de esta tesis, se analizan también los cambios sucedidos en las características clínicas de los pacientes con bacteriemia y se estudian en detalle las bases moleculares de la resistencia antibiótica en MRSA en asociación con los distintos clones. Por último, se presentan los resultados sobre la actividad *in vitro* de la ceftarolina en combinación con fosfomicina y daptomicina en una selección de aislamientos que representan los clones de MRSA endémicos en el HUB.

En este capítulo se discuten de forma conjunta los principales resultados de los trabajos que componen la tesis. En ellos se muestra una visión global de la evolución de la epidemiología molecular del MRSA, de los cambios sucedidos en las características clínicas de los pacientes y de los cambios en los perfiles de sensibilidad antibiótica a lo largo del tiempo.

Incidencia y características clínicas de los episodios de bacteriemia por MRSA

El **estudio 1A** muestra los cambios en la presentación clínica de la bacteriemia por MRSA durante las últimas décadas. A pesar de que el porcentaje de resistencia a meticilina en *S. aureus* parece estar disminuyendo en Europa (15,5% en 2019)¹²⁴, la tasa de mortalidad de las infecciones bacteriémicas por

MRSA sigue siendo alta en nuestro hospital (36% en el período 2014-2019) con datos similares a los reportados en otras regiones del mundo (alrededor de 25-30%)^{124,205,206}.

En el HUB, la aparición y posterior diseminación del MRSA durante la década de 1990 fue causada por introducción del clon Ibérico¹¹². La tasa de resistencia a meticilina en aislados clínicos se ha mantenido estable a lo largo de los últimos años sobre el 20%, coincidiendo con datos del ECDC^{124,188}. En España se han realizado varios estudios sobre la prevalencia de *S. aureus* a nivel nacional (1986, 1991, 1994, 1996, 2002 y 2006)^{168,207-209}, observando tendencias epidemiológicas similares a las del **estudio 1A**, con un porcentaje de MRSA del 1,5% en 1986, que alcanzó un máximo del 31% en 2002 para estabilizarse posteriormente alrededor del 29% en 2006²¹⁰. Cabe destacar que en el HUB se ha observado un descenso en la incidencia de MRSA, a pesar del incremento en la complejidad de los pacientes. Esto probablemente esté relacionado de las medidas establecidas para el control del MRSA hospitalario, incluyendo la vigilancia activa de pacientes, la descolonización y también la mejoría en el manejo de los dispositivos intravasculares.

En la actualidad y en nuestro medio, la bacteriemia por MRSA se asocia principalmente a la adquisición en el ámbito sanitario extrahospitalario (60%), a diferencia de la predominancia de casos de origen nosocomial durante los años previos a 2002 (80-91%). Estos cambios observados son consistentes con los reportados en otros estudios^{205,206} y probablemente se deban al envejecimiento de la población y al aumento del uso de dispositivos protésicos, lo que también se ha relacionado con una mayor incidencia de endo-

carditis^{205,211}. En este sentido en el **estudio 1A** también se observó un desplazamiento progresivo en el foco de la infección desde la bacteriemia de catéter, más frecuente en los 90, hacía otras patologías con mayor riesgo de mortalidad como la neumonía y la endocarditis^{61,170}. Esto puede deberse tanto al cambio de perfil clínico de los pacientes, quienes actualmente tienen una edad más avanzada y presentan más comorbilidades (incrementando el riesgo de bacteriemia severa)^{22,212}, y/o a los reemplazos clonales de MRSA. En este sentido cabe destacar que la drástica disminución de la bacteriemia de catéter, menos asociada a gravedad^{213,214}, puede haber contribuido al aumento relativo de la mortalidad a 30 días observado desde 2008 en el HUB.

El estudio de la patogenia de la infección y el establecimiento de los factores concretos que se asocian a mortalidad no es sencillo. De hecho, la mayoría de los estudios sobre la patogenia de *S. aureus* en bacteriemia se centran en pocas variables como causa de mortalidad²¹⁵. En un metanálisis realizado por Cosgrove *et al.*²¹³ sobre más de 30 estudios en bacteriemias causadas por *S. aureus*, se encontró que la resistencia a meticilina se asociaba con una mayor mortalidad en comparación con la bacteriemia por MSSA. Además, en el mismo estudio se observó que los episodios asociados a catéteres intravenosos presentaban una mortalidad reducida, probablemente debido a que el foco de infección en estos pacientes es más fácilmente controlable²¹³. Otros trabajos sobre mortalidad en bacteriemias causadas por MRSA muestran resultados similares a los del **estudio 1A**, con porcentajes de mortalidad a los 30 días que oscilan entre el 20% y el 60%^{22,213}. En otro trabajo en el que se exploraron los factores asociados a bacteriemia polimicrobiana en

una cohorte de 349 pacientes, el MRSA también se relacionó más frecuentemente con la bacteriemia polimicrobiana ²¹⁶. Además, la mortalidad a los 28 días fue más elevada para las infecciones polimicrobianas (30%) que las monomicrobianas (15%).

Los pacientes con comorbilidades tienen más probabilidades de desarrollar bacteriemia por MRSA debido a su salud deteriorada y al mayor tiempo que pasan en los centros de atención médica²¹⁵. Un ejemplo de ello serían los pacientes en las unidades de críticos, que requieren ventilación asistida y el uso de dispositivos intravasculares, lo que puede llevar a complicaciones como la infección pulmonar y un mayor riesgo de bacteriemia polimicrobiana²¹⁶. Al comparar las características clínicas y la mortalidad en las infecciones causadas por los distintos clones endémicos del HUB (**colección 1**), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, lo que sugiere que en nuestro entorno los factores relacionados con el huésped son los principales responsables de los cambios observados en la mortalidad. Sin embargo, existen estudios en los que se demuestra que los factores bacterianos pueden tener un rol importante. Por ejemplo, en el estudio de Recker *et al.*²¹⁵ se mostró que los factores predictivos de mortalidad asociada a bacteriemia por *S. aureus* cambiaban en función del clon. Compararon dos poblaciones, una de pacientes con bacteriemia causada por el clon CC22 y otra en la que la bacteriemia estaba causada por el CC30 (asociado a adquisición comunitaria). La edad de los pacientes y las comorbilidades fueron factores predictivos de la mortalidad en las infecciones causadas por el CC22, que tenían una puntuación de Charlson más alta y eran significativamente mayo-

res, mientras que en el caso de los aislados CC30, éstos solo desempeñaron un papel marginal a la hora de predecir el resultado de la infección. Esto pone de manifiesto que para el estudio de las infecciones bacteriémicas por MRSA se deben tener en cuenta tanto los factores del huésped como los bacterianos, así como sus posibles interacciones.

Evolución de la resistencia antibiótica en MRSA y determinantes genéticos asociados

Durante el periodo incluido en el **estudio 1A** (1990-2019) se observó una reducción en las tasas de resistencia a la mayoría de los antimicrobianos. Esto se debe a la desaparición de genotipos asociados a perfiles de multirresistencia, portadores en su mayoría de *SCCmec* de gran tamaño, como el clon Ibérico ST247-Ia, causante de un brote significativo de MRSA en el HUB entre 1990 y 1995¹¹², con resistencia a macrólidos, lincosamidas, aminoglucósidos, fluoroquinolonas, rifampicina y tetraciclinas, y dejando muy pocas opciones terapéuticas para la época, limitadas casi en exclusiva al uso de glicopéptidos. Este clon dejó de detectarse de forma significativa en España y en otros países europeos a finales de los años 90^{168,217,218}. A pesar de ello, se han reportado aislamientos esporádicos posteriores en varios países como Australia²¹⁹, Croacia²²⁰, República Checa²²¹, Países Bajos³² e Italia²²².

El clon ST228-I, muy prevalente en el HUB durante el período 2002-2007¹⁰⁶, presentaba un perfil de resistencia similar al clon Ibérico (con la excepción de la tetraciclina y una menor CMI para la rifampicina) y un *SCCmec* tipo I. Este clon fue responsable de un incremento de la resistencia a rifampi-

cina, desde un 33% en 2004 hasta el 57% en 2006, debido a mutaciones en *rpoB*. Desde 2014, con la desaparición de este clon, la resistencia a la rifampicina es prácticamente indetectable en nuestro medio³². El clon ST228, denominado también “*South-Germanic clone*”, fue descrito por primera vez en Alemania en 1992, y se extendió por toda Europa, siendo prevalente en países como Bosnia y Herzegovina (34%, 2009-2017)²²³ y Croacia donde una variante *single locus* (ST111) causó el 78% de infecciones por MRSA de un hospital de Zagreb en 2004²²⁰. Como en el HUB, este clon causó brotes en otros hospitales europeos en la primera década del siglo XXI, sin embargo, no hay descripciones recientes de este clon en la bibliografía^{134,224}.

Durante el período de estudio más reciente (2014-2019) se detectaron múltiples perfiles de sensibilidad antibiótica, poniendo en evidencia el incremento en la diversidad de la población de MRSA. De ellos, sólo la resistencia a quinolonas, tobramicina y eritromicina estaban ampliamente distribuidas entre los aislados MRSA del HUB. Estos patrones de resistencia antibiótica se repitieron en el **estudio multicéntrico 1B**, con porcentajes de resistencia también coincidentes con los resultados de otros estudios a nivel nacional^{142,207-209}. La resistencia a las **quinolonas** está ampliamente extendida entre los clones MRSA debido a mutaciones en los genes *gyrA* y *griA* (*parC*), que codifican para subunidades de las enzimas ADN girasa y topoisomerasa IV respectivamente, y está asociada sobre todo a MRSA de origen hospitalario³². De hecho, se ha sugerido que la resistencia a fluoroquinolonas pudo proporcionar una ventaja evolutiva durante las primeras etapas de la transmisión de determinados clones como el CC5-IV Pediátrico o el CC22-IV (EMR-

SA-15) en los entornos hospitalarios europeos^{94,95,134}. En cuanto a la resistencia a **tobramicina**, su persistencia en el tiempo y en diferentes clones de MRSA puede deberse a la transferencia de determinantes de resistencia a los aminoglucósidos entre estafilococos coagulasa negativos (ECN) y *S. aureus*^{225,226}. Varios estudios recogidos en la revisión de Vats *et al.*²²⁷ enfatizan el hecho de que los genes de resistencia a aminoglucósidos (entre otros antibióticos) pueden originarse en bacterias no patógenas ambientales de entornos no hospitalarios²²⁸. De hecho, en ciertos hábitats naturales se favorece la adquisición de determinantes de resistencia extracromosómicos, entre ellos la resistencia a metales pesados, debido a la liberación de efluentes industriales y agrícolas, lo que resulta en la supervivencia de las bacterias más tolerantes a estos compuestos^{229,230}. Además, se ha descrito la coselección de genes asociados a resistencia a metales pesados y a aminoglucósidos debido a que forman parte de integrones de clase I y de casetes cromosómicos que contribuyen a la transferencia de estos genes^{231,232}. En el caso de MRSA hay varios elementos SCCmec como el tipo I, que incluye el gen de resistencia a aminoglucósidos *aadD* integrado en el plásmido pUB110⁸⁴, y otros genes responsables de resistencia a iones y metales pesados³². En cambio, otros clones de MRSA con casete SCCmec tipo IV albergan genes de resistencia a aminoglucósidos en el Tn4001 (incluido en el SCCmec tipo IVc)^{84,233}, en el cromosoma o en plásmidos conjugativos⁸⁴. Sin duda la gran plasticidad de MRSA para adquirir elementos móviles^{159,226} es uno de los factores principales que ha contribuido a esta persistencia y propagación de genes de resistencia a aminoglucósidos en el entorno sanitario. Por último, la persistencia de la resis-

cia a **eritromicina** a lo largo del tiempo puede estar relacionada con cambios en la prescripción antibiótica. Durante los últimos años se ha producido una disminución del consumo de macrólidos de acción corta mientras que ha aumentado el de macrólidos de acción prolongada (como la azitromicina)²³⁴. De esta forma, el uso profiláctico prolongado de azitromicina, sobre todo en pacientes con enfermedades respiratorias crónicas, puede haber ejercido una presión selectiva sobre la población MRSA y favorecer la diseminación de la resistencia a eritromicina.²³⁵ Por otro lado, de la misma manera que se ha comentado para los aminoglucósidos, existen varios tipos de casetes SCC-*mec* (II, III y VIII) que incluyen el gen *erm*(A) (MLS_B) dentro del transposón Tn554 en las regiones J2 (*joining regions*)^{84,233}. Además, algunos plásmidos transferibles de pequeño tamaño también pueden transportar determinantes de resistencia a macrólidos como *erm*(C) y *mph*(C) (*macrolide phosphotransferase*)⁸⁴.

Es importante destacar que tanto la resistencia a los antimicrobianos de primera elección para el tratamiento de la bacteriemia por MRSA (p.ej., linezolid, daptomicina y vancomicina), como a la ceftarolina, fue anecdótica en las dos colecciones hospitalarias (**1** y **2**). La resistencia a la **daptomicina** se relacionó con mutaciones en *mprF* (descritas previamente)⁷⁴ en dos cepas CC22 de pacientes tratados con daptomicina. Aunque la resistencia a daptomicina es infrecuente en nuestro entorno, hay que tener en cuenta la asociación descrita entre mutaciones en *mprF* y el CC22²³⁶. De esta forma, un aumento en la frecuencia de cepas del CC22, como el que se ha descrito en el **estudio 1**, podría influir en las tasas de resistencia a la daptomicina en el futu-

ro, requiriendo una estrecha vigilancia. La mayoría de los aislamientos del **estudio 1** con resistencia a **ceftarolina** presentaron alteraciones en la PBP2a y pertenecían a un único clon (ST228-I, 7/10) cuya aparición en España es previa al uso clínico de la ceftarolina¹⁰⁶. Hay que resaltar que la resistencia a ceftarolina sigue siendo anecdótica en aislados MRSA ^{237,238}. En el estudio de Urbán *et al.*²³⁸ se describe que el cambio de los puntos de corte EUCAST en 2018 con la introducción de la categoría de sensibilidad intermedia causó que muchos de los aislamientos de MRSA que se consideraban resistentes en publicaciones previas a 2018 estén ahora en la categoría de sensibilidad intermedia (CMI entre >1 y ≤ 2 µg/ml). En nuestra colección se han detectado varios aislamientos con resistencia intermedia a ceftarolina sin cambios conocidos en PBP2A ni en otras PBPs o GdpP, sobre todo en aislamientos de ST247 (5/10) y CC22 (6/37). La resistencia a ceftarolina también puede deberse a mutaciones en *mecA* como se describe en el trabajo de Kelley *et al.*⁷³, en el que se encuentra resistencia intermedia a ceftarolina en un aislado de 1998 perteneciente al clon ibérico ST247-la y en aislamientos pertenecientes al ST228 de un hospital suizo, donde este clon fue prevalente entre 1998 y 2010. Cabe destacar la detección de dos aislamientos de USA300-SAE resistentes a ceftarolina (CMI ≥ 4 mg/L) en el **estudio 1A**. Este clon no suele asociarse con resistencia a muchos antibióticos, como se describe en el estudio de Richter *et al.*²³⁷ que analiza más de 1000 aislamientos de USA300 y en el que se asocia específicamente a sensibilidad a ceftarolina²³⁹. En ninguno de los dos aislamientos se detectaron modificaciones conocidas en la PBP2a, PBP2, PBP3, PBP4 ni GdpP con lo que es probable que haya otras mutacio-

nes involucradas no descritas aún. De todas formas, se sigue investigando activamente el papel de estos genes y otras vías metabólicas relacionadas con la resistencia a ceftarolina^{91,240}.

Afortunadamente, la frecuencia de aislamientos de MRSA resistentes a la **vancomicina** (VRSA) sigue siendo anecdótica en nuestro país. De hecho, ninguna de las cepas estudiadas en la **colección 1** presentó resistencia a glicopéptidos. Según una revisión actual⁴², los plásmidos enterocócicos que contienen el gen *vanA*²⁴¹ tienen una viabilidad y capacidad de propagación limitadas en *S. aureus*²⁴². Además, en el caso de las cepas de MRSA, parece haber una incompatibilidad con la resistencia a meticilina y a los glicopéptidos, llamada “efecto balancín”²⁴³. Este fenómeno se ha aprovechado en el tratamiento de las infecciones por *S. aureus*²⁴⁴, ya que la transpeptidasa codificada por *mecA*, no es capaz de modificar el precursor de pared en los aislados VRSA²⁴⁵.

De forma similar, tampoco se encontró resistencia a **linezolid** en nuestras series de aislamientos. Esto es concordante con una publicación previa del HUB²⁴⁶ en la que, después de buscar activamente resistencia a linezolid en 2215 aislamientos de bacteriemia, sólo se encontró en un caso (gen *cfr*), relacionado con el consumo previo de linezolid. No obstante, dado que se han publicado informes de cepas de MRSA ST22-IV con plásmidos que contienen el gen *cfr*²⁴⁷, es recomendable mantener la vigilancia epidemiológica de este clon.

Diversidad genética de las cepas de MRSA causantes de bacteriemia

El **estudio 1A** documenta los cambios clonales ocurridos en los episodios de bacteriemia por MRSA en el HUB durante un largo periodo de tiempo. Utilizando una cohorte retrospectiva que abarca tres décadas e incluye a más de 754 pacientes, este estudio mostró como los clones CC5 Pediátrico y CC8 ST8-IVc (no USA300) desplazaron progresivamente a otros anteriormente dominantes en nuestra institución. La dominancia de estos dos linajes entre las cepas que causaban infección en el HUB durante los años 2000 fue descrita en algunos trabajos anteriores^{124,206}. El predominio y reemplazo progresivo de los clones CC5-IV Pediátrico y del CC8 ST8-IV (no USA300) sobre el antiguo clon Ibérico ST247-la podría explicarse por tres factores: (i) la ventaja evolutiva de portar elementos *SCCmec* de tamaño pequeño como el tipo IV²⁴⁸, (ii) cambios en la política de consumo de antibióticos, o (iii) cambios en las estrategias de control de infección^{94,134,249,250}.

En el **estudio 1B**, se mostró una situación parecida en otros hospitales españoles: solo unos pocos clones causaron la mayoría de las bacteriemias analizadas y estos clones se correspondían con los mismos detectados en el HUB. Así, más de la mitad de los aislamientos pertenecieron a los clones Pediátrico CC5-IV (49%) y CC8 ST8-IVc (no USA300) (22%). El clon de MRSA pandémico CC5-IV o clon Pediátrico se ha expandido por todo el mundo durante las últimas décadas^{32,134}. Mientras que en otros países europeos se ha descrito que el CC5-IV dominante es el ST225²⁵¹, en España este clon Pediátrico presenta principalmente dos variantes *single locus* del ST5: el ST125, predominante en el **estudio 1B**, y el ST146. El ST125 y el ST146 no son habi-

tuales en otros países, con solo 58 secuencias disponibles del ST125 y 45 del ST146 en la base de datos PubMLST (<https://pubmlst.org/>), la mayoría de ellas depositadas desde España y Alemania (en comparación a las más de 4000 secuencias de ST5). La alta prevalencia de estos dos ST concuerda con otros estudios que describen la dominancia de este clon en España desde inicios del siglo XXI^{142,207,209,218,252,253}. Con respecto al clon CC8 ST8-IV existen múltiples sublinajes, algunos de ellos considerados emergentes o “de reciente aparición” (como el USA500 o el USA300) que hacen que la clasificación de este clon sea compleja y esté en continuo cambio¹⁷³, siendo el genoma accesorio (ausencia/presencia de toxinas, LPV, elementos genéticos móviles o subtipos de SCCmec-IV) el factor clave para su diferenciación^{32,173,254,255}. El clon CC8 ST8-IV (no USA300) es un clon que ha tenido una gran diseminación internacional y ha sido descrito en múltiples estudios tanto españoles como extranjeros, en baja proporción en 2009, pero en aumento a partir de 2014^{115,207,218,251–253,256,257}. Por ejemplo, en el estudio epidemiológico estadounidense de Tickler *et al.*²⁵⁸ se observa un aumento significativo de cepas ST8 con *spa* tipo t008, SCCmec tipo IV y negativas para la LPV y ACME, características similares a las del clon endémico descrito en el **estudio 1**.

En nuestras tres colecciones (**1**, **2** y **3**) se han detectado aislamientos pertenecientes al CC398, asociado a la ganadería porcina y a la resistencia a tetraciclinas²⁵⁹. Estudios recogidos por el ECDC²⁶⁰ describen cepas LA-MRSA detectadas en cerdos portadoras del gen *cfr* y del gen *mupA* de resistencia a mupirocina, lo cual es preocupante a nivel de tratamiento y descolonización, e indica la importancia del seguimiento de estas cepas, aunque continúan sien-

do infrecuentes en el ambiente sanitario. En los **estudios 1 y 2** se muestra que el clon CC398 está presente en Barcelona, esporádicamente en las bacteriemias del HUB y en mayor proporción en las muestras de la comunidad. En estudios previos del HUB ya se describió que las infecciones de los pacientes hospitalizados causadas por el CC398 tenían en su mayoría un origen comunitario¹²⁷. Todos los aislamientos CC398 se asociaron al SCCmec tipo V, que puede transportar genes de resistencia al zinc, y que se ha hipotetizado que podría ser debido a un mecanismo de coselección debido al uso de metales en la formulación de los piensos animales²⁶¹.

