

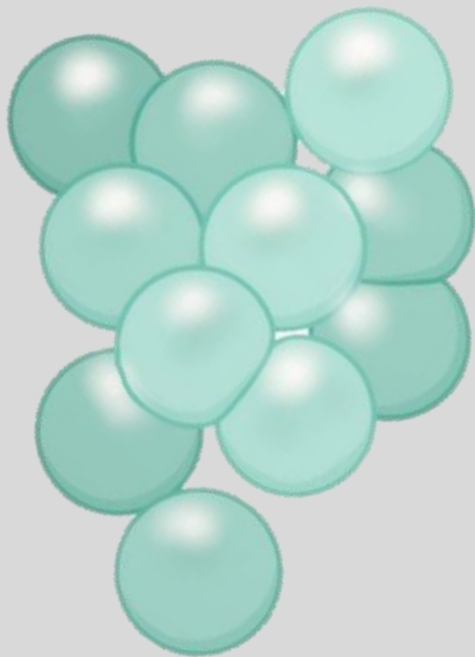
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA



DEPARTAMENT DE MICROBIOLOGÍA I ECOLOGÍA

DOCTORADO EN MEDICINA

Concentración mínima inhibitoria (CMI) de vancomicina para *Staphylococcus aureus* y riesgo de bacteriemia complicada.



Doctoranda:

Rocío Falcón Abad

Director de la Tesis:

David Navarro Ortega

Abril 2019

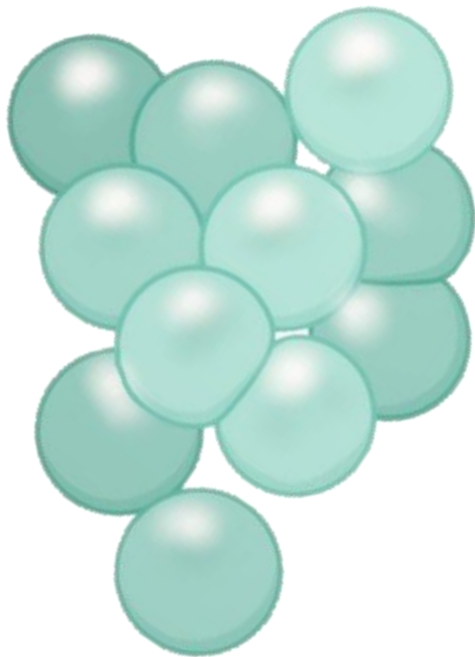
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA



DEPARTAMENT DE MICROBIOLOGÍA I ECOLOGÍA

DOCTORADO EN MEDICINA

Concentración mínima inhibitoria (CMI) de vancomicina para *Staphylococcus aureus* y riesgo de bacteriemia complicada.



Doctoranda:

Rocío Falcón Abad

Director de la Tesis:

David Navarro Ortega

Abril 2019



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

DEPARTAMENT DE MICROBIOLOGÍA I ECOLOGÍA

David Navarro Ortega, Jefe de Servicio del Servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario de Valencia y Catedrático de Microbiología de la Universidad de Valencia,

CERTIFICA:

Que el trabajo presentado por la Licenciada Rocío Falcón Abad, titulado: *“Concentración mínima inhibitoria (CMI) de vancomicina para Staphylococcus aureus y riesgo de bacteriemia complicada”* ha sido realizado bajo mi dirección, habiendo sido revisada y estando conforme con su presentación para obtener el grado de Doctor, siempre que así lo considere el tribunal designado por la Universidad de Valencia.

God, grant me the serenity to accept the
things I cannot change,
courage to change the things I can,
and wisdom to know the difference.

"Reinhold Niebhur"

Presentación

Esta tesis doctoral se presenta como compendio de publicaciones de acuerdo al nuevo Reglamento sobre depósito, evaluación y defensa de la tesis doctoral aprobado en cumplimiento de lo que disponen el Real Decreto 99/2011, de 28 de enero, por el que se regulan las enseñanzas oficiales de doctorado, así como del artículo 136 de los Estatutos de la Universitat de València.

Los resultados de esta tesis doctoral están compendiados en los siguientes artículos científicos, listados a continuación por orden cronológico de publicación:

- I. Falcón, R., Madrid, S., Tormo, N., Casañ, C., Albert, E., Gimeno, C., & Navarro, D. (2015). Intra-and interinstitutional evaluation of an Etest for vancomycin minimum inhibitory concentration measurement in *Staphylococcus aureus* blood isolates. *Clinical Infectious Diseases*, 61(9), 1490-1492.
- II. Falcón, R., Martínez, A., Albert, E., Madrid, S., Oltra, R., Giménez, E., Soriano M., Vinuesa V., Gozalbo D., Gil M. L., & Navarro, D. (2016). High vancomycin MICs within the susceptible range in *Staphylococcus aureus* bacteraemia isolates are associated with increased cell wall thickness and reduced intracellular killing by human phagocytes. *International journal of antimicrobial agents*, 47(5), 343-350.
- III. Falcón, R., Mateo, E. M., Talaya, A., Giménez, E., Vinuesa, V., Clari, M. Á., & Navarro, D. (2017). Reproducible measurement of vancomycin MICs within the susceptible range in *Staphylococcus aureus* by a broth microdilution method with a “quasi-continuum” gradient of antibiotic concentrations. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 36(12), 2355-2360.
- IV. Falcón, R., Mateo, E., Oltra, R., Giménez, E., Albert, E., Torres, I., & Navarro, D. (2019). Vancomycin MICs and risk of complicated bacteremia by

glycopeptide-susceptible *Staphylococcus aureus*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 1-10.

Agradecimientos

Este trabajo es el resultado final de una etapa de trabajo y dedicación, que no habrían enraizado y fructificado sin la fuerza y el empuje de la motivación. Por ello, esto es gracias a vosotros.

A mi tutor: David. Por su sabiduría y maestría. Por su ejemplo, exigencia y el valioso tiempo que generosamente ha compartido conmigo. Por compartir y transmitirme su visión de la vida.

A mis amigos, que han hecho de esta etapa una historia inolvidable. Por su paciencia y buen humor. A Teresa, Ana, Rocío, Juana, Estela, Eliseo, Dixie, Nacho, Felipe, Ram. Por el empuje, la comprensión y por cada uno de sus sabios consejos.

A mis compañeros, por enseñarme a disfrutar de cada paso del camino: Víctor, Javier, Lucía, Pilar, Maria Jesús, Loli, Anamaría, Lola, Amparo...

Especialmente a mi familia: mis padres Carlos y Amparo, y mis hermanas Teresa e Isabel. Por ser. Por estar. Por confiar. Por su pleno apoyo en los momentos de incertidumbre.

“Si he logrado ver más lejos, ha sido porque he subido a hombros de gigantes” (I. Newton).

Gracias.



- AC: Anticuerpos
- Agr: *Accessory gene regulator*; Gen regulador accesorio
- AUC: *Area under the curve*; Área bajo la curva

- BC: Bacteriemia complicada
- BMD: *Broth microdilution*; Microdilución en caldo

- CAB: *Community acquired bacteremia*; Bacteriemia adquirida en la comunidad
- CHiPs: *Chemotaxis inhibitory protein of staphylococci*; Proteína inhibidora de quimiotaxis estafilocócica
- CID: Coagulopatía intravascular diseminada
- CC: *Clonal complex*; Complejo clonal
- CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*
- CMI: Concentración mínima inhibitoria
- CPs: *Capsular polysaccharides*; Polisacáridos capsulares
- CV: Coeficiente de variación

- DNA: *Deoxyribonucleic acid*; Ácido desoxirribonucleico

- EI: Endocarditis infecciosa
- EUCAST: *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

- FV: Factores de virulencia

- hVISA: *Heteroresistant VISA*; VISA heterorresistente

- IgG: Inmunoglobulina G

- KI: *Killing index*; Índice de killing

- MALDI-TOF MS: *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight mass spectrometry*; Espectrometría de masas de desorción/ionización láser asistida por matriz-tiempo de vuelo
- MGEs: *Mobile genetic elements*; Elementos genéticos móviles
- MHC: *Major histocompatibility complex*; Complejo mayor de histocompatibilidad
- mL: mililitro
- MLST: *Multilocus sequence typing*; Tipado de secuencia multilocus
- MSSA: *Methicillin susceptible Staphylococcus aureus*; *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina
- MRSA: *Methicillin resistant Staphylococcus aureus*; *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina
- MSCRAMMs: *Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*; Componentes de la superficie microbiana que reconocen moléculas de adhesión de la matriz
- NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido
- NETs: *Neutrophil extracellular traps*; Trampas extracelulares de neutrófilos
- PBP: *Penicillin-binding protein*; Proteína de unión a penicilina
- PCR: *Polimerase chain reaction*; Reacción en cadena de la polimerasa
- PG: Peptidoglicano
- PFGE: *Pulsed-field gel electrophoresis*; Electroforesis en gel de campo pulsado
- PMN: Polimorfonucleares
- PSM: *Phenol-soluble modulins*; Modulinas solubles en fenol
- PTSAgs: *Pyrogenic toxin superantigens*; Superantígenos de toxina pirogénica
- ROS: *Reactive oxygen species*; Especies reactivas de oxígeno
- Rpm: Revoluciones por minuto
- RSV: *Reduced sensitivity to vancomycin*; Sensibilidad disminuida a vancomicina
- SAB: *Staphylococcus aureus bacteremia*; Bacteriemia por *Staphylococcus aureus*
- Sae: *Histidine protein kinase*; Histidina proteín-quinasa
- Sar: *Staphylococcal accessory regulator A*; Regulador A accesorio estafilocócico

- *srrAB*: *Staphylococcal respiratory response*; Sistema de respuesta respiratoria estafilocócico
- SCIN: *Staphylococcal complement inhibitor*; Inhibidor estafilocócico del complemento
- SCVs: *Small-colony variants*; Pequeñas colonias variantes
- SD: *Standard deviation*; Desviación estándar
- SI: Sistema inmune

- TEE: *Transesophageal echocardiography*; Ecocardiografía transesofágica
- TEM: *Transmission electron microscopy*; Microscopio de transmisión electrónica
- TTE: *Transthoracic echocardiography*; Ecocardiografía transtorácica

- UFC: Unidades Formadoras de Colonias

- VISA: *Vancomycin intermediated Staphylococcus aureus*; *S. aureus* intermedio a vancomicina
- VRSA: *Vancomycin resistant Staphylococcus aureus*; *S. aureus* resistente a vancomicina



Presentación.....	3
Agradecimientos.....	5
Abreviaturas y acrónimos.....	7
Índice de contenidos.....	11
I. Introducción.....	13
I.1 <i>Staphylococcus aureus</i> (<i>S. aureus</i>)	
I.1.1 Morfología de <i>S. aureus</i> y factores de virulencia.	
I.1.2 <i>S. aureus</i> y el sistema inmunitario.	
I.2 Infecciones causadas por <i>S. aureus</i>	
I.2.1 Patogenicidad de <i>S. aureus</i> y síndromes que produce.	
I.2.2 Bacteriemia: importancia y repercusión clínica.	
I.2.3 Manejo de la bacteriemia por <i>S. aureus</i> .	
I.3 CMI de Vancomicina en el contexto de SAB (bacteriemias por <i>S. aureus</i>)	
1.3.1 Dosificación de vancomicina.	
1.3.2 Impacto de la CMI de vancomicina de <i>S. aureus</i> en el desarrollo de complicaciones y mortalidad.	
II. Hipótesis.....	49
III. Objetivos.....	53
IV. Metodología.....	57
IV.1 Pacientes incluidos en el estudio.	
IV.2 Obtención y preservación de aislados de <i>S. aureus</i> productores de bacteriemias.	

IV.3	Evaluación analítica del E test.	
IV.4	Optimación de un método de microdilución en caldo para la determinación de la CMI de <i>S.aureus</i> a vancomicina.	
IV.4.1.	Preparación de los paneles con antimicrobiano.	
IV.4.2.	Preparación del inóculo.	
IV.5	Estudio de la actividad bactericida de los fagocitos humanos frente a <i>S. aureus</i> .	
IV.6	Ensayo de fagocitosis.	
IV.7	Medida de la pared celular mediante microscopio de transmisión de electrones (TEM).	
IV.8	Análisis genotípico de <i>S. aureus</i> productores de bacteriemias.	
IV.8.1	Extracción del DNA genómico.	
IV.8.2	Amplificación del DNA.	
IV.8.3	Hibridación en el microarray.	
IV.9	Análisis estadístico.	
V.	Resultados y Discusión.....	71
VI.	Limitaciones.....	139
VII.	Conclusiones.....	143
VIII.	Bibliografía.....	147
IX.	Anexos.....	169
	IX.1 Resumen.....	171
	IX.2 Índice de Tablas.....	183
	IX.3 Índice de Figuras.....	185
	IX.4 Tabla de Genes diana de <i>S. aureus</i> Genotyping kit 2.0 (Alere®).....	189
	IX.5 Escrito del Director de la Tesis Doctoral sobre el Factor de Impacto de las publicaciones que se recogen en la tesis doctoral.....	197
	.	
X.	Artículos.....	199

I. INTRODUCCIÓN







I. Introducción

I.1 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)

Staphylococcus aureus (*S. aureus*), miembro de la familia *Staphylococcaceae*, pertenece al Filo Firmicutes, Dominio Bacteria y Clase Bacilli (Garrity et al., 2004). De entre las treinta y seis especies que comprenden el género *Staphylococcus*, sólo dieciséis (el 30% aprox) infectan al ser humano, siendo *S. aureus* y *S. lugdunensis* las más patógenas (Longo, 2012).

I.1.1 Morfología de *S. aureus* y factores de virulencia.

Las características más destacables de esta bacteria son que tiene forma cocoide (como su propio nombre indica), con un diámetro de 0.5 - 1.5 μm y que se suele agrupar en pares o tétradas, imitando así la forma de racimos de uvas; tiene una respiración aerobia y anaerobia facultativa (Baird-Parker, 1990). Desde el punto de vista metabólico es poco exigente y está capacitada para resistir la desecación, desinfectantes químicos y tolerar concentraciones de NaCl de hasta un 12% (Longo, 2012). La mayoría presenta una pigmentación amarillenta y produce betahemólisis en agar sangre a las 24-36 horas de incubación (Bennett et al., 2014); es inmóvil y no produce esporas. Las enzimas coagulasa (capaz de convertir el fibrinógeno en fibrina) y catalasa, la producción de DNAsa y proteína A, así como su capacidad para fermentar el manitol también son características clave para su identificación (Becker et al., 2015).

Su pared celular es típica de las bacterias Gram positivas. Se trata de un elemento fundamental en la patogenicidad e infectividad del microorganismo (van Heijenoort and Gutmann, 2000) y observada por microscopía electrónica parece una estructura homogénea de 20-40 nm de grosor (Dmitriev et al., 2004). El 50% de su peso se corresponde al peptidoglicano (PG) (Lowy, 1998), una estructura formada por unidades alternas de amino azúcares N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico



entrelazadas por pentapéptidos de L-Ala-D-Gln-L-Lys-D-Ala-D-Ala que se unen al grupo carboxilo de cada N-acetilmurámico. Estos pentapéptidos a su vez están unidos por unas pentaglicinas, que actúan como puentes interpeptido conectando la lisina de una cadena de péptidos a la D-alanina del penúltimo puesto de la cadena de péptidos adyacente. También componen la pared celular los ácidos teicoicos (40% del peso seco), unidos por el grupo 6-hidroxil de algún N-acetil murámico de la cadena de glicano (Howden et al., 2010), y proteínas unidas a la pared celular como la proteína A, adhesinas y proteínas de unión a penicilina (PBPs; *penicillin-binding proteins*). Es también característico en *S. aureus* el grado extremadamente alto (del orden de 80-90%) de entrecruzamiento de mureína, determinado por el ratio entre los puentes peptídicos y el total de péptidos (Dmitriev et al., 2004). (Figura I.1)

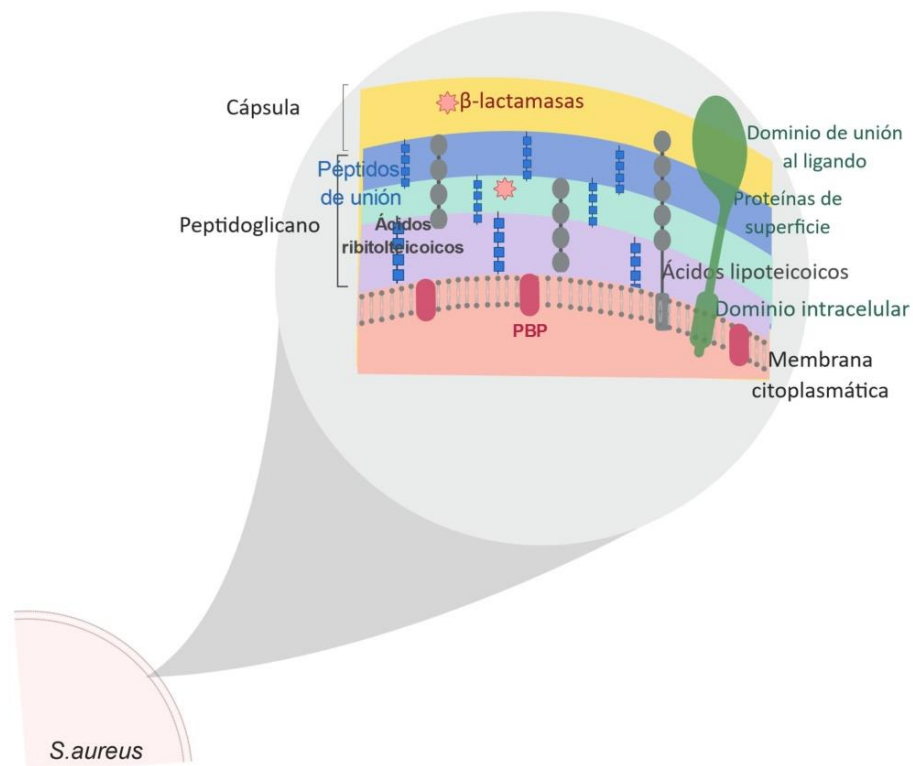


Figura I.1. Estructura de la pared celular de *S. aureus*.



De entre estas proteínas cabe destacar las PBPs, por su importante papel en la síntesis del peptidoglicano. En particular, las PBPs de elevado peso molecular (PBP1, PBP2, y PBP3), las cuales tienen una función transglicosilasa (une la subunidad N-acetilglicosamina al ácido N-acetil murámico), y transpeptidasa (une el penúltimo D-ala a la glicina de la pared celular naciente) (Howden et al., 2010).

Muchos *S. aureus* tienen la pared celular recubierta por un polisacárido que ejerce la función de cápsula.

El genoma consta de una única cadena doble de ácido desoxirribonucleico (DNA; *Deoxyribonucleic acid*) de 2.8-2.9 Mbps con contenido de G+C del 33%, (Baba et al., 2008) y codifica aproximadamente 2.700 proteínas. Casi el 75% del genoma está constituido por un componente central (core) conservado, que incluye genes presentes en todos los aislados asociados al metabolismo central y al mantenimiento de las funciones celulares básicas, y por otro que integra genes que codifican moléculas asociadas con virulencia (polisacáridos capsulares (CPs), *surface-binding proteins* y exoenzimas) (Dayan et al., 2016). El genoma accesorio de *S. aureus* se compone principalmente de elementos genéticos móviles (MGEs) que codifican la gran mayoría de factores de virulencia (FV) y de resistencia relacionados con procesos de colonización y patogénesis (*Panton-Valentin leukocidin toxic-shock síndrome toxin*) (Giulieri et al., 2016); se trata de secuencias de inserción, plásmidos, transposones y bacteriófagos integrados en islas de patogenicidad que se transfieren horizontalmente con elevada frecuencia entre aislados del mismo complejo clonal (CC; *clonal complex*) (Dayan et al., 2016).

S. aureus es uno de los patógenos más virulentos que infectan al ser humano, capaz de resistir la mayoría de mecanismos de defensa del hospedador debido a su compleja fisiología (Dayan et al., 2016) y a la gran cantidad de factores de virulencia que exhibe. (Tabla I.1).

Para reducir la demanda metabólica que conlleva la expresión de los factores de virulencia, ésta ocurre de manera coordinada en función de las necesidades de la bacteria, la fase de crecimiento en que se encuentre o en respuesta a señales del



exterior o del ambiente que le rodea (Archer, 1998): la expresión de moléculas de adhesión o de superficie celular se produce en la fase logarítmica de la replicación bacteriana, mientras que las proteínas que intervienen en la destrucción e invasión (como las proteínas secretadas) se expresan en la fase estacionaria y postexponencial (Gordon and Lowy, 2008) (Figura I.2). Se han descrito varios sistemas que regulan la expresión de las proteínas referidas, tales como el *accessory gene regulator (agr)*, *staphylococcal accessory regulator A (sar)*, *histidine protein kinase (sae)* o *staphylococcal respiratory response (srrAB)* (Dayan et al., 2016, Yarwood et al., 2001).

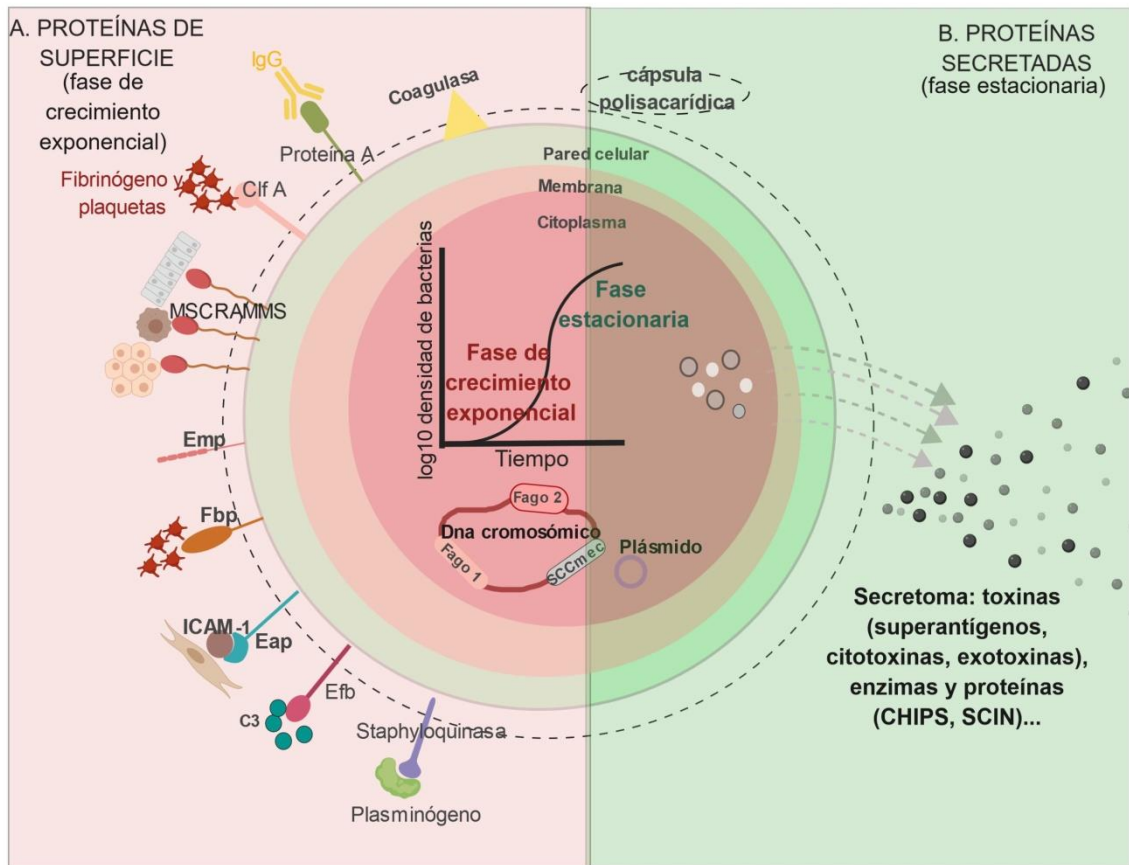


Figura I.2. Factores de virulencia de *S. aureus*.

El PG está rodeado de proteínas con capacidad de reconocer moléculas y unirse a ellas ("ligand-binding"), funcionando como adhesinas. Casi todas estas proteínas tienen



similitudes estructurales, presentando un extremo N terminal con función de señalización y capacidad secretora, una cadena de aminoácidos cargados positivamente que se extiende hacia el citoplasma, un dominio hidrofóbico transmembrana y una región C terminal que se ancla en la pared celular (Foster, 2005).

Tabla I.1: Factores de virulencia de *S. aureus*.