La capacidad de producir biofilm es un factor que puede contribuir a la persistencia de los clones endémicos de MRSA en el entorno hospitalario. Por un lado, la formación de biofilm dificulta la penetración de antibióticos grandes como los glucopéptidos, impidiendo alcanzar concentraciones elevadas en el interior del biofilm. También se ha descrito como algunas células de *S. aureus* dentro del biofilm utilizan un metabolismo anaerobio asociado con la resistencia a aminoglucósidos⁸⁴. Un estudio reciente llevado a cabo con cepas del HUB, ha demostrado que los clones CC5-IV Pediátrico y CC8 ST8-IV poseen una variante del factor de virulencia *sasG* que se asocia con una mayor capacidad para formar biofilm³⁹. Este trabajo sugiere que estos clones tienen una mayor probabilidad de éxito en el entorno hospitalario, coherente con los resultados del **estudio 1**, ya que esta variante de *sasG* les puede conferir una mayor capacidad de adherencia y formación de biofilm, permitiendo su supervivencia durante largos periodos de tiempo sobre superficies o material médico, como prótesis, catéteres, etc.

El último clon de MRSA que se ha detectado de forma significativa causando bacteriemia en nuestro ámbito es el CC22-IVh (o EMRSA-15). Se trata de un clon internacional³² asociado tanto a infecciones adquiridas en el ámbito sanitario como en la comunidad²⁶². De hecho, el CC22-IVh es una de las principales causas de bacteriemia por MRSA en algunas zonas de Reino Unido, llegando a causar entre el 47% y el 85% de casos^{32,263}. En una revisión reciente de Mairi *et al.*²⁶⁴, se recogen estudios que identifican al MRSA ST22 como predominante en zonas no solo de Europa, sino también de Asia y Oriente Medio. En el trabajo de Holden *et al.*⁹⁵ se ha propuesto que la expansión inicial de este clon en Europa podría deberse a la adquisición de resistencia a las fluoroquinolonas, ya que esta expansión coincidió con la introducción de estos fármacos en el ámbito hospitalario. Sin embargo, dado que la mayoría de los clones epidémicos de MRSA adquiridos en entornos sanitarios son resistentes a quinolonas, probablemente en su dispersión también estén involucrados otros rasgos genómicos.

Concordancia entre métodos de tipificación clásicos y por secuenciación del genoma completo (WGS)

Las técnicas clásicas de tipificación molecular, como el PFGE, el MLST, el *spa-typing*, *SCCmec-typing*, y el *agr-typing* han sido ampliamente utilizadas para detectar y diferenciar las distintas cepas y linajes de MRSA y su propagación geográfica^{130,144,196,265-267}. Sin embargo, estos métodos tienen limitaciones, especialmente por su baja resolución^{146,265} y como se ha comentado anteriormente, las infecciones clínicas por MRSA están causadas por unos pocos linajes¹⁶⁷ que no siempre pueden diferenciarse con suficiente precisión

mediante los métodos clásicos²⁶⁸. Un ejemplo de ello serían las cepas del CC8 ST8, como el USA300 o el USA500, que pueden tener el mismo *spa*-tipo, *SCCmec*, ST, *agr* y patrón de resistencia antibiótica¹⁷³.

Actualmente, la caracterización de MRSA se basa en la secuenciación del genoma completo por NGS, ya que la gran cantidad de datos que genera permite hacer un perfil genético preciso excelente para la investigación epidemiológica^{265,268,269}. Varios estudios recogidos por Durand *et al.*²⁶⁸ han demostrado la utilidad de la tipificación basada en NGS en estudios de brotes prospectivos y retrospectivos y en comparación con los resultados obtenidos con técnicas clásicas de PFGE, MLST, *spa-type*, entre otras^{36,116,270}. En este sentido, los datos obtenidos por WGS en el **estudio 1** y comparados a estudios previos del HUB^{23,127,170} respaldan el poder discriminatorio superior de la WGS para la tipificación de MRSA.

El *spa-typing* es el método mas utilizado en muchos estudios, sobre todo por su gran base de datos²⁷¹, y sus resultados se relacionan con STs concretos^{174,271,272}. Sin embargo, tiene un bajo poder discriminatorio comparado con el PFGE y no permite distinguir brotes intrahospitalarios de aislamientos habituales^{14,145}. Nuestros resultados apoyan que el uso de WGS para los estudios de clonalidad de MRSA confiere una mayor sensibilidad y especificidad que el **PFGE**, como ya se ha descrito en otras publicaciones^{264,271,273}. Aunque el PFGE sigue siendo muy útil para la vigilancia de brotes intrahospitalarios²⁷¹, teniendo en cuenta que el coste de la secuenciación ha disminuido considerablemente, una aproximación podría ser combinar los dos métodos:

PFGE como método de *screening* en los laboratorios con un alto número de muestras, y así poder seleccionar las más interesantes para WGS.

Mediante la tipificación por WGS del casete **SCCmec** de las cepas secuenciadas en el **estudio 1**, se obtuvo el tipo de SCCmec en la inmensa mayoría, a excepción del subtipo de aquellas en las que el casete estaba dividido en varios *contigs*, en estos casos se tuvo que realizar un análisis en profundidad mediante mapeo de las lecturas en genomas de referencia. En comparación con la PCR, la secuenciación NGS del elemento SCCmec permitió tipificar aislamientos que con la PCR no había sido posible. Estos resultados nos muestran que WGS es una técnica más precisa para la caracterización del SCCmec. Desde el uso de la NGS, el número de tipos y subtipos de SCCmec ha aumentado^{85,87} y esto supone un desafío para las metodologías basadas en PCR. La PCR multiplex puede detectar el tipo de casete, pero no su estructura y por tanto es menos discriminativa^{175,264}. Algunos protocolos de PCR multiplex^{150,196,264} incluyen una gran cantidad de oligonucleótidos y de condiciones de PCR, sin obtener *a priori* resultados tan eficientes como por WGS. Por tanto, la tipificación del casete SCCmec debería sustituirse, cuando sea posible, por la secuenciación del genoma completo.

La utilidad de la NGS para la investigación epidemiológica y de brotes está más que demostrada, pero sigue estando limitada por el tiempo que requiere y el reto que supone el análisis del gran volumen de datos que genera^{224,268,274}. Por otro lado, están las limitaciones económicas o la necesidad de resultados rápidos²⁷⁵, que complican su uso rutinario en muchos laboratorios, así que estos métodos clásicos no parece que vayan a dejar de utilizarse a

corto plazo en la literatura, ya que el uso de estas técnicas de tipado sigue contribuyendo a la visualización y entendimiento de la diversidad clonal y la transmisión de MRSA tanto en la comunidad como en el entorno sanitario²⁷⁶.

La secuenciación por NGS es una herramienta esencial hoy en día en el ámbito de la microbiología clínica para el análisis genómico de microorganismos en general, y de *S. aureus* en particular. Sin embargo, el desafío clave reside en dar un sentido a los datos obtenidos por WGS e interpretarlos rápidamente. En ocasiones la mayor limitación del análisis por WGS es la integridad y actualización de las bases de datos de referencia que se utilizan, como ResFinder²⁰³.

Análisis del pangenoma de los clones endémicos de MRSA

En el estudio de Bosi *et al.*¹⁵⁷ se analizó el pangenoma de *S. aureus* con una muestra de 64 genomas. Observaron que el pangenoma (conjunto de genes presentes en el conjunto de genomas estudiados) estaba formado por 7.457 genes. De ellos, 1.441 eran *core* (19%), 2871 eran genes accesorios (38%) y 3.145 eran únicos (42%). Normalmente en *S. aureus* los genes *core* están relacionados con procesos metabólicos, de transcripción y de traducción²⁶⁵. En cambio, más del 15% del genoma de *S. aureus* se asocia a genes accesorios y únicos relacionados normalmente con elementos genéticos móviles^{157,226,265}.

En el análisis del pangenoma del **estudio 1A**, detectamos un total de 3778 genes distintos entre la muestra de 114 genomas seleccionados. De

estos genes, 1679 (44%) se clasificaron como *core* al estar presentes en el 99%-100% de los genomas. Se ha descrito que el genoma de *S. aureus* contiene unos 2.800 genes de media¹⁵⁷. Esto implica que estos genes *core* representan más de la mitad del genoma, en concordancia con los resultados de nuestro estudio. En los análisis del pangenoma, la inclusión de más genomas va asociada a un aumento del número de genes detectados, pero se mantiene la cantidad de genes *core*. Esto indica que el aumento en el número total de genes se debe a un aumento del genoma accesorio^{157,277,278}. De esta forma, los pangenomas de los CC8 y CC5 analizados en el **estudio 1A** presentaron la proporción de genoma accesorio más elevada, lo que podría explicarse por el mayor número de genomas de estos CC incluidos en el estudio. Además, los clones Pediátrico, CC8 ST8-IV y ST247 han estado ampliamente distribuidos durante un largo periodo de tiempo, de modo que han tenido mayor oportunidad de evolucionar genéticamente. En contraste, el clon ST228, asociado a un brote en el HUB durante un periodo de tiempo más corto, presentó un genoma accesorio más pequeño¹⁰⁶. Hay que resaltar también que una mayor proporción de genoma accesorio puede asociarse a una mayor adaptación al entorno y al hospedador^{181,278}, explicando porque estos tres clones previamente mencionados han tenido un éxito epidemiológico global.

Un futuro análisis pangenómico en profundidad mediante la anotación de todos los genes detectados en nuestra colección de MRSA en España permitiría identificar el conjunto de genes de virulencia, de resistencia y genes metabólicos de cada linaje, lo cual nos permitiría entender mejor el origen de ciertos genes de resistencia y virulencia, así como la dinámica de su propa-

gación. Por ejemplo, en el estudio de Planet *et al.*²⁷⁹ se observó que los aislamientos de USA300 eran los únicos capaces, entre varios clones, de catabolizar la espermidina gracias al gen *speG* (espermidina acetil-transferasa) asociado al elemento ACME. La espermidina potencia la eliminación de *S. aureus* por los queratinocitos de la piel humana^{157,279}, por lo tanto, una hipótesis sería que la adquisición de *speG* haya podido contribuir a la rápida propagación de USA300 en la comunidad. Además, este gen tiene un origen en *S. epidermidis*, parte de la microbiota cutánea humana, y podría haber sido transferido horizontalmente a cepas del USA300²⁷⁹. Así, futuros análisis comparativos entre especies de estafilococos podrían aportar información valiosa que explique su capacidad de diseminación, su metabolismo y su patogenicidad. En nuestro **estudio 1**, el gen *speG* se ha detectado en 24 aislamientos pertenecientes al clon Pediátrico CC5 ST125-IV y recientemente, se han encontrado regiones del elemento ACME en cepas no pertenecientes al clon USA300²⁸⁰, entre ellas cepas CC5 ST5 en Japón⁸⁷. La identificación de ciertas rutas metabólicas que faciliten la patogenicidad o la diseminación estafilocócica, podría utilizarse en el diseño de nuevos agentes antibacterianos, cuya diana fueran precisamente estos componentes del metabolismo bacteriano, como sugiere Bosi *et al.*¹⁵⁷.

Epidemiología, diversidad clonal y sensibilidad antibiótica de MRSA extrahospitalario y comunitario

La definición de MRSA de adquisición comunitaria o CA-MRSA se ha utilizado para referirse tanto a las diferencias genéticas de los aislamientos de este tipo de cepas de MRSA, como a las características epidemiológicas de las infecciones causadas²⁸¹⁻²⁸³. Sin embargo, a menudo se usan definiciones más simplistas del término CA-MRSA, considerando todas las infecciones que ocurren en pacientes ambulatorios o en pacientes hospitalizados con infección por MRSA en las primeras 48h de hospitalización²⁸³. En el **estudio 2**, se siguió la definición más comúnmente aceptada, basada en: *i)* el entorno en el que se origina la infección por MRSA, *ii)* la exposición del paciente a entornos de atención médica, *iii)* las características genéticas y el perfil de sensibilidad antimicrobiano de los aislamientos y *iv)* el origen de la infección y la clínica que manifiesta el paciente²⁸¹.

A finales de la década de los 90, empezaron a aparecer cepas de MRSA asociadas a infecciones en pacientes no hospitalizados o CA-MRSA, que causaron varias muertes en niños en Estados Unidos. A partir del año 2000, empezaron a describirse brotes de MRSA adquiridos en la comunidad, en contextos masificados y con más contacto personal como atletas, niños, militares y prisioneros^{84,178}. Estas cepas eran diferentes a las hospitalarias, infectaban a una población diferente, causaban otro tipo de infecciones, diferían en los patrones de sensibilidad a antibióticos y se propagaban más rápidamente entre personas sanas²⁸³. A partir de principios del siglo XXI, hubo un cambio dramático en la estructura poblacional de los clones de MRSA en

Estados Unidos, ya que el CA-MRSA se convirtió en una de las principales causas de infecciones piel y partes blandas (IPPB) debido al aumento del clon USA300^{284,285}. Este clon se definió originalmente por su perfil de campo pulsado y no estaba genéticamente relacionado con las cepas clásicamente hospitalarias del CC8, como el clon Ibérico²⁵⁸. Por lo general, este clon muestra sensibilidad a la mayoría de clases de antibióticos²³⁹, con tasas generales de resistencia antibiótica más bajas que en otros clones endémicos^{183,258,282}.

La epidemiología global del MRSA comunitario es muy heterogénea, con importantes diferencias geográficas en los clones predominantes en cada región y la frecuencia con la que se aíslan, como es el caso del ST30-IV (*Southwest Pacific clone*), el ST59-V en Asia Central, el ST1-IV (USA400) en Asia Oriental y Oceanía y el ST80-IV en Europa, Norte de África y Oriente Medio^{264,281}. Contrariamente a la epidemiología actual del USA300 en Estados Unidos, donde recientemente se ha afianzado en el ambiente hospitalario como causa de bacteriemia nosocomial²⁸⁶, en España las infecciones por este clon se originan mayoritariamente en la comunidad^{168,287,288}, como se ha observado en los **estudios 1 y 2**. Existen dos variantes principales del clon USA300: el USA300NAE, portador del elemento móvil catabólico de arginina (ACME) y otra variante portadora del elemento de resistencia al cobre y al mercurio COMER, denominada variante latina o USA300SAE^{180,183,254}.

La infección clínica más común en las muestras del **estudio 2** fueron las infecciones de PPBs, tanto en las muestras CA-MRSA como en las CO-HCA-MRSA, así como se observan en otros estudios comunitarios recogidos en la revisión de Chua *et al.*²⁸¹. En nuestra **colección 3**, la mitad de las cepas

CA-MRSA analizadas fueron USA300 LPV positivas, con predominio de la variante USA300SAE, mientras que en el grupo CO-HCA-MRSA la distribución clonal fue similar a la del **estudio 1**, con predominancia del CC8 ST8 LPV negativo, seguido del CC5 pediátrico y del CC22. En este último grupo, el USA300 supuso un 5%, la mayoría (9/10) USA300NAE LPV positivas. No hay una razón específica descrita que explique la mayor frecuencia de USA300SAE respecto al USA300NAE, pero podría estar reflejando el alto número de movimientos migratorios entre España y América latina, donde este clon es prevalente^{180,289,290}.

Mientras que los aislados USA300SAE únicamente presentaban resistencia a β -lactámicos, a excepción de un aislado resistente a tetraciclina, todos los aislados USA300NAE presentaron resistencia a ciprofloxacino, y en menor medida a otros grupos de antibióticos. Se han descrito evidencias del aumento de adquisición de resistencias en el USA300NAE en Estados Unidos, con perfiles de resistencia a macrólidos, lincosamidas, quinolonas y tetraciclinas e incluso resistencia a gentamicina mediada por plásmidos²⁸¹. También se han detectado casos de USA300NAE con sensibilidad reducida a daptomicina y vancomicina (VISA)²⁸¹. Esta evolución hacia perfiles de resistencia más amplios por parte de cepas CA-MRSA, también se ha descrito en el clon de CA-MRSA más común en Europa, el ST80-IV LPV positivo, y el LA-MRSA CC398, ambos asociados normalmente a la resistencia a tetraciclinas^{259,281}, y cuya detección hospitalaria se ha asociado con resistencia a quinolonas^{129,264,281}. Probablemente, esto puede deberse al incremento del contacto de las cepas CA-MRSA con los ambientes hospitalarios.

Entre el resto de los clones detectados con mayor frecuencia, el CC22, CC5 Pediátrico y el CC8 LPV negativo, expresaron perfiles de resistencia idénticos a los detectados en el **estudio 1** hospitalario, con predominancia de la resistencia a fluoroquinolonas, macrólidos y aminoglucósidos. Muy pocos aislamientos de estos tres clones se consideraron como estrictamente CA-MRSA, destacando un aislado CC22 LPV positivo. Se ha descrito que el clon CC22 se encuentra no solo en hospitales sino en residencias y centros de salud, etc. y debido a su relevancia epidemiológica, habría que vigilar su expansión en la comunidad³². Aunque el **estudio 2** confirma el papel predominante de USA300 como causa de infecciones estrictamente CO-MRSA en nuestra área geográfica; globalmente la mayoría de aislados observados en la comunidad se relacionaron con clones endémicos hospitalarios y asociados a adquisición CO-HCA-MRSA.

Actividad *in vitro* de la combinación de antibióticos frente a MRSA

La daptomicina y la vancomicina se consideran opciones de tratamiento antibiótico de primera línea frente a la bacteriemia por MRSA^{291,292}. Sin embargo, se han descrito cepas MRSA con sensibilidad reducida a estos antibióticos en muchas partes del mundo^{51,75,76}. Curiosamente, algunos estudios muestran mejores resultados en pacientes con bacteriemia por MRSA tratados con daptomicina cuando la CMI de vancomicina es superior a 1 µg/ml, con tasas de mortalidad menores²⁹³. A pesar de ello, varios ensayos aleatorizados demuestran también que la daptomicina puede presentar fallo terapéutico en infecciones graves por MRSA incluso a dosis altas^{65,294,295}. Además, estos fra-

casos terapéuticos se asocian a la aparición de resistencia a la daptomicina durante el tratamiento, especialmente en pacientes con bacteriemia persistente, infecciones por dispositivos y endocarditis^{291,296,297}. En consecuencia, se han probado nuevas estrategias terapéuticas²⁹² y, de hecho, se recomienda el uso de combinaciones de antibióticos como estrategia preventiva de las resistencias a los antibióticos de primera línea, especialmente en el contexto de la bacteriemia persistente por MRSA^{71,214,298}.

En este sentido, varios estudios *in vitro* han evaluado el efecto sinérgico de combinaciones de antibióticos^{291,299}. La combinación de daptomicina y fosfomicina ha demostrado ser eficaz para el tratamiento de la bacteriemia por MRSA, dado que tienen mecanismos de acción diferentes y presentan un efecto sinérgico^{300,301}. De hecho, este tratamiento parece ofrecer resultados superiores que la terapia antibiótica estándar para la bacteriemia por MRSA³⁰². Esta combinación se estudió en el ensayo clínico BACSARM⁶⁶ al que pertenecen las muestras de la **colección 2**, mostrando un incremento del éxito terapéutico en un 12% respecto a la monoterapia con daptomicina, aunque sin alcanzar significación estadística. Esta combinación también mostró una menor tasa de fallo microbiológico y bacteriemia complicada, pero se observaron efectos adversos con más frecuencia, lo que puede limitar su uso⁶⁶.

La ceftarolina presenta una mejor difusión pulmonar que la daptomicina o la vancomicina y una potente actividad frente a VISA, VRSA, CA-MRSA y cepas resistentes a daptomicina³⁰³. Su uso para infecciones graves de MRSA (endocarditis y bacteriemia) es cada vez mayor, mostrando resultados

prometedores^{291,298,299,304}. En un ensayo clínico de 2019 se comparó el tratamiento inicial de la bacteriemia por MRSA con monoterapia estándar (de vancomicina o daptomicina) y con la combinación de daptomicina y ceftarolina³⁰⁵. En este estudio se observaron diferencias estadísticamente significativas en la mortalidad hospitalaria entre los dos grupos (0% para la terapia combinada y 26% para la monoterapia), lo que llevó a detener el estudio por consideraciones éticas. Sin embargo, un estudio observacional retrospectivo multicéntrico de 126 pacientes con bacteriemia por MRSA, evaluó la eficacia de la ceftarolina sola y en terapia combinada (principalmente con daptomicina) y no se encontraron diferencias significativas entre la eficacia de la ceftarolina sola (70%) y en combinación (65%)³⁰⁶.

La bibliografía muestra que la combinación de ceftarolina y daptomicina se ha probado *in vitro* en varias ocasiones^{307,308}. Un estudio multicéntrico en EE.UU. en 2014 comprobó la eficacia de la terapia de rescate con esta combinación en episodios de bacteriemia por *S. aureus* (26 casos, 20 de ellos MRSA)³⁰⁴. Además, demostraron la sinergia *in vitro* de la daptomicina y la ceftarolina en uno de los casos de MRSA mediante las técnicas de curvas de letalidad y tablero de ajedrez³⁰⁴.