Tipo	Factor	Función	Síndromes clínicos asociados
Moléculas de superficie	Polisacárido capsular (Cps)	Barrera antifagocítica. Inhibición del complemento.	Endocarditis, osteomielitis, artritis séptica, infecciones relacionadas con catéter, prótesis y abscesos (cápsula).
	Proteína A (<i>Spa</i>)	Evadir defensas del hospedador (acción antifagocitaria).	
	<i>Clumping factor A y B (ClfA y ClfB)</i>	Evadir defensas del hospedador (acción antifagocitaria).	
	<i>Microbial Surface components recognizing adhesive matrix molecule (MSCRAMMs)</i>	Adherencia y anclaje a células endoteliales y membrana basal.	
	<i>Fibronectin-binding proteins (fbp)</i>	Acción antifagocitaria.	
	Proteína de adhesión extracelular (<i>Eap</i>)	Evadir defensas del hospedador.	
	Proteína extracelular de unión al	Evadir defensas del hospedador.	



	fibrinógeno (<i>Efb</i>)		
	Estafiloquinasa (<i>Sak</i>)	Invasión.	
	Aureolisina (<i>Aur</i>)	Evadir defensas del hospedador.	
	<i>Extracellular matrix protein-binding protein (Emp)</i>	Invasión. Favorece formación de biofilm.	
Proteínas secretadas	Proteínas inhibidoras de quimiotaxis (<i>chp</i>) (CHIPS)	Acción antifagocitaria.	Infecciones invasivas de piel.
	<i>Staphylococcus complement inhibitor (scn)</i> (SCIN)	Evadir defensas del hospedador.	
	<i>Von Willebrand factor-binding protein (vWbp)</i>	Invasión.	
Toxinas	α -toxina (<i>Hla</i>)	Evadir defensas del hospedador.	Neumonía necrotizante (PVL), intoxicación alimentaria, SST, síndrome de la piel escaldada, impétigo y sepsis.
	γ -hemolisina (<i>Hly</i>)	Evadir defensas del hospedador.	
	Leucocidina de Pantón-Valentine y leucocidinas E-D (PVL y LukED)	Evadir defensas del hospedador.	
	Enterotoxinas (A-H) (<i>Sea-h</i>)	Actividad emética. Invasión.	
	Toxina del síndrome del shock tóxico-1 (<i>tst-1</i>)	Producción shock tóxico. Invasión.	
	Toxinas exfoliativas (<i>et</i>)	Descamación superficial de la piel.	

		Invasión.	
Enzimas	Coagulasa (<i>Coa</i>)	Formación de abscesos. Evadir defensas del hospedador.	Destrucción de tejido e infecciones metastásicas.
	Hialuronidasa	Invasión.	
	Catalasa (<i>kat</i>)	Evadir defensas del hospedador.	
	Lipasas	Invasión-colonización.	
	Termonucleasa (<i>nuc</i>)	Invasión.	

I.1.2 *S. aureus* y el sistema inmunitario

El primer impedimento con el que se encuentra el microorganismo para infectar al huésped es la barrera física constituida por la piel y mucosas. Una vez superada, el sistema del complemento constituye la línea de defensa innata más primitiva frente a las bacterias extracelulares; sin embargo, *S. aureus*, escapa fácilmente de su acción gracias a la cápsula polisacáridica que le rodea y a través de la secreción de unas proteínas capaces de inhibir su acción como *Efb*, con capacidad de unirse a C3 y bloquear su depósito en la superficie celular, las proteínas SCIN y la estafiloquinasa (proteína activadora de plasminógeno que actúa activando la serina proteasa de plasmina limpiando la superficie la C3b e Inmunoglobulina G (IgG)). El principal mecanismo de defensa frente a *S. aureus* es la fagocitosis, mediada esencialmente por los leucocitos polimorfonucleares (PMN o neutrófilos) (Figura I.3): son granulocitos de vida corta que circulan ~10–24 h antes de migrar a los tejidos donde actúan durante 1–2 días hasta que se produce la apoptosis y son aclarados por los macrófagos. En respuesta al daño tisular o la presencia de patógenos invasores se segregan mediadores inflamatorios y quimioatrayentes de neutrófilos provocando su extravasación al sitio de la infección. Allí, los neutrófilos reconocen por sus receptores



(PRRs) a los “pathogen-associated molecular patterns” (PAMPs) de la bacteria (como PG, lipoproteínas, ácidos lipoteicoicos, lipopolisacáridos y flagelina). Los neutrófilos tienen una capacidad fagocítica notable, siendo capaces de ingerir más de 9 partículas de $2 \times 3 \mu\text{m}$ con tan solo un diámetro de $\sim 10 \mu\text{m}$ (Rigby and DeLeo, 2012).

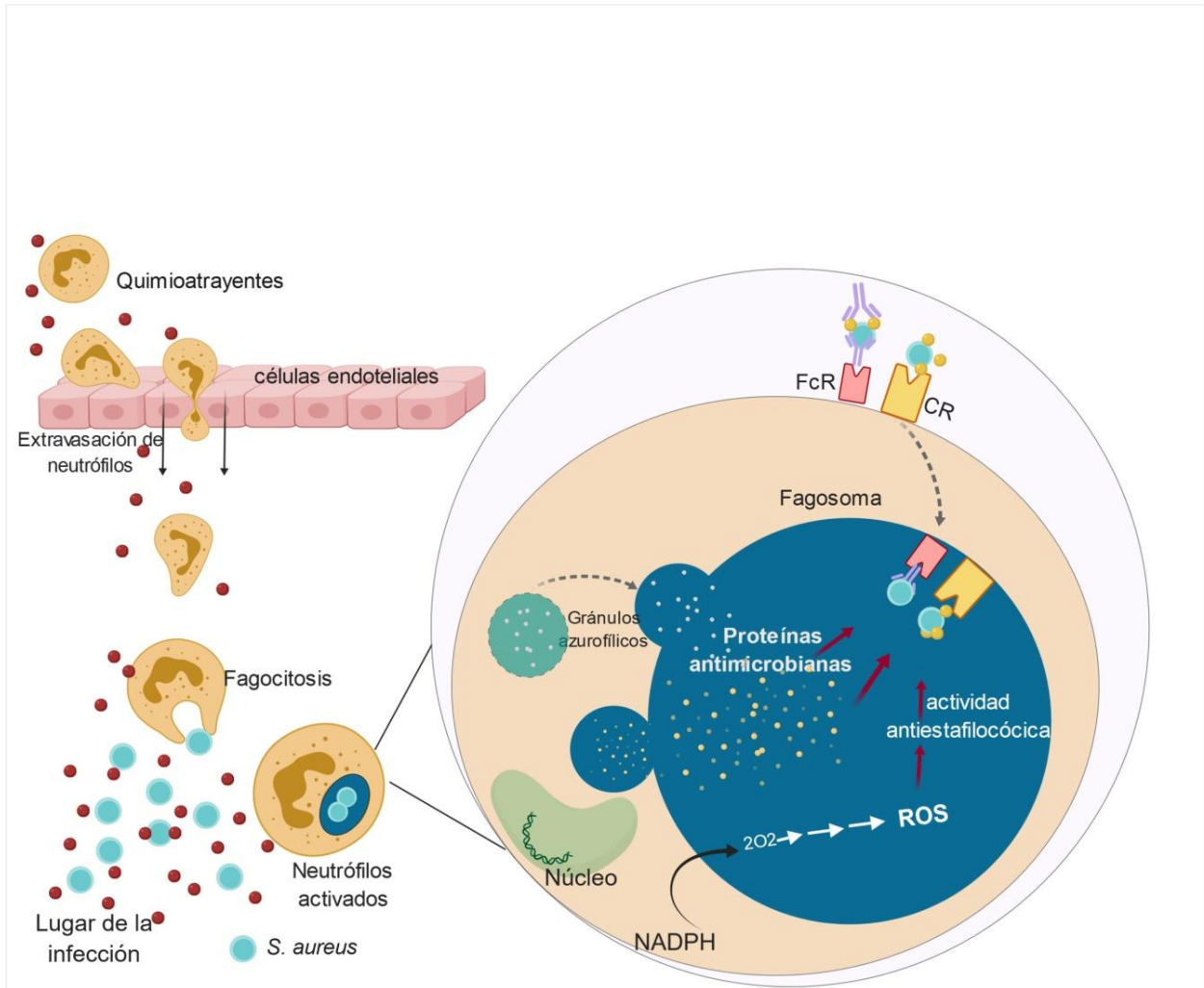


Figura I.3. Representación del proceso de fagocitosis de las células bacterianas por parte de los neutrófilos y mecanismos de killing.



La unión de esos receptores activa señales de transducción que desencadenan una serie de reacciones que contribuyen en última instancia a la acción bactericida: facilitan la supervivencia celular, promueven la adhesión y fagocitosis, inducen la liberación de citoquinas y quimiocinas, provocan la desgranulación y promueven la formación y liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS; *Reactive oxygen species*), entre otras cosas. El fagosoma sirve para restringir las fuerzas nutricionales y proporciona a los neutrófilos un compartimento aislado donde encierra al patógeno y sus productos tóxicos. Allí las bacterias son destruidas por la enzima nicotinamida adenina dinucleótido oxidasa (NADH oxidasa), ROS y proteínas liberadas tras la fusión de los gránulos con el fagosoma (Rigby and DeLeo, 2012).

Recientemente se han descubierto nuevas moléculas: *neutrophil extracellular traps* (NETs), que han demostrado capacidad de unirse y matar a una gran variedad de patógenos incluyendo *S. aureus* (Rigby and DeLeo, 2012) gracias a su facultad de degradar factores de virulencia y matar a la bacteria extracelularmente, antes incluso de que sean ingeridos (Brinkmann et al., 2004).

S. aureus ha ido adaptando su potencial virulento para lograr no sólo evitar, sino también superar estos mecanismos de defensa, a través de varias estrategias (Foster, 2005):

a. Inhibición de la quimiotaxis: Aproximadamente el 60% de *S. aureus* secretan unas proteínas inhibitoras de quimiotaxis (CHIPs; *Chemotaxis Inhibitory Protein of Staphylococci*) que se unen a los receptores de la superficie de los neutrófilos, bloqueando la cascada de quimiotaxis e impidiendo la extravasación de los neutrófilos (Rooijackers et al., 2006). *Eap* también actúa a este nivel, uniéndose a ICAM-1 y bloqueando así la posible unión de LFA-1 de los neutrófilos, previniendo la adhesión de leucocitos, diapédesis y extravasación, interfiriendo en la migración de PMN al lugar de la infección (Foster, 2005).

b. Resistencia a la fagocitosis: Para que se produzca la fagocitosis es necesaria una previa opsonización de las células, pero *S.aureus* presenta una cápsula polisacáridica y varias proteínas de superficie que interfieren en la unión del complemento y de los



anticuerpos (AC) actuando como anti-opsoninas (proteína A y *ClfA* y B). La proteína A posee la capacidad de unirse a las regiones Fc de las inmunoglobulinas G (IgG 1, 2 y 4), pero con una orientación incorrecta, de manera que no puede ser reconocida por los receptores de las IgG de los neutrófilos, escapando así de su acción fagocítica. Los *Clumping factor* A y B son adhesinas con afinidad por el fibrinógeno y a las plaquetas. El dominio N terminal se une con la cadena γ del fibrinógeno, de manera que queda recubierto de fibrinógeno impidiendo la deposición o el acceso de las opsoninas (Risley et al., 2007).

c. Resistencia al killing fagocítico: la protección frente a los mecanismos del killing dependientes de oxígeno es mediada por la catalasa, carotenoides, SPD y estafiloxantina (pigmento dorado) (Rigby and DeLeo, 2012). Las estrategias para evadir el ataque independiente de oxígeno son vía AMPs. Además de liberar proteasas no específicas, *S. aureus* siente la presencia de AMPs por un sistema de “*three-component gene-regulatory*” que responde a la presencia de AMPs activando mecanismos de modificación de los ácidos teicoicos de la pared, los ácidos lipoteicoicos y fosfolípidos de membrana: se producen las proteínas Dlt, que provocan sustituciones de D-ala en el ribitol de los ácidos teicoicos y lipoteicoicos neutralizando la carga negativa de la superficie celular que atrae a las moléculas catiónicas. Por otro lado, las proteínas MprF añaden L-lys al fosfatidilglicerol expuesto en la cara externa de la membrana citoplasmática. Todo ello conlleva a una disminución de la afinidad de las defensas catiónicas antimicrobianas secretadas por el fagosoma o de sustancias del suero cargadas positivamente como la lactoferrina o fosfolipasa A2 consiguiendo repelerlas de la membrana citoplasmática (Rigby and DeLeo, 2012). Otro mecanismo para sobrevivir al killing intracelular es interferir en la fusión del endosoma y evitar la liberación de sustancias antimicrobianas por factores que dependen del regulador *sarA* (Rigby and DeLeo, 2012).

d. Destrucción de los leucocitos: uno de los mecanismos de ataques más eficaces de *S. aureus* son las toxinas que secreta, de las que podemos distinguir tres tipos: citotoxinas, superantígenos (toxinas pirógenas) y toxinas exfoliativas. Todas ellas actúan formando poros en las membranas citoplasmáticas produciendo su lisis (Schmitz et al., 1997) (Figura I.4).

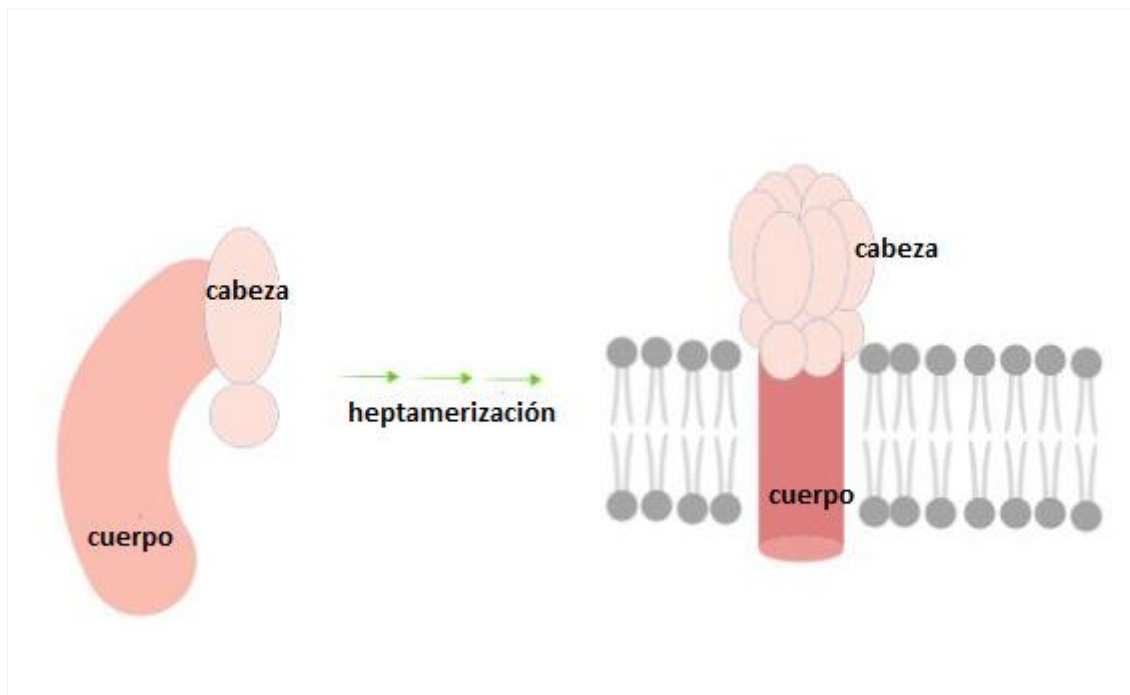


Figura I.4. Representación de la formación de poros heptaméricos en las membranas celulares eucariotas por las toxinas estafilocócicas. El dominio circular del cuerpo se adhiere a la membrana y las regiones heptamerizadas del cuerpo son las responsables de la formación del poro, con un radio aproximado de 14Å.

Las que tienen acción directa con la evasión de la respuesta inmune son las que atacan directamente las células blancas y rojas. α -hemolisina es capaz de destruir una gran variedad de células como eritrocitos, células epiteliales, fibroblastos, monocitos, macrófagos y linfocitos, aunque no neutrófilos (Li et al., 2009). PVL se ha asociado históricamente con infecciones severas, aunque recientemente hay estudios que contradicen ésta afirmación (Voyich et al., 2006). Actúan formando poros en las membranas de PMN, MCFS y monocitos (Watkins et al., 2012). Además, *S. aureus* secreta unas moléculas: modulinas solubles en fenol (PSMs; *phenol-soluble modulins*), capaces de inducir quimiotaxis en neutrófilos, liberación de citoquinas y de lisar neutrófilos, eritrocitos y monocitos.



e. Acción citotóxica y patogénica:

e.1. Superantígenos: son moléculas capaces de actuar como mitógenos de los linfocitos T, induciendo directamente una fuerte estimulación policlonal de éstas células (Rongpharpi et al., 2014). Son proteínas de pequeño peso molecular que se relacionan estructuralmente con las toxinas (Figura I.5). Actúan uniéndose a moléculas del Complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC; *Major histocompatibility complex*) estimulando la proliferación de linfocitos T y liberación masiva de citoquinas que producen síndrome del shock tóxico (daño tisular producido por exceso de toxinas). Producen un síndrome caracterizado por el rápido establecimiento de fiebre, shock, permeabilidad capilar que deriva en una disfunción multiorgánica (Dinges et al., 2000).

Se comportan como tales las enterotoxinas (moléculas con actividad emética que han sido relacionadas con riesgo de padecer complicaciones en bacteriemias por *S.aureus* (SAB; *S. aureus bacteremia*) (Calderwood et al., 2013) y la toxina del síndrome del shock tóxico-1.

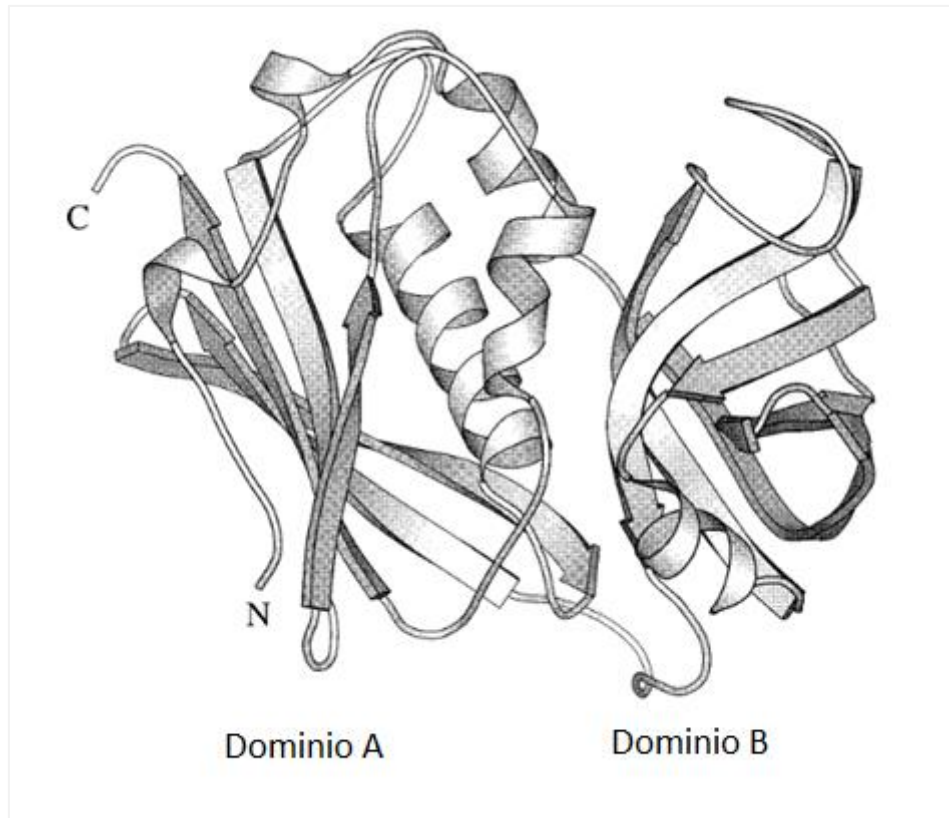


Figura I.5. Características generales de la estructura de las SE, distinguiéndose los dominios A y B. Aunque no tengan la secuencia primaria idéntica, su estructura es muy similar a la de TSST-1. Presentan una forma elipsoide y contienen dos dominios desiguales. La estructura secundaria es una combinación de alpha-hélices y láminas beta. (Imagen obtenida de (Dinges et al., 2000)).

e.2. Epidermolisinas o toxinas exfoliativas: Se clasifican en 2 serotipos: ETA y ETB. Producen el síndrome de la piel escaldada o impétigo por su capacidad de romper los desmosomas que unen a las células adyacentes, resultando en la dehiscencia de la epidermis a nivel de la granulosa, produciéndose la descamación superficial de la piel (Longo, 2012).

e.3 Enzimas: Es capaz de sintetizar un gran número de enzimas, destacando las proteasas, lipasas (hacen posible su supervivencia en zonas donde predominan los lípidos, como los folículos pilosos), hialuronidasas y elastasas, que ayudan a destruir tejidos. Presenta en su membrana una acetiltransferasa clave para evitar el efecto de



la lisozima (péptido antimicrobiano presente en muchos fluidos con capacidad muramidasa que actúa rompiendo enlaces glucosídicos entre Nacetil glucosamina y Nacetilmurámico del PG). Mediante esta enzima, *S. aureus* modifica el grupo C6 hidroxilo del ácido murámico evitando así la acción de la lisozima (Foster, 2005).

e.4 Von Willebrand factor-binding protein y coagulasa: Promueven la activación no proteolítica de protrombina y la escisión de fibrinógeno soluble provocando la formación de coágulos de fibrina (Bonar et al., 2015, Dayan et al., 2016)

e.5 Formación de biofilms: se define como una agrupación de bacterias embebidas en una matriz de polisacárido extracelular, adhesinas, proteínas secretadas y asociadas a la pared y DNA extracelular (Dayan et al., 2016). Las bacterias que tienen esta capacidad, crean una espesa película protectora sobre las células del tejido infectado, de materiales extraños, o válvulas cardíacas, creando una barrera física frente al sistema inmune (SI) o los antibióticos (Kiedrowski et al., 2011).

I.2 Infecciones causadas por *S. aureus*

I.1.2 Patogenicidad de *S. aureus* y síndromes que produce

S. aureus se encuentra ampliamente distribuido por todo el mundo, y se comporta tanto como patógeno como comensal. Este microorganismo forma parte de la microflora de la piel, colonizando diversas partes del cuerpo como axilas, ingles, faringe, vagina o tracto gastrointestinal, pero el nicho por excelencia es la mucosa nasal. Se estima que entre un 25-50% de personas sanas puede colonizarse de manera persistente o transitoria (Longo, 2012). Así, los portadores se pueden clasificar en 3 grupos: portadores persistentes (10-35%, con la misma cepa a lo largo del tiempo), portadores intermitentes (20-75%, con diferentes cepas), y no portadores (5-50%) (Williams, 1963). El personal sanitario, los diabéticos insulino dependientes, infectados

por VIH, usuarios de drogas parenterales, pacientes sometidos a hemodiálisis o personas con lesiones cutáneas representan grupos de población con mayor predisposición a ser colonizados por esta bacteria.

S. aureus constituye una de las principales causas de infecciones nosocomiales, siendo una de las primeras causas de bacteriemias primarias (Rigby and DeLeo, 2012) y encabezando la lista de los productores de infecciones de piel y tejidos blandos, heridas quirúrgicas, endocarditis y sepsis relacionada con catéter (Seidl et al., 2011). (Tabla I.2).

Tabla I.2: Infecciones causadas por *S.aureus*:

Infecciones piel y partes blandas	Foliculitis
	Ántrax (carbunco, forunculosis)*
	Celulitis
	Impétigo
	Mastitis
	Infecciones de incisiones quirúrgicas
	Hidradenitis supurativa
Infecciones musculoesqueléticas	Artritis séptica
	Osteomielitis
	Piomiositis
	Abscesos
Infecciones de vías respiratorias	Neumonía
	Émbolos pulmonares sépticos
	Empiema
Bacteriemia y complicaciones	Septicemia
	Endocarditis infecciosa (EI)
Endocarditis infecciosa	
Infecciones en dispositivos	Catéteres intravasculares
	Prótesis articulares



Enfermedades mediadas por toxinas	Síndrome del shock tóxico (SST)
	Intoxicación alimentaria
	Síndrome exfoliativo estafilocócico o (síndrome de la piel escaldada)
Infecciones invasoras extrahospitalarias por MRSA	Fascitis necrosante
	Síndrome de Waterhouse-Friderichsen
	Neumonía necrosante
	Púrpura fulminante

Tabla modificada de (Longo, 2012).

*carbunco= forunculosis o ántrax: lesión cutánea con supuración profunda que afecta al tejido subcutáneo.

I.2.2 Bacteriemia: importancia y repercusión clínica.