Nuestros resultados del **estudio 3** muestran que la combinación de ceftarolina y daptomicina presenta una actividad sinérgica o aditiva *in vitro* en la mayoría de los aislamientos de MRSA, por lo que puede añadir un beneficio potencial al tratamiento. De igual forma, el trabajo de García *et al.* de 2016³⁰⁸ muestra resultados similares mediante la técnica de lectura de la proporción CMI:CMI por solapamiento de tiras de gradiente E-test. En Gil Romero *et al.*

de 2020³⁰⁷ obtuvieron resultados de adición (53%) y sinergia (6%) frente a MSSA, pero frente a MRSA no se observaron efectos sinérgicos sino aditivos (81%).

Hay que resaltar que la mayoría de trabajos no se acompañan de un estudio en detalle de la epidemiología molecular de los aislamientos, por lo que sus resultados no pueden ponerse en contexto de los linajes específicos de MRSA. Por tanto, parte del objetivo del **estudio 3** fue el de comprobar si estas combinaciones tenían una actividad sinérgica *in vitro* contra los clones de MRSA epidémicos causantes de bacteriemia en el HUB, algunos de ellos con sensibilidad disminuida a los antibióticos probados. En este sentido, presentamos evidencias de que la combinación de ceftarolina con daptomicina fue activa frente a todos los aislamientos seleccionados, incluidos los que presentaron resistencia a ceftarolina (ST228) y aquellos resistentes a daptomicina (ST22).

Por otro lado, la actividad *in vitro* de fosfomicina con ceftarolina se ha probado en un estudio reciente mediante tablero de ajedrez en cepas de *S. aureus* VRSA y VISA (cinco de ellos MRSA) con un resultado de sinergia en todos los aislamientos ($n = 18$)³⁰⁹. En cambio, los resultados del **estudio 3** no mostraron efecto sinérgico, sino aditivo e indiferente a partes iguales (50%). Una explicación a esta diferencia puede ser que las poblaciones de ambos estudios eran diferentes y las técnicas utilizadas también, por lo que se vuelve a resaltar la importancia de la caracterización molecular en los estudios *in vitro*. Respecto a la metodología utilizada, no existe ningún método para detectar sinergias *in vitro* estandarizado y, de hecho, se describe que la correla-

ción de los resultados entre técnicas puede ser diferente entre publicaciones¹⁹³. A pesar de ello, en general se considera que la mayor concordancia se da con resultados obtenidos por curvas de letalidad y por solapamiento de tiras de gradiente, ya que se han descrito errores de reproducibilidad al usar el método de tablero de ajedrez^{309,310}. En futuros estudios, la combinación de estos y otros antibióticos modernos como el ceftobiprole se podrían probar en más linajes clonales y mediante las tres técnicas de análisis de la actividad *in vitro* (solapamiento de E-test, curvas de letalidad y tablero de ajedrez) en paralelo, con tal de comprobar estos resultados sin sesgos metodológicos.



CONCLUSIONES

"I do know some things"
– Jon Snow

VI. Conclusiones

- i. La presentación clínica de la infección bacteriémica por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en el Hospital Universitario de Bellvitge ha cambiado en las últimas décadas. Se ha convertido en una infección que ocurre en pacientes de edad avanzada, afectados por múltiples comorbilidades, en contacto estrecho con el sistema sanitario y asociada a una elevada mortalidad.
- ii. El clon ST247-MRSA-Ia (clon ibérico), dominante en la década de los 90, fue sustituido progresivamente por poblaciones bacterianas pertenecientes al clon Pediátrico CC5-MRSA-IV (ST125, ST5 y ST146) y al CC8-MRSA-IV (no USA300) que se han mantenido mayoritarias hasta el final del estudio. Esta tendencia se ha observado tanto en el Hospital Universitario de Bellvitge, como en otros hospitales españoles.
- iii. La resistencia a fluoroquinolonas, macrólidos y aminoglucósidos forma parte del fenotipo de resistencia antibiótica más común entre los aislamientos contemporáneos de MRSA. Este perfil de resistencia es compartido por ambos linajes CC5- MRSA-IV y CC8-MRSA-IV.
- iv. La resistencia a daptomicina, aunque en niveles mínimos en nuestro estudio (<0,5%), se asoció al clon emergente CC22-MRSA-IVh y fue debido a mutaciones en el gen *mprF* (factor de resistencia a múltiples péptidos).
- v. La mayoría de las infecciones detectadas en la comunidad se asociaron a clones endémicos hospitalarios (CC5, CC8 y CC22) y se produjeron en pacientes relacionados con el ámbito sanitario.

- vi. Los aislados obtenidos de las infecciones de adquisición estrictamente comunitaria pertenecían predominantemente al linaje USA300 (variante Epidémica Sudamericana (SAE) y productora de leucocidina de Pantón-Valentine).
- vii. La secuenciación del genoma completo, en comparación con los métodos de tipado molecular clásicos, tiene mayor poder de discriminación y se ha convertido en una herramienta esencial para la completa descripción de la epidemiología de MRSA.
- viii. La combinación *in vitro* de ceftarolina y daptomicina presenta una actividad sinérgica o aditiva frente a todos los aislamientos de MRSA seleccionados, incluidos los clones asociados a resistencia a ceftarolina (ST228) y a daptomicina (CC22), por lo que puede añadir un potencial beneficio al tratamiento de la bacteriemia por MRSA.



BIBLIOGRAFÍA

*"Daría todo lo que sé por la
mitad de lo que ignoro"*
– René Descartes

VII. Bibliografía

1. Bhunia AK. *Staphylococcus aureus in Foodborne microbial pathogens: Mechanisms and pathogenesis*. In: 1st Ed. Vol 2018. New York, NY: Springer, New York, NY, 2007; 181–91.
2. Schleifer K-H, Bell JA. *Family VIII. Staphylococcaceae in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 3: The Firmicutes*. In: Vos P, Garrity GM, Jones D, *et al.*, eds. *Systematic Bacteriology*. 2nd ed. Springer New York, 2009; 392–433.
3. Euzéby JP. Genus *Staphylococcus*. *List Prokaryotic names with Standing Nomenclature (LPSN)* 2022. Available at: <https://lpsn.dsmz.de/genus/staphylococcus>. Date Accessed: 2022-11-09. Accessed November 9, 2022.
4. Parte AC, Carbasse JS, Meier-Kolthoff JP, *et al.* List of prokaryotic names with standing in nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *Int J Syst Evol Microbiol* 2020; **70**: 5607–12.
5. Heilmann C, Ziebuhr W, Becker K. Are coagulase-negative staphylococci virulent? *Clin Microbiol Infect* 2019; **25**: 1071–80.
6. Cercenado E. *Staphylococcus lugdunensis*: A unique coagulase-negative staphylococcus. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2009; **27**: 139–42.
7. Huebner J, Goldmann DA. Coagulase-negative staphylococci: Role as pathogens. *Annu Rev Med* 1999; **50**: 223–36.
8. Brown DFJ, Edwards DI, Hawkey PM, *et al.* Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J Antimicrob Chemother* 2005; **56**: 1000–18.
9. Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, *et al.* MALDI-TOF mass spectrometry: An emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front Microbiol* 2015; **6**: 791.
10. Wertheim HFL, Melles DC, Vos MC, *et al.* The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis* 2005; **5**: 751–62.
11. Center for Disease Control and Prevention. Healthcare Settings | MRSA | CDC. CDC 2019. Available at: <https://www.cdc.gov/mrsa/healthcare/index.html>. Accessed November 18, 2022.
12. Sakr A, Brégeon F, Mège JL, Rolain JM, *et al.* *Staphylococcus aureus* nasal colonization: An update on mechanisms, epidemiology, risk factors, and subsequent infections. *Front Microbiol* 2018; **9**: 2419–34.
13. Muthukrishnan G, Lamers RP, Ellis A, *et al.* Longitudinal genetic analyses of *Staphylococcus aureus* nasal carriage dynamics in a diverse population. *BMC Infect Dis* 2013; **13**: 1–13.

14. Pantosti A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with animals and its relevance to human health. *Front Microbiol* 2012; **3**: 127.
15. Wasserman E, Taljaard J, Wasserman E, *et al.* Southern African Journal of Epidemiology and Infection Update on infections caused by *Staphylococcus aureus* Update on infections caused by *Staphylococcus aureus*. *South African J Epidemiol Infect* 2011; **26**: 60–4.
16. Liu J, Chen D, Peters BM, *et al.* Staphylococcal chromosomal cassettes *mec* (SCC*mec*): A mobile genetic element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microb Pathog* 2016; **101**: 56–67.
17. Young BC, Earle SG, Soeng S, *et al.* Panton-valentine leucocidin is the key determinant of *Staphylococcus aureus* pyomyositis in a bacterial GWAS. *Elife* 2019; **8**: e42486.
18. Shettigar K, Murali TS. Virulence factors and clonal diversity of *Staphylococcus aureus* in colonization and wound infection with emphasis on diabetic foot infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2020; **39**: 2235–46.
19. Song KH, Kim CJ, Choi NK, *et al.* Clinical and economic burden of bacteremia due to multidrug-resistant organisms in Korea: a prospective case control study. *J Glob Antimicrob Resist* 2022; **31**: 379–85.
20. Schmidt A, Bénard S, Cyr S. Hospital Cost of Staphylococcal Infection after Cardiothoracic or Orthopedic Operations in France: A Retrospective Database Analysis. *Surg Infect (Larchmt)* 2015; **16**: 428–35.
21. Rai A, Khairnar K. Overview of the risks of *Staphylococcus aureus* infections and their control by bacteriophages and bacteriophage-encoded products. *Brazilian J Microbiol* 2021; **52**: 2031–42.
22. Bai AD, Lo CKL, Komorowski AS, *et al.* *Staphylococcus aureus* bacteraemia mortality: a systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect* 2022; **28**: 1076–84.
23. Gasch O, Ayats J, Ángeles Domínguez M, *et al.* Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) bloodstream infection: Secular trends over 19 years at a University Hospital. *Medicine (Baltimore)* 2011; **90**: 319–27.
24. Bush LM. Bacteriemia. *Man MSD versión para Prof Enfermedades Infecc* 2022. Available at: <https://www.msdmanuals.com/es-es/professional/enfermedades-infecciosas/biología-de-las-enfermedades-infecciosas/bacteriemia>. Accessed November 23, 2022.
25. Antonio M, Gudíol C, Royo-Cebrecos C, *et al.* Current etiology, clinical features and outcomes of bacteremia in older patients with solid tumors. *J Geriatr Oncol* 2019; **10**: 246–51.
26. Alpern ER. Bacteremia. In: *Pediatric Emergency Medicine*. StatPearls Publishing, 2008; 530–4.

27. Jayaweera JAAS, Sivakumar D. Asymptomatic central line-associated bloodstream infections in children implanted with long term indwelling central venous catheters in a teaching hospital, Sri Lanka. *BMC Infect Dis* 2020; **20**: 457–67.
28. Turner NA, Sharma-Kuinkel BK, Maskarinec SA, *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. *Nat Rev Microbiol* 2019; **17**: 203–18.
29. Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College (CAMS&PUMC). Virulence Factor DataBase - Pathogenesis of *Staphylococcus aureus*. 2022. Available at: <http://www.mgc.ac.cn/cgi-bin/VFs/genus.cgi?Genus=Staphylococcus>. Accessed November 28, 2022.
30. American Society for Microbiology. *FAQ: The Threat of MRSA*. American Society for Microbiology; 2015.
31. Van Wamel WJB, Rooijackers SHM, Ruyken M, *et al.* The Innate Immune Modulators Staphylococcal Complement Inhibitor and Chemotaxis Inhibitory Protein of *Staphylococcus aureus* are Located on β -Hemolysin-Converting Bacteriophages. *J Bacteriol* 2006; **188**: 1310.
32. Monecke S, Coombs G, Shore AC, *et al.* A field guide to pandemic, epidemic and sporadic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* 2011; **6**: e17936.
33. Ferreira C, Costa SS, Serrano M, *et al.* Clonal lineages, antimicrobial resistance, and PVL carriage of *Staphylococcus aureus* associated to skin and soft-tissue infections from ambulatory patients in Portugal. *Antibiotics* 2021; **10**: 345.
34. Zhu Y, Tang Z, Huo S, *et al.* Regulatory relationship between macrophage autophagy and PVL-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Immunobiology* 2022; **227**: 152223.
35. Hoseini Alfatemi SM, Motamedifar M, Hadi N, *et al.* Analysis of virulence genes among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. *Jundishapur J Microbiol* 2014; **7**: 10741.
36. Kong C, Neoh HM, Nathan S. Targeting *Staphylococcus aureus* toxins: A potential form of anti-virulence therapy. *Toxins (Basel)* 2016; **8**: 72.
37. Lade H, Kim J-S. Bacterial targets of antibiotics in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics* 2021; **10**: 398.
38. Thompson TA, Brown PD. Association between the agr locus and the presence of virulence genes and pathogenesis in *Staphylococcus aureus* using a *Caenorhabditis elegans* model. *Int J Infect Dis* 2017; **54**: 72–6.
39. Carrera-Salinas A, González-Díaz A, Vázquez-Sánchez DA, *et al.* *Staphylococcus aureus* surface protein G (sasG) allelic variants: correlation between biofilm formation and their prevalence in methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) clones. *Res Microbiol* 2022; **173**.

40. Jensen SO, Lyon BR. Genetics of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiol* 2009; **4**: 565–82.
41. Ito T, Katayama Y, Hiramatsu K. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; **43**: 1449–58.
42. Vestergaard M, Frees D, Ingmer H. Antibiotic Resistance and the MRSA Problem. *Microbiol Spectr* 2019; **7**.
43. Foster TJ. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. *FEMS Microbiol Rev* 2017; **41**: 430–49.
44. Kashyap R, Shah A, Dutt T, *et al*. Treatments and limitations for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A review of current literature. *World J Clin Infect Dis* 2019; **9**: 1–10.
45. Murray CJ, Ikuta KS, Sharara F, *et al*. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet* 2022; **399**: 629–55.
46. Lowy FD. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest* 2003; **111**: 1265–73.
47. Knox R. A New Penicillin (BRL 1241) Active Against Penicillin-resistant *Staphylococci*. *Br Med J* 1960; **2**: 690.
48. Jevons MP. “Celbenin” - resistant *Staphylococci*. *Br Med J* 1961; **1**: 124.
49. Silva V, Capelo JL, Igrejas G, *et al*. Molecular Epidemiology of *Staphylococcus aureus* Lineages in Wild Animals in Europe: A Review. *Antibiotics* 2020; **9**: 122.
50. Harkins CP, Pichon B, Doumith M, *et al*. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* emerged long before the introduction of methicillin into clinical practice. *Genome Biol* 2017; **18**.
51. McGuinness WA, Malachowa N, Deleo FR. Vancomycin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *YALE J Biol Med* 2017; **90**: 269–81.
52. Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. A new class of genetic element, *staphylococcus* cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**: 1549–55.
53. Castle SS. Methicillin. In: *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*. Elsevier, 2007; 1–4.
54. Newsom SWB. MRSA—Past, Present, Future. *J R Soc Med* 2004; **97**: 509–10.
55. Lee AS, De Lencastre H, Garau J, *et al*. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Dis Prim* 2018; **4**: 18033.
56. Lee JH, Jeong JM, Park YH, *et al*. Evaluation of the Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)-Screen Latex Agglutination Test for Detection of

- MRSA of Animal Origin. *J Clin Microbiol* 2004; **42**: 2780.
57. Nguyen DT, Yeh E, Perry S, *et al.* Real-Time PCR Testing for *mecA* Reduces Vancomycin Usage and Length of Hospitalization for Patients Infected with Methicillin-Sensitive *Staphylococci*. *J Clin Microbiol* 2010; **48**: 785.
58. Hope WW, Morton AP, Looke DFM, *et al.* A PCR method for the identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from screening swabs. *Pathology* 2004; **36**: 265–8.
59. Sherlock O, Dolan A, Humphreys H. MRSA screening: can one swab be used for both culture and rapid testing? An evaluation of chromogenic culture and subsequent Hain GenoQuick PCR amplification/detection. *Clin Microbiol Infect* 2010; **16**: 955–9.
60. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. MRSA in Healthcare Settings | HAI | CDC. *Centers Dis Control Prev* 2019. Available at: <https://www.cdc.gov/hai/organisms/mrsa-infection.html>. Accessed November 15, 2022.
61. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* Infections. *N Engl J Med* 1998; **339**: 520–32.
62. Rolo J, Worning P, Boye Nielsen J, *et al.* Evidence for the evolutionary steps leading to *mecA*-mediated β -lactam resistance in staphylococci. *PLoS Genet* 2017; **13**.
63. Coleman DC, Shore AC, Goering R V., Monecke S. Editorial: New insights and updates on the molecular epidemiology and antimicrobial resistance of MRSA in humans in the whole-genome sequencing era. *Front Microbiol* 2019; **10**: 2–139.
64. Kirst HA, Thompson DG, Nicas TI. Historical Yearly Usage of Vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; **42**: 1303.
65. Fowler VG, Boucher HW, Corey GR, *et al.* Daptomycin versus standard therapy for bacteremia and endocarditis caused by *Staphylococcus aureus*. *N Engl J Med* 2006; **355**: 653–65.
66. Pujol M, Miró J-M, Shaw E, *et al.* Daptomycin plus fosfomycin versus daptomycin alone for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia and endocarditis: A randomized clinical trial. *Clin Infect Dis* 2021; **72**: 1517–25.
67. Wilcox MH, Tack KJ, Bouza E, *et al.* Complicated skin and skin-structure infections and catheter-related bloodstream infections: noninferiority of linezolid in a phase 3 study. *Clin Infect Dis* 2009; **48**: 203–12.
68. Arshad S, Huang V, Hartman P, *et al.* Ceftaroline fosamil monotherapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia: a comparative clinical outcomes study. *Int J Infect Dis* 2017; **57**: 27–31.
69. Friedman L, Alder JD, Silverman JA. Genetic changes that correlate with reduced susceptibility to daptomycin in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents*

- Chemother* 2006; **50**: 2137–45.
70. Kanesaka I, Fujisaki S, Aiba Y, *et al.* Characterization of compensatory mutations associated with restoration of daptomycin-susceptibility in daptomycin non-susceptible methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and the role *mprF* mutations. *J Infect Chemother* 2019; **25**: 1–5.
 71. Li SM, Zhou YF, Li L, *et al.* Characterization of the multi-drug resistance gene *cfr* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains isolated from animals and humans in China. *Front Microbiol* 2018; **9**.
 72. Long SW, Olsen RJ, Mehta SC, *et al.* PBP2a mutations causing high-level ceftaroline resistance in clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; **58**: 6668–74.
 73. Kelley WL, Jousselin A, Barras C, *et al.* Missense mutations in PBP2A affecting ceftaroline susceptibility detected in epidemic hospital-acquired Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonotypes ST228 and ST247 in Western Switzerland archived since 1998. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; **59**: 1922–30.
 74. Sabat AJ, Tinelli M, Grundmann H, *et al.* Daptomycin resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with novel non-synonymous mutations in the *mprF* and *vraS* genes: A new insight into daptomycin resistance. *Front Microbiol* 2018; **9**: 2705.
 75. Ernst CM, Slavetinsky CJ, Kuhn S, *et al.* Gain-of-function mutations in the phospholipid flippase MprF confer specific daptomycin resistance. *MBio* 2018; **9**: 1–12.
 76. Bayer AS, Mishra NN, Chen L, *et al.* Frequency and distribution of single-nucleotide polymorphisms within *mprF* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates and their role in cross-resistance to daptomycin and host defense antimicrobial peptides. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; **59**: 4930–7.
 77. Miragaia M. Factors contributing to the evolution of *mecA*-mediated β -lactam resistance in staphylococci: Update and new insights from whole genome sequencing (WGS). *Front Microbiol* 2018; **9**: 2723.
 78. Brown DFJ, Reynolds PE. Intrinsic resistance to beta-lactam antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *FEBS Lett* 1980; **122**: 275–8.
 79. Labischinski H. Consequences of the interaction of β -lactam antibiotics with penicillin binding proteins from sensitive and resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Med Microbiol Immunol* 1992; **181**: 241–65.
 80. Young M, Walsh DJ, Masters E, *et al.* Identification of *Staphylococcus aureus* Penicillin Binding Protein 4 (PBP4) Inhibitors. *Antibiot (Basel, Switzerland)* 2022; **11**: 1351.
 81. Ito T, Hiramatsu K, Oliveira DC, *et al.* Classification of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*): Guidelines for reporting novel SCC*mec* elements. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 4961–7.

82. Ito T, Katayama Y, Asada K, *et al.* Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**: 1323–36.
83. Rolo J, Worning P, Nielsen JB, *et al.* Evolutionary Origin of the Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*). *Antimicrob Agents Chemother* 2017; **61**: 2302–16.
84. Mlynarczyk-Bonikowska B, Kowalewski C, Krolak-Ulinska A, *et al.* Molecular mechanisms of drug resistance in *Staphylococcus aureus*. *Int J Mol Sci* 2022; **23**: 8088.
85. Kaya H, Hasman H, Larsen J, *et al.* SCC*mec* Finder, a web-based tool for typing of staphylococcal cassette chromosome *mec* in *Staphylococcus aureus* using whole-genome sequence data. *mSphere* 2018; **3**: 612–7.
86. Lakhundi S, Zhang K. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular characterization, evolution, and epidemiology. *Clin Microbiol Rev* 2018; **31**: 1–103.
87. Urushibara N, Aung MS, Kawaguchiya M, Kobayashi N. Novel staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) type XIV (5A) and a truncated SCC*mec* element in SCC composite islands carrying *speG* in ST5 MRSA in Japan. *J Antimicrob Chemother* 2020; **75**: 46–50.
88. Zong Z, Peng C, Lü X. Diversity of SCC*mec* elements in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci clinical isolates. *PLoS One* 2011; **6**: 20191.
89. Ślusarczyk R, Bielejewska A, Bociek A, Bociek M. Resistance to ceftaroline - 2018 review. *Eur J Biol Res* 2018; **8**: 112–20.
90. Watkins RR, Holubar M, David MZ. Antimicrobial resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to newer antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 2019; **63**: 1216–9.
91. Chan LC, Basuino L, Diep B, Hamilton S, Chatterjee SS, Chambers HF. Ceftobiprole- and ceftaroline-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; **59**: 2960–4.
92. Malachowa N, Deleo FR. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cell Mol Life Sci* 2010; **67**: 3057–71.
93. Sidhu MS, Heir E, Leegaard T, Wiger K, *et al.* Frequency of disinfectant resistance genes and genetic linkage with beta-lactamase transposon Tn552 among clinical staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; **46**: 2797–803.
94. Fuzi M. Dissimilar fitness associated with resistance to fluoroquinolones influences clonal dynamics of various multiresistant bacteria. *Front Microbiol* 2016; **7**: 1017.
95. Holden MTG, Hsu LY, Kurt K, *et al.* A genomic portrait of the emergence, evolution, and global spread of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pandemic.

- Genome Res* 2013; **23**: 653–64.
96. Cabrera R, Fernández-Barat L, Motos A, *et al.* Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains from the endotracheal tubes of patients with nosocomial pneumonia. *Antimicrob Resist Infect Control* 2020; **9**: 43.
 97. Fathi J, Hashemizadeh Z, Dehkordi RS, *et al.* Evaluation of aminoglycoside modifying enzymes, SCCmec, coagulase gene and PCR-RFLP coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolates from hospitals in Shiraz, southwest of Iran. *Heliyon* 2022; **8**: 10230.
 98. Zárate SG, De La Cruz Claire ML, Benito-Arenas R, Revuelta J, Santana AG, Bastida A. Overcoming aminoglycoside enzymatic resistance: Design of novel antibiotics and inhibitors. *Molecules* 2018; **23**: 284.
 99. Mikłasińska-Majdanik M. Mechanisms of resistance to macrolide antibiotics among *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics* 2021; **10**: 1406.
 100. Matsuoka M, Inoue M, Endo Y, Nakajima Y. Characteristic expression of three genes, *msr(A)*, *mph(C)* and *erm(Y)*, that confer resistance to macrolide antibiotics on *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 2003; **220**: 287–93.
 101. Osei Sekyere J, Mensah E. Molecular epidemiology and mechanisms of antibiotic resistance in *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp., and *Streptococcus* spp. in Africa: a systematic review from a One Health perspective. *Ann N Y Acad Sci* 2020; **1465**: 29–58.
 102. Kooistra-Smid M, Nieuwenhuis M, Van Belkum A, Verbrugh H. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* burn wound colonization. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2009; **57**: 1–13.
 103. Udo EE, Al-Sweih N, Noronha BC. A chromosomal location of the *mupA* gene in *Staphylococcus aureus* expressing high-level mupirocin resistance. *J Antimicrob Chemother* 2003; **51**: 1283–6.
 104. Baquero F, Levin BR. Proximate and ultimate causes of the bactericidal action of antibiotics. *Nat Rev Microbiol* 2021; **19**: 123–32.
 105. Zulfiana R, Suharjono, Kuntaman. Genetic profile mutation *rpoB* in clinical isolate of rifampicin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 2021; **32**: 773–6.
 106. Mick V, Domínguez MA, Tubau F, *et al.* Molecular characterization of resistance to Rifampicin in an emerging hospital-associated Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone ST228, Spain. *BMC Microbiol* 2010; **10**: 68.
 107. Lee YC, Chen PY, Wang JT, *et al.* Prevalence of fosfomycin resistance and gene mutations in clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Resist Infect Control* 2020; **9**: 135.

108. Sastry S, Doi Y. Fosfomycin: Resurgence of An Old Companion. *J Infect Chemother* 2016; **22**: 273.
109. Partridge SR, Kwong SM, Firth N, *et al.* Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev* 2018; **31**: 1–61.
110. Wang Y, Li X, Wang Y, *et al.* Intracellular Accumulation of Linezolid and Florfenicol in OptrA-Producing *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*. *Molecules* 2018; **23**: 3195.
111. Kuroda M, Kuroda H, Oshima T, *et al.* Two-component system VraSR positively modulates the regulation of cell-wall biosynthesis pathway in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 2003; **49**: 807–21.
112. Dominguez MA, De Lencastre H, Linares J, *et al.* Spread and maintenance of a dominant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone during an outbreak of MRSA disease in a Spanish hospital. *J Clin Microbiol* 1994; **32**: 2081–7.
113. De Oliveira DMP, Forde BM, Kidd TJ, *et al.* Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *Clin Microbiol Rev* 2020; **33**: 181–19.
114. Lakhundi S, Zhang K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clin Microbiol Rev* 2018; **31**.
115. Chambers HF, DeLeo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol* 2009; **7**: 629–41.
116. Harris SR, Cartwright EJP, Török ME, *et al.* Whole-genome sequencing for analysis of an outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A descriptive study. *Lancet Infect Dis* 2013; **13**: 130–6.
117. Strauß L, Stegger M, Akpaka PE, *et al.* Origin, evolution, and global transmission of community-acquired *Staphylococcus aureus* ST8. *Proc Natl Acad Sci* 2017; **114**: 10596–4.
118. Nimmo GR, Coombs GW. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Australia. *Int J Antimicrob Agents* 2008; **31**: 401–10.
119. Campbell R, Martin D, Pierce D, *et al.* Community-associated MRSA among Indigenous children in remote settings: Best practices for NPs. *Nurse Pract* 2020; **45**: 34.
120. Chatterjee SS, Otto M. Improved understanding of factors driving methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemic waves. *Clin Epidemiol* 2013; **5**: 205–17.
121. Popovich KJ, Snitkin ES, Hota B, *et al.* Genomic and Epidemiological Evidence for Community Origins of Hospital-Onset Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infections. *J Infect Dis* 2017; **215**: 1640–7.
122. Monecke S, Müller E, Dorneanu OS, *et al.* Molecular Typing of MRSA and of Clinical *Staphylococcus aureus* Isolates from Iași, Romania. *PLoS One* 2014; **9**.

123. OneHealthTrust. Resistance Map - Antibiotic Resistance. 2022. Available at: <https://resistancemap.onehealthtrust.org/AntibioticResistance.php>. Accessed November 18, 2022.
124. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) - AER for 2019. *Annu Epidemiol Rep* 2019 2020.
125. Verkola M, Takala M, Nykäsenoja S, *et al.* Low-level colonization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs is maintained by slowly evolving, closely related strains in Finnish pig farms. *Acta Vet Scand* 2022; **64**: 34.
126. Graveland H, Wagenaar JA, Heesterbeek H, *et al.* Methicillin resistant staphylococcus aureus ST398 in veal calf farming: Human MRSA carriage related with animal antimicrobial usage and farm hygiene. *PLoS One* 2010; **5**: 10990.
127. Camoez M, Sierra JM, Pujol M, *et al.* Prevalence and molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 resistant to tetracycline at a Spanish hospital over 12 years. *PLoS One* 2013; **8**: 72828.
128. van Alen S, Ballhausen B, Peters G, *et al.* In the centre of an epidemic: Fifteen years of LA-MRSA CC398 at the University Hospital Münster. *Vet Microbiol* 2017; **200**: 19–24.
129. Lozano C, Rezusta A, Gómez P, *et al.* High prevalence of spa types associated with the clonal lineage CC398 among tetracycline-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in a Spanish hospital. *J Antimicrob Chemother* 2012; **67**: 330–4.
130. Van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, *et al.* Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin Microbiol Infect* 2007; **13**: 1–46.
131. Tenover FC, Arbeit RD, Goering R V, *et al.* Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; **33**: 2233–2239.
132. Jolley KA, Maiden MCJ. BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. *BMC Bioinformatics* 2010; **11**: 1–11.
133. Ito T, Hiramatsu K, Tomasz A, *et al.* Guidelines for reporting novel *mecA* gene homologues. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 4997–9.
134. Challagundla L, Reyes J, Rafiqullah I, *et al.* Phylogenomic classification and the evolution of Clonal complex 5 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the Western Hemisphere. *Front Microbiol* 2018; **9**: 1–14.
135. Álvarez-Narváez S, Logue CM, Barbieri NL, *et al.* Comparing PFGE, MLST, and WGS in monitoring the spread of macrolide and rifampin resistant *Rhodococcus equi* in horse production. *Vet Microbiol* 2020; **242**.

136. Hallin M, Friedrich AW, Struelens MJ. *spa* typing for epidemiological surveillance of *Staphylococcus aureus*. *Methods Mol Biol* 2009; **551**: 189–202.
137. Petersen A, Larssen KW, Gran FW, *et al.* Increasing Incidences and Clonal Diversity of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in the Nordic Countries - Results From the Nordic MRSA Surveillance. *Front Microbiol* 2021; **12**: 1–10.
138. Zhou W, Jin Y, Liu X, *et al.* Comparison of genetic features and evolution of global and chinese strains of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST22. *Microbiol Spectr* 2022; **10**: 2037–21.
139. Pereira G do N, Rosa R da S, Dias AA, *et al.* Characterization of the virulence, agr typing and antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food handlers in Brazil. *Brazilian J Infect Dis* 2022; **26**: 102698.
140. Lindsay JA. Genomic variation and evolution of *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol* 2010; **300**: 98–103.
141. Nübel U, Roumagnac P, Feldkamp M, *et al.* Frequent emergence and limited geographic dispersal of methicillin- resistant *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105**: 14130–5.
142. Lozano C, Porres-Osante N, Crettaz J, *et al.* Changes in genetic lineages, resistance, and virulence in clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Spanish hospital. *J Infect Chemother* 2013; **19**: 233–42.
143. Larsen M V., Cosentino S, Rasmussen S, *et al.* Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *J Clin Microbiol* 2012; **50**: 1355–61.
144. Silva V, Hermenegildo S, Ferreira C, *et al.* Genetic Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from Human Bloodstream Infections: Detection of MLSB Resistance. *Antibiot (Basel, Switzerland)* 2020; **9**: 375.
145. Church DL, Chow BL, Lloyd T, *et al.* Comparison of automated repetitive-sequence-based polymerase chain reaction and *spa* typing versus pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; **69**: 30–7.
146. Petersson AC, Olsson-Liljequist B, Mörner H, *et al.* Evaluating the usefulness of *spa* typing, in comparison with pulsed-field gel electrophoresis, for epidemiological typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a low-prevalence region in Sweden 2000-2004. *Clin Microbiol Infect* 2010; **16**: 456–62.
147. Asadollahi P, Farahani NN, Mirzaii M, *et al.* Distribution of the most prevalent *spa* types among clinical isolates of methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* around the world: A review. *Front Microbiol* 2018; **9**: 163.
148. David MZ, Daum RS, Bayer AS, *et al.* *Staphylococcus aureus* bacteremia at 5 US academic medical centers, 2008-2011: significant geographic variation in community-onset infections. *Clin Infect Dis* 2014; **59**: 798–807.

149. Von Dach E, Diene SM, Fankhauser C, Schrenzel J, Harbarth S, François P. Comparative Genomics of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Shows the Emergence of Clone ST8-USA300 in Geneva, Switzerland. *J Infect Dis* 2016; **213**: 1370–9.
150. Uehara Y. Current Status of Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec). *Antibiotics* 2022; **11**: 86–98.
151. Mardis ER. DNA sequencing technologies: 2006–2016. *Nat Protoc* 2017; **12**: 213–8.
152. Thermes C. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet* 2014; **30**: 418–26.
153. Yin Y, Butler C, Zhang Q. Challenges in the application of NGS in the clinical laboratory. *Hum Immunol* 2021; **82**: 812–9.
154. Amarasinghe SL, Su S, Dong X, *et al.* Opportunities and challenges in long-read sequencing data analysis. *Genome Biol* 2020; **21**: 1–16.
155. Wang Y, Zhao Y, Bollas A, *et al.* Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications. *Nat Biotechnol* 2021 3911 2021; **39**: 1348–65.
156. Stefan CP, Hall AT, Graham AS, *et al.* Comparison of Illumina and Oxford Nanopore Sequencing Technologies for Pathogen Detection from Clinical Matrices Using Molecular Inversion Probes. *J Mol Diagnostics* 2022; **24**: 395–405.
157. Bosi E, Monk JM, Aziz RK, *et al.* Comparative genome-scale modelling of *Staphylococcus aureus* strains identifies strain-specific metabolic capabilities linked to pathogenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; **113**: 3801–9.
158. Medini D, Donati C, Tettelin H, *et al.* The microbial pan-genome. *Curr Opin Genet Dev* 2005; **15**: 589–94.
159. Holden MTG, Feil EJ, Lindsay JA, *et al.* Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; **101**: 9786–91.
160. McCarthy AJ, Loeffler A, Witney AA, *et al.* Extensive Horizontal Gene Transfer during *Staphylococcus aureus* Co-colonization In Vivo. *Genome Biol Evol* 2014; **6**: 2697–708.
161. Martak D, Meunier A, Sauget M, *et al.* Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and whole-genome-sequencing-based typing confirms the accuracy of pulsed-field gel electrophoresis for the investigation of local *Pseudomonas aeruginosa* outbreaks. *J Hosp Infect* 2020; **105**: 643–7.
162. Jagadeesan B, Gerner-Smidt P, Allard MW, *et al.* The use of next generation sequencing for improving food safety: Translation into practice. *Food Microbiol* 2019; **79**: 96–115.
163. Planet PJ, Narechania A, Chen L, *et al.* Architecture of a species: phylogenomics

- of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 2017; **25**: 153–66.
164. Nimmo GR, Bergh H, Nakos J, *et al*. Replacement of healthcare-associated MRSA by community-associated MRSA in Queensland: Confirmation by genotyping. *J Infect* 2013; **67**: 439–47.
165. Oksuz L, Dupieux C, Tristan A, *et al*. The high diversity of MRSA clones detected in a university hospital in Istanbul. *Int J Med Sci* 2013.
166. Moore PCL, Lindsay JA. Molecular characterisation of the dominant UK methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains, EMRSA-15 and EMRSA-16. *J Med Microbiol* 2002; **51**: 516–21.
167. Enright MC, Robinson DA, Randle G, *et al*. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99**: 7687–92.
168. Rodríguez-Baño J, Domínguez MA, Blas A, *et al*. Clinical and molecular epidemiology of community-acquired, healthcare-associated and nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Spain. *Clin Microbiol Infect* 2009; **15**: 1111–8.
169. Oliveira DC, Tomasz A, de Lencastre H. Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet Infect Dis* 2002; **2**: 180–9.
170. Gasch O, Camoez M, Dominguez MA, *et al*. Predictive factors for mortality in patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream infection: Impact on outcome of host, microorganism and therapy. *Clin Microbiol Infect* 2013; **19**: 1049–57.
171. Gasch O, Camoez M, Dominguez MA, *et al*. Lack of association between genotypes and haematogenous seeding infections in a large cohort of patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia from 21 Spanish hospitals. *Clin Microbiol Infect* 2014; **20**: 361–7.
172. Albrecht N, Jatzwauk L, Slickers P, *et al*. Clonal replacement of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in a German University Hospital over a period of eleven years. *PLoS One* 2011; **6**.
173. Bowers JR, Driebe EM, Albrecht V, *et al*. Improved subtyping of *Staphylococcus aureus* Clonal complex 8 strains based on whole-genome phylogenetic analysis. *mSphere* 2018; **3**: 1–15.
174. Boswihi SS, Verghese T, Udo EE. Diversity of clonal complex 22 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in Kuwait hospitals. *Front Microbiol* 2022; **13**: 1–12.
175. Monecke S, Jatzwauk L, Müller E, *et al*. Diversity of SCCmec elements in *staphylococcus aureus* as observed in south-eastern Germany. *PLoS One* 2016; **11**.

176. Diep BA, Gill SR, Chang RF, *et al.* Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 2006; **367**: 731–9.
177. Li M, Diep BA, Villaruz AE, *et al.* Evolution of virulence in epidemic community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci* 2009; **106**: 5883–8.
178. Diekema DJ, Richter SS, Heilmann KP, *et al.* Continued emergence of USA300 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States: results from a nationwide surveillance study. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2014; **35**: 285–92.
179. Tristan A, Bes M, Meugnier H, *et al.* Global distribution of Panton-Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, 2006. *Emerg Infect Dis* 2007; **13**: 594–600.
180. Arias CA, Reyes J, Carvajal LP, *et al.* A prospective cohort multicenter study of molecular epidemiology and phylogenomics of *Staphylococcus aureus* bacteremia in nine Latin American countries. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; **61**: 1–13.
181. Almebairik N, Zamudio R, Ironside C, *et al.* Genomic Stability of Composite SCCmec ACME and COMER-Like Genetic Elements in *Staphylococcus epidermidis* Correlates With Rate of Excision. *Front Microbiol* 2020; **11**: 166.
182. Montgomery CP, Boyle-Vavra S, Daum RS. The Arginine Catabolic Mobile Element Is Not Associated with Enhanced Virulence in Experimental Invasive Disease Caused by the Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* USA300 Genetic Background. *Infect Immun* 2009; **77**: 2650.
183. Planet PJ, Diaz L, Kolokotronis SO, *et al.* Parallel epidemics of community-associated methicillin-resistant staphylococcus aureus USA300 infection in North and South America. *J Infect Dis* 2015; **212**: 1874–82.
184. Cassini A, Högberg LD, Plachouras D, *et al.* Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *Lancet Infect Dis* 2019; **19**: 56–66.
185. Akova M. Epidemiology of antimicrobial resistance in bloodstream infections. *Virulence* 2016; **7**: 252–66.
186. Rice LB. Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE. *J Infect Dis* 2008; **197**: 1079–81.
187. Mulani MS, Kamble EE, Kumkar SN, *et al.* Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. *Front Microbiol* 2019; **10**: 539.
188. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance Atlas of infectious diseases - Antimicrobial Resistance Rates - MRSA 2021. *ECDC Website* 2016. Available at: <https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx>. Accessed

December 13, 2022.

189. Clausen PTLC, Aarestrup FM, Lund O. Rapid and precise alignment of raw reads against redundant databases with KMA. *BMC Bioinforma* 2018 191 2018; **19**: 1–8.
190. Friedman ND, Kaye KS, Stout JE, *et al.* Health care-associated bloodstream infections in adults: A reason to change the accepted definition of community-acquired infections. *Ann Intern Med* 2002; **137**: 791–7.
191. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing - 30th Edition: A CLSI supplement for global application. M100*. 2020.
192. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. *Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 7.0, 2017*. 2017.
193. Canut Blasco A, Collazos Blanco A, Díez Aguilar M, *et al.* Métodos microbiológicos para la determinación in vitro de la actividad de combinaciones de antimicrobianos. *Proced Microbiol Clínica Recom la Soc Española Enfermedades Infecc y Microbiol Clínica* 2020; **70**: 1–61.
194. Lina G, Piémont Y, Godail-Gamot F, *et al.* Involvement of Pantón-Valentine Leukocidin—Producing *Staphylococcus aureus* in Primary Skin Infections and Pneumonia. *Clin Infect Dis* 1999; **29**: 1128–32.
195. Enright MC, Day NPJ, Davies CE, *et al.* Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2000; **38**: 1008–15.
196. McClure-Warnier JA, Conly JM, Zhang K. Multiplex PCR assay for typing of staphylococcal cassette Chromosome mec types I to V in Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Vis Exp* 2013; **79**: 1–15.
197. Seemann T. Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 2014; **30**: 2068–9.
198. Bartels MD, Petersen A, Worning P, *et al.* Comparing Whole-genome sequencing with Sanger sequencing for *spa* typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2014; **52**: 4305.
199. Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, *et al.* BLAST+: Architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 2009; **10**: 1–9.
200. Croucher NJ, Page AJ, Connor TR, *et al.* Rapid phylogenetic analysis of large samples of recombinant bacterial whole genome sequences using Gubbins. *Nucleic Acids Res* 2015; **43**: 1–15.
201. Argimón S, Abudahab K, Goater RJE, *et al.* Microreact: visualizing and sharing data for genomic epidemiology and phylogeography. *Microb genomics* 2016; **2**: 93–104.
202. Page AJ, Cummins CA, Hunt M, *et al.* Roary: Rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics* 2015; **31**: 3691–3.