La bacteriemia se define como la presencia de bacterias viables en sangre; ésta puede o no estar asociada a enfermedad (Rongpharpi et al., 2014). Resulta difícil determinar su incidencia, pero en países desarrollados se estima que varía entre 80-190 casos/100.000 habitantes por año (Le Moing et al., 2015), siendo *S. aureus* el causante del 10-30% de todas ellas (Van Hal et al., 2012b) y predominando MSSA (*S. aureus* sensible a meticilina; *Methicillin susceptible S.aureus*) sobre MRSA (*S. aureus* resistente a meticilina; *Methicillin resistant S. aureus*) (Jokinen et al., 2018, Laupland et al., 2013).

En la era preantibiótica, la mortalidad por SAB llegaba al 80%, sin embargo estas cifras disminuyeron drásticamente con la introducción de los antibióticos llegando hasta el 20-35% y manteniéndose relativamente constante desde entonces (Rongpharpi et al., 2014, Anantha et al., 2014, Van Hal et al., 2012b).

Se han descrito como factores predictores de mortalidad la adquisición en la comunidad (CAB; *Comunity acquired bacteremia*) (definida como aquella en la que los



hemocultivos son positivos durante las primeras 48 horas tras la hospitalización o si existían evidencias de infección por *S. aureus* en el ingreso) (Lautenschlager et al., 1993), la presencia de hemocultivos de control positivos a las 48-96 horas, la fiebre persistente a las 72 horas y hallazgos en la piel sugestivos de infección sistémica tales como petequias, vasculitis, equimosis o pústulas (Tong et al., 2015). También se ha relacionado con mayores tasas de mortalidad la MRSAB persistente (Van Hal et al., 2012b).

La bacteriemia persistente se produce en 6-38% de SAB, aunque la definición no es homogénea, variando entre los 3-7 días desde que se instaura la terapia apropiada (Van Hal et al., 2012b). Se consideran factores de riesgo la fuente de la infección (EI u osteomielitis vertebral), heterorresistencia a vancomicina, tratamiento antibiótico adecuado y la presencia o retención de material protésico. Independientemente de que haya complicaciones o no, la persistencia de la bacteriemia es un factor de peor pronóstico (Van Hal et al., 2012b).

La fuente de la bacteriemia, o el foco primario desde el que la bacteria llega al torrente sanguíneo, es crucial para establecer un rápido y correcto diagnóstico, manejo clínico y estrategia terapéutica. Se han asociado distintas tasas de mortalidad a los 30 días en función del foco primario, diferenciando altas tasas en focos desconocidos (un 22-48%), EI (25-60%) e infecciones pulmonares (39-67%); y tasas relativamente bajas en SSTI (15-17%), tracto urinario (10%) o bacteriemias relacionadas con catéter (7-21%) (Van Hal et al., 2012b).

El foco primario puede ser extravascular (celulitis, úlcera, herida, forúnculo, infecciones osteoarticulares, infección pleuropulmonar...), o intravascular (EI, uso de drogas inyectables o dispositivos intravasculares). El foco principal desde el que suele entrar la bacteria es la piel o tejidos blandos. Hay determinados factores predisponentes como hospitalizaciones previas, abuso del alcohol, cáncer, corticoesteroides, diabetes mellitus, fallo renal crónico, terapia citostática e inmunosupresiva, cirrosis, cardiomiopatía, abuso de drogas parenterales y enfermedad cardíaca congénita (Rongpharpi et al., 2014). En el 20% de los casos aproximadamente se desconoce la verdadera causa de la bacteriemia (Tong et al., 2015).



El proceso patofisiológico que se produce es el siguiente:

Las principales dianas de *S. aureus* en sangre son las células del SI y el endotelio vascular, provocando inflamación, disminución de función del SI, alteración de la coagulación y desestabilidad de la integridad vascular. Estas alteraciones se ven acentuadas por la respuesta inflamatoria del huésped, lo que puede culminar en manifestaciones clínicas graves de sepsis o shock séptico (Powers and Wardenburg, 2014).

En condiciones normales, el endotelio vascular actúa de barrera entre la sangre y los tejidos previniendo la invasión tisular, pero en SAB se produce una disminución de la integridad de las venas, producida por los mediadores proinflamatorios inducidos por el patógeno, que actúan destruyendo las uniones intercelulares. El epitelio dañado además es un potente estímulo para el rápido reclutamiento de plaquetas y cascadas de coagulación. La cascada de coagulación se altera por los factores de virulencia de *S. aureus* (*Coa*, *vWbp*, *ClfA* y *ClfB*) y por la respuesta inflamatoria, rompiéndose el equilibrio de la homeostasis que lleva a formación de trombos intravasculares. Los coágulos de fibrina provocan la agrupación de bacterias en la sangre facilitando su supervivencia. Esto se produce en un sitio estratégico donde la bacteria, cargada de sus factores de virulencia, atrae a plaquetas, leucocitos y proteínas de coagulación produciendo una oclusión microvascular que incrementa la permeabilidad vascular (Powers and Wardenburg, 2014). La inflamación unida a la reducción del flujo sanguíneo y la disfunción del endotelio produce una disminución de la oxigenación en el tejido, provocando los síntomas característicos como fiebre, hipotensión, permeabilidad capilar, coagulopatía intravascular diseminada (CID), depresión de la función miocárdica y disfunción multiorgánica (Keynan and Rubinstein, 2013), precipitando la situación de sepsis y fallo de órganos vitales.

Una vez en el torrente sanguíneo, cualquier órgano o tejido puede ser virtualmente infectado, desencadenando complicaciones como EI, infecciones metastásicas (émbolos, tromboflebitis, infecciones osteoarticulares, discitis, abscesos) o síndrome séptico. Las complicaciones aparecen en un 11-43% de casos (Dayan et al., 2016).



Las manifestaciones clínicas por lo tanto son muy variadas desde cuadros inaparentes (paso puntual a sangre de una baja carga bacteriana) (Serrano et al., 2018) hasta el shock séptico, el cual se produce por una respuesta inflamatoria incontrolada, desencadenada por una liberación masiva de citoquinas proinflamatorias Th1 como TNF α , IL-1 β , IL-6 e IFN y provocada por factores de virulencia como las toxinas superantigénicas provocando un fracaso multiorgánico. *S. aureus* representa una de las causas más frecuentes de shock séptico.

La distinción entre bacteriemia complicada y no complicada es clave en el manejo de la SAB, ya que determina el seguimiento clínico, la duración de terapia antibiótica y el pronóstico de la enfermedad (Tong et al., 2015, Gudiol et al., 2017).

Se considera bacteriemia complicada si cumple alguno de los siguientes criterios: desarrollo de endocarditis bacteriana, tromboflebitis séptica (definida como bacteriemia persistente al menos a las 72 horas después de la instauración del tratamiento asociada a un trombo documentado), artritis, espondilodiscitis y diseminación hematológica de la infección; o infección que incluya prótesis vascular u osteoarticular (excluyendo catéter intravascular) sin retirar a los 4 días (Aguado et al., 2011)

La sociedad americana *Infectious Diseases Society of America* (IDSA) define SAB no complicada si se descarta El por ecocardiografía, ausencia de prótesis, hemocultivos negativos de 2-4 días después del hemocultivo positivo, ausencia de fiebre durante 72h después de iniciar el tratamiento correcto y ausencia de evidencias de infección metastásica (Liu et al., 2011).

Ahora bien, la evolución de la bacteriemia es el resultado de la compleja interacción de 3 elementos principales: el huésped (sus características clínicas de base), el microorganismo (los factores de virulencia y resistencia), y la interacción entre el huésped y el patógeno (actividad del SI y patogenicidad del microorganismo en el paciente), por lo que son numerosos los factores clínicos, terapéuticos y



microbiológicos que contribuyen a orientar la evolución de la enfermedad hacia su resolución o hacia diversas complicaciones o incluso mortalidad.

Los datos publicados hasta la fecha en relación a los genes de virulencia y el desarrollo de complicaciones son discordantes, pero todo apunta a que las características genéticas y fenotípicas de la bacteria son las que finalmente van a determinar la evolución de la enfermedad (Recker et al., 2017).

De hecho, diversos genes han sido relacionados ya con algún tipo de complicación (EI, bacteriemia persistente...): *fnbA* y *fnbB* (Xiong et al., 2009, Peacock et al., 2000), *clfB* (clumping factor B) (Nienaber et al., 2011), *cna* (collagen adhesin) (Nienaber et al., 2011, San-Juan et al., 2017b), *tst* y enterotoxinas (Nienaber et al., 2011, Rieg et al., 2013), *agr* (Xiong et al., 2009, Park et al., 2013)... Sin embargo, los últimos estudios utilizan las técnicas de secuenciación (WGS) para evaluar la presencia de dichos genes y fallan a la hora de vincularlos con complicaciones (Lilje et al., 2017).

No obstante, la multifuncionalidad y redundancia de los factores de virulencia, así como la compleja naturaleza de los mecanismos de regulación (Giulieri et al., 2016), y el carácter ubicuo de la mayoría de ellos hace muy difícil interpretar el papel que tienen muchos de los factores de virulencia en la patogénesis de la enfermedad por *S. aureus* (Gordon and Lowy, 2008), y por ello las conclusiones obtenidas de los escasos estudios que hasta ahora que se centran en el análisis de los rasgos genotípicos de *S. aureus* y la producción de bacteriemia complicada son discordantes.

I.2.3. Manejo de la bacteremia por *S. aureus*.

El correcto manejo terapéutico de SAB debe ser individualizado para cada paciente y está determinado por la susceptibilidad antibiótica del aislado, la fuente de SAB, la presencia de endocarditis y/o infección metastásica y factores de base del hospedador como enfermedades de bases o alergias a los antibióticos (Mitchell and Howden, 2005, Corey, 2009).



El retraso en la instauración del tratamiento es una de las principales causas que se ha relacionado con peores pronóstico en SAB (Lodise et al., 2003, Kollef et al., 2000, Mather et al., 2016, Ibrahim et al., 2000), además de aumentar el tiempo de hospitalización; de ahí la importancia de un precoz y preciso diagnóstico microbiológico para establecer un rápido control de la fuente e inicio de terapia efectiva.

El principal método diagnóstico de la bacteriemia sigue siendo actualmente el hemocultivo, extrayéndose las muestras de sangre mediante venopunción (extracción periférica). Hay que tener en cuenta que durante un episodio de bacteriemia el número de microorganismos presentes en la sangre puede variar entre 10 unidades formadoras de colonias (UFC)/mililitro (mL) y 10^4 UFC/mL, pudiendo ser incluso inferior a 0.1 UFC/mL en el 20% de los casos (Rodríguez Díaz et al., 2017), por ello se precisan de técnicas sensibles para su detección. La implementación de la tinción de Gram inmediatamente después de detectarse crecimiento en el hemocultivo tuvo un impacto significativo a la hora de manejar la bacteriemia; sin embargo, con las nuevas tecnologías, se puede llegar a afinar en la identificación y sensibilidad antibiótica en tiempos muy reducidos: con la instauración de la espectrometría de masas (MALDI-TOF MS; *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization -Time-of-Flight mass spectrometry*) se puede hacer una identificación en menos de dos horas en el 95% de los casos con una especificidad del 100% (Gudiol et al., 2015).

En las bacteriemias por *S. aureus*, se plantean dos panoramas radicalmente distintos a la hora de establecer el tratamiento en función del comportamiento que presente el *S. aureus* frente a la metilicina, pero cuando se diagnostica la enfermedad esta información no está disponible, de modo que el tratamiento empírico debe cubrir todo el espectro (Holubar et al., 2016).

Las bacteriemias por *S. aureus* pueden tratarse con penicilinas, cefazolina, glicopéptidos, daptomicina, linezolid y ceftarolina (cuando la bacteriemia es secundaria a STTs) (Gudiol et al., 2017). La terapia empírica está supeditada a la epidemiología local, pero la elevada incidencia global de MRSA y la prevalencia cada vez más alta de cepas de *S. aureus* con concentración mínima inhibitoria (CMI) alta de



vancomicina hacen necesario y urgente el estudio de sensibilidad antibiótica. La terapia oral es inapropiada como inicio de terapia para SAB (Mitchell and Howden, 2005), por lo que lo más aceptado hasta el momento es el uso de vancomicina o daptomicina como tratamiento de primera línea (Liu et al., 2011, Choo and Chambers, 2016). Ceftarolina es una buena alternativa aunque su amplio espectro juega en contra de su uso como terapia definitiva si no hay infección polimicrobiana. La combinación de varios antibióticos ha probado ser más efectiva (Holubar et al., 2016), por lo que se recomienda una combinación de un agente anti MSSA (oxacilina, cefazolina, cefuroxima o ceftriaxona) y vancomicina (los betalactámicos presentan mejor actividad que la vancomicina frente a MSSA, pero no cubre un posible MRSA) (Keynan and Rubinstein, 2013).

a) Tratamiento de MSSAB:

Las penicilinas clásicas siguen siendo el tratamiento de elección para MSSAB debido a su potente actividad bactericida. Sin embargo, casi el 90% de las cepas de *S. aureus* son portadores de β -lactamasa de clase A (Bla), dotándoles de resistencia a éste fármaco (Gudiol et al., 2017). Por ello los expertos recomiendan la administración de penicilinas resistentes a estas penicilinasas como meticilina, nafcilina, oxacilina o cloxacilina (2g/6h iv); sin embargo, los clínicos deben considerar una terapia combinada si el paciente está en riesgo de padecer una bacteriemia complicada o aparecen complicaciones. En pacientes alérgicos o intolerantes a penicilinas resistentes a penicilinasas, las principales alternativas son vancomicina o cefalosporinas de primera generación (Mitchell and Howden, 2005, Cisneros-Herreros et al., 2007).

b) Tratamiento de MRSAB:

Vancomicina se ha considerado tradicionalmente el agente de elección (Moise and Sakoulas, 2015, Holland et al., 2014, Mitchell and Howden, 2005). La vancomicina es un glicopéptido que se une al dipéptido terminal de la cadena de aminoácidos del PG naciente, bloqueando así la síntesis de la pared celular. Posee un efecto bactericida lento. Se estudia más adelante en el apartado I.3. La eficacia de la vancomicina ha



disminuido en los últimos años por el incremento modal de las CMI (creep), si bien la relación de este fenómeno con la mortalidad es discutido (Kalil et al., 2014). Las principales alternativas a la vancomicina son linezolid y daptomicina, aunque hay otras (Tabla I.3):

- Linezolid: se trata de una oxazolidinona sintética, con acción bacteriostática, que actúa inhibiendo la síntesis proteica en la subunidad 50S ribosomal. No presenta resistencia cruzada con otros inhibidores de la síntesis de proteínas como tetraciclinas, clindamicina y macrólidos. Tiene buena distribución tisular y excelente biodisponibilidad, pudiéndose administrar vía oral o parenteral, alcanzando similares concentraciones séricas. Se han observado resistencias a linezolid y su duración está limitada a 28 días por sus posibles efectos adversos (Keynan and Rubinstein, 2013).
- Daptomicina: es un lipopéptido cíclico con actividad bactericida cuyo mecanismo es despolarizar la membrana celular insertándose en ella. No puede usarse si el foco es respiratorio ya que es inactivada por el surfactante pulmonar. La CMI de daptomicina puede aumentar durante el curso del tratamiento, y esto puede estar influenciado por el previo uso de vancomicina: aislados que han sido expuestos a vancomicina presentaron heterorresistencia a daptomicina, por lo que la determinación de la CMI de daptomicina ha de hacerse tanto al principio como al final del tratamiento. Es el único antibiótico que ha demostrado no inferioridad a vancomicina en los estudios para el tratamiento de MRSAB (Van Hal et al., 2012a) por lo que se considera tratamiento de primera línea para MRSAB (Gudiol et al., 2017).
- Quinupristina-dalfopristina: esta combinación de una estreptogramina del grupo B (quinupristina) y un derivado semisintético de estreptogramina del grupo A (dalfopristina) genera un resultado soluble para su administración iv. (Howden et al., 2010). Puede ser una alternativa válida pero posee limitaciones a tener en cuenta, como que requiere administración venosa central por riesgo



de flebitis en venas periféricas y sus múltiples efectos adversos. Se han visto desarrollo de resistencias durante el tratamiento. Debe plantearse su uso cuando hay intolerancia severa a vancomicina.

- Trimetroprim-sulfametoxazol: es una combinación de 2 compuestos con actividad sinérgica ya que actúan en pasos consecutivos en la vía de síntesis del ácido fólico. Algunas de cepas de MRSA siguen siendo sensibles a éste compuesto, pero no tiene efecto si existe pus sin drenar (abscesos).
- Clindamicina: es una lincosamida de origen semisintético bacteriostática con excelente penetración tisular.
- Teicoplanina: con acción similar a vancomicina pero menos efectos adversos (Gudiol et al., 2017). No está recomendada como terapia inicial por las altas tasas de bacteriemias en estudios de EI por *S. aureus* (Mitchell and Howden, 2005).
- Telavancina, Dalbavancina y Oritavancina: son lipoglicopéptidos semisintéticos con actividad bactericida frente a MRSA. Actualmente sólo están indicados para infecciones complicadas de la piel y tejidos blandos.
- Tigeciclina: glicilglicina, la primera de una nueva generación de tetraciclinas, que inhibe la síntesis de proteínas uniéndose a la subunidad 30S ribosomal bloqueando la entrada del aminoacil-tRNA al sitio A del ribosoma (Holubar et al., 2016).



Tabla 1.3: Perfil de agentes antimicrobianos empleados para el tratamiento de las infecciones por MRSA.

Agente	Puntos de corte de CMI ($\mu\text{g/mL}$)	Índices PK-PD asociados con eficacia	Actividad frente a <i>S. aureus</i>
Vancomicina	≤ 2	AUC/CMI	Bactericida
Linezolid	≤ 4	AUC/CMI	Bacteriostática
Daptomicina	≤ 1	AUC/CMI	Bactericida
Quinupristina-dalfopristina	≤ 1	AUC/CMI	Bacteriostática
Trimetoprim-sulfametoxazol*	≤ 2	AUC/CMI	Bacteriostática
Clindamicina	≤ 0.25	AUC/CMI (Índice PK/PD no establecido)	Bacteriostática
Teicoplanina	≤ 2	AUC/CMI	Bactericida
Dalbavancina/Oritavancina/Telavancina	≤ 0.12	AUC/CMI	Bactericida
Tigeciclina	≤ 0.25	AUC/CMI	Bacteriostática
Ceftarolina	≤ 1	T>CMI	Bactericida
Tedizolid	≤ 0.5	AUC/CMI	Bacteriostática

Tabla modificada de (Holubar et al., 2016).

*Trimetoprim:sulfametoxazol a la concentración de 1:19. Los puntos de corte se refieren a la concentración de Trimetoprim.

AUC: área bajo la curva (*Area under the curve*).

Además del tratamiento antibiótico es necesaria la eliminación (control) del foco de la infección (ej. drenaje o desbridamiento quirúrgico), y se recomienda tomar hemocultivos de seguimiento a los 2-4 días desde la positividad del primer



hemocultivo para documentar el aclaramiento de la bacteriemia (A-II). Se recomienda también ecocardiografía en pacientes adultos con bacteriemia (ecocardiografía transesofágica (TEE; *Transesophageal echocardiography*) mejor que ecocardiografía transtorácica (TTE; *Transthoracic echocardiography*) (A-II) a todos los casos de SAB debido a la alta frecuencia de endocarditis en estos casos (30%) (Keynan and Rubinstein, 2013, Liu et al., 2011). Si la sensibilidad a vancomicina y daptomicina es baja, las alternativas terapéuticas incluyen: quinupristina/dalfopristina (7.5 mg/kg, iv cada 8 h), Trimetroprim-sulfametoxazol (5 mg/kg, iv cada 12 h), linezolid (600 mg, iv cada 12 h) o telavancina (10 mg/kg, iv cada 24 h)(C-III) (Liu et al., 2011). En función de las características clínicas del paciente y el foco primario se determina la duración del tratamiento, aconsejando tratamientos más prolongados si el foco es de localización profunda (Keynan and Rubinstein, 2013). La duración del tratamiento debe extenderse de 4 a 6 semanas, a menos que el paciente cumpla los criterios de bacteriemia no complicada (Moise and Sakoulas, 2015), en cuyo caso se podría acortar a 14 días desde el primer hemocultivo negativo (recomendación débil basada en evidencia de baja calidad) (Holland et al., 2014).

Cierto es que las últimas guías recomiendan al clínico orientar el manejo terapéutico (determinando si se continúa o no administrando vancomicina) apoyándose fundamentalmente en las características clínicas del paciente, no en la CMI de vancomicina (recomendación A-III), sobre todo para los aislados con CMIs ≤ 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, únicamente sustituyendo el antibiótico si el paciente no presenta respuesta clínica y microbiológica a vancomicina a pesar de las correctas medidas de desbridamiento y eliminación de otro posible foco de infección (Liu et al., 2011). Para aislados con CMI >2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (por ejemplo: VISA o VRSA), debe usarse una alternativa a vancomicina (A-III). No obstante, detectar el momento en el que un paciente es refractario al tratamiento con vancomicina es un tema arduo, entre otras cosas porque la media de tiempo que requiere la MRSA bacteriemia para aclararse es de 7-9 días; muchos expertos están de acuerdo en que si la bacteriemia persiste a los 7 días debe plantearse un cambio en el tratamiento. Además deben tenerse en consideración otros factores, como la respuesta clínica global del paciente, las concentraciones



séricas de vancomicina, los resultados de los test de sensibilidad y la presencia y posibilidad de eliminar otros focos de infección. La decisión de modificar la terapia y la ventana de tiempo en la que esta debe ocurrir varía en función del escenario clínico. Debe plantearse si la bacteriemia persiste tras una semana, pero debe considerarse antes si las condiciones del paciente empeoran a pesar del adecuado desbridamiento y eliminación de focos o si la CMI es de $2 \mu\text{g/mL}$, particularmente en pacientes críticos o sépticos. Por otro lado, no se recomiendan cambios inmediatos en la terapia si el paciente responde clínicamente y con CMIs $<2 \mu\text{g/mL}$, ya que en muchos casos, la bacteriemia se resolverá con una terapia continua de vancomicina (Liu et al., 2011).

I.3 CMI de Vancomicina en el contexto de SAB

Vancomicina es un glicopéptido relativamente grande (peso molecular $1.485,7 \text{ g/mol}$), derivado de *Amycolatopsis orientalis* (conocido como *Streptomyces orientalis* o *Nocardia orientalis*) (Cui et al., 2006) (Figura I.6). Actúa bloqueando físicamente un sustrato clave para la síntesis de la pared celular: un residuo de D-alanina-D-alanina del PG precursor, formando un complejo estable no covalente (puentes de hidrógeno entre la parte peptídica de la vancomicina y el dipeptido D-ala-D-Ala), y a sustratos de la enzima glucosiltransferasa y transpeptidasa de las PBPs por impedimento estérico (Kahne et al., 2005), por lo que impide la formación de la cadena nascente del PG (Howden et al., 2010). Actúa en la parte externa de la membrana plasmática, provocando una acumulación de residuos de UDP unidos a precursores de N-acetilmurámico. Para que ejerza su acción la vancomicina deberá difundir hasta el septo de división celular donde se localizan los precursores del PG.

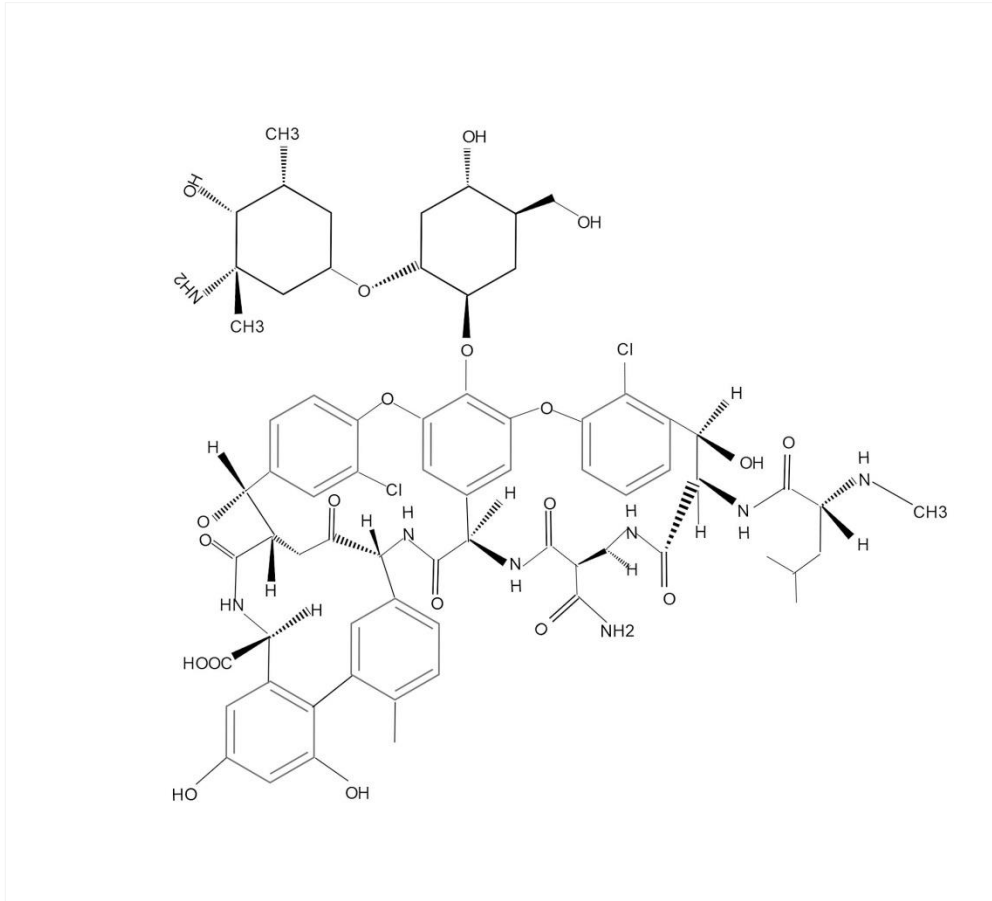


Figura I.6. Estructura química de la vancomicina.