203. Bortolaia V, Kaas RS, Ruppe E, *et al.* ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J Antimicrob Chemother* 2020; **75**: 3491–500.
204. Kadlec K, Schwarz S. Identification of a novel trimethoprim resistance gene, *dfkK*, in a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 strain and its physical linkage to the tetracycline resistance gene *tet(L)*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 776–8.
205. Souli M, Ruffin F, Choi SH, *et al.* Changing characteristics of *Staphylococcus aureus* bacteremia: results from a 21-year, prospective, longitudinal study. *Clin Infect Dis* 2019; **69**: 1868–77.
206. Dupper AC, Sullivan MJ, Chacko KI, *et al.* Blurred molecular epidemiological lines between the two dominant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones. *Open Forum Infect Dis* 2019; **6**: 1–9.
207. Vindel A, Cuevas O, Cercenado E, *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Spain: molecular epidemiology and utility of different typing methods. *J Clin Microbiol* 2009; **47**: 1620–7.
208. Cuevas O, Cercenado E, Vindel A, *et al.* Evolution of the antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. in Spain: five nationwide prevalence studies, 1986 to 2002. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 4240–5.
209. Cuevas Ó, Cercenado E, Goyanes MJ, *et al.* *Staphylococcus* spp. en España: situación actual y evolución de la resistencia a antimicrobianos (1986-2006). *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008; **26**: 269–77.
210. Garriga Ferrer-Bergua L, Borrull Senra AM, Pérez Velasco C, *et al.* Rate of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pediatric emergency departments in Spain. *An Pediatr (English Ed)* 2022; **97**: 95–102.
211. Fowler VG, Miro JM, Hoen B, *et al.* *Staphylococcus aureus* endocarditis: A consequence of medical progress. *JAMA* 2005; **293**: 3012–21.
212. van Hal SJ, Jensen SO, Vaska VL, *et al.* Predictors of mortality in *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Microbiol Rev* 2012; **25**: 362–86.
213. Cosgrove SE, Sakoulas G, Perencevich EN, *et al.* Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: A meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2003; **36**: 53–9.
214. Gudiol F, Aguado JM, Almirante B, *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**: 1–23.
215. Recker M, Laabei M, Toleman MS, *et al.* Clonal differences in *Staphylococcus aureus* bacteraemia-associated mortality. *Nat Microbiol* 2017 **210** 2017; **2**: 1381–8.
216. Zheng C, Zhang S, Chen Q, *et al.* Clinical characteristics and risk factors of

- polymicrobial *Staphylococcus aureus* bloodstream infections. *Antimicrob Resist Infect Control* 2020; **9**: 76–87.
217. Cuevas O, Cercenado E, Bouza E, *et al.* Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Spain: a multicentre prevalence study (2002). *Clin Microbiol Infect* 2007; **13**: 250–6.
218. Pérez-Roth E, Lorenzo-Díaz F, Batista N, *et al.* Tracking methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones during a 5-year period (1998 to 2002) in a Spanish hospital. *J Clin Microbiol* 2004; **42**: 4649–56.
219. Australian Commission on Safety and Quality in Health Care (AURA). *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Australia MRSA bacteraemia - 2013 to 2018*. 2020.
220. Budimir A, Deurenberg RH, Bošnjak Z, *et al.* A variant of the Southern German clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is predominant in Croatia. *Clin Microbiol Infect* 2010; **16**: 1077–83.
221. Melter O, Aires De Sousa M, Urbášková P, *et al.* Update on the major clonal types of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the Czech Republic. *J Clin Microbiol* 2003; **41**: 4998–5005.
222. Campanile F, Bongiorno D, Stefani S. Hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (HA-MRSA) in Italy. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2009; **8**.
223. Numanović F, Dermota U, Smajlović J, *et al.* Characterization and clonal representation of MRSA strains in Tuzla Canton, Bosnia and Herzegovina, from 2009 to 2017. *Med Glas (Zenica)* 2021; **18**: 1–9.
224. Ruan Z, Jani M, Castillo Ramírez S, *et al.* Phylogeographical Analysis Reveals the Historic Origin, Emergence, and Evolutionary Dynamics of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ST228. *Front Microbiol* 2020; **1**: 2063–75.
225. Haaber J, Penadés JR, Ingmer H. Transfer of Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 2017; **25**: 893–905.
226. John J, George S, Nori SRC, *et al.* Phylogenomic Analysis Reveals the Evolutionary Route of Resistant Genes in *Staphylococcus aureus*. *Genome Biol Evol* 2019; **11**: 2917.
227. Vats P, Kaur UJ, Rishi P. Heavy metal-induced selection and proliferation of antibiotic resistance: A review. *J Appl Microbiol* 2022; **132**: 4058–76.
228. Xiong W, Sun Y, Ding X, *et al.* Antibiotic resistance genes occurrence and bacterial community composition in the Liuxi River. *Front Environ Sci* 2014; **2**: 61.
229. Al-Musharafi SK. Heavy Metals in Sewage Treated Effluents: Pollution and Microbial Bioremediation from Arid Regions. *Open Biotechnol J* 2016; **10**: 352–62.
230. Masindi V, Muedi KL, Masindi V, *et al.* Environmental Contamination by Heavy Metals. In: *Heavy Metals*. IntechOpen, 2018; 115–34.

231. Zhang XX, Zhang T, Zhang M, *et al.* Characterization and quantification of class 1 integrons and associated gene cassettes in sewage treatment plants. *Appl Microbiol Biotechnol* 2009; **82**: 1169–77.
232. Kotlarska E, Łuczkiwicz A, Pisowacka M, *et al.* Antibiotic resistance and prevalence of class 1 and 2 integrons in *Escherichia coli* isolated from two wastewater treatment plants, and their receiving waters (Gulf of Gdansk, Baltic Sea, Poland). *Environ Sci Pollut Res* 2015; **22**: 2018–30.
233. Mlynarczyk A, Mlynarczyk B, Kmera-Muszynska M, *et al.* Mechanisms of the resistance and tolerance to beta-lactam and glycopeptide antibiotics in pathogenic gram-positive cocci. *Mini Rev Med Chem* 2009; **9**: 1527–37.
234. Adriaenssens N, Bruyndonckx R, Versporten A, *et al.* Consumption of macrolides, lincosamides and streptogramins in the community, European Union/European Economic Area, 1997-2017. *J Antimicrob Chemother* 2021; **76**: 30–6.
235. Doan T, Worden L, Hinterwirth A, *et al.* Macrolide and nonmacrolide resistance with mass azithromycin distribution. *N Engl J Med* 2020; **383**: 1941–50.
236. Weber RE, Fuchs S, Layer F, *et al.* Genome-wide association studies for the detection of genetic variants associated with daptomycin and ceftaroline resistance in *Staphylococcus aureus*. *Front Microbiol* 2021; **12**: 1–15.
237. Richter SS, Heilmann KP, Dohrn CL, *et al.* Activity of Ceftaroline and Epidemiologic Trends in *Staphylococcus aureus* Isolates Collected from 43 Medical Centers in the United States in 2009. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 4154–60.
238. Urbán E, Stone GG. Impact of EUCAST ceftaroline breakpoint change on the susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates collected from patients with complicated skin and soft-tissue infections. *Clin Microbiol Infect* 2019; **25**: 1–4.
239. Farrell DJ, Castanheira M, Mendes RE, *et al.* In Vitro Activity of Ceftaroline Against Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae*: A Review of Published Studies and the AWARE Surveillance Program (2008–2010). *Clin Infect Dis* 2012; **55**: S206–14.
240. Gostev V, Sopova J, Kalinogorskaya O, *et al.* In vitro ceftaroline resistance selection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* involves different genetic pathways. *Microb Drug Resist* 2019; **25**: 1401–9.
241. Gardete S, Tomasz A. Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest* 2014; **124**: 2836–40.
242. Zhu W, Murray PR, Huskins WC, *et al.* Dissemination of an *Enterococcus* Inc18-Like *vanA* plasmid associated with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 4314–20.
243. Ortwine JK, Werth BJ, Sakoulas G, *et al.* Reduced glycopeptide and lipopeptide

- susceptibility in *Staphylococcus aureus* and the 'seesaw effect': Taking advantage of the back door left open? *Drug Resist Updat* 2013; **16**: 73–9.
244. Carmona-Torre F, Rua M, Del Pozo JL. Directed therapeutic approach to *Staphylococcus aureus* infections. Clinical aspects of prescription. *Rev Esp Quimioter* 2016; **29**: 15–20.
245. Severin A, Shang WW, Tabei K, Tomasz A. Penicillin-binding protein 2 is essential for expression of high-level vancomycin resistance and cell wall synthesis in vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the enterococcal *vanA* gene complex. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 4566–73.
246. Sierra JM, Camoez M, Tubau F, *et al.* Low prevalence of Cfr-mediated linezolid resistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Spanish hospital: case report on linezolid resistance acquired during linezolid therapy. *PLoS One* 2013; **8**: 1–3.
247. Shore AC, Lazaris A, Kinnevey PM, *et al.* First Report of *cfr*-Carrying Plasmids in the Pandemic Sequence Type 22 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Type IV Clone. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; **60**: 3007–15.
248. Deresinski S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: An evolutionary, epidemiologic, and therapeutic odyssey. *Clin Infect Dis* 2005; **40**: 562–73.
249. Armand-Lefevre L, Buke C, Ruppe E, *et al.* Secular trends and dynamics of hospital associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect* 2010; **16**: 1435–41.
250. Saliba P, Hornero A, Cuervo G, *et al.* Interventions to decrease short-term peripheral venous catheter-related bloodstream infections: impact on incidence and mortality. *J Hosp Infect* 2018; **100**: 178–86.
251. Grundmann H, Schouls LM, Aanensen DM, *et al.* The dynamic changes of dominant clones of *Staphylococcus aureus* causing bloodstream infections in the European region: Results of a second structured survey. *Eurosurveillance* 2014; **19**: 20987.
252. Pérez-Vázquez M, Vindel A, Marcos C, *et al.* Spread of invasive Spanish *Staphylococcus aureus* spa-type t067 associated with a high prevalence of the aminoglycoside-modifying enzyme gene *ant(4')-Ia* and the efflux pump genes *msrA/msrB*. *J Antimicrob Chemother* 2009; **63**: 21–31.
253. Argudín MA, Mendoza MC, Méndez FJ, *et al.* Clonal complexes and diversity of exotoxin gene profiles in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates from patients in a Spanish hospital. *J Clin Microbiol* 2009; **47**: 2097–105.
254. Jiménez JN, Ocampo AM, Vanegas JM, *et al.* CC8 MRSA strains harboring SCCmec type IVc are predominant in Colombian hospitals. *PLoS One* 2012; **7**:

- 38576.
255. Rolo J, Miragaia M, Turlej-Rogacka A, *et al.* High genetic diversity among community-associated *Staphylococcus aureus* in Europe: Results from a multicenter study. *PLoS One* 2012; **7**: 1–10.
256. Torres-Sangiao E, Pérez-Castro S, Fernández-Natal MI, *et al.* Identification of international circulating lineages of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the north of Spain and their glycopeptide and linezolid susceptibility. *J Med Microbiol* 2012; **61**: 305–7.
257. Wang X, Zhao H, Wang B, *et al.* Identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST8 isolates in China with potential high virulence. *Emerg Microbes Infect* 2022; **11**: 507.
258. Tickler IA, Goering R V, Mediavilla JR, *et al.* Continued expansion of USA300-like methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among hospitalized patients in the United States. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2017; **88**: 342–7.
259. Ruiz-Ripa L, Bellés-Bellés A, Fernández-Fernández R, *et al.* Linezolid-resistant MRSA-CC398 carrying the *cfr* gene, and MRSA-CC9 isolates from pigs with signs of infection in Spain. *J Appl Microbiol* 2021; **131**: 615–22.
260. Authority EFS, Control EC for DP and. The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2019–2020. *EFSA J* 2022; **20**.
261. Hau SJ, Frana T, Sun J, *et al.* Zinc Resistance within Swine-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates in the United States Is Associated with Multilocus Sequence Type Lineage. *Appl Environ Microbiol* 2017; **83**.
262. Monecke S, Ruppelt-Lorz A, Müller E, *et al.* Dissemination of high-level mupirocin-resistant CC22-MRSA-IV in Saxony. *GMS Hyg Infect Control* 2017; **12**: 1–5.
263. Toleman MS, Reuter S, Jamroz D, *et al.* Prospective genomic surveillance of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) associated with bloodstream infection, England, 1 October 2012 to 30 September 2013. *Eurosurveillance* 2019; **24**: 1–12.
264. Mairi A, Touati A, Lavigne JP. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ST80 Clone: A Systematic Review. *Toxins (Basel)* 2020; **12**: 1–21.
265. Naorem RS, Blom J, Fekete C. Genome-wide comparison of four MRSA clinical isolates from Germany and Hungary. *PeerJ* 2021; **9**: 10185.
266. Zhang K, McClure JA, Conly JM. Enhanced multiplex PCR assay for typing of staphylococcal cassette chromosome *mec* types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Mol Cell Probes* 2012; **26**: 218–21.
267. Mistry H, Sharma P, Mahato S, *et al.* Prevalence and Characterization of Oxacillin Susceptible *mecA*-Positive Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* Causing

- Bovine Mastitis in India. *PLoS One* 2016; **11**: 1–10.
268. Durand G, Javerliat F, Bes M, *et al.* Routine whole-genome sequencing for outbreak investigations of *Staphylococcus aureus* in a national reference center. *Front Microbiol* 2018; **9**: 511.
269. Forde BM, Bergh H, Cuddihy T, *et al.* Clinical Implementation of Routine Whole-genome Sequencing for Hospital Infection Control of Multi-drug Resistant Pathogens. *Clin Infect Dis* 2022; 1–8.
270. Köser CU, Ellington MJ, Cartwright EJP, *et al.* Routine use of microbial whole genome sequencing in diagnostic and public health microbiology. *PLoS Pathog* 2012; **8**: 1–9.
271. Dendani Chadi Z, Dib L, Zeroual F, Benakhla A. Usefulness of molecular typing methods for epidemiological and evolutionary studies of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infections. *Saudi J Biol Sci* 2022; **29**: 1–14.
272. Bonsaglia ECR, Silva NCC, Rossi BF, *et al.* Molecular epidemiology of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) isolated from milk of cows with subclinical mastitis. *Microb Pathog* 2018; **124**: 130–5.
273. Roe CC, Horn KS, Driebe EM, *et al.* Whole genome SNP typing to investigate methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage in a health-care provider as the source of multiple surgical site infections. *Hereditas* 2016; **153**: 11–8.
274. Bogaerts B, Winand R, Fu Q, *et al.* Validation of a bioinformatics workflow for routine analysis of whole-genome sequencing data and related challenges for pathogen typing in a European national reference center: *Neisseria meningitidis* as a Proof-of-Concept. *Front Microbiol* 2019; **10**: 362.
275. Tang S, Orsi RH, Luo H, *et al.* Assessment and Comparison of Molecular Subtyping and Characterization Methods for *Salmonella*. *Front Microbiol* 2019; **10**: 1591.
276. Rodriguez M, Hogan PG, Satola SW, *et al.* Discriminatory Indices of Typing Methods for Epidemiologic Analysis of Contemporary *Staphylococcus aureus* Strains. *Medicine (Baltimore)* 2015; **94**: 1–8.
277. Hyun JC, Monk JM, Palsson BO. Comparative pangenomics: analysis of 12 microbial pathogen pangenomes reveals conserved global structures of genetic and functional diversity. *BMC Genomics* 2022; **23**: 7–25.
278. Gonzalez-Diaz A, Carrera-Salinas A, Pinto M, *et al.* Comparative pangenome analysis of capsulated *Haemophilus influenzae* serotype f highlights their high genomic stability. *Sci Rep* 2022; **12**: 1–10.
279. Planet PJ, Larussa SJ, Dana A, *et al.* Emergence of the epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300 coincides with horizontal transfer of the arginine catabolic mobile element and *speG*-mediated adaptations for survival on skin. *MBio* 2013; **4**: 1–10.

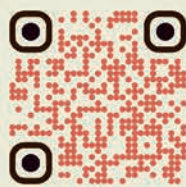
280. Sabat AJ, Köck R, Akkerboom V, *et al.* Novel Organization of the Arginine Catabolic Mobile Element and Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Composite Island and Its Horizontal Transfer between Distinct *Staphylococcus aureus* Genotypes. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; **57**: 5774.
281. Chua K, Laurent F, Coombs G, *et al.* Not Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA)! A Clinician's Guide to Community MRSA - Its Evolving Antimicrobial Resistance and Implications for Therapy. *Clin Infect Dis* 2011; **52**: 99–114.
282. Sader HS, Mendes RE, Jones RN, *et al.* Antimicrobial susceptibility patterns of community- and hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from United States Hospitals: results from the AWARE Ceftaroline Surveillance Program (2012–2014). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2016; **86**: 76–9.
283. David MZ, Daum RS. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clin Microbiol Rev* 2010; **23**: 616–87.
284. King MD, Humphrey BJ, Wang YF, *et al.* Emergence of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA 300 clone as the predominant cause of skin and soft-tissue infections. *Ann Intern Med* 2006; **144**: 309–17.
285. Popovich KJ, Weinstein RA, Hota B. Are community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains replacing traditional nosocomial MRSA strains? *Clin Infect Dis* 2008; **46**: 787–94.
286. Dyzenhaus S, Sullivan MJ, Alburquerque B, *et al.* MRSA lineage USA300 isolated from bloodstream infections exhibit altered virulence regulation. *Cell Host Microbe* 2023; **31**: 1–15.
287. Daskalaki M, Rojo P, Marin-Ferrer M, *et al.* Pantón-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus* skin and soft tissue infections among children in an emergency department in Madrid, Spain. *Clin Microbiol Infect* 2010; **16**: 74–7.
288. Marimón JM, Villar M, García-Arenzana JM, *et al.* Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* carrying the panton-valentine leucocidin genes in northern Spain. *J Infect* 2012; **64**: 47–53.
289. Blanco R, Tristan A, Ezpeleta G, *et al.* Molecular Epidemiology of Pantón-Valentine Leukocidin-Positive *Staphylococcus aureus* in Spain: Emergence of the USA300 Clone in an Autochthonous Population. *J Clin Microbiol* 2011; **49**: 433.
290. Manzur A, Dominguez AM, Pujol M, *et al.* Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: An emerging threat in Spain. *Clin Microbiol Infect* 2008; **14**: 377–80.
291. Gudíol C, Cuervo G, Shaw E, *et al.* Pharmacotherapeutic options for treating *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Expert Opin Pharmacother* 2017; **18**: 1947–63.
292. Liu C, Bayer A, Cosgrove SE, *et al.* Clinical practice guidelines by the infectious

- diseases society of america for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children. *Clin Infect Dis* 2011; **52**: 19–55.
293. Moore CL, Osaki-Kiyan P, Haque NZ, *et al.* Daptomycin versus vancomycin for bloodstream infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a high vancomycin minimum inhibitory concentration: a case-control study. *Clin Infect Dis* 2012; **54**: 51–8.
294. Tong SYC, Lye DC, Yahav D, *et al.* Effect of Vancomycin or Daptomycin With vs Without an Antistaphylococcal β -Lactam on Mortality, Bacteremia, Relapse, or Treatment Failure in Patients With MRSA Bacteremia: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* 2020; **323**: 527–37.
295. Gasch O, Camoez M, Domínguez MA, *et al.* Emergence of resistance to daptomycin in a cohort of patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* persistent bacteraemia treated with daptomycin. *J Antimicrob Chemother* 2014; **69**: 568–71.
296. Moise PA, North D, Steenbergen JN, *et al.* Susceptibility relationship between vancomycin and daptomycin in *Staphylococcus aureus*: facts and assumptions. *Lancet Infect Dis* 2009; **9**: 617–24.
297. Hayden MK, Rezai K, Hayes RA, *et al.* Development of Daptomycin resistance in vivo in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 5285–7.
298. Kullar R, Sakoulas G, Deresinski S, *et al.* When sepsis persists: a review of MRSA bacteraemia salvage therapy. *J Antimicrob Chemother* 2016; **71**: 576–86.
299. Lewis PO, Heil EL, Covert KL, *et al.* Treatment strategies for persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *J Clin Pharm Ther* 2018; **43**: 614–25.
300. Falagas ME, Athanasaki F, Voulgaris GL, *et al.* Resistance to fosfomycin: Mechanisms, frequency and clinical consequences. *Int J Antimicrob Agents* 2019; **53**: 22–8.
301. García-de-la-Mària C, Gasch O, García-Gonzalez J, *et al.* The Combination of Daptomycin and Fosfomycin Has Synergistic, Potent, and Rapid Bactericidal Activity against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in a Rabbit Model of Experimental Endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 2018; **62**: 2633.
302. Miño JM, Entenza JM, Del Río A, *et al.* High-dose daptomycin plus fosfomycin is safe and effective in treating methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 4511–5.
303. Saravolatz LD, Pawlak J, Johnson L. *In vitro* activity of ceftaroline against community-associated methicillin-resistant, vancomycin-intermediate, vancomycin-resistant, and daptomycin-nonsusceptible *Staphylococcus aureus* isolates. *J Antimicrob Chemother* 2023; **78**: 238–41.

304. Sakoulas G, Moise PA, Casapao AM, *et al.* Antimicrobial salvage therapy for persistent staphylococcal bacteremia using daptomycin plus ceftaroline. *Clin Ther* 2014; **36**: 1317–33.
305. Geriak M, Haddad F, Rizvi K, *et al.* Clinical Data on Daptomycin plus Ceftaroline versus Standard of Care Monotherapy in the Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother* 2019; **63**: 2483–18.
306. Zasowski EJ, Trinh TD, Claeys KC, *et al.* Multicenter Observational Study of Ceftaroline Fosamil for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; **61**: 15–6.
307. Gil Romero Y, Gómez-Garcés JL. *In vitro* activity of ceftaroline in combination with other antimicrobials active against *Staphylococcus* spp. *Enfermedades Infecc y Microbiol Clin (English ed)* 2020; **38**: 25–7.
308. García AB, Candel FJ, Lopez L, *et al.* In vitro ceftaroline combinations against methicillinresistant *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol* 2016; **65**: 1119–22.
309. Saravolatz LD, Pawlak J. *In vitro* activity of fosfomycin alone and in combination against *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility or resistance to methicillin, vancomycin, daptomycin or linezolid. *J Antimicrob Chemother* 2023; **78**: 238–41.
310. Leber AL. Synergism Testing: Broth Microdilution Checkerboard and Broth Macrodilution Methods. In: *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. John Wiley & Sons, Ltd, 2016; 5–23.
311. World Health Organization (WHO). *Central Asian and European Surveillance of Antimicrobial Resistance*. Geneva; 2019.
312. World Health Organization (WHO). *Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) Report: early implementation 2020*. Geneva; 2020.



ANEXOS



Artículo publicado



Article

Molecular Epidemiology, Antimicrobial Susceptibility, and Clinical Features of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infections over 30 Years in Barcelona, Spain (1990–2019)

Daniel Antonio Vázquez-Sánchez ^{1,2}, Sara Grillo ³, Anna Carrera-Salinas ¹ , Aida González-Díaz ^{1,4}, Guillermo Cuervo ³, Inmaculada Grau ^{3,4} , Mariana Camoez ^{1,2}, Sara Martí ^{1,4,5}, Dàmaris Berbel ^{1,4}, Fe Tubau ^{1,4}, Carmen Ardanuy ^{1,4,6} , Miquel Pujol ^{2,3} , Jordi Càmarà ^{1,4,*} and M^a Ángeles Domínguez ^{1,2,6,*}

¹ Department of Microbiology, Hospital Universitari de Bellvitge-IDIBELL, 08907 Barcelona, Spain

² CIBER de Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC), Instituto de Salud Carlos III, 28020 Madrid, Spain

³ Department of Infectious Diseases, Hospital Universitari de Bellvitge-IDIBELL, 08907 Barcelona, Spain

⁴ CIBER de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Instituto de Salud Carlos III, 28020 Madrid, Spain

⁵ Department of Medicine, School of Medicine and Health Sciences, University of Barcelona, 08007 Barcelona, Spain

⁶ Department of Pathology and Experimental Therapeutics, College of Medicine, University of Barcelona, 08007 Barcelona, Spain

* Correspondence: jcamara@bellvitgehospital.cat (J.C.); adominguez@bellvitgehospital.cat (M.Á.D.); Tel.: +34-93-260-79-30 (ext. 8041) (J.C.); +34-93-260-79-30 (ext. 7606) (M.Á.D.)



Citation: Vázquez-Sánchez, D.A.; Grillo, S.; Carrera-Salinas, A.; González-Díaz, A.; Cuervo, G.; Grau, I.; Camoez, M.; Martí, S.; Berbel, D.; Tubau, F.; et al. Molecular Epidemiology, Antimicrobial Susceptibility, and Clinical Features of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infections over 30 Years in Barcelona, Spain (1990–2019). *Microorganisms* **2022**, *10*, 2401. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10122401>

Academic Editor: Vineet K. Singh

Received: 2 November 2022

Accepted: 1 December 2022

Published: 3 December 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream infections (MRSA-BSI) are a significant cause of mortality. We analysed the evolution of the molecular and clinical epidemiology of MRSA-BSI ($n = 784$) in adult patients (Barcelona, 1990–2019). Isolates were tested for antimicrobial susceptibility and genotyped (PFGE), and a selection was sequenced (WGS) to characterise the pangenome and mechanisms underlying antimicrobial resistance. Increases in patient age (60 to 71 years), comorbidities (Charlson's index > 2 , 10% to 94%), community-onset healthcare-associated acquisition (9% to 60%), and 30-day mortality (28% to 36%) were observed during the 1990–1995 and 2014–2019 periods. The proportion of catheter-related BSIs fell from 57% to 20%. Current MRSA-BSIs are caused by CC5-IV and an upward trend of CC8-IV and CC22-IV clones. CC5 and CC8 had the lowest core genome proportions. Antimicrobial resistance rates fell, and only ciprofloxacin, tobramycin, and erythromycin remained high ($>50\%$) due to GyrA/GrlA changes, the presence of aminoglycoside-modifying enzymes (AAC(6')-Ie-APH(2'')-Ia and ANT(4')-Ia), and *mph(C)/msr(A)* or *erm(C)* genes. Two CC22-IV strains showed daptomycin resistance (MprF substitutions). MRSA-BSI has become healthcare-associated, affecting elderly patients with comorbidities and causing high mortality rates. Clonal replacement with CC5-IV and CC8-IV clones resulted in lower antimicrobial resistance rates. The increased frequency of the successful CC22-IV, associated with daptomycin resistance, should be monitored.

Keywords: MRSA; *Staphylococcus aureus*; bacteraemia; antimicrobial resistance; whole-genome sequencing; bloodstream infection; BSI

1. Introduction

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a serious global health concern that causes considerable morbidity and mortality [1]. MRSA infections are associated with higher mortality than methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) infections [2,3]. Despite the introduction of new antimicrobials and improved supportive therapy, 30-day mortality in severe MRSA infections, such as bloodstream infections (BSI), remains high, between 18% and 29% [4,5].

S. aureus can develop resistance through the acquisition of mobile genetic elements (horizontal gene transfer) or via chromosomal mutations [6,7]. In fact, methicillin resistance is mostly associated with the *mecA* gene, which codes for a low-affinity penicillin-binding protein (PBP2a) incorporated into the chromosome through the acquisition of a genomic island, staphylococcal chromosomal cassette *mec* (SCC*mec*) [8,9]. In addition to β -lactam resistance, a significant proportion of MRSA isolates are also resistant to other antimicrobial groups, such as quinolones, aminoglycosides, and macrolides, a situation that limits the therapeutic options available [10]. In addition, resistance to linezolid, vancomycin, and some last-resort antibiotics for treating MRSA infections, such as ceftaroline or daptomycin, though still uncommon, has already been described [11]. For all these reasons, MRSA has been included in the list of pathogens for which researching and developing new antibiotics is a priority [2,12,13].

MRSA isolates related to the hospital setting frequently exhibit a multidrug-resistant (MDR) phenotype, cause infections in patients with comorbidities, and may be associated with nosocomial outbreaks [14]. The emergence of these MDR isolates seems to be closely related to the selective pressure exerted by the use of antibiotics [15,16]. In contrast, community-acquired (CA) infections may occur in otherwise healthy individuals and are usually less associated with antimicrobial resistance. However, invasive infections caused by CA-MRSA isolates have been reported to be more severe and to require intensive care unit admission more frequently, indicating a potential increased virulence [17,18]. In recent years, broad-scale infection prevention measures have focused on reducing the incidence of infections caused by both hospital-onset (HO-HCA) and community-onset healthcare-associated (CO-HCA) MRSA, thus potentially limiting the spread of clones typically associated with this setting [19]. In this regard, severe MRSA infections are caused by a limited number of clones distributed worldwide [20], whose epidemiology has been established by classical typing methods, such as pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), *S. aureus* protein A (*spa*) typing, and multilocus sequence typing (MLST). As with other pathogens, whole-genome sequencing (WGS) has shown excellent discriminatory power for MRSA isolates, and it is increasingly being used as part of infection control practices [21,22].

In this study, we explored the molecular epidemiology, genomic diversity, and clinical characteristics of MRSA-BSI in a tertiary care hospital over 30 years (1990–2019). The use of microbiologic and genomics approaches together with WGS and clinical data allowed us to trace the rise and fall of MRSA clones and to study the mechanisms underlying antimicrobial resistance and the changes occurring in the clinical presentation of MRSA-BSI over time.

2. Materials and Methods

2.1. Study Setting, Definitions, and Clinical Data

Bellvitge University Hospital (HUB) is a 700-bed teaching hospital for adult patients located in the Barcelona Metropolitan Area in Spain. At HUB, all MRSA-BSI isolates are prospectively collected and stored at -80°C . MRSA-BSI patients' demographic and clinical data, including age, sex, acquisition, source of infection, and 30-day mortality, are prospectively collected from electronic resources. For this study, we included episodes recorded over a 30-year period (1990–2019). An MRSA-BSI episode was defined as a positive blood culture for MRSA in a patient with clinical signs and symptoms compatible with infection. Only the first episode per patient and year was considered. BSI episodes were classified as HO-HCA, CO-HCA, or CA, according to Friedman's criteria and following the new terminology for MRSA bacteraemia [23,24]. In brief, episodes that occurred at least ≥ 48 h after hospitalisation with no signs or symptoms of infection at admission were considered HO-HCA. Episodes within 48 h of admission were considered CO-HCA or CA depending on whether the patient had had recent contact with health-care settings or not, respectively.

2.2. Bacterial Isolates and Antibiotic Susceptibility Testing

As part of the daily practice, *S. aureus* isolates were identified by conventional methods (Mannitol agar, DNase and coagulase test) and, since 2012, by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight (MALDI-TOF). Antimicrobial susceptibility testing was performed by disk diffusion (1990–1998) and/or microdilution (from 1999 onwards) using commercial panels (MicroScan, Beckman Coulter, Brea, CA, USA) and following the recommendations and criteria of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) for each period [25]. Susceptibility to 14 antimicrobials (ciprofloxacin, clindamycin, cotrimoxazole, erythromycin, fosfomycin, fusidic acid, gentamicin, linezolid, oxacillin, penicillin, rifampicin, tetracycline, tobramycin, and vancomycin) was routinely tested in all isolates. Susceptibility to ceftaroline, daptomycin, and mupirocin was additionally tested by microdilution and chloramphenicol by disk diffusion in all isolates selected for WGS. Isolates were classified as MDR if they were resistant to ≥ 3 antimicrobial categories [26].

2.3. Molecular Typing, Whole-Genome Sequencing, and Bioinformatic Analysis

Molecular characterisation was performed by PFGE (SmaI) in all available isolates ($n = 702$) (Figure S1). The PFGE band patterns were interpreted according to Tenover's criteria [27]. Furthermore, other additional tests (MLST, *spa*, *agr*, and SCCmec typing) were performed in at least one strain of each PFGE pattern (328/702, 46%) in accordance with a previously described methodology [28]. A selection of 114 isolates (Table S1), representative of all periods and including all major clonal complexes (CC) and sporadic PFGE types, was studied by WGS. DNA extraction and quantification were performed using a QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and a Quantus™ Fluorometer (Promega, WI, USA) respectively. A Nextera XT DNA Prep Kit (Illumina, San Diego, CA, USA) was used to prepare the libraries, followed by paired-end sequencing on a MiSeq platform (Illumina). Sequences were assembled with the INNUca v4.2 pipeline (github.com/B-UMMI/INNUca; accessed on 7 July 2021) with default parameters and annotated using Prokka v.1.12 [29].

MLST, *spa*-type, and SCCmec-type were obtained in silico using online tools from the Center for Genomic Epidemiology [30–32]. New alleles and ST profile numbers were registered in PubMLST (pubmlst.org; accessed on 18 February 2022). For phylogenetic analysis, a full genome alignment was constructed using Snippy 3.1 (github.com/tseemann/snippy; accessed on 10 March 2022) and *S. aureus* NCTC8325 (Accession number CP000253.1) as a reference. Subsequently, the whole genome alignment was subjected to the prediction and removal of recombinant regions using Gubbins v2.3.4 software, and a phylogenetic tree was constructed using RAxML-NG [33]. Phylogenetic tree visualisation was performed using Microreact [34]. The pangenome analysis was performed using Roary [35], with a minimum identity percentage of 80% for BLASTp. Genes associated with transferable resistance were screened using ResFinder [36]. The analysis of point mutations in genes associated with antibiotic resistance (*mecA*, *mprF*, *gyrA*, *gyrB*, *griA*, *griB*, *pbp2*, *pbp4*, *rpoB*, *rpoC*, *murA*, *glpT*, *uhpT*, *dfrB*, and *ileS*) was performed with Geneious R9 (Biomatters) using *S. aureus* COL (Accession number CP000046) genome as a reference.

Reads were deposited in the European Nucleotide Archive (ENA): study accession number PRJEB54086.

2.4. Statistical Analysis

Statistical analyses were conducted using GraphPad Prism 5.01 software. Fisher's exact test (two-tailed) or an unpaired *t*-test was used when appropriate and *p*-values ≤ 0.05 were considered statistically significant. The incidence rates of MRSA- and MSSA-BSI were calculated using the total number of hospital stays (100,000 patient-days) as the denominator. For the analysis, the study was divided into five periods: 1990–1995, 1996–2001, 2002–2007, 2008–2013, and 2014–2019.

2.5. Ethics

This study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki of the World Medical Association. It was approved by the HUB's Clinical Research Ethics Committee (PR293/22). Written informed consent was not required as this was a retrospective and observational study with isolates obtained as part of routine microbiological tests. Patient data were always protected in accordance with the local committee and national standards.

3. Results

3.1. Incidence and Clinical Characteristics of MRSA-BSI Episodes

From 1990 to 2019, we detected 3544 MSSA- and 819 MRSA-BSI episodes (Figure 1). The incidence of *S. aureus* BSI increased from 45.3 episodes per 100,000 patient-days in the first period (1990–1995) to 60.3 in the last period (2014–2019). The incidence of both MSSA- and MRSA-BSI increased over time, reaching a peak in 2002–2007 (Figure 1). The percentage of MRSA among all *S. aureus*-BSIs varied between 15% and 23%, with the highest percentage in 2002–2007, coinciding with a peak of *S. aureus*-BSI incidence (63.5 episodes per 100,000 patient-days).

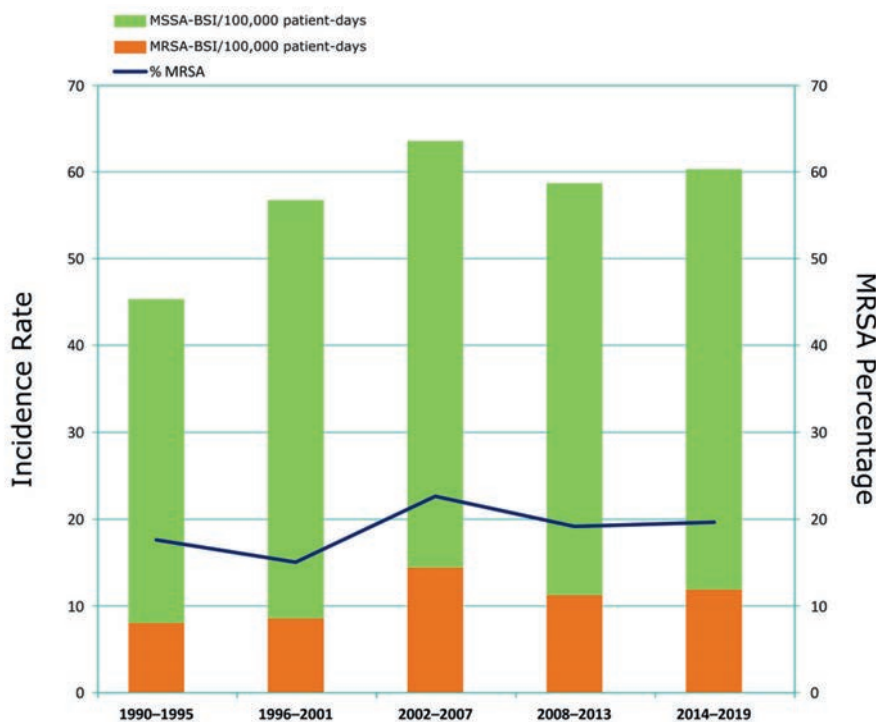


Figure 1. Evolution of MSSA- and MRSA-BSI over the study period. Incidence rates of MSSA- and MRSA-BSI (episodes per 100,000 patient-days) are shown in bars. The blue line shows the percentage of methicillin-resistant isolates.

Clinical characteristics were available for 784 MRSA-BSI episodes (Table 1). The median age of patients rose from 60 to 71 years old, and the proportion of female patients increased from 25% to 46% throughout the study period. The proportion of patients with a Charlson's comorbidity index (CCI) > 2 rose from 10% in 1990–1995 to 94% in 2014–2019. An increase in 30-day mortality was observed after 2008, with rates of 28–29% recorded from 1990 to 2001 and 36–38% between 2008 and 2019. Regarding the acquisition of MRSA infection, the proportion of HO-HCA MRSA-BSI episodes fell from 91% to 26%, whereas the CO-HCA MRSA-BSI episodes rose from 9% to 60% in the same periods. CA non-healthcare-

associated episodes emerged in 2002–2007 and increased progressively, accounting for 14% of MRSA-BSIs in the last period (2014–2019). As for the sources of infection, a significant reduction in the proportion of catheter-related BSIs was observed over time (from 57% to 20%). In the last period, HO-HCA MRSA-BSI episodes most frequently originated in the respiratory tract (13/39) or vascular catheter (11/39), while CO-HCA MRSA-BSI sources of infection were mainly vascular catheter (19/89) and skin and soft tissue infections (SSTI) (17/89). The most frequent sources of CA episodes were SSTI (9/21) and unknown focus (4/21) (Table S2).

Table 1. Clinical and demographic characteristics of MRSA-BSI episodes by period. The table shows the total number of episodes and the percentages (in parentheses).

		Period				
		1990–1995	1996–2001	2002–2007	2008–2013	2014–2019
Number of episodes		137	142	207	149	149
Sex, female		34 (25)	38 (27)	76 (37)	62 (42)	68 (46) *
Age, mean $\pm$ SD (range)		60.2 $\pm$ 18.9 (22–94)	68.3 $\pm$ 16.3 (23–99)	70.2 $\pm$ 14.9 (24–98)	70.1 $\pm$ 14.1 (27–94)	71.2 $\pm$ 14.5 (19–85) *
Acquisition	HO-HCA	124 (91)	113 (80)	98 (47)	70 (47)	39 (26) *
	CO-HCA	13 (9)	29 (20)	107 (52)	71 (48)	89 (60) *
	CA	0 (0)	0 (0)	2 (1)	8 (5)	21 (14) *
Source of infection						
	Catheter	78 (57)	71 (50)	62 (30)	35 (24)	30 (20) *
	Skin and soft tissue	8 (6)	12 (8)	34 (16)	20 (13)	29 (20) *
	Respiratory tract	1 (1)	14 (10)	17 (8)	17 (11)	24 (16) *
	Urinary	2 (1)	5 (4)	22 (11)	21 (14)	12 (8) *
	Osteoarticular	4 (3)	5 (4)	12 (6)	11 (7)	13 (9) *
	Endocarditis	5 (3)	3 (2)	4 (2)	4 (3)	11 (7)
	Other source ‡	16 (12)	22 (15)	35 (17)	13 (9)	10 (7)
	Unknown source	23 (17)	10 (7)	21 (10)	28 (19)	20 (13)
CCI	>2	13 (10)	20 (25)	92 (49)	117 (82)	140 (94) *
	≥ 5	7 (6)	3 (4)	33 (18)	94 (66)	112 (75) *
	Not available	13	61	21	7	0
30-day mortality		39 (28)	41 (29)	57 (28)	57 (38)	54 (36)

‡ Other sources: biliary, pericardium, central nervous system. * Significant differences between the 1990–1995 and 2014–2019 periods ($p < 0.05$). CCI, Charlson’s comorbidity index; HO-HCA, hospital-onset healthcare-associated; CO-HCA, community-onset healthcare-associated; CA, community-acquired.

3.2. Molecular Epidemiology of MRSA-BSI

A total of 702/784 isolates (90%) were available for molecular studies. Five main genotypes accounted for 96% (675/702) of the MRSA population (Figure 2). Isolates of Iberian clone CC8 ST247 carrying a SCCmec element type Ia (162/702, ST247-Ia [37]) were predominant until 1999 and associated with an MDR profile, including resistance to aminoglycosides, fluoroquinolones, lincosamides, macrolides, rifampicin, and tetracyclines. CC5 ST228-I (72/702, Southern German clone) was prevalent from 2002 to 2009 and also exhibited an MDR profile (macrolides, aminoglycosides, fluoroquinolones, and rifampicin). CC5 isolates harbouring SCCmec-IV (279/702, Paediatric clone) emerged in 1997 and increased rapidly to become the most frequent clone from 2001 to 2015. Isolates of this clone showed different STs (mostly ST125 and ST146) and varied resistance profiles (RPs). The second most frequent lineage was CC8 ST8-IV (120/702), which emerged in 2000 and is currently the first cause of MRSA-BSI. Similar to CC5-IV, this lineage includes isolates with diverse antimicrobial RPs, most of them showing tobramycin and ciprofloxacin

resistance. In addition, a subset of ST8-IV isolates (18/120) was positive for Pantone-Valentine leukocidin (PVL). Six of these isolates were related to the USA300 North American Epidemic clone, which is related to the arginine catabolic mobile element (ACME) and *SCCmec*-IVa, and eight isolates were related to the USA300 South American Epidemic clone, which is associated with copper and mercury resistance element (COMER) and *SCCmec*-IVc. The most recent major clone, CC22 ST22-IVh (42/702, UK-EMRSA-15), has become more frequent since its emergence in 2007, and it is uniformly associated with ciprofloxacin resistance and variable macrolide phenotypes.