Se sintetizó en 1953 y se comercializó rápidamente dada la necesidad de un tratamiento alternativo para tratar los *S. aureus* resistentes a penicilina (Holmes et al., 2015); sin embargo, debido a sus efectos ototóxicos y nefrotóxicos y al desarrollo de otros nuevos fármacos como la meticilina, fue relegada a antibiótico de segunda línea durante la década de los 60 (Moellering Jr, 2006). Más tarde, recobró vigencia para tratar los MRSA emergentes (McGuinness et al., 2017), instaurándose como tratamiento de elección desde entonces. Aunque hace ya más de 50 años que está en uso, todavía hay controversia sobre las dosis óptimas (Holmes et al., 2015).

Para asegurar el éxito terapéutico, los puntos de corte establecidos por el CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), y EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) para *S. aureus* se modificaron en 2006 (Tabla I.4).



Tabla I.4: Puntos de corte de vancomicina para *S. aureus* según los distintos organismos internacionales.

Clasificación	Microdilución en caldo (BMD; <i>Broth microdilution</i>) (µg/mL)		
	CLSI antes 2006	CLSI después 2006	EUCAST
Sensible	≤4	≤2	≤2
Intermedio	8-16	4-8	-
Resistente	≥32	≥16	≥4

I.3.1 Dosificación de vancomicina

La vancomicina es un antibiótico con actividad concentración-independiente y prolongado efecto postantibiótico (Blasco et al., 2015). El parámetro farmacodinámico (PK/PD) que mejor predice la eficacia de la vancomicina es AUC /CMI. Las guías recomiendan que ésta oscile en torno a 400 (Holmes et al., 2015, Rybak et al., 2009a), por lo que una correcta medición de la CMI resulta crucial para establecer el tratamiento idóneo.

- El AUC es el área bajo la curva de concentración plasmática a las 24 horas y representa la exposición del organismo al fármaco (Blasco et al., 2015).

$$AUC = \frac{\text{dosis}}{CL}$$

Se expresa en mg x h/L y se calcula midiendo concentraciones en suero, considerándose aceptables niveles de entre 15 y 20 µg/mL cada 8-12 horas para alcanzar AUC/CMI>400 (suponiendo que la CMI es de 1µg/mL y en un paciente con buena función renal) (Holmes et al., 2015). La probabilidad de conseguir 400 es baja cuando los valores de CMI oscilan 2g/ml, aunque se mantengan los niveles de 15–20g/m (Van Hal et al., 2012a).



- La CMI se define como la concentración más baja de antimicrobiano que es capaz de inhibir el crecimiento visible del microorganismo. El tamaño del inóculo, el tipo de medio de crecimiento, el tiempo de incubación y el método de preparación del inóculo pueden influenciar los valores de CMI. Para homogeneizar estas variables, existen unos procedimientos estandarizados por el CLSI para testar bacterias que crecen en medio aerobio, levaduras y hongos filamentosos mediante la técnica de microdilución (Balouiri et al., 2016). Las técnicas que se emplean para la determinación de éste parámetro las debe de tener en cuenta el clínico a la hora de interpretar los resultados (Holmes et al., 2015), pues los resultados pueden variar en función de éstas; de hecho, las guías actuales recomiendan una decisión terapéutica basada en la respuesta clínica, no en los valores de CMIs (Van Hal et al., 2011a).

Es un fármaco que presenta escasa penetración tisular. La dosis inicial de vancomicina se debe calcular en función del peso actual del paciente y las siguientes dosis se ajustarán en base a las concentraciones séricas hasta alcanzar las concentraciones terapéuticas (Rybak et al., 2009b). Se suele administrar a dosis intermitentes aunque las infusiones continuas son buenas para conseguir más rápido las concentraciones y menos variabilidad en las concentraciones séricas. No se han demostrado mejorías clínicas con éste método, pero si menor nefrotoxicidad y mayor estado de concentraciones constantes (Holmes et al., 2015). Para maximizar la eficacia, las concentraciones séricas de vancomicina deben monitorizarse desde el 3 día para mantener niveles cercanos a 20 mg/L (Mitchell and Howden, 2005).



I.3.2 Impacto de la CMI de vancomicina de *S. aureus* en el desarrollo de complicaciones y mortalidad.

La primera cepa resistente de *S. aureus* a vancomicina no se aisló hasta 2002 (McGuinness et al., 2017). Esta resistencia viene conferida por el gen *vanA*, que actúa reemplazando el dipéptido diana del antibiótico (D-Ala-D-Ala), hidrolizando este precursor y sintetizando D-Ala-D lactato, el cual ya no presenta afinidad por vancomicina. *VanA* es un operon codificado en el transposón Tn1546 que forma parte de un plásmido conjugativo de VRE (enterococo resistente a vancomicina) (McGuinness et al., 2017). El escaso número de cepas de *S. aureus* resistentes a vancomicina (VRSA) reportado sugiere que la resistencia mediada por el gen *vanA* no se extiende rápidamente, probablemente por el alto coste en “fitness” que le supone a la bacteria; sin embargo, los aislados con sensibilidad intermedia a vancomicina (VISA; *Vancomycin intermediated Staphylococcus aureus*) o hVISA (*heteroresistant VISA*) se han comunicado con frecuencia en todo el mundo (Hu et al., 2016).

El concepto de VISA o hVISA surgió ante la necesidad de clasificar a las cepas de *S. aureus* que no son resistentes a vancomicina (por la adquisición del gen *vanA*), pero presentan una sensibilidad disminuida a dicho fármaco. Se trata de una población mixta de células, derivada de una misma colonia de *S. aureus*, en la que la mayoría son sensibles a vancomicina ($CMI \leq 2 \mu\text{g/ml}$), pero hay una subpoblación que presenta resistencia a nivel de VISA ($CMI \geq 4 \mu\text{g/ml}$) (McGuinness et al., 2017). Aunque los mecanismos por los que se producen estas colonias heterorresistentes no están bien definidos, todas presentan alteraciones en genes reguladores que controlan el metabolismo y la estructura de la pared celular (Mather et al., 2016). Estas alteraciones son variables, pero todas ellas muestran características fenotípicas comunes como un engrosamiento de la pared celular y tasa de crecimiento disminuída. El engrosamiento de la pared reduce el coeficiente de difusión de vancomicina a través de las capas del PG por lo que las moléculas del fármaco no llegan a la membrana citoplasmática dónde ejercen su acción.

También existe una alteración del perfil de proteínas de superficie, formación de biofilm, expresión de proteína A o producción de la cápsula (Howden et al., 2010). Otra



teoría que se plantea es que una disminución de la expresión de genes reguladores como *agr*, produce un aumento de la expresión de adhesinas de superficie que les permite unirse al fibrinógeno y fibronectina, disminución de la virulencia, con la consecuente reducción de mortalidad y complicaciones (Marbach et al., 2017, Howden et al., 2006).

Hace algunos años, el preocupante aumento de las infecciones causadas por *S. aureus* resistente a meticilina, que demostró expandirse con gran rapidez, incentivó la búsqueda de factores que predijesen un peor pronóstico en el contexto de las bacteriemias causadas por este microorganismo

Asimismo, se ha observado que las cepas de *S. aureus* que presentan sensibilidad disminuida a vancomicina es decir, una CMI próxima al límite de la sensibilidad ($\geq 1.5 \text{g/mL}$ y $< 2 \text{g/mL}$), están relacionadas con una peor respuesta al tratamiento y evolución de la enfermedad (Sakoulas et al., 2004, Moise-Broder et al., 2004, Hidayat et al., 2006, Aguado et al., 2011).

Parece plausible pensar que la causa de estas complicaciones sea un tratamiento inefectivo, por la manifiesta dificultad de alcanzar óptimos niveles terapéuticos de vancomicina cuando la CMI está próxima a 2. Sin embargo, (Holmes et al., 2011) demostraron que esta evolución era independiente del tratamiento (se asociaba tanto en MSSAB como en MRSAB, es decir, tanto si se trataba con betalactámicos o con vancomicina), dejando entonces abierta la posibilidad de que esta CMI alta de vancomicina se corresponda, más que a una resistencia a la acción del tratamiento, a determinadas características fenotípicas de la bacteria que la hacen más virulenta; es decir, que la CMI no sólo es un parámetro que oriente hacia un correcto manejo terapéutico, sino que puede también ser un marcador subrogado de virulencia del microorganismo, manifestado en el desarrollo de complicaciones en SAB o mortalidad (Soriano et al., 2008).

En este sentido, se ha visto que las cepas que presentan sensibilidad disminuida a vancomicina (RSV; *reduced sensitivity to vancomycin*) se caracterizaban por presentar variaciones en el grosor de la pared celular, disminución de la autólisis y alteraciones



metabólicas, de lo que se puede inferir que los cambios que afectan a la biología de la pared celular o de la membrana celular pueden potenciar la virulencia del *S. aureus* y conceptualmente afectar a la CMI de vancomicina (Howden et al., 2010, Holland and Fowler Jr, 2011).

De hecho, hay estudios que relacionan directamente un engrosamiento de la pared celular con CMIs altas de vancomicina (Cui et al., 2003). Este engrosamiento de la pared celular, además de suponer un inconveniente para la penetración de los fármacos, también supondrá un inconveniente para la acción del killing de los granulocitos, aumentando su resistencia a la opsonofagocitosis y el killing de fagocitos profesionales (Méhes et al., 2012, Cui et al., 2003).

En definitiva, se producen una serie de cambios en la estructura de *S. aureus* que alteran su interacción con el hospedador y que podrían explicar su habilidad para evadir el SI y la persistencia y complicaciones que se observan clínicamente (Cameron et al., 2016) pero no se ha llegado a ninguna conclusión hasta el momento. El esclarecimiento del verdadero impacto de los valores de las CMIs de las cepas de *S. aureus* sensibles a vancomicina en el desenlace final de las bacteriemias es de una relevada trascendencia si consideramos que puede influenciar críticamente en el manejo terapéutico de esta entidad clínica.

II. HIPÓTESIS





La asociación de CMI's altas ($\geq 1,5$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ en el rango de sensibilidad) de vancomicina para *S. aureus* (sensible y resistente a meticilina), determinadas por Etest, con el desarrollo de bacteriemia complicada es espuria ("artefactual"), lo que probablemente resulta de la imprecisión de este método; sin embargo, esta característica (CMI's $\geq 1,5$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ por Etest) podría estar vinculada con algún rasgo fenotípico o genotípico del microorganismo que le confiriera una patogenicidad especial en este contexto clínico (marcador subrogado de virulencia). No obstante, la CMI de vancomicina para *S. aureus* (siempre en el rango de sensibilidad) medida mediante un método preciso y robusto de microdilución no debería ser un factor de riesgo relevante para el desarrollo de bacteriemias complicadas.

III. OBJETIVOS



III.1 Evaluar las prestaciones analíticas del Etest para la determinación de la sensibilidad de *S. aureus* a vancomicina.

III.2 Desarrollo de un método robusto de microdilución para la determinación de la sensibilidad de *S. aureus* a vancomicina, que incluya un gradiente cuasi continuo de concentraciones del antimicrobiano.

III.3 Determinar si existe algún rasgo fenotípico/genotípico vinculado a las cepas de *S. aureus* con concentraciones mínimas inhibitorias (CMIs) a vancomicina en el límite alto de sensibilidad medidas por Etest ($CMI \geq 1,5 \mu\text{g/mL}$).

III.4 Investigar el impacto de varias características feno y genotípicas de *S. aureus* en el riesgo de desarrollo de bacteriemias complicadas.

IV. METODOLOGÍA





IV.1 Pacientes incluidos en el estudio

Los criterios de inclusión y las características clínicas de los pacientes que se incluyeron en los estudios se detallan en los apartados correspondientes de cada artículo.

IV.2 Obtención y preservación de aislados de *S. aureus* productores de bacteriemias

En el Servicio de Microbiología del Hospital Clínico de Valencia (HCV) las muestras de sangre se trabajan inoculando 10mL de la sangre del paciente en botellas de hemocultivos (BD BACTEC™ PlusAerobic/F y Plus Anaerobic/F) y procesándose en un sistema de monitorización automática de crecimiento, BACTEC™ FX, Becton Dickinson, BD Diagnostics, Franklin Lakes, USA). Este dispositivo mantiene a los frascos en agitación continua y a 36°C para favorecer el crecimiento microbiano, al mismo tiempo que detecta el crecimiento bacteriano mediante un sensor fluorimétrico de gases integrado en el vial del hemocultivo: los fotodetectores del instrumento miden el nivel de fluorescencia que emite cada vial, el cual se corresponde a la cantidad de CO₂ liberado por los microorganismos. Al detectar crecimiento el sistema emite una alerta y se procede inmediatamente a la identificación del microorganismo causante de la bacteriemia mediante tinción de Gram y sistema MALDI-TOF MS y al estudio de sensibilidad antibiótica, incluyendo la detección de resistencia a meticilina, utilizando las técnicas de MicroScan® (Siemens Healthcare Diagnostics, West Sacramento, CA) o Phoenix (Becton Dickinson, BD Diagnostics, Franklin Lakes, USA). Paralelamente se siembra la muestra en agar chocolate (y McConkey o CNa si procede). Al inicio del estudio no se habían introducido estas técnicas en la rutina de trabajo del laboratorio; el procedimiento que se seguía consistía en realizar la tinción de Gram y sembrar después en los correspondientes medios para su posterior identificación y estudio de sensibilidad antibiótica.

Los aislados de *S. aureus* se confirmaban mediante la técnica de coagulasa (Pastorex Staph-Plus kit, Bio-Rad, Munich, Germany) seguida de la identificación por el sistema



MALDI-TOF MS. Se determinó la sensibilidad a vancomicina en el momento del aislamiento mediante el Etest. Las cepas aisladas se preservaron en medio BHI (*brain-heart infusión*, caldo corazón-cerebro) con glicerol (-70°C).

Para proceder a la realización del estudio, todos los aislados de *S. aureus* productores de bacteriemias entre los años 2012-2016 fueron descongelados y subcultivados en placas de agar asangre (trypticase soy agar 5% sheep's blood (TSA), Beckton Dickinson, Sparks, Maryland).

IV.3 Evaluación analítica del Etest.

El Etest se realizó sembrando 200 μL del inóculo estándar de 0.5 McFarland ($0.98 \times 10^8 - 1.3 \times 10^8$ UFC/mL) en agar Mueller-Hinton (BD), y aplicando la tira de Etest de vancomicina (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France). El experimento se realizó paralelamente en dos centros: el HCU y el Consorcio Hospital General (CHG) (se trabajaron las mismas cepas el mismo día, y se utilizaron los mismos lotes del medio de cultivo y de tiras de Etest). Las placas fueron leídas visualmente usando lentes de aumento después de 24 horas de incubación a 35°C . Las medidas de Etest se acompañaron de un recuento de colonias en paralelo para verificar la densidad de la suspensión del inóculo en términos de CFU/mL.

Para estudiar la heterorresistencia a vancomicina (hVISA) mediante el Etest se utilizó un inóculo correspondiente a 2.0 McFarland con placas de agar BHI (BD) y tiras de vancomicina y teicoplanina (bioMérieux). Se considera heterorresistencia por el método macrométrico del Etest si existen CMI de vancomicina y teicoplanina ≥ 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o una CMI de teicoplanina ≥ 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$, independientemente de la CMI de vancomicina.

IV.4 Optimización de un método de microdilución en caldo para la determinación de la CMI de *S.aureus* a Vancomicina

El método casero de microdilución se llevó a cabo en placas comerciales estériles de 96 pocillos (12x8) (Greiner CELLSTAR, BioOne de Sigma Aldrich) siguiendo las recomendaciones del CLSI (Wayne, 2014) y SEIMC (Cantón et al., 2000) (Figura IV.1).

IV.4.1 Preparación de los paneles con antimicrobiano:

Se utilizó vancomicina en polvo (100 mg) con una potencia de ≥ 900 μg de vancomicina por mg, proporcionado por Sigma Aldrich Chemicals (St. Louis, MO, USA) y se disolvió en agua estéril calculando las proporciones adecuadas para preparar soluciones de concentraciones seriadas de 0.50, 0.62, 0.75, 0.87, 1.0, 1.25, 1.40, 1.50, 1.60, 1.75, y 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en caldo Mueller-Hinton ajustado a cationes (Sigma Aldrich). Al disponer de 12 columnas, podemos estudiar en cada placa 11 diluciones (la última columna se suele utilizar como control de crecimiento). El volumen final de cada pocillo es habitualmente de 100 μl , por lo que antes de la inoculación de la placa, cada pocillo debe contener 100 μl de caldo con antimicrobiano (si volumen del inóculo es menor de 10 μl).

IV.4.2 Preparación del inóculo:

El inóculo en los métodos de dilución en caldo se prepara a partir de suspensiones de 0.5 de la escala de MacFarland (Cantón et al., 2000), medida por nefelometría (Vitek DensiCheck nephelometer de bioMérieux diagnostics, Marcy-l'Étoile, France), para obtener un inóculo final de 5 (se acepta de 3 a 7) $\times 10^5$ CFU/ml diluyendo en caldo Mueller-Hinton (Sigma Aldrich), para finalmente inocular 5 μL en cada pocillo. Las placas de microdilución se sellaron con adhesivo para evitar la evaporación del medio de cultivo durante la incubación.

Tras la incubación (24h a 35°C), se procedió a la lectura de los resultados. Ésta es más sencilla utilizando un lector con espejo en el que se refleja la parte inferior de la placa (Cantón et al., 2000). Se utilizó la cepa ATCC 29213 como control de calidad.

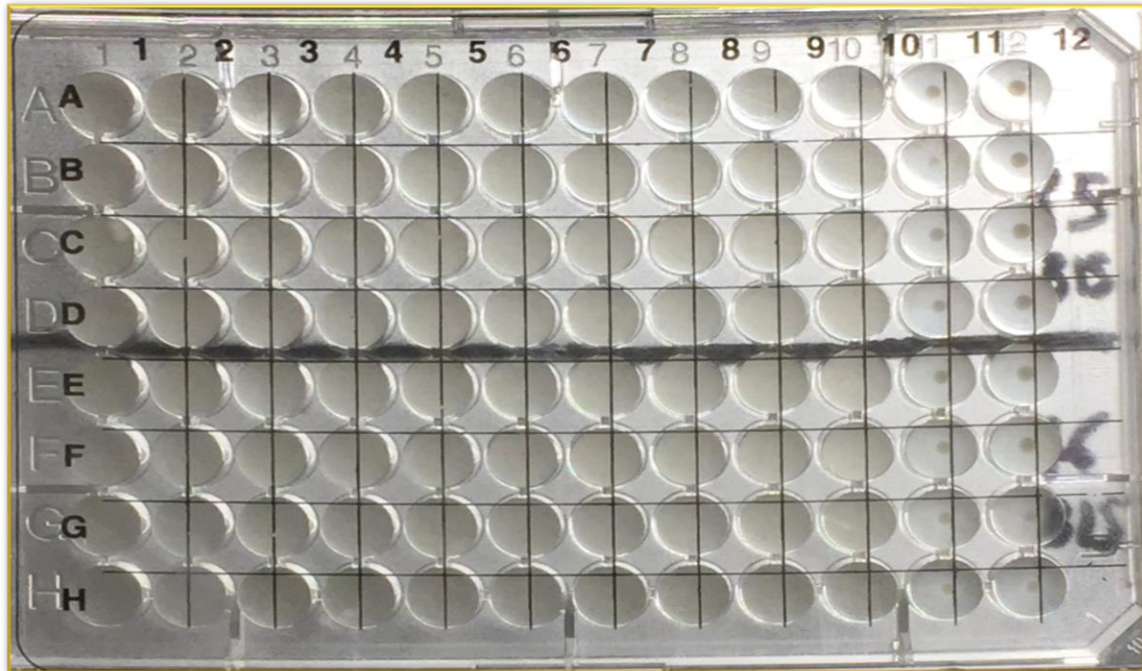


Figura IV.1. Panel de microdilución con concentraciones cuasicontinuas de vancomicina.

La CMI se define como la menor concentración de antimicrobiano que a simple vista inhibe completamente el crecimiento del microorganismo estudiado. La interpretación de los resultados, que a veces resulta compleja, se facilita tomando como referencia el crecimiento observado en los tubos o pocillos usados como control positivo, que deben presentar una clara turbidez o un botón de al menos 2 mm de diámetro.

IV.5 Estudio de la actividad bactericida de los fagocitos humanos frente a *S. aureus*

Estos experimentos se llevaron a cabo utilizando un protocolo diseñado para *Candida albicans*, el cual fue adaptado y optimizado para *S. aureus* (Murciano et al., 2008).

De forma esquemática, el protocolo del ensayo de killing fue el siguiente:

Se obtuvo sangre total de voluntarios sanos mediante punción en tubos heparinizados (Lithium Heparin, BD) y fue inmediatamente utilizada para el experimento. Una

alícuota de dicha sangre se centrifugó durante 5min a 3000xg para obtener la fracción de plasma. El cultivo primario de los aislados se realizó en placas de agar sangre (BD). Se reincubaron en caldo BHI a 37°C hasta la fase crecimiento exponencial ($A_{600nm} \sim 0.25-0.35$), después se lavaron con solución salina de buffer fosfato pH 7.4 (PBS), y se resuspendieron en un medio RPMI 164 (Gibco, Barcelona, Spain). Se inoculó una concentración de bacterias de 0.5×10^6 con 100 μ l de sangre completa y de plasma, en paralelo, y se incubó 1h a 37°. El ratio final entre las células bacterianas/ leucocitos es 1:1. Se sembraron las muestras a los tiempos 0 y 1h para cuantificar el número de células viables. Se realizaron diluciones seriadas (-1, -2 y -3) en agua estéril y se sembró la última en placas de Mueller Hinton mediante un asa de Digradlsky, dejándose reincubar 24h a 37°C. El porcentaje de supervivencia se calcula de la siguiente manera:

- % CFU in sangre= [CFU sangre(1 h)/CFU sangre(0 h)] x 100
- % CFU en plasma= [CFU plasma (1 h)/CFU plasma (0 h)] x 100;
- % supervivencia= (% CFU in sangre/% CFU plasma) x 100
- % killing=: 100 - % supervivencia.

Se testaron distintos aislados en tandas independientes usando sangres de distintos voluntarios, para validar el método. La cepa SA ATCC 25923 (CMI de vancomicina de 1 μ g/mL por Etest), la cual previamente se había demostrado que se mataba eficazmente con un porcentaje de killing del 80%, se usó como cepa control (Méhes et al., 2012). Estudios previos demostraron que el coeficiente de variación entre replicados y el coeficiente de variación inter-ensayo usando sangre de distintos voluntarios fue <10% y que la congelación como método de conservación de las cepas no afectaba a la susceptibilidad al killing por los fagocitos humanos.

IV.6 Ensayo de fagocitosis

Se obtuvieron concentraciones determinadas de los aislados de *S. aureus* (2.0×10^7 bacterias/mL) incubando a 37 °C en oscuridad durante 30 minutos con 5.0 μ M de éster de succinimidil-carboxifluoresceína (CFDA/SE, Molecular Probes, Oregon, USA) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Se lavaron las células con PBS,



resuspendiéndolas en buffer de fijación (BD) y manteniéndose 30 minutos a temperatura ambiente. Se cuantificaron mediante el citómetro BD FACSVerser™ Flow Cytometer (BD Bioscience). Las células (6×10^6 bacterias/ $5 \mu\text{L}$) se inocularon en $100 \mu\text{L}$ de sangre total y se incubaron 15 min a 37°C . Los neutrófilos y monocitos fueron marcados según los procedimientos estándares usando los siguientes anticuerpos (todos suministrados por BD): PE-labeled anti CD15 (clon W6D3) y APC-labeled anti-CD14 (clon M5E2). Las muestras fueron fijadas y los eritrocitos lisados usando FACS y buffer de lisis (BD). Los neutrófilos y monocitos se analizaron basándose en la expresión de CD15 y CD14, respectivamente, y el grado de fagocitosis se determinó analizando el porcentaje de células que emitían fluorescencia verde (CFDA-SE labeled) y midiendo la intensidad del fluorocromo. Los análisis de citometría de flujo se realizaron mediante el analizador LSR Fortessa (BD) y los datos fueron procesados por FACSDiva software. Se utilizó como control la cepa *S. aureus* ATCC 25923

IV.7 Medida de la pared celular mediante microscopio de transmisión de electrones (TEM; *Transmission electron microscopy*)

Para estudiar el grosor de la pared celular de las bacterias se adaptó un protocolo diseñado anteriormente utilizando un microscopio electrónico de barrido, con el fin de evaluar mejor las características morfológicas (Cui et al., 2000, Cui et al., 2003). Se fijaron las células bacterianas con glutaraldehído al 2,5% en 0.1M de buffer fosfato (PB) pH 7.4, durante 24 horas a 4°C , y posteriormente se lavaron 3 veces con PB. Se añadió una gota de 1.5% agar. Las células se volvieron a fijar con 2% OsO_4 durante 1 h a temperatura ambiente y teñidas con 1% de acetato de uranilo a 4°C durante 2 h en la oscuridad. Las células fueron entonces enjuagadas con agua destilada deshidratada en etanol y embebidas toda la noche en resina Durcupan (Fluka, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Tras la polimerización, se cortaron secciones muy finas, de $0.07 - 0.08 \mu\text{m}$, con un cuchillo de diamante, teñidas con citrato de plomo (Reynolds solution), y examinadas con el microscopio de transmisión electrónica FEI Tecnai G2 Spirit (FEI Europe, Eindhoven, Netherlands). Todas las imágenes se adquirieron a 1336×1336 pixels usando una cámara digital Morada (Olympus Soft Image Solutions GmbH,

Münster, Germany) y analizadas mediante iTEM software (Olympus TEM software, Münster, Germany) (Figura IV.2). Para el análisis Se seleccionaron 10 bacterias de cada cepa con cortes ecuatoriales similares. El grosor de la pared se midió en 4 puntos distintos de la pared (siempre en la misma posición: arriba, abajo, derecha e izquierda), aquellas en las que la resolución de la membrana plasmática y la superficie de la bacteria era más nítida. El grosor de la pared celular de cada aislado se calculó con la media de los valores de cada medida (la media de las 4 medidas).

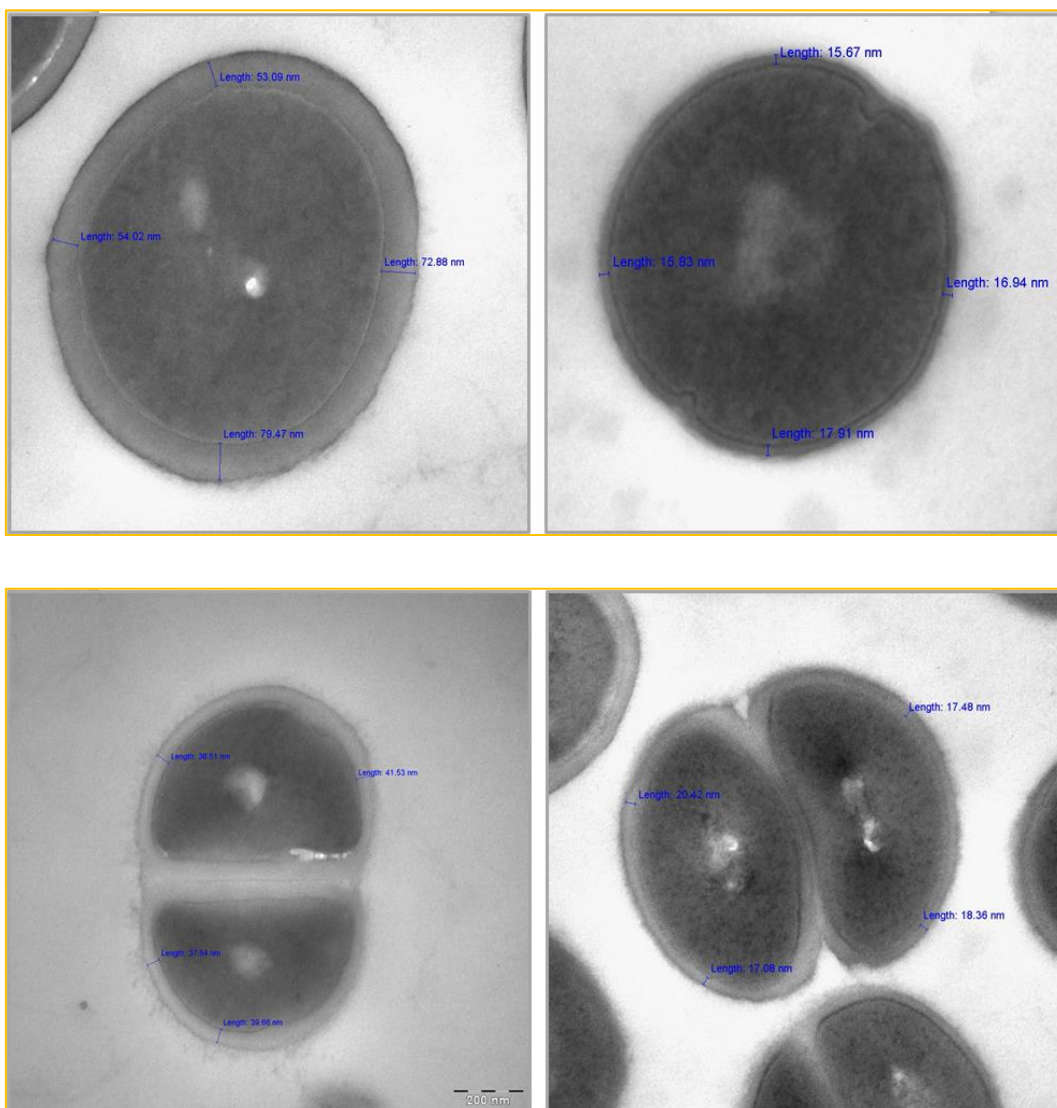


Figura IV.2. Fotografías de *S. aureus* obtenidas mediante microscopía electrónica en las que se mide el grosor de la pared celular.



IV.8 Análisis genotípico de *S. aureus* productores de bacteriemias

Los aislados de *S. aureus* fueron genotipados usando el *S. aureus* DNA microarray y reactivos de Clondiag (Staphylococcus aureus Genotyping Kit 2.0; Clondiag, Jena, Germany) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Este DNA microarray incluye 333 secuencias diana correspondientes a 170 genes y sus variantes alélicas, cubriendo marcadores de especies, marcadores de reconocimiento de secuencias SCCmec y tipos capsulares así como grupos *agr*, genes de resistencia, exotoxinas, genes MSCRAMM... (Rasmussen, Monecke, Ehricht, & Söderquist, 2013). Las dianas que cubre este microarray están definidas en el material suplementario (Anexo IX.3).

IV.8.1 Extracción del DNA genómico:

Tras descongelar las cepas y sembrarlas en placas de agar sangre (BD), se extrajo el DNA tras 24 h de crecimiento bacteriano usando un extractor de DNA y reactivos de Quiagen (Valencia, USA) y el dispositivo automático EZ1 (Qiagen).

Se realizó esta extracción mediante un lisado enzimático de las cepas resuspendiendo cada inóculo bacteriano en 200 μ L de solución de lisis (con lisozima, lisostafina y RNAsa). Tras reincubarse durante 45 min en agitación (300rpm) a 37°C se añadieron 10 μ L de proteinasa K y 100 μ L de buffer AL (DNeasy kit; QIAgen, Hilden, Germany) y se reincubaron 45 min a 56°C. Inmediatamente después, las muestras se procesaron por el extractor automático QIAgen EZ1 siguiendo el protocolo de lisis tisular del fabricante (Monecke et al., 2007). La concentración resultante de DNA se midió espectrofotométricamente a 260nm (NanoDrop 2000, Thermo Fisher Products Wilmington, DE USA).

IV.8.2 Amplificación del DNA:

Se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; *Polimerase chain reaction*) a los extractos resultantes de DNA libre de fragmentos de RNA añadiendo a 5 μ L de DNA 5 μ L de Master Mix (B1^{ST2} y B2) siguiendo el siguiente protocolo:

Precalentamiento a 105°C	
300 s a 96 °C	
50 (a 55) ciclos	60s, 96°C
	20s, 50°C
	40s, 72°C
Enfriamiento a 4°C	

Durante este proceso, se incorpora la biotina-16-dUTP a los amplicones.

IV.8.3 Hibridación en el microarray:

El proceso de hibridación se llevó a cabo añadiendo 10 µL del producto amplificado en los pocillos suministrados (Alere Technologies GmbH, Jena, Germany) (Figura IV.3) y reincubando a 55°C a 550rpm durante 50 minutos. Tras una serie de etapas de lavado en las que se eliminó el material genético sin hibridar, se añadió 100 µL de un conjugado (horseradish peroxidase-streptavidin) durante 15 min a 30°C y 550 rpm. Los puntos formados en la micromatriz se tiñeron añadiendo 100µL de TMB (tetrametilbenzimidaz): un colorante precipitante clave para la correspondiente lectura de los pocillos.



Figura IV.3. Matriz en la que se realiza el proceso de hibridación.



La lectura se realizó mediante un dispositivo (Alere Technologies GmbH, Jena, Germany) capaz de analizar las imágenes que forman los puntos visibles en las matrices procesadas (creando una imagen digital ampliada) e interpretar los patrones de cada micromatriz superponiendo una cuadrícula de coordenadas sobre las imágenes digital (Rasmussen et al., 2013, Monecke et al., 2006) (Figura IV.4). Para facilitar la interpretación computerizada de los datos, se crea un algoritmo basado en la medida de la transmisión de luz a través de los puntos con respecto a su entorno. Los puntos de corte para interpretar los resultados positivos o negativos se determinan en cada experimento basándose en la medida de los marcadores de control positivos.

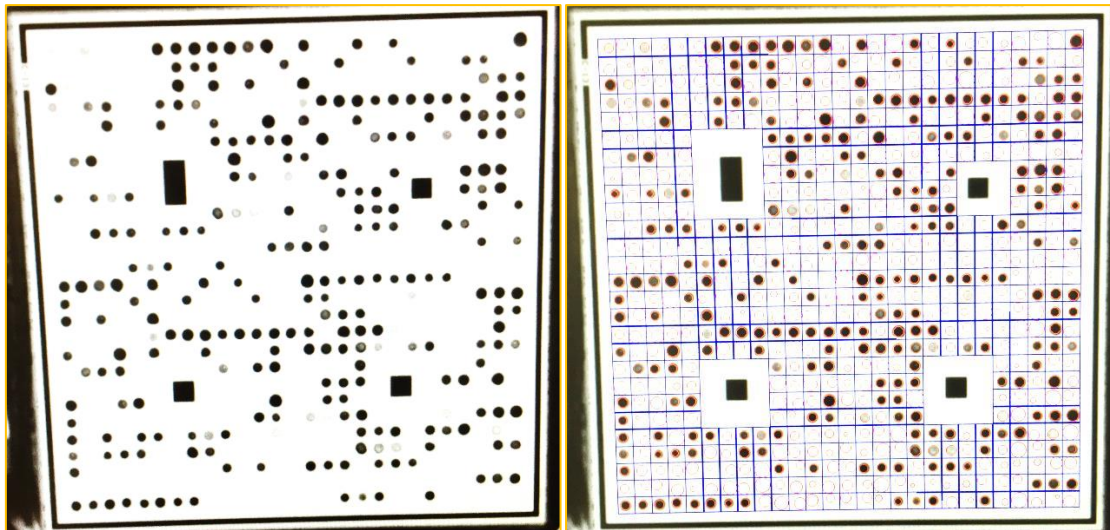


Figura IV.4. Imagen digitalizada y procesada de la micromatriz de hibridación.

IV.9 Análisis estadístico

Los datos se analizaron con el paquete estadístico SPSS (versión 20.0, Chicago, IL, USA). La normalidad de las distribuciones se contrastó mediante las pruebas Kolmogorov-Smirnov (K-S) y Shapiro-Wilk. La independencia de las variables categóricas se analizó mediante el contraste Chi cuadrado y el test exacto de Fisher, y la comparación de muestras independientes se llevó a cabo mediante la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. La asociación de dos variables continuas se analizó mediante el coeficiente de correlación de Spearman. Por último, para analizar los factores de riesgo para desarrollar bacteriemia complicada, se realizó un modelo de regresión logística

múltiple en el que se incluyeron todas las variables clínicas relevantes (con P valor <0.05) y los posibles factores de confusión que presentaron un valor de P <0.1 en el análisis univariado que se había realizado previamente. Un valor de P menor a 0.05 se consideró estadísticamente significativo en todos los casos.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN







V.1. Evaluación analítica del Etest para la determinación de la sensibilidad de *S. aureus* a vancomicina.

La técnica que se emplea para determinar las CMI de *S. aureus* a vancomicina en la mayoría de los laboratorios es el Etest. Se trata de un método de gradiente de concentración que combina el principio de difusión y dilución (Balouiri et al., 2016). El E-test permite la medición de valores de CMI intermedios (0.016, 0.023, 0.032, 0.047, 0.064, 0.094, 0.125, 0.19, 0.25, 0.38, 0.5, 0.75, 1.00, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 6.0, 8.0 $\mu\text{g/mL}$...) (Figura V.1) y no solo valores dobles (\log_2) como las técnicas de microdilución convencionales (0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0 y 32.0 $\mu\text{g/mL}$).



Figura V.1. Imagen de una tira de Etest de vancomicina en la que se determina la CMI de vancomicina para *S. aureus*.



Sin embargo, la reproducibilidad de los resultados del Etest y la varianza interobservador del ensayo no han sido analizados convenientemente. Dado el estrecho margen de las CMI para categorizar los aislados como de “alta sensibilidad” ($\leq 1 \mu\text{g/mL}$) o de “baja sensibilidad” ($\geq 1.5 \mu\text{g/mL}$) a vancomicina, el esclarecimiento de la precisión y reproducibilidad de este método es trascendente.

Este fue el objetivo del artículo I, en el que se analizó un total de 100 cepas de *S. aureus* (MSSA, $n=65$; MRSA, $n=35$) aisladas a partir de hemocultivos entre 2012 y 2015 en el HCU. La cepa control fue *S. aureus* ATCC 25923. Siguiendo las instrucciones del proveedor, los valores de CMI entre dos diluciones se redondearon a la CMI contigua con mayor valor. Se definieron como discrepancias mayores y menores las variaciones de CMI que resultaron o no en un cambio de categorización de sensibilidad ($\geq 1.5 \mu\text{g/mL}$ vs. $< 1.5 \mu\text{g/mL}$) respectivamente. Todas las cepas analizadas fueron sensibles a vancomicina. El valor CMI modal en conjunto a vancomicina fue de $1.5 \mu\text{g/mL}$, tal y como puede apreciarse en la Figura V.2. Ninguna cepa exhibió heterorresistencia a vancomicina.

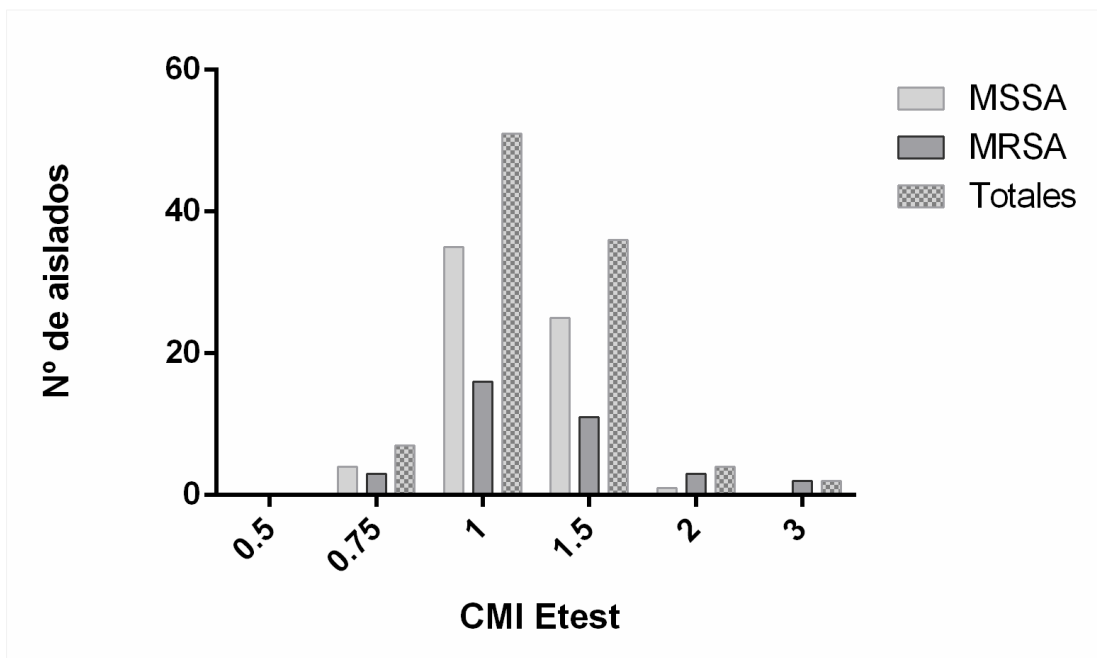


Figura V.2. Valores de CMI de vancomicina para *S. aureus* (MSSA, MRSA y todos) medidas por Etest.



V.1.1. Determinación de la varianza intra-ensayo del análisis.

Para evaluar la repetitividad del ensayo (varianza intra-ensayo), se analizaron 20 cepas por quintuplicado (10 MRSA y 10 MSSA). La desviación estándar fue de 0.023 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (± 1.03) (Figura V.3). No se observaron discrepancias mayores en la categorización de las 20 cepas.

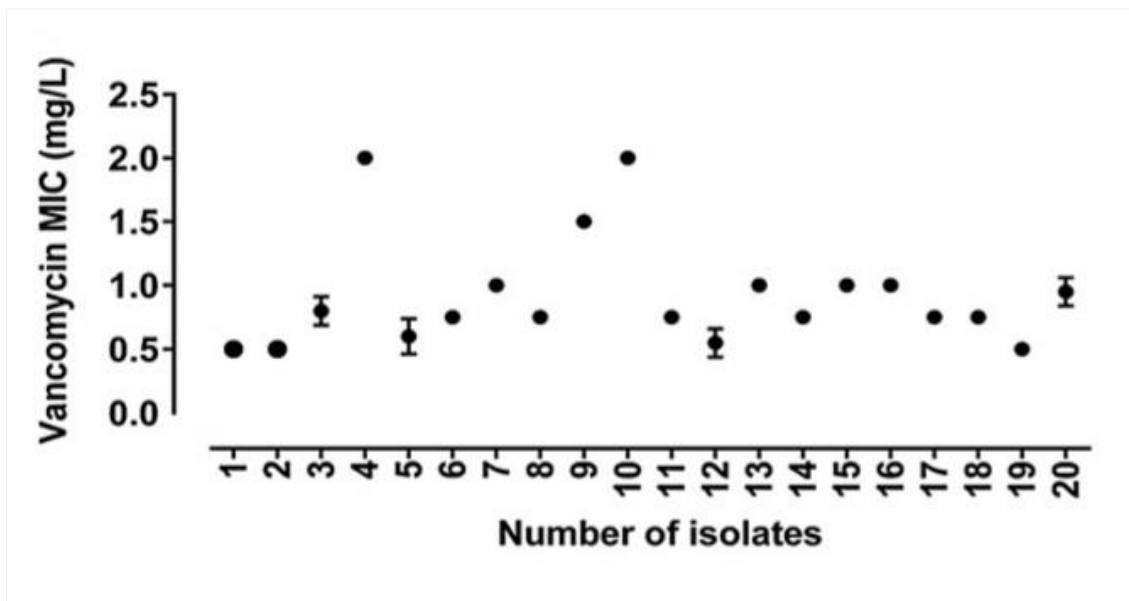


Figura V.3. Precisión del intra-ensayo determinada por la desviación estándar de los valores de CMI de vancomicina para *S. aureus* de 20 cepas (10 MRSA y 10 MSSA).

V.1.2. Determinación de la reproducibilidad de los resultados obtenidos por Etest.

Por un lado, se midió la reproducibilidad intra-ensayo alterando únicamente la variable de la lectura. Se analizó la concordancia inter-observador comparando los valores de las 100 medidas determinados por dos observadores distintos en ambos centros (HCU y HGU). La lectura de las placas no es automática y las realizaron dos personas calificadas por centro para evaluar la varianza inter-observador.

La media en cada centro fue comparable ($P > 0.5$), sin embargo, tal y como se representa en la Figura V.4., se observaron discrepancias mayores: 10 en el HCU



(correspondientes a 9MSSA y 1MRSA) y 11 en HGU (6 MRSA y 5 MSSA). El grado de concordancia en la categorización de las cepas (baja sensibilidad frente a alta) fue bueno en los dos centros ($\kappa=0.79$ en HCU y $\kappa=0.66$ en HGU).

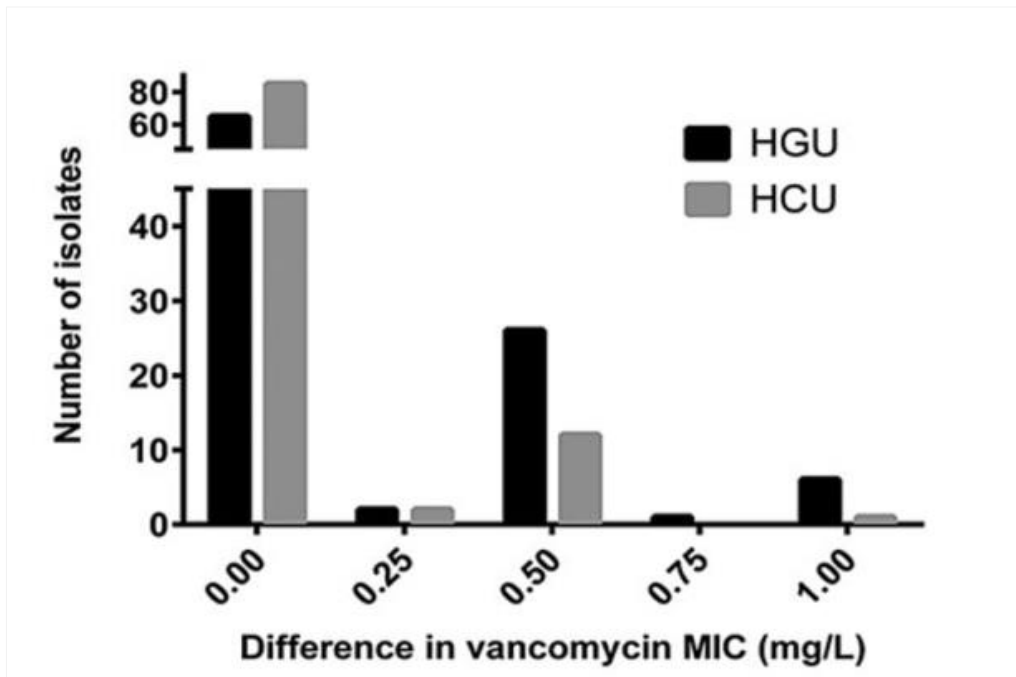


Figura V.4. Discrepancias en los valores de CMI de vancomicina para *S. aureus* determinadas por dos observadores en los dos centros (HGU y HCU).

Por otro lado, se estudió la reproducibilidad inter-centro realizando este procedimiento en el HCU y HGU en paralelo. Ésta resultó prácticamente nula, ya que la concordancia entre los valores medidos en los dos centros (utilizando como valor de CMI la media de los valores obtenidos por los 2 observadores) resultó ser muy baja ($\kappa=0.112$). Como se puede observar en la Figura V.5., los valores de CMI en el HCU (CMI media, 1.20 $\mu\text{g}/\text{mL}$; SD, 0.36) fueron significativamente menores ($P<0.0001$; t test) que los medidos en el HGU (CMI media, 1.67 $\mu\text{g}/\text{mL}$; SD, 0.44). En conjunto, la media de la diferencia entre los valores medidos en las dos instituciones fue de 0.468 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (95% IC 0.541–0.39) (Figura V.6). Se observaron 53 y 37 discrepancias mayores y menores, respectivamente (44 correspondientes a MSSA y 9 MRSA).