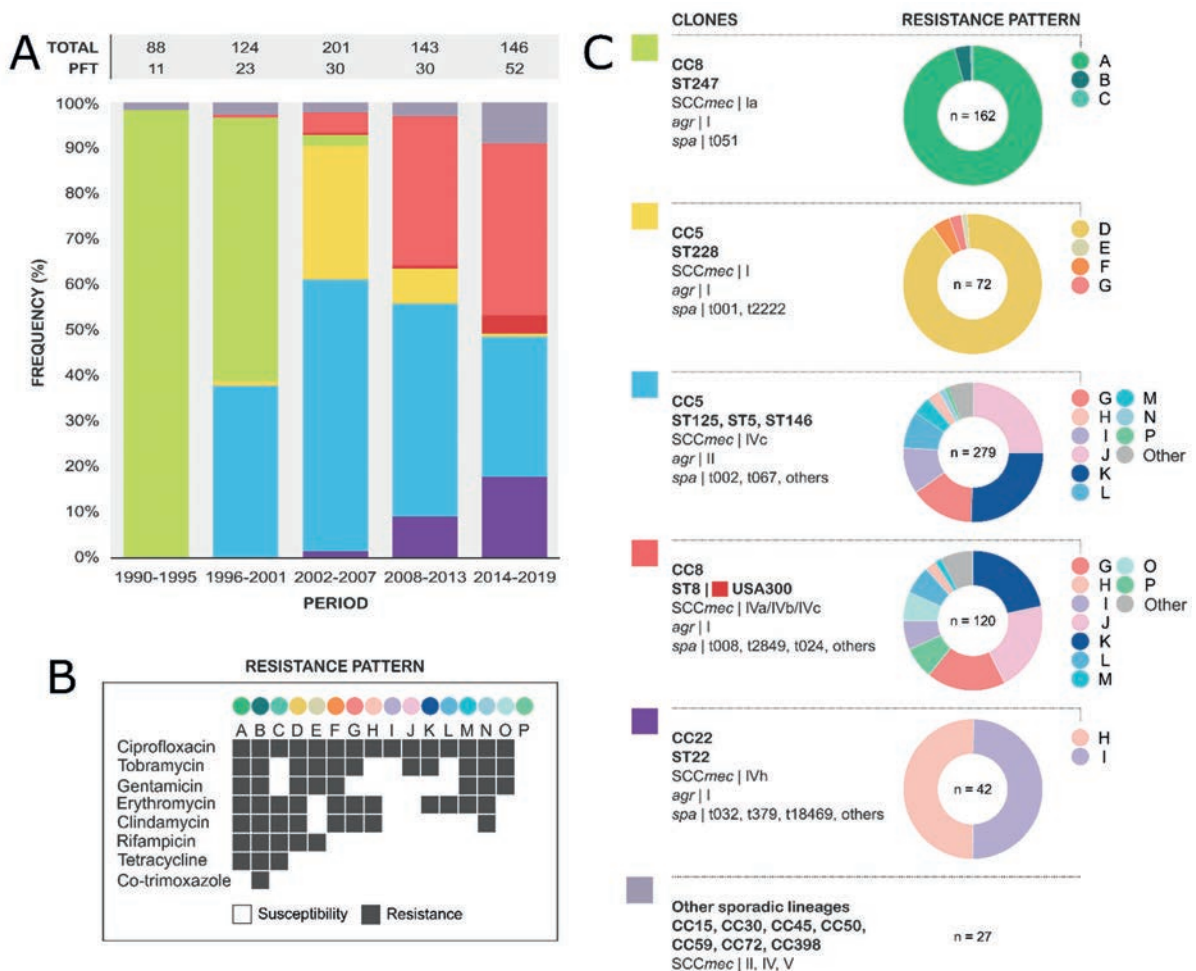


Figure 2. Evolution of MRSA-BSI clones and antimicrobial resistance patterns. **(A)** Distribution and frequency of MRSA-BSI lineages by period. The total number of MRSA-BSI isolates and the different PFGE types in each period are shown above bars. Clones are represented by coloured bars in (A) and by coloured squares in (C). **(B)** Resistance profiles of MRSA-BSI strains. **(C)** Molecular characterisation of major clones and their resistance profiles. The resistance profile of the major clones is represented by coloured dots in (B,C). Other minor resistance profiles ($n < 5$) are shown as 'Other'. CC, clonal complex; PFT, pulsed-field type; *SCCmec*, staphylococcal chromosomal cassette *mec*; *spa*, *spa*-type; ST, sequence type; *agr*, accessory gene regulator Agr.

Figure S2 shows the pangenome composition of each clone among the sequenced isolates. Pangenome analysis detected a pool of 3778 genes, many shared by all genomes (core genes, $n = 1679$, 44%), 322 genes in 95–99% of the genomes (soft-core genes), 821 genes in 15–94% (shell genes), and 956 genes in <15% of the genomes (cloud genes). The phylogenetic tree shows four major CCs clustering together: CC5, CC8, CC72, and CC22. When each CC was examined separately, differences in the gene pools were observed, with CC72 showing the largest gene pool ($n = 3255$)—although it only contained four samples—and CC22, the smallest ($n = 2617$). CC8 and CC5 had the lowest total core genome proportions (67% and 69% respectively), showing a higher genetic variability than the other CCs, while CC22 was genetically more homogeneous. CC8-ST8 and CC5-ST125 Paediatric clone, had more accessory genes per genome than ST247 or ST228.

3.3. Evolution and Molecular Basis of Antimicrobial Resistance

The evolutions of the antimicrobial resistance rates over time are shown in Figure 3. The percentages of resistance to specific antibiotics among the MRSA isolates are shown by period. The disappearance of genotypes with extended resistance profiles, such as ST247-Ia and ST228I, resulted in a fall in the resistance rates to most antimicrobials. Only ciprofloxacin, tobramycin, and erythromycin had resistance percentages above 50% in the last period. All isolates were susceptible to vancomycin and linezolid.

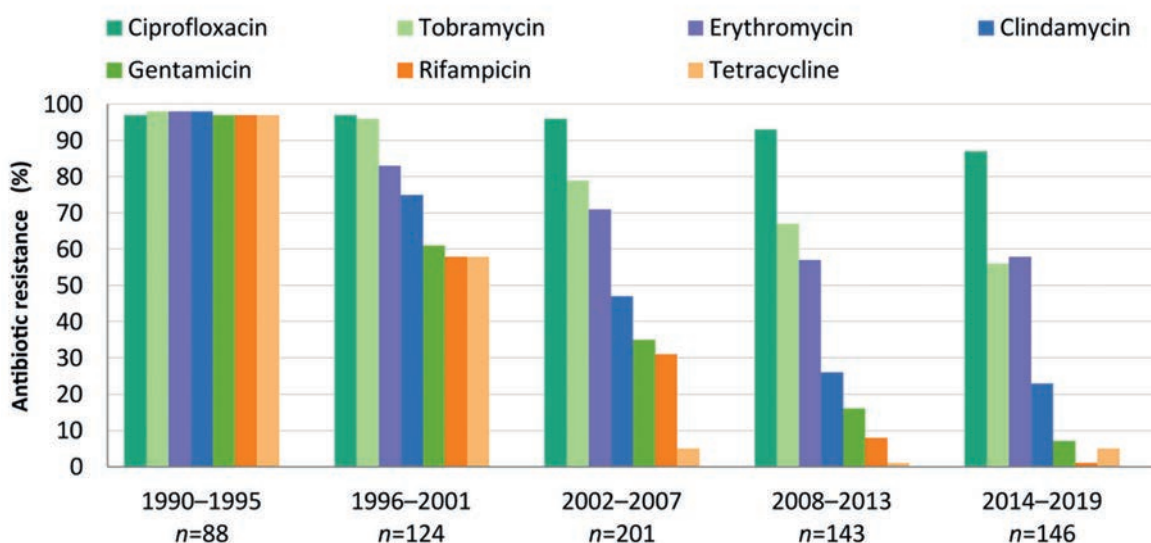


Figure 3. Evolution of antimicrobial resistance rates by period. Only antimicrobials with resistance rates above 5% are shown. All decreases in the percentages of antibiotic resistance were statistically significant ($p < 0.01$) when comparing the first (1990–1995) and the last periods (2014–2019).

Figure 4 summarises the genetic relatedness and the main resistance determinants of the MRSA-BSI strains sequenced through WGS. The most notable resistance mechanisms among the antibiotics with the highest resistance rates are specified next. **Quinolones.** High-ciprofloxacin MICs ($\text{MIC} > 2 \text{ mg/L}$) were associated with substitutions in the quinolone resistance-determining regions (QRDRs) of DNA gyrase GyrA (S84L/V, S85P, and E88K)

and topoisomerase IV GrlA (S80F/Y, S81P, and E84K/G). One CC398 strain had a first-step mutation in GrlA-S80F (MIC = 2 mg/L). No relevant amino acid substitution in GyrB or GrlB was found. **Aminoglycosides.** Resistance to aminoglycosides was found in all clones except CC22. It was related to the presence of aminoglycoside-modifying enzymes, such as the bifunctional protein AAC(6′)-Ie-APH(2′′)-Ia (gentamicin and tobramycin resistance) and ANT(4′)-Ia (tobramycin resistance). **Macrolides and lincosamides.** The *mph(C)* and *msr(A)* genes were found in 32/67 erythromycin-resistant strains. Erythromycin plus clindamycin resistance (MLSB phenotype) was observed in 35 isolates, associated with genes *erm(A)* (mostly detected in ST247-Ia and ST228-I clones) and *erm(C)* (mostly detected in CC22). A single ST8 isolate, in addition to *erm(A)*, also carried the *linA* gene. **Rifampicin.** Rifampicin resistance was associated with RpoB alterations, present only in clones ST247-Ia (H481N plus S529L and/or D471G) and ST228-I (H481N). No changes were found in RpoC. **Tetracyclines.** Among the 15 tetracycline-resistant strains, 11 carried *tet(M)*, three *tet(K)*, and one (CC398) harboured both genes. **Chloramphenicol.** Seven ST125 strains were resistant to chloramphenicol and carried the *catA* gene. **Fosfomycin.** Two fosfomycin-resistant strains had alterations in UhpT (E235STOP or G170STOP) and six carried the *fosB* gene. There were no strains with MurA or GlpT changes. In two ST228 isolates, no genetic determinants were found associated with fosfomycin resistance. **Mupirocin.** Four strains showed high-level mupirocin resistance and the presence of the *mupA* gene. **Co-trimoxazole.** Two resistant strains carried *dfrC* and *dfrG* genes. No mutations were found in the *dfrB* gene. Another CC398 strain had a *dfrK* gene related to an ST398 plasmid [38] but was susceptible to co-trimoxazole. **Fusidic acid.** One strain was resistant and carried the *fusC* gene. **Ceftaroline.** Resistance to ceftaroline was associated with changes in PBP2a (N146K or E239K) in eight ST228-I strains. These isolates were obtained before ceftaroline was implemented at the HUB. Two ST8-IV strains also showed ceftaroline non-susceptibility, but no changes in PBP2a, PBP2, or PBP4 were found. **Daptomycin.** Changes in MprF (T345I and L826F) were found in two daptomycin-resistant CC22-IV strains, isolated during specific treatment with daptomycin.

3.4. Major Lineages and Clinical Characteristics of Recent MRSA-BSI Episodes (2008–2019)

We compared the demographic and clinical data of BSI episodes caused by isolates of the most prevalent lineages (CC5-IV, CC8-IV, and CC22-IV) from 2008 to 2019, when these genotypes co-existed (Table S3). In general, episodes caused by all three clones were similar with regard to demographic and clinical characteristics. In addition, no statistically significant differences in age, sex, CCI, or 30-day mortality between the clones were found. Nevertheless, BSI episodes caused by CC8-IV and CC22-IV clones tended to have a lower respiratory tract origin more often than those caused by CC5-IV (frequencies of 17%, 21%, and 9% respectively).

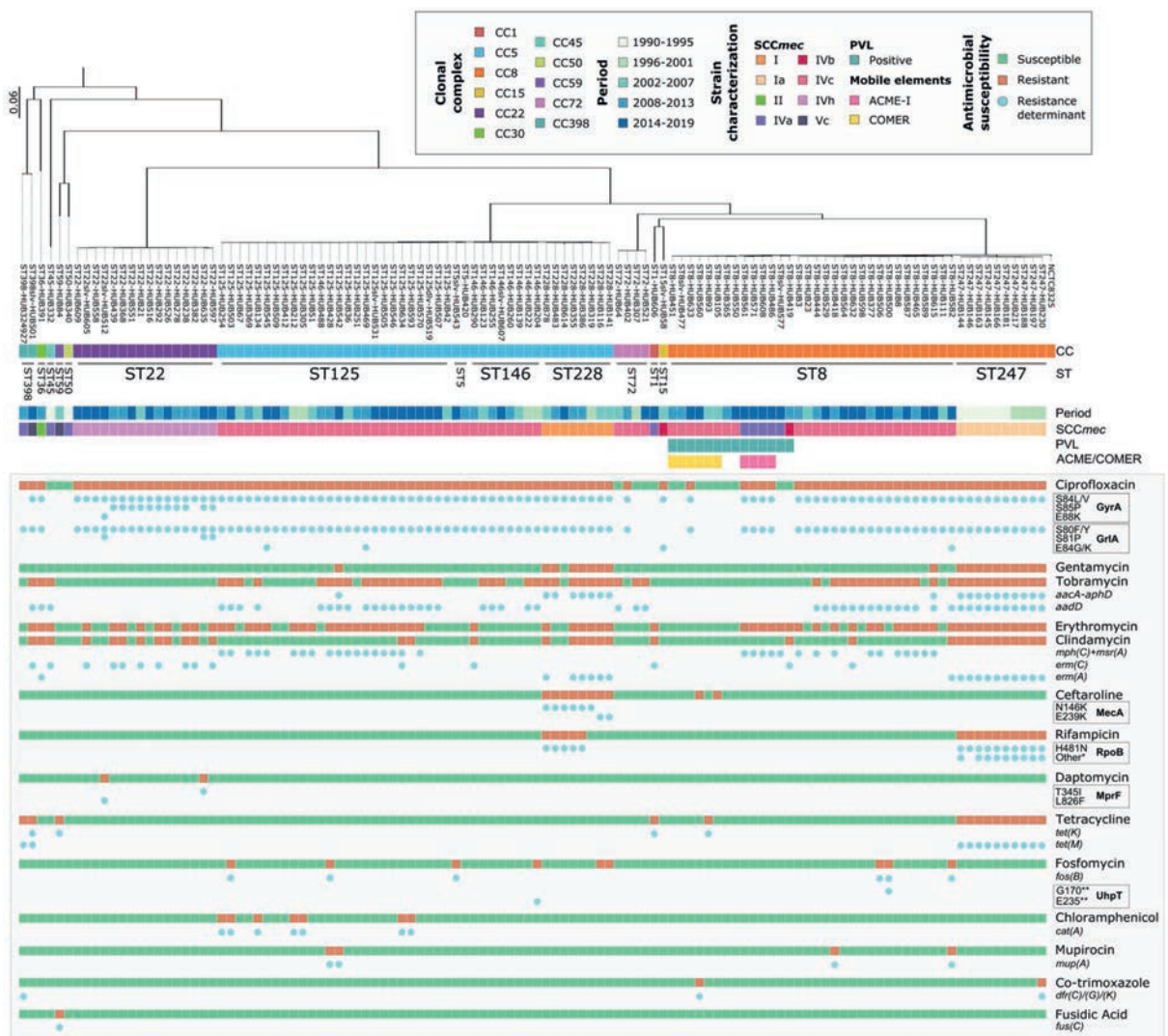


Figure 4. Assembly-based core SNP phylogenetic tree, period, clonal complex, antibiotic resistance, and associated molecular mechanisms. The coloured bars indicate the period and the strain characteristics (CC, SCCmec, PVL, and ACME/COMER elements). In the grey-shaded area, the coloured squares represent the antimicrobial resistance (in red) and susceptibility (in green) by antibiotic group and following CLSI breakpoints [25], followed by blue circles when a resistance determinant was detected. * Other alterations of RpoB, D471G/Y, and S529L. ** Indicates a STOP codon. CC, clonal complex; ST, sequence type; SCCmec, staphylococcal chromosomal cassette mec; PVL, Panton-Valentine leukocidin; ACME, arginine catabolic mobile element; COMER, copper and mercury resistance mobile element.

4. Discussion

Even though the percentage of methicillin resistance appears to be declining in European countries [39], MRSA-BSI still has very high mortality rates [39–41]. Therefore, to understand the changing landscape of MRSA infections, it is essential to study the changes occurring in the profile of patients affected together with the clonal evolution of MRSA

isolates. In this study, we present data on the clinical characteristics and the molecular epidemiology of MRSA-BSI at a tertiary-care hospital over the last 30 years.

Following the initial emergence and rise in MRSA-BSI infections during the 1990s [37], methicillin resistance among *S. aureus* clinical isolates has remained stable at around 20% at HUB [5]. Nevertheless, the clinical presentation of MRSA-BSI has changed dramatically. This may be due to changes in the patients, who are currently older and have more comorbidities, to shifts in MRSA clones, or to a combination of the two. In our setting, current MRSA-BSIs are mostly related to health-care acquisition. This is consistent with published data from around the world and might be attributed to population ageing and the increasing use of prosthetic devices, which has also been associated with a rise in the rate of endocarditis [40,41] (as we observed in the 2014–2019 period). Our study also shows a significant reduction in the frequency of catheter-related BSIs over time, a situation that highlights the efficacy of the infection control measures that were progressively implemented in our institution [42]. Indeed, while the incidence of MSSA-BSI has remained stable since 2002, MRSA-BSI incidence has fallen, despite the increasing complexity of patient management. The drastic reduction in catheter-related BSIs together with the population ageing and the increased number of comorbidities (which both raise the risk of complicated bacteraemia) [4,43] may also have influenced the proportional increase in 30-day mortality observed since 2008. Although bacterial factors cannot be overlooked, in our series, we did not find significant differences in clinical characteristics and mortality among infections caused by different MRSA clones, suggesting that host factors mainly drive the observed changes in mortality.

Through the study period, we observed a reduction in the resistance rates for most antimicrobials. This is due to the disappearance of genotypes with extended resistance profiles and large SCCmec, such as the ST247-Ia Iberian clone, which caused a significant outbreak in our centre from 1990 to 1995 [37], and the ST228-I Southern German clone, highly prevalent in the 2002–2007 period [44]. Currently, resistance to only quinolones, tobramycin, and erythromycin remains significantly prevalent in MRSA-BSI isolates. Quinolone resistance is widespread among MRSA clones and typically associated with hospital-acquired MRSA [45]. It has been proposed that fluoroquinolone resistance may provide an evolutionary advantage that contributes to the initial phase of the spread of CC5-IV Paediatric or CC22-IV EMRSA-15 clones across European hospital environments [46–48]. In regard to tobramycin, its consistency over time and across different clones may originate from the transfer via the conjugation of aminoglycoside resistance determinants between coagulase-negative staphylococci and *S. aureus*, which was demonstrated in another study [49]. In addition, certain SCCmec elements, such as type I, comprise additional genes that encode resistance to other antimicrobials, such as *aadD*, and to heavy metal ions [45]. Clones carrying SCCmec-IVc can also harbour aminoglycoside-resistant genes in the chromosome or in conjugative plasmids [50]. This may have contributed to the persistence of these determinants in HCA-MRSA clones. With respect to macrolides, the maintenance of erythromycin resistance could be associated with a change in macrolide prescription: in recent years, the consumption of long-acting macrolides (e.g., azithromycin) rose in parallel to a fall in the use of short-acting macrolides [51]. Then, the long-term prophylactic use of azithromycin may have resulted in a selection pressure of macrolide-resistant MRSA in patients with chronic respiratory diseases [52]. Resistance to first-election antibiotics, such as linezolid and vancomycin, and last-resort antibiotics for MRSA-BSI treatment, such as daptomycin or ceftaroline, was negligible in our series. Daptomycin resistance was related to previously described *mprF* mutations [53] in two CC22 strains, and most ceftaroline non-susceptible isolates belonged to a single ancient clone (ST228-I, PBP2A alterations), indicating that these resistance mechanisms are not currently widespread in our area. Nevertheless, it should be noted that an association between *mprF* mutations and CC22 has been reported [54], so an increasing frequency of CC22 strains in our region may affect future daptomycin resistance rates.

A few successful clones were responsible for the majority of BSIs over the study period. Consistent with the published data [39,41], most MRSA isolates in the last decade belonged to CC5-IV or CC8-IV. The competitive fitness advantage of carrying small *SCCmec* elements, such as *SCCmec*-IV [55], together with changes in antimicrobial consumption or infection control strategies [47,48,56], may explain the dominance of CC5-IV and CC8-IV clones over the ancient ST247-Ia. Both clones also showed higher genomic diversity, as evidenced by their high proportions of accessory genomes, which may explain their adaptability. Another reason for the persistence of these epidemic clones in the hospital setting could be their enhanced ability for biofilm production when compared to sporadic MRSA clones. This was shown in a recent paper, where CC5 and CC8 presented the virulence factor *sasG* variant associated with bacteraemia and higher rates of biofilm formation, favouring their success in the hospital setting [57]. In recent years, CC22-IV (EMRSA-15) has emerged as an increasingly important cause of MRSA-BSI in our geographical area. MRSA CC22-IV has been detected worldwide [45], is associated with both healthcare and community acquisition [58] and is one of the main causes of MRSA-BSI in some regions [59]. It has been proposed that the initial expansion of this clone was related to the acquisition of fluoroquinolone resistance, coinciding with the introduction of fluoroquinolones in the hospital setting [46]. However, as most epidemic HCA-MRSA clones also characteristically display fluoroquinolone resistance, it seems that other genomic features must be involved in their success. Nevertheless, the increased incidence of CC22-IV in our geographical area in recent years should be closely monitored.