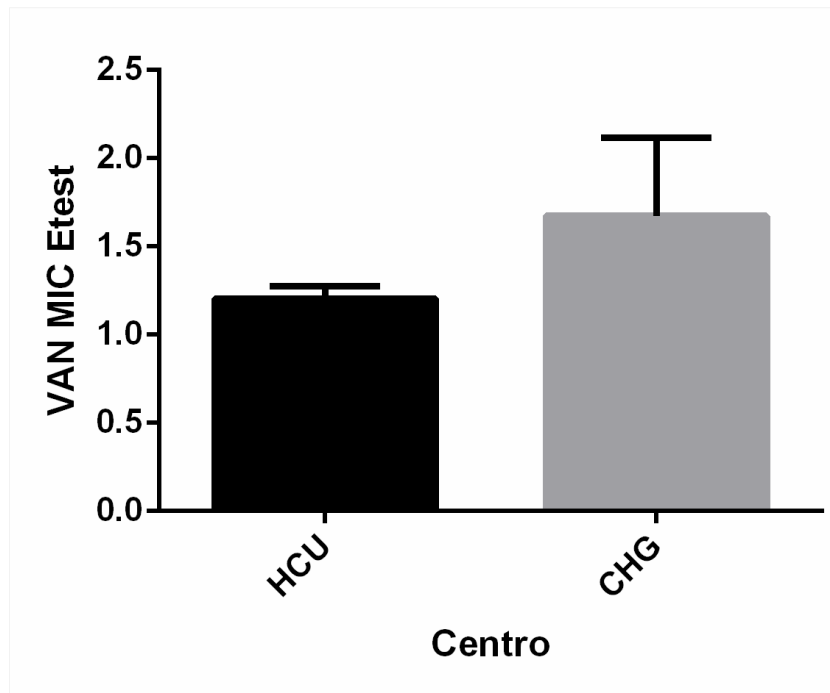


Figura V.5. Valores de CMI de vancomicina (VAN MIC) para *S. aureus* medidas por Etest en el HCU y HGU (media y desviación estándar).

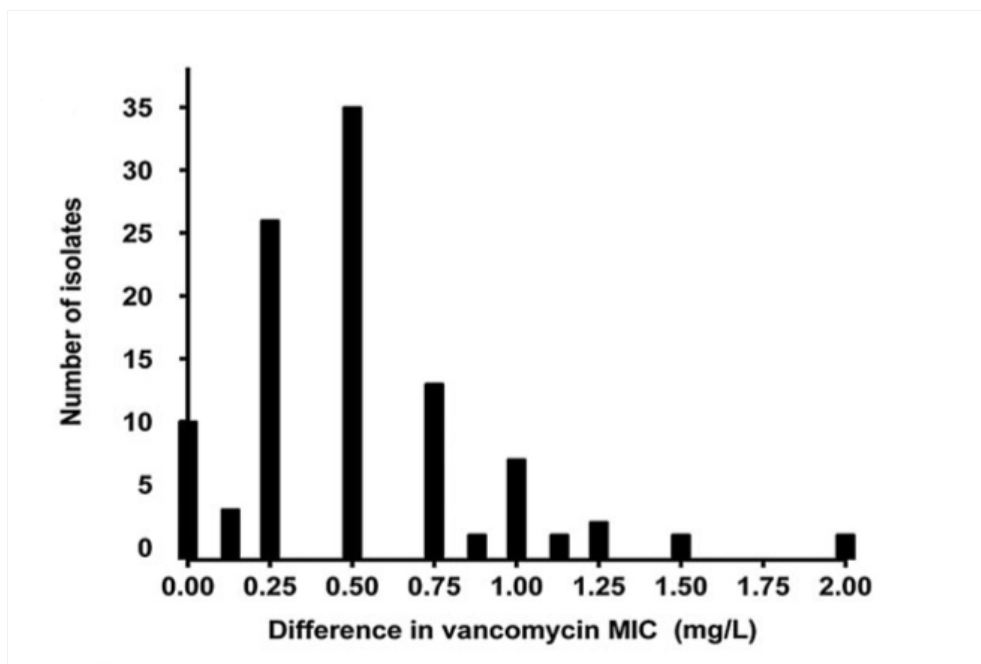


Figura V.6. Discrepancias en los valores de CMI obtenidas en los dos centros.



V.1.3. Evaluación del efecto de la congelación en la CMI de vancomicina para *S. aureus* determinada por Etest.

Las cepas incluidas en los estudios suelen congelarse y descongelarse repetidas veces, siendo ésta otra variable que puede afectar al valor de la CMI de vancomicina. En efecto, hay datos publicados que indican que la congelación de las cepas de *S. aureus* entre 6-12 meses resulta en una disminución de la CMI (Ludwig et al., 2012, Charlton et al., 2014, Edwards et al., 2011). En concordancia con esto, los valores de CMIs de los cultivos primarios (en el momento del aislamiento) fueron significativamente menores que los obtenidos en el momento del estudio ($P < 0.001$; t test) (Figura V.7).

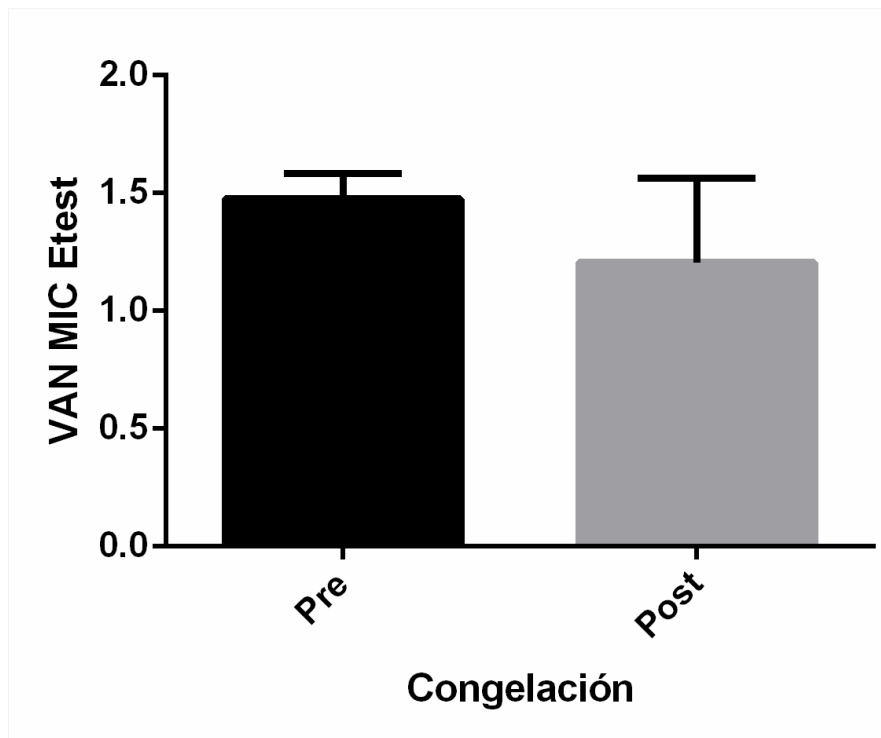


Figura V.7. Valores de CMI de vancomicina (VAN MIC Etest) de *S. aureus* medidas por Etest en los diferentes momentos del análisis (precongelación (“Pre”), y tras 6 meses de congelación (“Post”)) (media y desviación estándar).

Estas diferencias supusieron 40 discrepancias mayores (28 MSSA y 12 MRSA). Se observó que este efecto era más evidente cuanto mayor era el tiempo de congelación, observándose más diferencias en aislados que se preservaron durante 1 año que los

que se congelaron 6 meses. Estos resultados, sin embargo, no descartan necesariamente la asociación entre altos valores de CMI y mala evolución de la enfermedad invasiva.

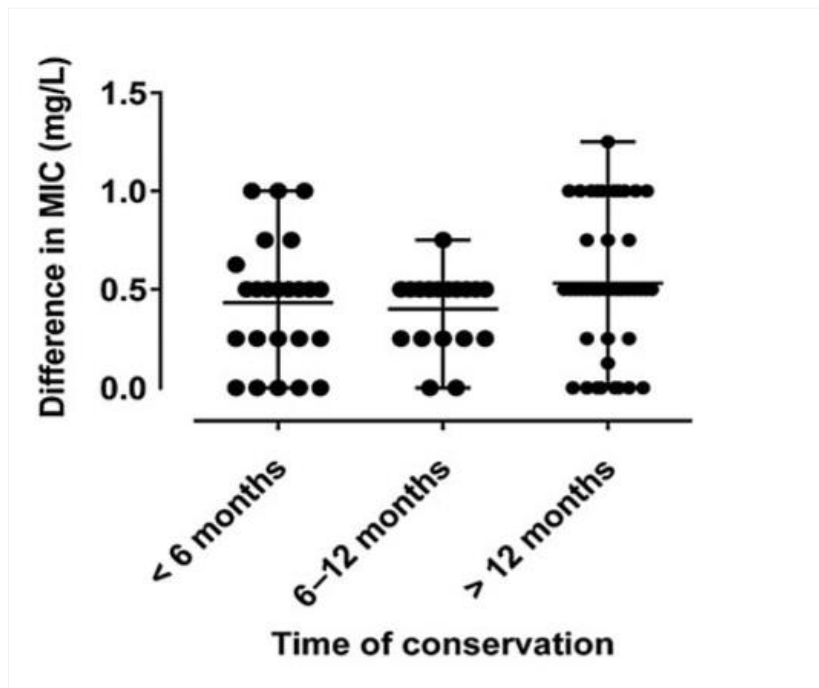


Figura V.8. Diferencias de los valores de CMI medidos en el momento del aislamiento de *S. aureus* vs los valores obtenidos en los subcultivos primarios en el HCU (media de los valores determinados por dos observadores).

Los valores de los subcultivos fueron significativamente menores ($P < .001$; t test). Este efecto se pudo evidenciar a los 6 meses, aunque se incrementa cuanto mayor es el tiempo de congelación (Figura V.8).



V.2. Desarrollo de un método robusto de microdilución para la determinación de la CMI de vancomicina para *S. aureus* que incluya un gradiente cuasi continuo de concentraciones del antimicrobiano.

La técnica que se emplea para medir las CMIs en la mayoría de los estudios que analizan la relación de CMI de vancomicina y evolución de las SAB es el Etest, entre otras cosas porque los métodos de microdilución únicamente incluyen diluciones dobles del antimicrobiano (0.5, 1, 2, 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$...), mientras que el Etest proporciona CMIs adicionales, clave para la correcta categorización de los aislados de *S. aureus* como “baja sensibilidad” o “elevada sensibilidad”. Sin embargo, esto supone la posibilidad de una categorización errónea de los aislados. Además, los valores que se obtienen por esta técnica se correlacionan muy poco con los obtenidos por el método recomendado por los organismos internacionales (microdilución), tendiendo a ser 0,5-1,5 \log_2 mayores (Van Hal et al., 2012a, Prakash et al., 2008, Sader et al., 2009).

Por ese motivo, el desarrollo de un método reproducible de microdilución (BMD) que incluya diluciones inter \log_2 del antimicrobiano en el límite de los valores de sensibilidad constituiría una herramienta clave para clarificar el impacto de la CMI de vancomicina en la evolución de las bacteriemias por *S. aureus*. En el artículo III presentamos el desarrollo de una técnica de microdilución que incorpora concentraciones crecientes de vancomicina tales como 0.50, 0.62, 0.75, 0.87, 1.0, 1.25, 1.40, 1.50, 1.60, 1.75 y 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

V.2.1. Determinación de la precisión y robustez del método desarrollado

a) Evaluación de la precisión intra-ensayo:

Los 50 aislados se estudiaron por cuadruplicado testándose 2 cepas por cada placa de 8 filas. El coeficiente de variación (CV) de cada aislado se calculó dividiendo la desviación estándar (SD) de las cuatro medidas de cada aislado entre la media de



las cuatro medidas y multiplicando por 100. El CV fue 22.4% y 20.9% en los ensayos 1 y 2, respectivamente, siendo la desviación estándar de 0.15 µg/mL en ambos ensayos.

b) Evaluación de la precisión inter-ensayo:

Se repitió el ensayo 6 horas más tarde para estudiar la variación inter-ensayo. La media de las diferencias de los valores de CMI entre los 2 ensayos de todos los aislados fue 0.04 µg/mL (95% CI, 0.011–0.07 µg/mL) y la desviación estándar de las diferencias fue 0.119 µg/mL. De hecho, los valores de CMI difirieron menos de 0.1 µg/mL para la mayoría de aislados (n = 36), y no más de 0.5 µg/mL entre todos los aislados, por lo que la precisión de éste método excede la aceptada (± 1 dilución \log_2). El valor modal de la CMI fue 0.75 µg/mL en los dos ensayos, y la media fue 0.70 µg/mL [95% CI, 0.65–0.74 µg/mL] y 0.74 µg/mL (95% CI, 0.70–0.79 µg/ mL), respectivamente (Figura V.9)

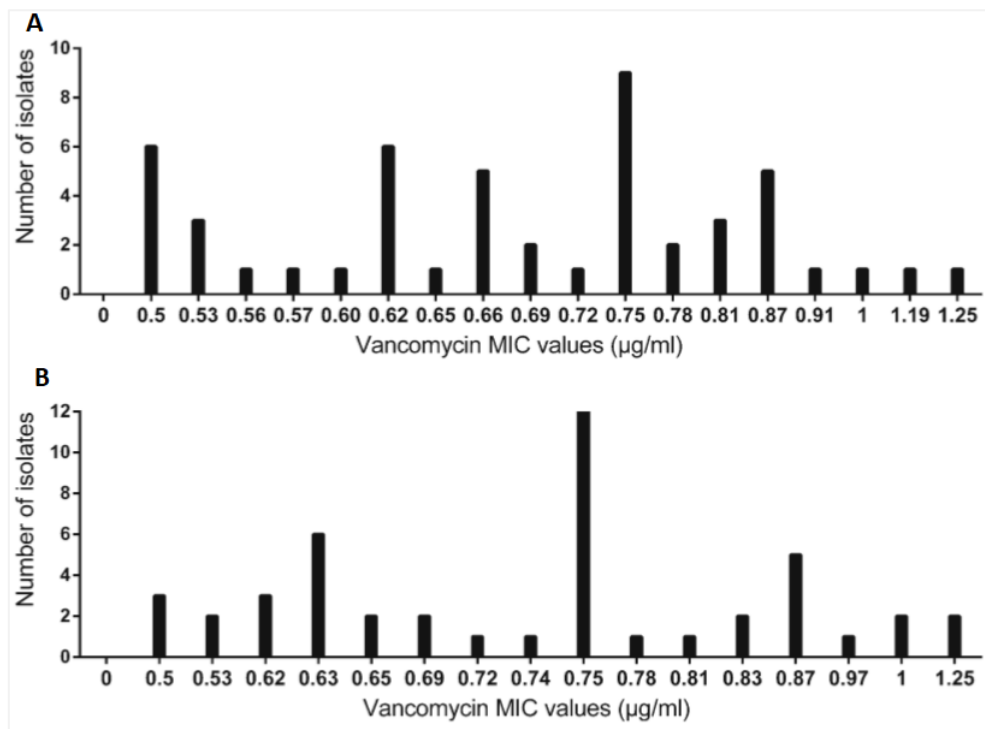


Figura V.9. Distribución de los valores de CMI de vancomicina (µg/ml) de los aislados de *S. aureus* (n=50) en el primer experimento (A) y en el segundo (B). Los valores que se muestran de CMI corresponden a la media de los cuatro valores obtenidos de cada aislado.



- c) Para estimar la reproducibilidad inter-centro del ensayo, 10 aislados (5 MSSA y 5 MRSA) se testaron por quintuplicado en paralelo (mismo subcultivo de *S. aureus* en el mismo día) en el Servicio de Microbiología del HCU y en el servicio de Microbiología del Hospital San Francisco de Borja (HSFB). Los coeficientes de variación inter-ensayo e inter-centro se calcularon utilizando la media de la SD dividida entra la media total del duplicado de todas muestras (ensayo 1 y ensayo 2, y ensayo en HCU y HSFB), y multiplicándola por 100.

La media de las diferencias de los valores de CMI de los 10 aislados entre los dos experimentos realizados en paralelo en los dos centros (HCU and HSFB) fue 0.04 µg/mL (95% CI, 0–0.08 µg/mL), y la desviación estándar de las diferencias fue 0.12 µg/mL.

V.2.2. Comparación del método desarrollado de BMD con el Etest

Una posible explicación para la mala correlación de ambas técnicas es el efecto del factor inóculo, ya que difiere en ambas.

Para estudiar el impacto de éste, un total de 17 *S. aureus* (MSSA, n = 8 and MRSA, n = 9) fueron testados por Etest al mismo tiempo que se realizaba el BMD casero (con escala de concentraciones cuasi-continua), utilizando tres inóculos distintos (1×10^8 CFU/mL (0.5 McFarland), 1×10^7 CFU/mL, y 1×10^6 CFU/mL). Las placas fueron leídas visualmente por dos observadores tras 24 horas de incubación a 35°C.

La media de los valores de CMI obtenidos por Etest con inóculo 0.5 McFarland (1.13 µg/mL; 95% CI, 0.98–1.29 µg/mL) fue significativamente mayor ($P \leq 0.001$) que la medida por BMD (0.75 µg/mL; 95% CI, 0.70–0.79 µg/mL), y la correlación entre los dos métodos fue muy baja (Rho, 0.319; $P = 0.148$). Sin embargo, la media de los valores de CMI obtenidos por Etest con inóculos menores (0.77 y 0.74 µg/mL para 10^7 o 10^6 CFU/mL, respectivamente), y los medidos por Etest sí que fue comparable y con una correlación significativa ($P = 0.004$ para 10^7 CFU/mL y $P = 0.029$ para 10^6 CFU/mL) (Figura V.10).

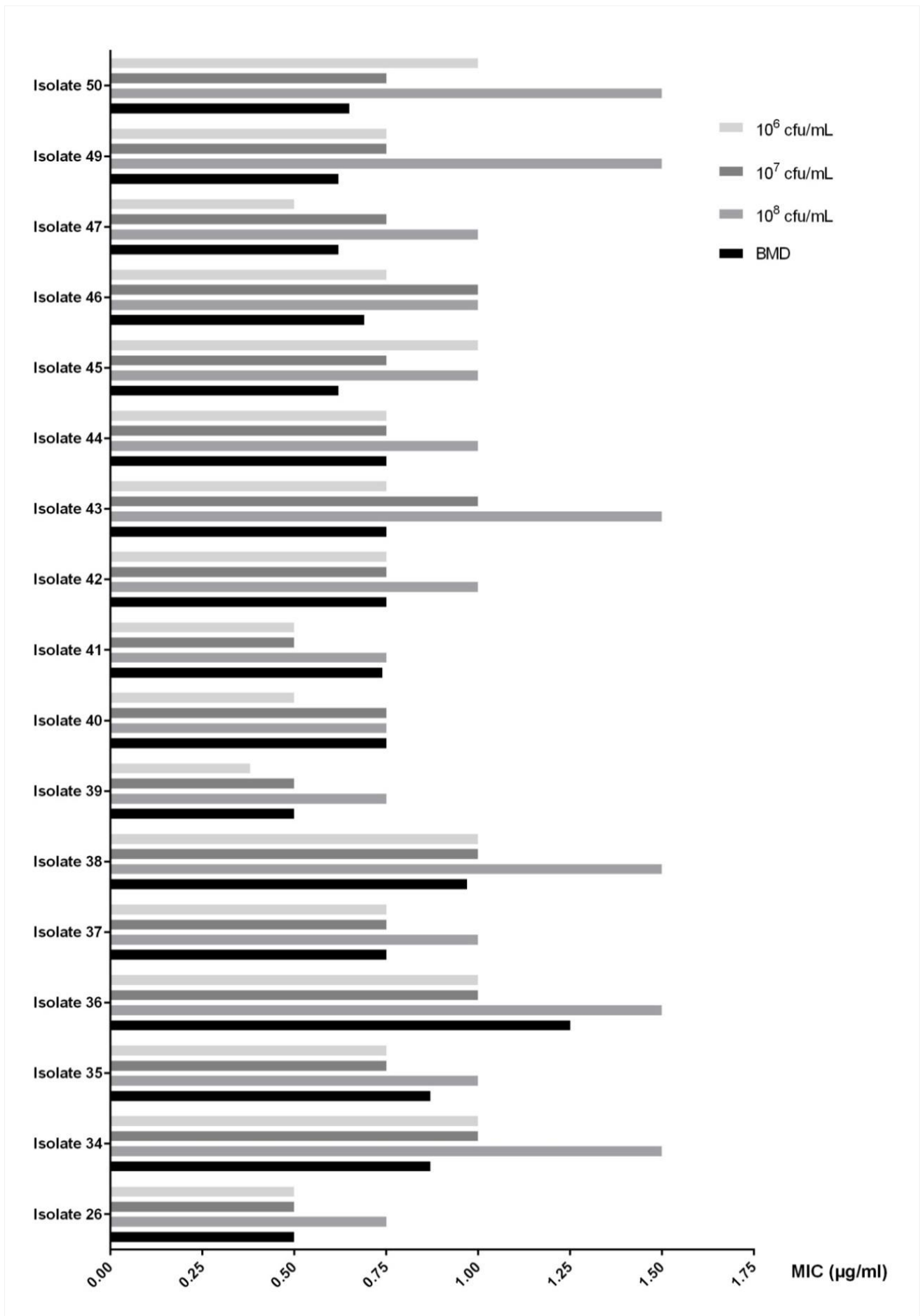




Figura V.10. Valores de CMI medidos por BMD y Etest (empleando 3 inóculos distintos). Los valores de CMI de BMD se corresponden a la media de los 4 replicados testados de cada aislado.

Se analizó la precisión del Etest repitiendo el ensayo por duplicado, y se observó que el CV decrecía paralelamente al inóculo bacteriano: la media de la diferencia entre los dos experimentos fue 0.133 $\mu\text{g/mL}$ (95% CI, -0.061 - 0.168 $\mu\text{g/mL}$) cuando se usó un inóculo estándar, 0.057 $\mu\text{g/mL}$ (95% CI, -0.051 - 0.167 $\mu\text{g/mL}$) para un inóculo de 1×10^7 , y 0.034 $\mu\text{g/mL}$ (95% CI, -0.006 - 0.075 $\mu\text{g/mL}$) para 1×10^6 .

La obtención de CMIs más altas cuando se emplea Etest con respecto al BMD puede deberse al alto inóculo que se usa (Charlton et al., 2014), y de hecho, así lo comprobamos, pudiéndose equiparar los valores de ambos métodos utilizando inóculos menores en el Etest. Además se mejoró también la precisión del Etest disminuyendo el inóculo. Esto parece de especial relevancia para futuros estudios ya que los métodos de microdilución no son muy útiles para detectar subpoblaciones de *S.aureus* que desarrollan ligera resistencia a vancomicina (por ejemplo hVISA).

V.2.3. Estudio del efecto de congelación en la reproducibilidad del ensayo

La repercusión de la congelación en el fitness de la bacteria se ha estudiado ya cuando se emplea la técnica del Etest, pero resulta interesante investigar también cómo afecta en la técnica de microdilución. Para ello, 15 aislados de *S. aureus* (MSSA, n = 9 y MRSA, n = 6) fueron criopreservados de 1 a 3 meses, y se descongelaron para trabajarse por cuadruplicado. La media de las CMIs antes de la congelación, tras un mes y a los 3 meses, fue 0.62 $\mu\text{g/mL}$ ($P = 0.569$ y $P = 0.924$ en las diferencias entre las CMIs antes de la congelación y un mes, y antes de la congelación y 3 meses, respectivamente) (Figura V.11), por lo que parece que el efecto de la congelación cuando se emplea BMD es inexistente.

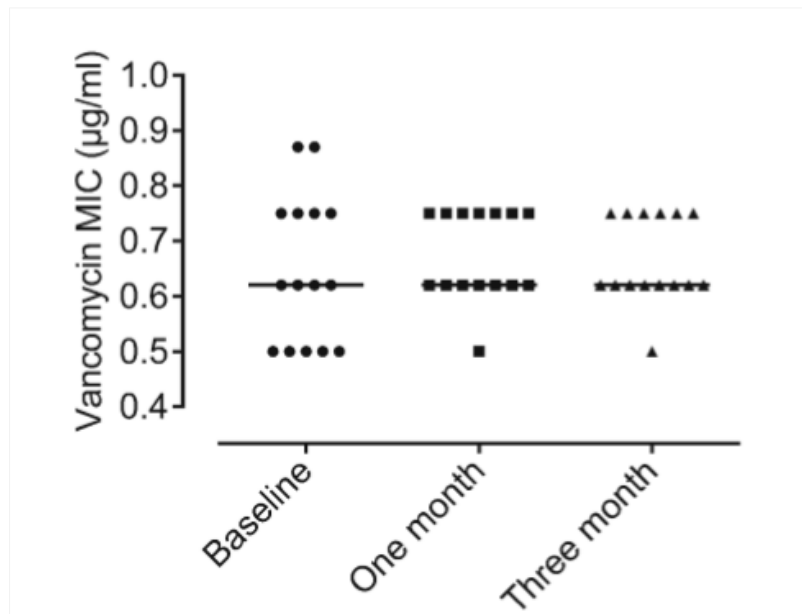


Figura V.11. Efecto de la congelación en los valores de la CMI de vancomicina para *S.aureus*. Se muestran los valores de la CMI de vancomicina medidas en el momento del aislamiento, tras 1 mes y tras 3 meses de congelación a -20°C . El valor de la CMI que se muestra es la media de los cuatro valores determinados para cada aislado.

Por otro lado, se evaluó el posible efecto de la criopreservación en la acción del antimicrobiano. Si en efecto ésta no repercutiera, nos permitiría llevar a cabo un estudio prospectivo multicéntrico para evaluar el impacto clínico de la CMI de una forma más robusta. Considerando que un tiempo válido para ello sería de 1-3 meses, evaluamos el efecto de la congelación a -20°C durante este tiempo.

Para ello, 34 cepas de *S. aureus* fueron testados por cuadruplicado tras la congelación de los paneles (criopreservados a -20°C durante 1-3 meses), observándose CV comparables intra e inter-ensayo (21.9% y 22.1%), respectivamente, cuando se utilizaron placas congeladas. Los valores de CMI medidos con las placas congeladas (media $0.74\ \mu\text{g}/\text{mL}$; 95% CI, $0.68-0.79\ \mu\text{g}/\text{mL}$) fue similar al medido entre los dos ensayos, por lo que el almacenamiento a -20°C hasta 3 meses demostró no tener impacto en los valores de CMI.



Hasta la fecha, se han realizado tres meta-análisis que estudian la implicación clínica de “altas CMIs” (Van Hal et al., 2012a, Jacob and DiazGranados, 2013, Kalil et al., 2014), con resultados discordantes. Esto puede deberse a que comparan estudios que utilizan distintas técnicas para evaluar las CMIs, las cuales, además de no ser comparables, determinan distintas concentraciones (es decir, miden distintos valores de CMI).

De hecho, los puntos de corte que el CLSI establece para definir “alta CMI” y “baja CMI” varían en función la técnica que se utilice (Tabla V.1): para BMD, se consideran “baja CMI” valores de <1.0 mg/L; MIC ≥ 2.0 mg/L se corresponden a “alta CMI”, y para Etest CMI <1.5 mg/L pertenecen al grupo de “baja CMI”; CMI ≥ 1.5 mg/L al de “alta CMI” (Kalil et al., 2014).

Tabla V.1: Valores definidos por el CLSI de CMI de vancomicina para categorizar a los aislados de *S. aureus* en función de las distintas técnicas para determinarla.

	“baja CMI”	“alta CMI”
BMD	<1.0 mg/L	≥ 2.0 mg/L
Etest	<1.5 mg/L	≥ 1.5 mg/L

Algunos autores ya han desarrollado métodos de microdilución con concentraciones intermedias equivalentes a las del Etest, pero también obtienen resultados discordantes. El primer estudio que desarrolló un método de microdilución con concentraciones intermedias fue el llevado a cabo por (Shoji et al., 2015), en el que midiendo intervalos de CMIs de 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ encuentran la CMI de MRSA ≥ 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ como factor pronóstico de complicaciones en MRSAB. (Hos et al., 2017), sin embargo, estudiando las mismas concentraciones que el Etest pero por BMD no encuentran esta relación (aunque sí con comorbilidades del paciente), lo que apunta a que las decisiones del clínico no deben apoyarse tanto en el valor de la CMI medida cuanto en la respuesta clínica del paciente.

La discrepancia entre estos resultados puede deberse a que ambos métodos no son comparables, es decir, la correlación entre los valores de CMI que se obtienen



mediante estas dos técnicas es muy pobre (Rojas et al., 2012, Phillips et al., 2016), aunque sí hay estudios que encuentran concordancia entre los resultados obtenidos por Etest y BMD (Khatib et al., 2013, Berghaus et al., 2015, Baker et al., 1991, Gupta et al., 2015, Swenson et al., 2009).

Al compararse el método del Etest tanto con sistemas automatizados (BDPhoenix, Vitek 2, y Microscan) (Chen et al., 2013, Kruzel et al., 2011, Muñoz-Cobo et al., 2011), como con técnicas de dilución en agar (Prakash et al., 2008), e incluso con técnicas de microdilución caseras que miden concentraciones comparables (Kruzel et al., 2011, Mason et al., 2009, Khatib et al., 2013, Sader et al., 2009), los resultados que se obtienen indican que el Etest sobreestima las CMI (Sader et al., 2009, Kruzel et al., 2011, Hsu et al., 2008), siendo los valores que se obtienen por esta técnica 0.5-1 log₂ diluciones mayores que por BMD (Van Hal et al., 2012a, Prakash et al., 2008, Sader et al., 2009, Keel et al., 2010, Muñoz-Cobo et al., 2011, Van Hal and Fowler Jr, 2013). De hecho, (Sader et al., 2009) estudian 36 concentraciones de vancomicina entre 64 y 0.06g/ml (64, 32, 16, 8, 4, 3, 2.5, 2, 1.875, 1.75, 1.625, 1.5, 1.375, 1.25, 1.125, 1, 0.938, 0.875, 0.813, 0.75, 0.688, 0.625, 0.563, 0.5, 0.469, 0.438, 0.406, 0.375, 0.344, 0.313, 0.281, 0.25, 0.188, 0.12, 0.094 y 0.06 µg/mL) en 1800 aislados de MRSA, hallando las CMIs obtenidas por el Etest 0.5 a 1.5 diluciones log₂ mayores que las obtenidas por BMD. Esta variación conlleva a diferencias en la categorización de las cepas como “alta CMI” o “baja CMI”, dentro del rango de sensibilidad (Chen et al., 2013), por lo que los datos de CMI que manejan los clínicos deberían de obtenerse por métodos más precisos y reproducibles que el Etest.

Además, hay que tener en cuenta que las variables que afectan a la reproducibilidad de los estudios, aunque todos empleen técnicas de microdilución, son múltiples (Tabla V.2).



Tabla V.2: Variables que intervienen en la técnica de microdilución:

Fuente	Variable
Placa de 96 pocillos de BMD	Tipo de pocillos (base de U vs V)
	Composición del plástico
	Método de esterilización
	Composición del CA-MHB
	Potencia del fármaco
Microorganismo	Nº de subcultivos
	Condiciones de almacenamiento
	Edad de la bacteria
	Nº de colonias
	Fase de crecimiento
	Método de estandarización del inóculo
	Inoculación del panel
Condiciones de incubación	Tiempo
	Atmósfera
	Temperatura
	Humedad
Método de lectura	Espejo
	Luz
	Observador

Tabla copiada de (Charlton et al., 2014).

Nuestros resultados indican que el efecto de la congelación en el método de microdilución desarrollado, tanto en el fitness de la bacteria como en el efecto del antibiótico (los valores de CMI medidos utilizando placas congeladas fueron comparables a las no-congeladas), es despreciable.

Resulta interesante por ello para futuros estudios, ya que incluso utilizando el mismo método de microdilución, hay variables que afectan a la reproducibilidad del ensayo como la potencia de la vancomicina utilizada o la casa comercial que suministra el CA-



MHB (Swenson et al., 2009, Charlton et al., 2014). Una forma de disminuir estos sesgos es preparar las placas usando los mismos lotes de reactivos y ser congeladas para su posterior uso cuando convenga a la investigación.

Hay que destacar que la mayoría de los estudios analizan aislados resistentes a meticilina, pero esto no debería ser un sesgo ya que tal y como hemos analizado nosotros y otros autores previamente, la resistencia a meticilina no conlleva diferencias en el comportamiento de *S. aureus* frente a vancomicina (Keel et al., 2010, Wang et al., 2006).

En conclusión, la categorización como “sensible” o “resistente” a vancomicina no parece ser suficiente para llevar a cabo un correcto manejo del paciente con bacteriemia por *S. aureus* (Sader et al., 2009) dada la aparente repercusión de la correcta categorización de las cepas de *S. aureus* como “baja o alta sensibilidad” a vancomicina por su posible impacto en la evolución de la enfermedad, por lo que la determinación de una CMI precisa por parte del laboratorio es un factor clave para orientar al clínico hacia la decisión más acertada. Por ello, hemos desarrollado un método válido de microdilución (técnica recomendada por los organismos internacionales) que sea capaz de medir concentraciones próximas al límite de sensibilidad e incorpore concentraciones crecientes de vancomicina dentro del rango de sensibilidad; no sólo entre las diluciones convencionales de \log_2 , sino también entre la escala del Etest, cuya precisión y repetitividad excede la aceptada para los métodos de dilución de referencia ($\pm 1 \log_2$). De hecho, los valores de CMI medidos entre los distintos experimentos y entre los distintos centros difieren menos de $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ en la mayoría de los aislados y menos de $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ para todos ellos. Por ello resulta una herramienta útil para medir con precisión y poder llegar a predecir el impacto clínico de la CMI de vancomicina, aunque éste requiera una validación inter-centro más exhaustiva.



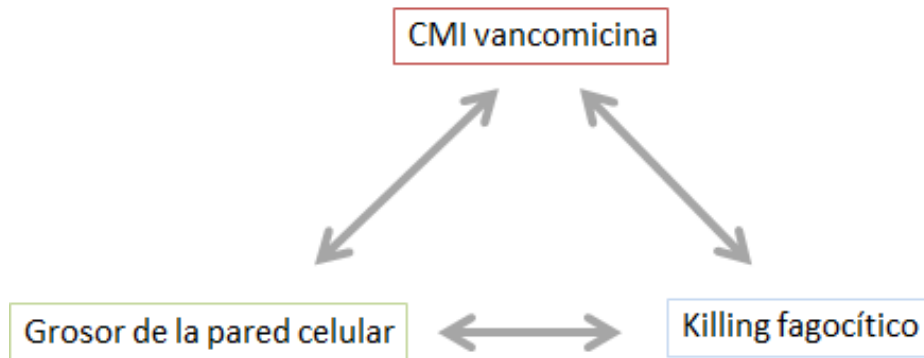
V.3. Determinar si existe algún rasgo fenotípico/genotípico vinculado a las cepas de *S. aureus* con concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) a vancomicina en el límite alto de sensibilidad medidas por Etest (CMI \geq 1,5 μ g/mL).

El esclarecimiento del verdadero impacto de los valores de CMI de vancomicina para *S. aureus* en la evolución de las bacteriemias es de relevancia, dado que puede influir en el manejo terapéutico de esta entidad clínica.

Las cepas de *S. aureus* que presentan valores de CMI a vancomicina en el límite de la sensibilidad ($\geq 1.5 \mu\text{g/mL}$), medidos por el método del Etest, se han asociado con mayores tasas de morbimortalidad que los que están causadas por cepas más sensibles ($\text{MIC} \leq 1 \mu\text{g/mL}$) (Soriano et al., 2008, Holmes et al., 2011, Aguado et al., 2011, Aguado et al., 2012, Cervera et al., 2014, Bouiller et al., 2018, San-Juan et al., 2017a), aunque esta afirmación ha sido contradicha (Rojas et al., 2012, López-Cortés et al., 2015).

De esta forma, la CMI de vancomicina para *S. aureus* en el límite alto de la sensibilidad ($\geq 1.5 \mu\text{g/mL}$), medida por Etest, podría reflejar una ventaja fenotípica en términos de virulencia, previsiblemente relacionado con estrategias de supervivencia de la bacteria como la evasión del sistema inmune (en concreto a la lisis bacteriana (“killing”) por parte de los fagocíticos); de hecho, hay estudios que afirman que los aislados hVISA son más resistentes a la opsonofagocitosis y a la lisis fagocítica que los VSSA, al menos bajo ciertas condiciones (Méhes et al., 2012), en relación con cambios estructurales tales como el aumento del grosor de la pared celular que le llevan también a desarrollar resistencias antibióticas.

Por ello, estudiamos la posibilidad de que altas CMIs de vancomicina dentro del límite de la sensibilidad en bacteriemias causadas por *S. aureus* se asocien con un incremento del grosor de la pared celular y una internalización o killing subóptimo por parte de los fagocitos humanos.



V.3.1 Estudio de la CMI de vancomicina como marcador subrogado de resistencia a la lisis por fagocitos.

En primer lugar, analizamos la eficacia con la que los neutrófilos humanos lisaban a las distintas cepas de *S. aureus* incluidas en el estudio.

Para ello, desarrollamos un ensayo in vitro con sangre total basándonos en un modelo diseñado para determinar el índice de killing (%) (KI; *Killing index*) para *Candida albicans* (Murciano et al., 2008) y adaptándolo para *S. aureus*, tal y como se ha descrito previamente. Los aislados difieren en su susceptibilidad a la lisis de los fagocitos en la sangre total, muchos de ellos siendo eliminados eficazmente. Todos los aislados crecieron también en las muestras de plasma, demostrando su resistencia frente a la acción del complemento (Lee et al., 2004). Clasificamos la sensibilidad de las bacterias a la lisis fagocítica en dos grupos, catalogando a los aislados que se lisan eficazmente en el grupo de killing alto (>70%), y a los que presentan un killing subóptimo en el grupo de killing bajo (<70%). Dentro de este grupo diferenciamos también entre los que presentan un killing apenas imperceptible (<30%) y los que presentan un killing intermedio (>30 y <70). Como se muestra en la Figura V.12, la mayoría de las cepas (n= 61) se lisaron tan eficazmente como el control (KI >70%). Las cepas restantes (n=34) se categorizaron en el grupo de killing bajo (KI <70%). El rango resultó ser de 91.84 (mínimo= 3.77 y máximo= 95.61).

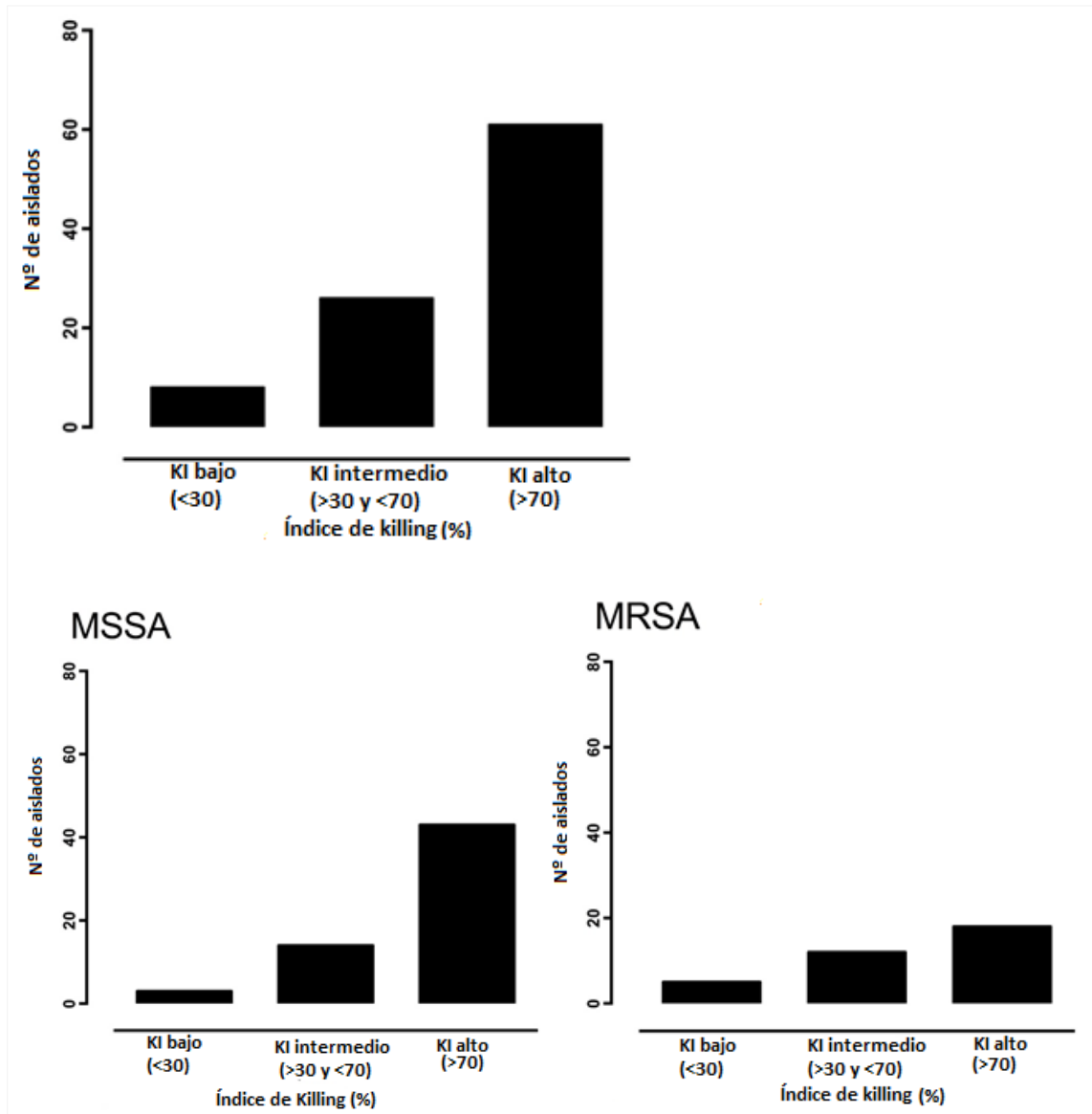


Figura V.12. Distribución de los aislados de *S. aureus* en los diferentes grupos de killing (categorizados en KI bajo (< 30%), KI intermedio ($\leq 30\%$ y $> 70\%$), y KI alto ($\geq 70\%$)).

Una vez categorizadas en función del killing, investigamos la medida en que este parámetro se relaciona con la CMI de vancomicina. Este experimento lo realizamos dos veces (artículo II y artículo IV), dado que en el momento del primer análisis no disponíamos de un método preciso de microdilución para determinar la CMI de



vancomicina, por lo que el experimento se realizó empleando la técnica del Etest, con las consiguientes limitaciones. Posteriormente, en el artículo IV, una vez desarrollado y validado el método casero de BMD, se modificaron ciertas variables del estudio como el método de detección de CMI y el número de muestras, estudiándose un total de 148 aislados de *S. aureus* (MSSA n= 113; MRSA n= 35).

Para el análisis de la CMI se excluyeron las cepas que presentaban un KI de 60%-70% con el fin de minimizar el impacto de la variación intra-ensayo (<10%) en la categorización de los aislados.

Todos los aislados resultaron sensibles a vancomicina ($\leq 2 \mu\text{g/mL}$), y ninguno fue categorizado como hVISA. Los valores modales de los aislados MRSA coincidieron con los de MSSA ($0.63 \mu\text{g/mL}$ por BMD y $1.00 \mu\text{g/mL}$ por Etest). Los valores mínimos que se obtuvieron fueron $0.5 \mu\text{g/mL}$ por ambos métodos, y los valores máximos $1.25 \mu\text{g/mL}$ por BMD y $1.5 \mu\text{g/mL}$ por Etest. Se observó una correlación muy pobre ($\rho=0.291$) entre los valores obtenidos por ambos métodos. Tal y como se observa en la Figura V.13., no se encontró ninguna correlación significativa independientemente del método analizado ($P=0.79$ para BMD y $P=0.09$ para Etest).

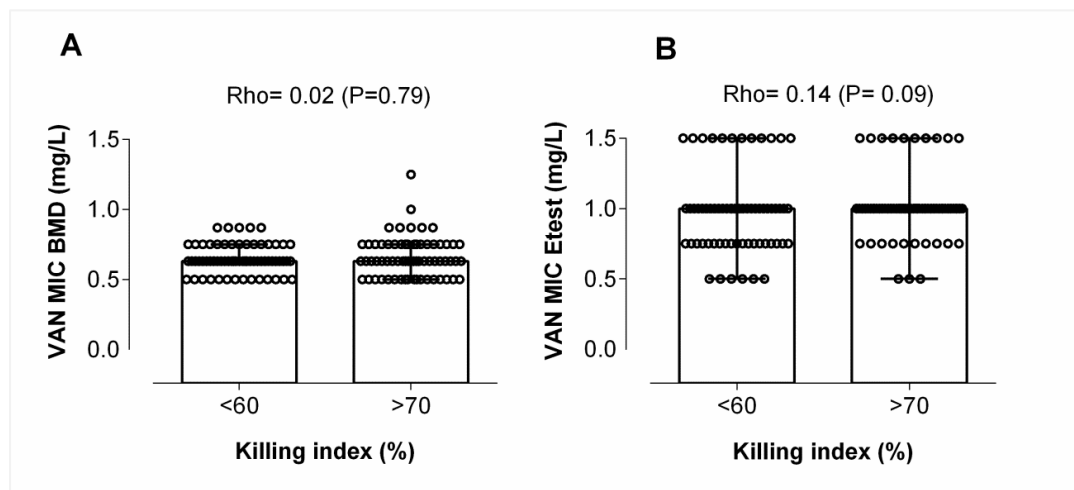
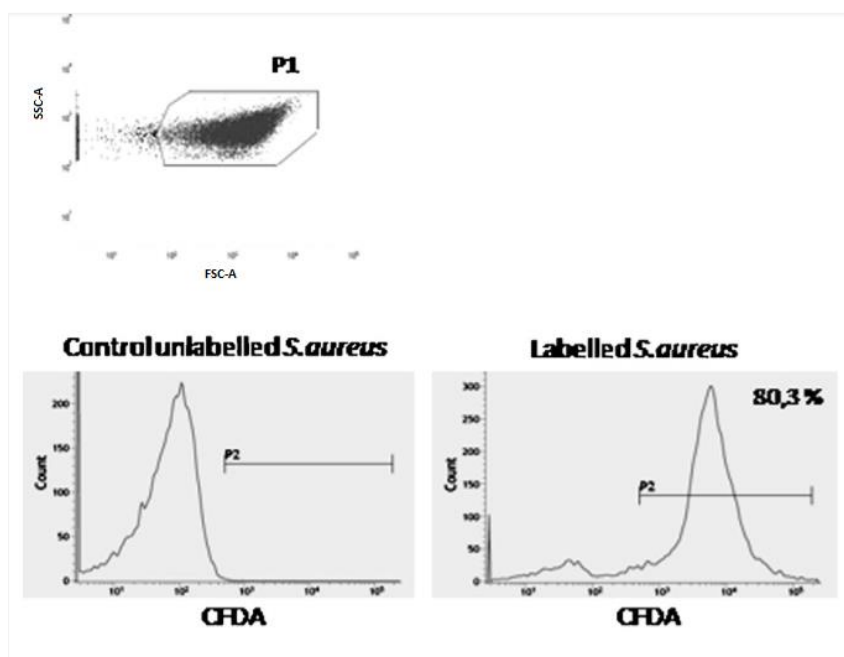


Figura V.13. Valores de la CMI de vancomicina tanto por el método de BMD (media= 0.65; mediana=0.63 para <60 y media= 0.66 y mediana= 0.63 para >70) (A) y por Etest (media= 0.97; mediana=1.0 para <60 y media= 1.02 y mediana= 1 para >70) (B) en función de la resistencia que presentan a la fagocitosis mediada por neutrófilos medida en KI.



V.3.2 Estudio de la internalización de *S. aureus* en el proceso de fagocitosis.

Como hemos explicado en el apartado I.1.2 de la Introducción, el proceso de lisis bacteriana está precedido por el reconocimiento del microorganismo por parte de los neutrófilos. Para averiguar si las diferencias observadas en el KI entre las cepas se debía a la variación en el proceso de lisis, estudiamos también la internalización de los aislados de *S. aureus* por los fagocitos humanos midiendo la eficiencia con la que los aislados en ambos grupos de killing son internalizados. Estudiamos 10 aislados, de los cuales 6 presentaban un KI bajo (<30%), y 4 KI alto (>80%), obteniendo la misma eficacia en relación a la internalización de los aislados de la bacteria por parte de ambas poblaciones celulares (monocitos y neutrófilos) ($P = 0.08$ para KI <30% y $P = 0.14$ para KI >80%). Tal y como se muestra en la Figura V.14., las células bacterianas se clasificaron siguiendo los parámetros de dispersión FFC/SSC (P1). Estas células fueron analizadas según la intensidad de fluorescencia. Se indica el porcentaje de bacterias unidas (P2). Las poblaciones de fagocitos se distribuyeron en función de FSC/SSC. Se utilizó la expresión de CD15 y CD14 para diferenciar a los neutrófilos y a los monocitos, respectivamente, y la fagocitosis se determinó analizando el porcentaje de células que emitían fluorescencia (FMI). El nº de células bacterianas ingeridas por ambas células fue también comparable ($P = 0.64$ neutrófilos, y $P = 0.84$ monocitos).