This study included a large collection of well-characterised MRSA-BSI isolates over a long period of time. However, certain limitations of the study are worth discussing. First, it was restricted by its retrospective nature and by the lack of information on certain MRSA-BSI episodes. Secondly, it did not include episodes occurring outside the hospital, which may represent a bias, but this limitation is probably minor given that the severity of MRSA-BSI usually requires hospital care.

In conclusion, MRSA-BSI has primarily become a community-onset healthcare-associated infection in our setting, affecting the elderly and patients with comorbidities, and leading to high mortality. Antimicrobial resistance rates have fallen, with only ciprofloxacin, tobramycin, and erythromycin continuing to be significant. The emergence and rise of CC22 strains, and their potential link with daptomycin resistance, should be closely monitored.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/microorganisms10122401/s1>, Figure S1: Study flow diagram; Figure S2: Pangenome analysis; Table S1: Summary of MRSA bloodstream isolates included in this study; Table S2: Source of infection of MRSA-BSI episodes by acquisition; Table S3: Comparison of the clinical characteristics of the three major clones in the 2008–2019 period.

Author Contributions: Conceptualisation, D.A.V.-S., J.C. and M.Á.D.; data curation, D.A.V.-S. and S.G.; formal analysis, D.A.V.-S., S.G., A.C.-S. and A.G.-D.; funding acquisition, M.Á.D.; investigation, D.A.V.-S. and M.C.; methodology, D.A.V.-S., S.G., M.C., F.T. and J.C.; project administration, C.A. and M.Á.D.; resources, S.M., C.A. and M.Á.D.; software, D.A.V.-S., A.C.-S. and A.G.-D.; supervision, S.M., J.C. and M.Á.D.; validation, S.G., G.C., I.G., D.B., F.T. and J.C.; visualisation, D.A.V.-S., S.G., A.C.-S. and A.G.-D.; writing—original draft preparation, D.A.V.-S., J.C. and M.Á.D.; writing—review and editing, G.C., S.M., C.A., M.P., J.C. and M.Á.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was funded by Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) through the Projects from the Fondo de Investigaciones Sanitarias ‘PI16/01382’ to M.Á.D., by CIBER de Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC-CB21/13/00009), and by CIBER de Enfermedades Respiratorias (CIBERES-CB06/06/0037), co-funded by the European Regional Development Fund/European Social Fund (ERDF/ESF, ‘Investing in your future’). A.C.-S. was supported by the FPU grant ‘FPU16/02202’ (Formación de Profesorado Universitario, Ministerio de Educación, Spain), and S.M. was supported by the Miguel Servet contract ‘CP19/00096’ (ISCIII). We thank the CERCA programme/Generalitat de Catalunya for institutional support.

Data Availability Statement: All relevant data are available in the article or the Supplementary Materials.

Acknowledgments: We thank all the staff of the Clinical Microbiology Department at the Hospital Universitari de Bellvitge that contributed to this work on a daily basis.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Lee, A.S.; de Lencastre, H.H.; Garau, J.; Kluytmans, J.; Malhotra-Kumar, S.; Peschel, A.; Harbarth, S. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2018**, *4*, 18033. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- World Health Organization. Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance 2014. In *WHO 2014 AMR Report*; WHO: Geneva, Switzerland, 2014; pp. 1–8.
- Munckhof, W.J.; Nimmo, G.R.; Carney, J.; Schooneveldt, J.M.; Huygens, F.; Inman-Bamber, J.; Tong, E.; Morton, A.; Giffard, P. Methicillin-Susceptible, Non-Multiresistant Methicillin-Resistant and Multiresistant Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections: A Clinical, Epidemiological and Microbiological Comparative Study. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2008**, *27*, 355–364. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Bai, A.D.; Lo, C.K.L.; Komorowski, A.S.; Suresh, M.; Guo, K.; Garg, A.; Tandon, P.; Senecal, J.; del Corpo, O.; Stefanova, I.; et al. *Staphylococcus aureus* Bacteraemia Mortality: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clin. Microbiol. Infect.* **2022**, *28*, 1076–1084. [\[CrossRef\]](#)
- Gasch, O.; Ayats, J.; Ángeles Domínguez, M.; Tubau, F.; Linares, J.; Peña, C.; Grau, I.; Pallarés, R.; Gudíol, F.; Ariza, J.; et al. Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Bloodstream Infection: Secular Trends over 19 Years at a University Hospital. *Medicine* **2011**, *90*, 319–327. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Jensen, S.O.; Lyon, B.R. Genetics of Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus Aureus*. *Future Microbiol.* **2009**, *4*, 565–582. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Ito, T.; Katayama, Y.; Hiramatsu, K. Cloning and Nucleotide Sequence Determination of the Entire *Mec* DNA of Pre-Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43*, 1449–1458. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Robinson, D.A.; Enright, M.C. Evolutionary Models of the Emergence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 3926–3934. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Nübel, U.; Roumagnac, P.; Feldkamp, M.; Song, J.H.; Ko, K.S.; Huang, Y.C.; Coombs, G.; Ip, M.; Westh, H.; Skov, R.; et al. Frequent Emergence and Limited Geographic Dispersal of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 14130–14135. [\[CrossRef\]](#)
- Kashyap, R.; Shah, A.; Dutt, T.; Wieruszewski, P.M.; Ahdal, J.; Jain, R. Treatments and Limitations for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: A Review of Current Literature. *World J. Clin. Infect Dis.* **2019**, *9*, 1–10. [\[CrossRef\]](#)
- Watkins, R.R.; Holubar, M.; David, M.Z. Antimicrobial Resistance in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* to Newer Antimicrobial Agents *Antimicrob. Agents Chemother.* **2019**, *63*, e01216-19. [\[CrossRef\]](#)
- Asokan, G.V.; Ramadhan, T.; Ahmed, E.; Sanad, H. WHO Global Priority Pathogens List: A Bibliometric Analysis of Medline-PubMed for Knowledge Mobilization to Infection Prevention and Control Practices in Bahrain. *Oman Med. J.* **2019**, *34*, 184. [\[CrossRef\]](#)
- WHO. *Antibiotic Resistance: Multi-Country Public Awareness Survey*; WHO: Geneva, Switzerland, 2015; ISBN 978 92 4 150981 7.
- Planet, P.J. Life after USA300: The Rise and Fall of a Superbug. *J. Infect. Dis.* **2017**, *215*, S71–S77. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- SJ, P.; GK, P. Mechanisms of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Ann. Rev. Biochem.* **2015**, *84*, 577–601. [\[CrossRef\]](#)
- Vestergaard, M.; Frees, D.; Ingmer, H. Antibiotic Resistance and the MRSA Problem. *Microbiol. Spectr.* **2019**, *7*, 2–7. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Robinson, J.O.; Pearson, J.C.; Christiansen, K.J.; Coombs, G.W.; Murray, R.J. Community-Associated versus Healthcare-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bacteraemia: A 10-Year Retrospective Review. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2009**, *28*, 353–361. [\[CrossRef\]](#)
- Nimmo, G.R.; Coombs, G.W. Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Australia. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2008**, *31*, 401–410. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Nimmo, G.R.; Bergh, H.; Nakos, J.; Whitley, D.; Marquess, J.; Huygens, F.; Paterson, D.L. Replacement of Healthcare-Associated MRSA by Community-Associated MRSA in Queensland: Confirmation by Genotyping. *J. Infect.* **2013**, *67*, 439–447. [\[CrossRef\]](#)
- Turner, N.A.; Sharma-Kuinkel, B.K.; Maskarinec, S.A.; Eichenberger, E.M.; Shah, P.P.; Carugati, M.; Holland, T.L.; Fowler, V.G. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: An Overview of Basic and Clinical Research. *Nat. Rev. Microbiol.* **2019**, *17*, 203–218. [\[CrossRef\]](#)
- Lakhundi, S.; Zhang, K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clin. Microbiol. Rev.* **2018**, *31*, 1–103. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Sullivan, M.J.; Altman, D.R.; Chacko, K.I.; Ciferri, B.; Webster, E.; Pak, T.R.; Deikus, G.; Lewis-Sandari, M.; Khan, Z.; Beckford, C.; et al. A Complete Genome Screening Program of Clinical Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates Identifies the Origin and Progression of a Neonatal Intensive Care Unit Outbreak. *J. Clin. Microbiol.* **2019**, *57*, e01261-19. [\[CrossRef\]](#)

23. Friedman, N.D.; Kaye, K.S.; Stout, J.E.; McGarry, S.A.; Trivette, S.L.; Briggs, J.P.; Lamm, W.; Clark, C.; MacFarquhar, J.; Walton, A.L.; et al. Health Care-Associated Bloodstream Infections in Adults: A Reason to Change the Accepted Definition of Community-Acquired Infections. *Ann. Intern. Med.* **2002**, *137*, 791–797. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Klevens, R.M.; Morrison, M.A.; Nadle, J.; Petit, S.; Gershman, K.; Ray, S.; Harrison, L.H.; Lynfield, R.; Dumyati, G.; Townes, J.M.; et al. Invasive Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in the United States. *JAMA* **2007**, *298*, 1763–1771. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing—30th Edition: A CLSI supplement for global application. M100. *J. Serv. Mark.* **2020**, *40*, 1–296.
26. Magiorakos, A.P.; Srinivasan, A.; Carey, R.B.; Carmeli, Y.; Falagas, M.E.; Giske, C.G.; Harbarth, S.; Hindler, J.F.; Kahlmeter, G.; Olsson-Liljequist, B.; et al. Multidrug-Resistant, Extensively Drug-Resistant and Pandrug-Resistant Bacteria: An International Expert Proposal for Interim Standard Definitions for Acquired Resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* **2012**, *18*, 268–281. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Tenover, F.C.; Arbeit, R.D.; Goering, R.V.; Mickelsen, P.; Murray, B.E.; Persing, D.H.; Swaminathan, B. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. *J. Clin. Microbiol.* **1995**, *33*, 2233–2239. [\[CrossRef\]](#)
28. Gasch, O.; Camoez, M.; Dominguez, M.A.; Padilla, B.; Pintado, V.; Almirante, B.; Molina, J.; Lopez-Medrano, F.; Ruiz, E.; Martinez, J.A.; et al. Predictive Factors for Mortality in Patients with Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infection: Impact on Outcome of Host, Microorganism and Therapy. *Clin. Microbiol. Infect.* **2013**, *19*, 1049–1057. [\[CrossRef\]](#)
29. Seemann, T. Prokka: Rapid Prokaryotic Genome Annotation. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 2068–2069. [\[CrossRef\]](#)
30. Larsen, M.V.; Cosentino, S.; Rasmussen, S.; Friis, C.; Hasman, H.; Marvig, R.L.; Jelsbak, L.; Sicheritz-Pontén, T.; Ussery, D.W.; Aarestrup, F.M.; et al. Multilocus Sequence Typing of Total-Genome-Sequenced Bacteria. *J. Clin. Microbiol.* **2012**, *50*, 1355–1361. [\[CrossRef\]](#)
31. Bartels, M.D.; Petersen, A.; Worning, P.; Nielsen, J.B.; Larner-Svensson, H.; Johansen, H.K.; Andersen, L.P.; Jarlöv, J.O.; Boye, K.; Larsen, A.R.; et al. Comparing Whole-Genome Sequencing with Sanger Sequencing for *Spa* Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **2014**, *52*, 4305. [\[CrossRef\]](#)
32. Kaya, H.; Hasman, H.; Larsen, J.; Stegger, M.; Johannesen, T.B.; Allesøe, R.L.; Lemvig, C.K.; Aarestrup, F.M.; Lund, O.; Larsen, A.R. SCCmec Finder, a Web-Based Tool for Typing of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* in *Staphylococcus aureus* Using Whole-Genome Sequence Data. *mSphere* **2018**, *3*, e00612-17. [\[CrossRef\]](#)
33. Croucher, N.J.; Page, A.J.; Connor, T.R.; Delaney, A.J.; Keane, J.A.; Bentley, S.D.; Parkhill, J.; Harris, S.R. Rapid Phylogenetic Analysis of Large Samples of Recombinant Bacterial Whole Genome Sequences Using Gubbins. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, e15. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Argimón, S.; Abudahab, K.; Goater, R.J.E.; Fedosejev, A.; Bhai, J.; Glasner, C.; Feil, E.J.; Holden, M.T.G.; Yeats, C.A.; Grundmann, H.; et al. Microreact: Visualizing and Sharing Data for Genomic Epidemiology and Phylogeography. *Microb. Genom.* **2016**, *2*, e000093. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Page, A.J.; Cummins, C.A.; Hunt, M.; Wong, V.K.; Reuter, S.; Holden, M.T.G.; Fookes, M.; Falush, D.; Keane, J.A.; Parkhill, J. Roary: Rapid Large-Scale Prokaryote Pan Genome Analysis. *Bioinformatics* **2015**, *31*, 3691–3693. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Bortolaia, V.; Kaas, R.S.; Ruppe, E.; Roberts, M.C.; Schwarz, S.; Cattoir, V.; Philippon, A.; Allesøe, R.L.; Rebelo, A.R.; Florensa, A.F.; et al. ResFinder 4.0 for Predictions of Phenotypes from Genotypes. *J. Antimicrob. Chemother.* **2020**, *75*, 3491–3500. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Dominguez, M.A.; de Lencastre, H.; Linares, J.; Tomasz, A. Spread and Maintenance of a Dominant Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Clone during an Outbreak of MRSA Disease in a Spanish Hospital. *J. Clin. Microbiol.* **1994**, *32*, 2081–2087. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Kadlec, K.; Schwarz, S. Identification of a Novel Trimethoprim Resistance Gene, DfrK, in a Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ST398 Strain and Its Physical Linkage to the Tetracycline Resistance Gene *Tet(L)*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53*, 776–778. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
39. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Antimicrobial Resistance in the EU/EEA (EARS-Net)—AER for 2019. In *Annual Epidemiological Report 2019*; European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC): Solna, Sweden, 2020.
40. Souli, M.; Ruffin, F.; Choi, S.H.; Park, L.P.; Gao, S.; Lent, N.C.; Sharma-Kuinkel, B.K.; Thaden, J.T.; Maskarinec, S.A.; Wanda, L.; et al. Changing Characteristics of *Staphylococcus aureus* Bacteremia: Results from a 21-Year, Prospective, Longitudinal Study. *Clin. Infect. Dis.* **2019**, *69*, 1868–1877. [\[CrossRef\]](#)
41. Dupper, A.C.; Sullivan, M.J.; Chacko, K.I.; Mishkin, A.; Ciferri, B.; Kumares, A.; Berbel Caban, A.; Oussenko, I.; Beckford, C.; Zeitouni, N.E.; et al. Blurred Molecular Epidemiological Lines between the Two Dominant Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clones. *Open Forum. Infect. Dis.* **2019**, *6*, ofz302. [\[CrossRef\]](#)
42. Saliba, P.; Hornero, A.; Cuervo, G.; Grau, I.; Jimenez, E.; Berbel, D.; Martos, P.; Verge, J.M.; Tebe, C.; Martínez-Sánchez, J.M.; et al. Interventions to Decrease Short-Term Peripheral Venous Catheter-Related Bloodstream Infections: Impact on Incidence and Mortality. *J. Hosp. Infect.* **2018**, *100*, e178–e186. [\[CrossRef\]](#)
43. van Hal, S.J.; Jensen, S.O.; Vaska, V.L.; Espedido, B.A.; Paterson, D.L.; Gosbell, I.B. Predictors of Mortality in *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Clin. Microbiol. Rev.* **2012**, *25*, 362–386. [\[CrossRef\]](#)

44. Mick, V.; Domínguez, M.A.; Tubau, F.; Liñares, J.; Pujol, M.; Martín, R. Molecular Characterization of Resistance to Rifampicin in an Emerging Hospital-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clone ST228, Spain. *BMC Microbiol.* **2010**, *10*, 68. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Monecke, S.; Coombs, G.; Shore, A.C.; Coleman, D.C.; Akpaka, P.; Borg, M.; Chow, H.; Ip, M.; Jatzwauk, L.; Jonas, D.; et al. A Field Guide to Pandemic, Epidemic and Sporadic Clones of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e17936. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Holden, M.T.G.; Hsu, L.Y.; Kurt, K.; Weinert, L.A.; Mather, A.E.; Harris, S.R.; Strommenger, B.; Layer, F.; Witte, W.; de Lencastre, H.; et al. A Genomic Portrait of the Emergence, Evolution, and Global Spread of a Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Pandemic. *Genome Res.* **2013**, *23*, 653–664. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Challagundla, L.; Reyes, J.; Rafiqullah, I.; Sordelli, D.O.; Echaniz-Aviles, G.; Velazquez-Meza, M.E.; Castillo-Ramírez, S.; Fittipaldi, N.; Feldgarden, M.; Chapman, S.B.; et al. Phylogenomic Classification and the Evolution of Clonal Complex 5 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in the Western Hemisphere. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1901. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
48. Fuzi, M. Dissimilar Fitness Associated with Resistance to Fluoroquinolones Influences Clonal Dynamics of Various Multiresistant Bacteria. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 1017. [\[CrossRef\]](#)
49. Haaber, J.; Penadés, J.R.; Ingmer, H. Transfer of Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Trends. Microbiol.* **2017**, *25*, 893–905. [\[CrossRef\]](#)
50. Mlynarczyk-Bonikowska, B.; Kowalewski, C.; Krolak-Ulinska, A.; Marusza, W. Molecular Mechanisms of Drug Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 8088. [\[CrossRef\]](#)
51. Adriaenssens, N.; Bruyndonckx, R.; Versporten, A.; Hens, N.; Monnet, D.L.; Molenberghs, G.; Goossens, H.; Weist, K.; Coenen, S. Consumption of Macrolides, Lincosamides and Streptogramins in the Community, European Union/European Economic Area, 1997–2017. *J. Antimicrob. Chemother.* **2021**, *76*, 30–36. [\[CrossRef\]](#)
52. Doan, T.; Worden, L.; Hinterwirth, A.; Arzika, A.M.; Maliki, R.; Abdou, A.; Zhong, L.; Chen, C.; Cook, C.; Lebas, E.; et al. Macrolide and Nonmacrolide Resistance with Mass Azithromycin Distribution. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *383*, 1941–1950. [\[CrossRef\]](#)
53. Sabat, A.J.; Tinelli, M.; Grundmann, H.; Akkerboom, V.; Monaco, M.; del Grosso, M.; Errico, G.; Pantosti, A.; Friedrich, A.W. Daptomycin Resistant *Staphylococcus aureus* Clinical Strain with Novel Non-Synonymous Mutations in the *MprF* and *VraS* Genes: A New Insight into Daptomycin Resistance. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2705. [\[CrossRef\]](#)
54. Weber, R.E.; Fuchs, S.; Layer, F.; Sommer, A.; Bender, J.K.; Thürmer, A.; Werner, G.; Strommenger, B. Genome-Wide Association Studies for the Detection of Genetic Variants Associated with Daptomycin and Ceftaroline Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 639660. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
55. Deresinski, S. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: An Evolutionary, Epidemiologic, and Therapeutic Odyssey. *Clin. Infect. Dis.* **2005**, *40*, 562–573. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
56. Armand-Lefevre, L.; Buke, C.; Ruppe, E.; Barbier, F.; Lolom, I.; Andremont, A.; Ruimy, R.; Lucet, J.C. Secular Trends and Dynamics of Hospital Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Infect.* **2010**, *16*, 1435–1441. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
57. Carrera-Salinas, A.; González-Díaz, A.; Vázquez-Sánchez, D.A.; Camoez, M.; Niubó, J.; Càmarà, J.; Ardanuy, C.; Martí, S.; Domínguez, M.Á.; Garcia, M.; et al. *Staphylococcus aureus* Surface Protein G (*SasG*) Allelic Variants: Correlation between Biofilm Formation and Their Prevalence in Methicillin-Resistant *S. aureus* (MRSA) Clones. *Res. Microbiol.* **2022**, *173*, 103921. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
58. Monecke, S.; Ruppelt-Lorz, A.; Müller, E.; Reissig, A.; Thürmer, A.; Shore, A.C.; Coleman, D.C.; Ehricht, R.; Jatzwauk, L. Dissemination of High-Level Mupirocin-Resistant CC22-MRSA-IV in Saxony. *GMS Hyg. Infect. Control* **2017**, *12*, Doc19. [\[CrossRef\]](#)
59. Toleman, M.S.; Reuter, S.; Jamroz, D.; Wilson, H.J.; Blane, B.; Harrison, E.M.; Coll, F.; Hope, R.J.; Kearns, A.; Parkhill, J.; et al. Prospective Genomic Surveillance of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Associated with Bloodstream Infection, England, 1 October 2012 to 30 September 2013. *Eurosurveillance* **2019**, *24*, 1800215. [\[CrossRef\]](#)