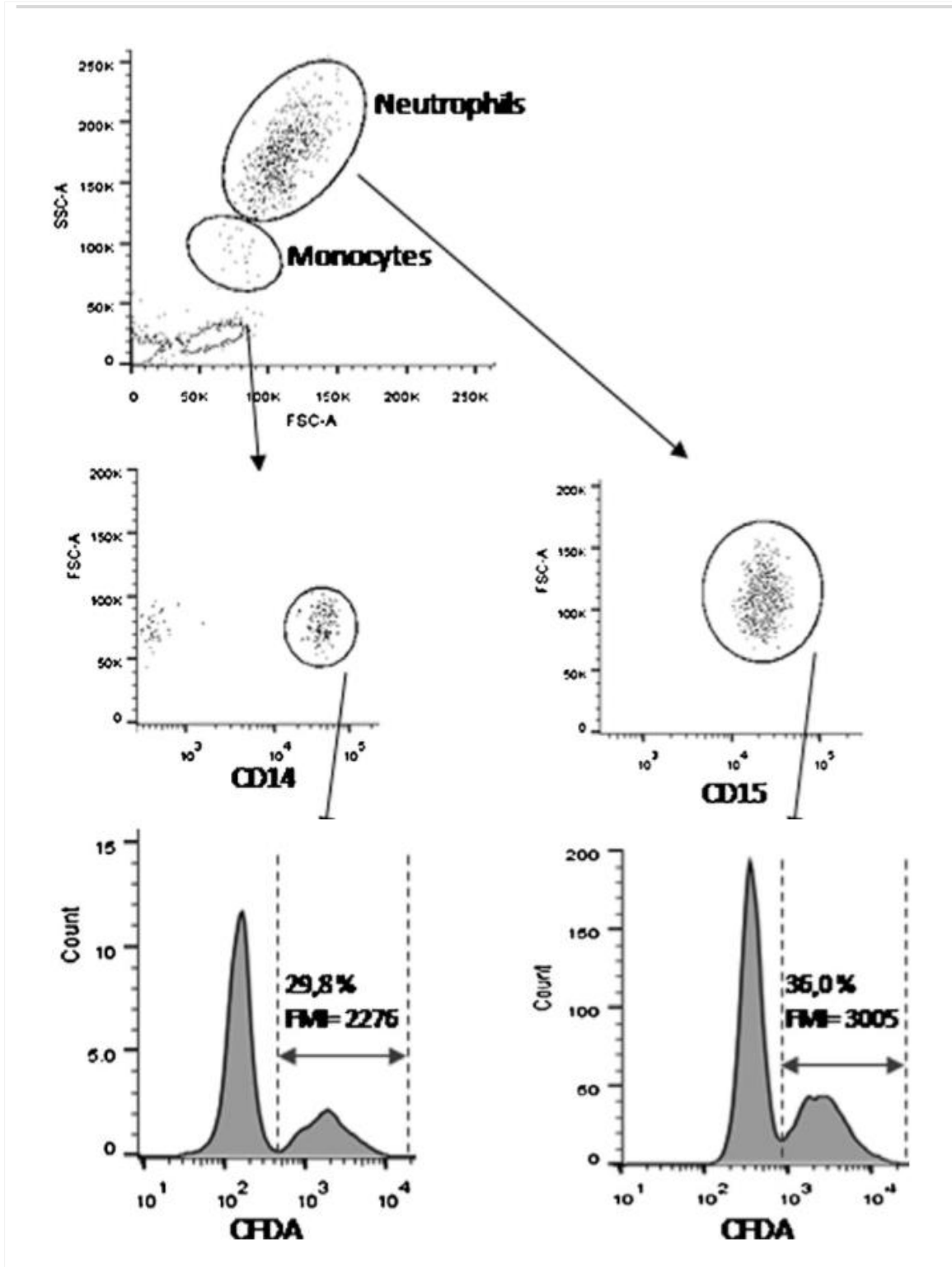


Figura V.14. Ensayo de fagocitosis



V.3.2 Evaluación de la repercusión del grosor de la pared celular de *S. aureus*

Las cepas de *S. aureus* que presentan sensibilidad intermedia a vancomicina (VISA), así como las hVISA y las VRSA exhiben un aumento en la síntesis de su pared celular y una pared celular significativamente engrosada en comparación con las cepas VSSA (Cui et al., 2000, Cui et al., 2003). En este sentido, el engrosamiento de la pared se plantea como un determinante de baja sensibilidad o resistencia a la vancomicina por parte de *S. aureus* (Cui et al., 2000). Por analogía, este fenómeno puede afectar al fallo en el tratamiento de las bacteriemias por MSSA tratadas con beta-lactámicos, produciéndose un atrapamiento del antibiótico en la pared celular impidiendo que alcance su diana, aunque esta teoría no ha sido probada todavía. Alternativamente o concomitantemente, el grosor de la pared puede resultar en un impedimento en el proceso de fagocitosis o en los mecanismos del killing por parte de los fagocitos. Si esto fuese cierto, contribuiría a explicar por qué las infecciones sistémicas por *S. aureus* con sensibilidad disminuida a vancomicina presentan peor pronóstico, por cuanto la fagocitosis y el killing bacteriano mediado por los neutrófilos es crítico para la defensa del hospedador frente a *S. aureus* (Rigby and DeLeo, 2012).

Para investigar si las cepas que presentan un engrosamiento de la pared celular son lisadas ineficazmente por los neutrófilos humanos (KI) y si esta característica está relacionada con la CMI de vancomicina, realizamos un estudio morfométrico de 26 aislados (13 MSSA and 13 MRSA) mediante microscopía electrónica de transmisión. Los resultados se muestran en las Tablas V.3 y V.4 y Figura V.15.



Tabla V.3: Datos obtenidos de los 26 aislados estudiados en relación al grosor de la pared celular, el % de Killing por parte de los fagocitos y la CMI de vancomicina (Etest).

Nº aislado	Grosor pared	% Killing	CMI vancomicina (Etest)
1	20,02	73,52	1,5
2	23,94	23,58	2
3	21,03	85,71	2,5
4	20,85	59,99	2
5	21,22	26,72	1,5
6	21,6	82,01	0,75
7	25,59	59,93	2
8	19,46	68,15	0,75
9	22,63	19,23	1
10	17,31	87,73	1,5
11	20,33	12,57	2
12	20,95	47,22	2
13	37,68	21,51	3
14	16,57	65,21	2
15	18,83	24,72	2
16	18,74	4,58	2
17	15,83	95,61	2
18	17,51	90,49	0,75
19	16,16	90,7	0,5
20	18,79	82,44	1
21	18,82	88,23	2
22	17,88	63,81	2
23	17,31	88,73	2
24	17,89	90,87	1
25	51,28	30,01	1,5
26	15,61	26,15	2

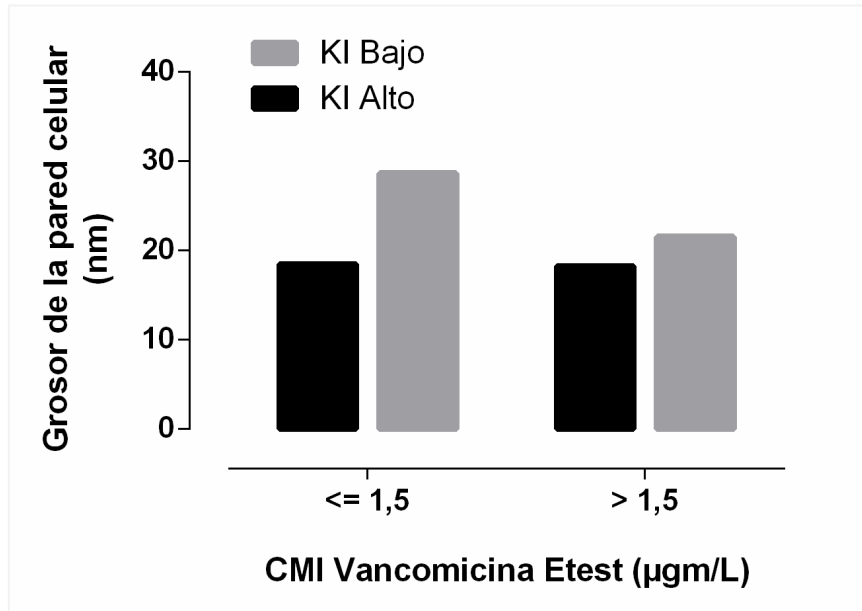


Figura V.15. Grosor de la pared celular de las cepas de *S. aureus* (media) en función de la CMI de vancomicina y al grupo de killing al que pertenecen (Alto >70%; Bajo ≤70%).

15 aislados pertenecían al grupo de killing bajo (incluyendo 8 con KI <30%) y 11 al alto. El grosor de la pared celular se correlacionó inversamente con el KI (Figura V.16.), siendo la pared significativamente más gruesa en los aislados del grupo del killing bajo ($P=0.03$).

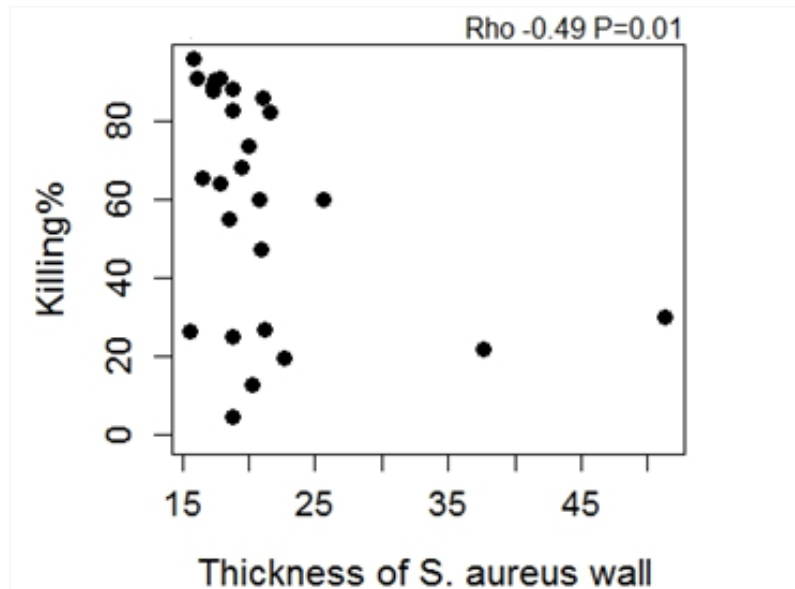


Figura V.16. Correlación de los valores del grosor de la pared celular con el índice de killing.

De nuestros resultados se puede inferir que el grosor de la pared celular no impide la ingestión de las bacterias, pero podría actuar como impedimento para la correcta formación del fagosoma o ayudar a liberación de la bacteria e intervenir en los procesos de evasión del killing intracelular (ROS, NETs y proteínas microbicidas). A pesar de que nuestros datos no prueban que la relativa refractariedad de ciertos aislados a la lisis por los fagocitos se deba al grosor de la pared, esto parece una teoría plausible ya que una característica de todos los aislados que presentan baja sensibilidad al killing fue un elevado grosor de la pared celular.

Por analogía, el aumento del grosor de la pared también explicaría el fracaso de los β -lactámicos en las MSSAB, porque favorece el atrapamiento de los antibióticos en la pared celular dificultando el acceso a su diana.



Tabla V.4: Valores de CMI de vancomicina (Etest) y Grosor de la pared celular de aislados de *S. aureus* que presentan alta o baja sensibilidad al killing producido por los fagocitos humanos.

Parámetro	Alto Índice de Killing (>70%)			Bajo Índice de Killing (<60%)*		
	Todos (n=61)	MSSA (n=43)	MRSA (n=18)	Todos (n=18)	MSSA (n=6)	MRSA (n=12)
Mediana de CMI de Vancomicina (rango) en µg/mL	1.50 (0.50-2.00)	1.50 (0.50-2.00)	1.50 (0.50-2.00)	2.00 (0.75-3.00)	1.75 (1.50-2.00)	2.00 (0.75-3.00)
Mediana del Grosor de la pared celular (rango) en nm	17.89 (15.83-21.60)	17.51 (15.83-18.82)	20.53 (17.31-21.60)	20.90 (15.61-51.28)	18.79 (18.47-51.28)	21.09 (15.61-37.68)

* La distribución entre índice de killing alto y bajo las consideramos >70% y <60% respectivamente

En conclusión, nuestros datos indican que la CMI de vancomicina medida por Etest no se correlaciona con un killing ineficaz por parte de los fagocitos humanos.



V.3.3 Estudio de factores genotípicos de *S. aureus* asociados a CMIs elevadas de vancomicina.

La posibilidad de que el desarrollo de fenotipos RVS esté determinado por la presencia de ciertos genes específicos resulta factible, y ha sido postulada ya por algunos autores (Lalani et al., 2008, Viedma et al., 2014, San-Juan et al., 2017b, Holmes et al., 2014), de manera que uno de los objetivos que desarrollamos en el artículo IV fue el estudio del impacto de la carga genética de los aislados de *S. aureus* productores de bacteriemia en cuanto a su comportamiento ante la vancomicina.

Estudiamos la presencia de determinados genes mediante la tecnología de hibridación utilizando *S. aureus* DNA microarray y reactivos de Clondiag (*Staphylococcus aureus* Genotyping Kit 2.0; Clondiag, Jena, Germany), el cual incluye 333 secuencias diana correspondientes a 170 genes y sus variantes alélicas, cubriendo marcadores de especies, marcadores de reconocimiento de secuencias SCCmec y tipos capsulares así como grupos *agr*, genes de resistencia, exotoxinas, genes MSCRAMM... (Rasmussen, Monecke, Ehricht, & Söderquist, 2013).

Algunos determinantes genotípicos de *S. aureus* como el CC, la presentación de CP5+ o el tipo de *agr* ya han sido considerados como responsables de virulencia (Seidl et al., 2011, Watts et al., 2005, Recker et al., 2017), sin embargo en nuestro análisis, la distribución entre los valores de CMI de *S. aureus* a vancomicina medidos por ambos métodos y entre los dos grupos de killing de dichos genes fue homogénea.

a) Complejo clonal (CC):

Existen distintos métodos para tipificar las bacterias como PFGE, Multi Locus Sequence Type (MLST), SCCmec (staphylococcal cassette chromosome mec) typing, *spa* (staphylococcal protein A) typing, o WGS, accessory gene regulator (*agr*) typing, y “toxin gene profiling” (Liu et al., 2018, Giulieri et al., 2016).



MLST es una técnica con un elevado poder discriminatorio en el tipado de *S. aureus*. Se basa en el análisis de las secuencias de 7 genes constitutivos (“housekeeping genes”). Cada fragmento se corresponderá con una variante alélica y la combinación de todas las variantes alélicas resulta en lo que se denomina perfil alélico o secuencia tipo (Sequence type, ST) (Enright y col., 2000). Los complejos clonales se definen como clusters de ST con pequeñas diferencias en el perfil alélico (Melles et al., 2004). Como hay muchos tipos de variantes alélicas posibles, resulta poco probable que dos bacterias presenten el mismo perfil alélico (Enright y col., 2002). En caso de que así sea pueden adscribirse al mismo tipo de clon, y si coinciden en 5 de las 7 variantes alélicas se considera que pertenecen al mismo complejo clonal (Lindsay y col., 2006). Los genes analizados para *S. aureus* son: *arcC*, *aroE*, *glpF*, *Gmk*, *Pta*, *Tpi* y *qiL*.

Como se puede inferir de la amplia variedad de CC que se documentaron en nuestra serie (un total de 21 tipos), los aislados presentaban una gran diversidad genética. Los CC más prevalentes fueron CC5 (n=39), CC30 (n=19), CC8 (n=15), CC22 (n=12), CC45 (n=9) y CC398 (n=8). Los valores de CMI de vancomicina para *S. aureus* fueron comparables entre los distintos tipos clonales, independientemente del método de detección de la CMI empleado ($P=0.61$ con BMD y $P=0.51$ con Etest) (Tablas V.5 y V.6) (Figura V.17).

Tabla V.5: Valores de CMI de vancomicina ($\mu\text{g}/\text{mL}$) medidos por BMD de las cepas de *S. aureus* incluidos en el estudio según los grupos clonales.

	Media	0.5	0.63	0.75	0.87	1.00	1.25	Total	P
CMI BMD									
CC5	0.63	9 (23.1)	13 (33.3)	11 (28.2)	4 (10.3)	2 (5.1)	0 (0.0)	39	0.20
CC8	0.63	3 (18.8)	9 (56.3)	3 (18.8)	1 (6.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	16	0.84
CC15	0.57	2 (50)	2 (50)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	4	0.775
CC22	0.75	1 (8.3)	4 (33.3)	6 (50)	1 (8.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	12	0.37
CC30	0.63	9 (47.4)	7 (36.8)	2 (10.5)	1 (5.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	19	0.24
CC45	0.69	1 (10)	4 (40)	5 (50)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	10	0.43
CC398	0.66	1 (12.5)	4 (50)	3 (37.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	8	0.83
Otros CC	0.63	10 (28.6)	15 (42.9)	6 (17.1)	2 (5.7)	0 (0.0)	1 (2.9)	35	0.09

Tabla V.6: Valores de CMI de vancomicina ($\mu\text{g}/\text{mL}$) medidos por Etest de las cepas de *S. aureus* incluidos en el estudio según los grupos clonales.

	Media	0.5	0.75	1.00	1.5	Total	P
CMI Etest							
CC5	1.00	2 (5.1)	5 (12.8)	22 (56.4)	10 (25.6)	39	0.42
CC8	1.00	1 (5.3)	6 (31.6)	11 (57.9)	1 (5.3)	19	0.27
CC15	1.00	2 (12.5)	5 (31.3)	6 (37.5)	3 (18.8)	16	0.39
CC22	1.00	0 (0.0)	1 (25)	2 (50)	1 (25)	4	0.93
CC30	0.88	2 (12.7)	4 (33.3)	6 (50)	0 (0.0)	12	0.14
CC45	1.00	0 (0.0)	0 (0.0)	8 (80)	2 (20)	10	0.25
CC398	1.00	1 (12.5)	1 (12.5)	5 (62.5)	1 (12.5)	8	0.83
Otros CC	1.00	1 (2.85)	6 (17.1)	19 (54.3)	9 (25.7)	35	0.10

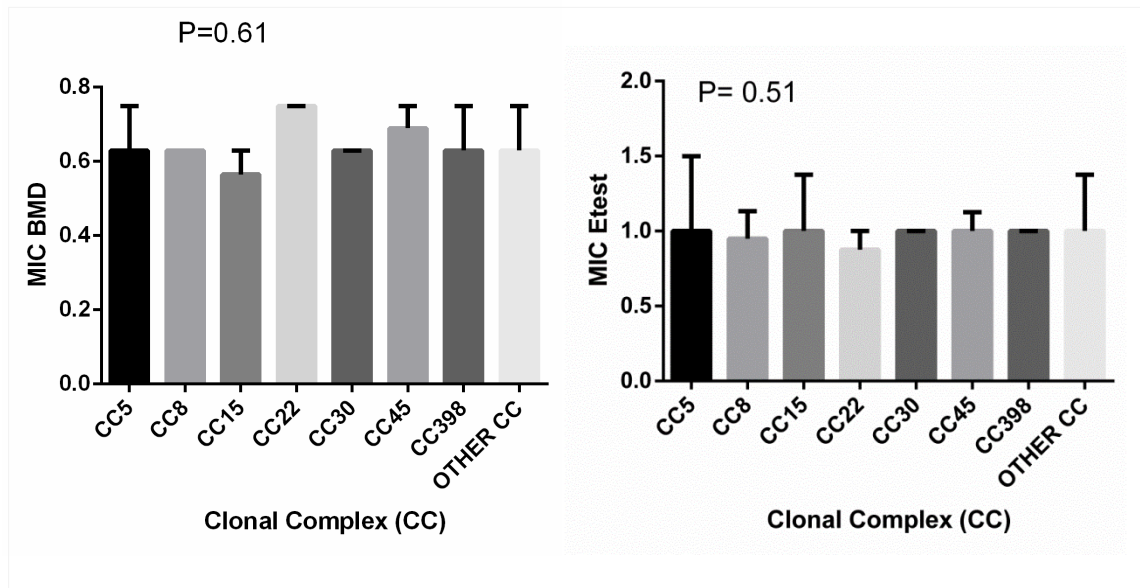


Figura V.17. Distribución de los valores de CMI de vancomicina para *S. aureus* medidos por BMD y Etest de los distintos tipos clonales estudiados.

b) Tipo *agr*:

El operon *agr* constituye un sistema regulador que controla la expresión global de los factores de virulencia en función de la densidad celular (Painter et al., 2014). Existen cuatro tipos de *agr* (I-IV), los cuales se diferencian en el tipo de estructura que reconocen (AIP I-AIP IV). Teniendo en cuenta que la molécula efectora de este sistema (RNA III) media la expresión de proteínas y toxinas de secreción como α -hemolisina, δ -hemolisina (cuya expresión fenotípica se utiliza como marcador de funcionalidad de *agr*) PSMs y PVL, *agr* bien podría considerarse un regulador asociado a virulencia. No obstante, la supresión de *agr* también está vinculada a patogenicidad asociándose con osteomielitis, artritis, mastitis, abscesos subcutáneos e EI (Seidl et al., 2011), bacteriemia persistente (Xiong et al., 2009, Park et al., 2013) e incluso mortalidad (Schweizer et al., 2011). En condiciones normales *agr* reprime la expresión de la molécula de evasión del sistema inmune SpA y moléculas de adhesión FnBPs, las cuales son responsables de adhesión, invasión y persistencia en las células endoteliales. La



disminución de la actividad de *agr* promueve su expresión induciendo la diseminación de *S. aureus* (Malachowa et al., 2011).

Si la disfunción de *agr* facilita la persistencia de *S. aureus* dentro de las células, promueve el escape a la acción de vancomicina, la cual es incapaz de penetrar dentro de las células. Esta resistencia al tratamiento con vancomicina podría explicar la peor evolución de las cepas que tienen comprometida la función de *agr* (Sakoulas et al., 2002). Sin embargo, en nuestro estudio, no hubo diferencias en cuanto al tipo de *agr* en cuanto a la CMI de vancomicina (Tabla V.7) (Figura V.18).

Estudios previos han relacionado la disfunción de *agr* y el tipo *agr* II y sensibilidad disminuída a vancomicina (Sakoulas et al., 2002, Howden et al., 2010, Moise et al., 2009, Holmes et al., 2014), pero la asociación entre elevadas CMIs y mortalidad es más compleja y no puede ser explicada únicamente por la disfunción del *agr*, ya que entre otras cosas, estas cepas han demostrado ser menos virulentas en modelos con invertebrados (Peleg et al., 2009).

Tabla V.7: Valores de CMI de vancomicina determinados por las dos técnicas (BMD y Etest) en función del grupo *agr*.

	<i>agr</i> I (n=58)				<i>agr</i> II (n=53)				<i>agr</i> III (n=25)				<i>agr</i> IV (n=4)			
	Mediana	Máximo	Mínimo	<i>P</i>	Mediana	Máximo	Mínimo	<i>P</i>	Mediana	Máximo	Mínimo	<i>P</i>	Mediana	Máximo	Mínimo	<i>P</i>
CMI	0.63	1.00	0.5	0.61	0.63	1.00	0.5	0.58	0.63	0.87	0.5	0.79	0.63	0.75	0.5	0.81
BMD																
CMI	1.00	1.5	0.5	0.38	1.00	1.5	0.5	0.02	1.00	1.5	0.5	0.03	1.00	1.00	0.75	0.64
Etest																

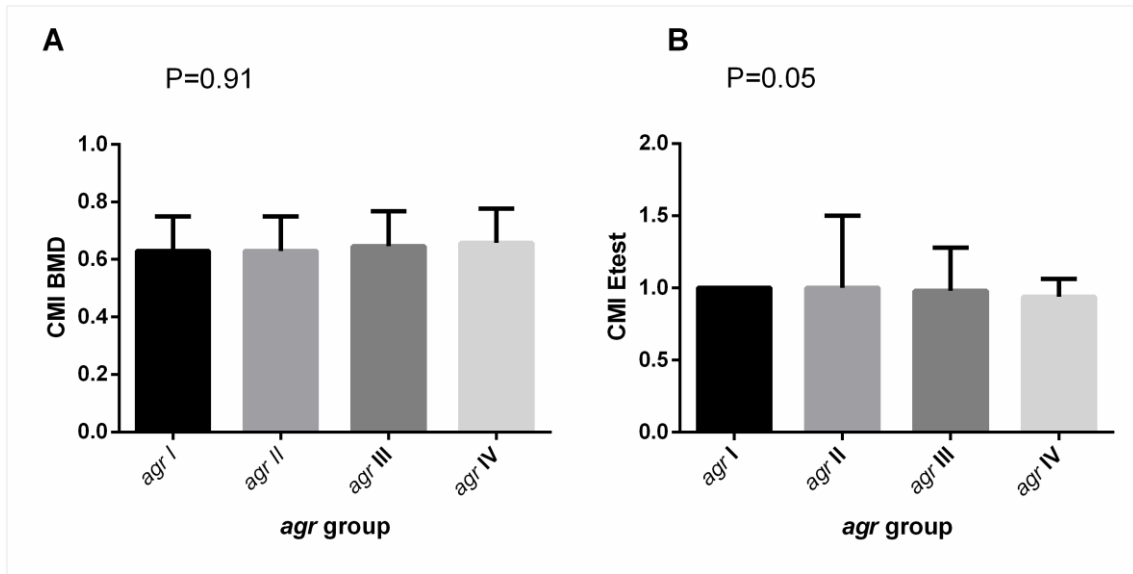


Figura V.18. Valores de CMI de las cepas de vancomicina para *S. aureus* de los distintos grupos de *agr*.

En cuanto al resto de los genes estudiados en el array, no solo no encontramos ningún gen que predispusiera a presentar elevadas CMIs, sino que los valores de CMI de vancomicina fueron significativamente menores en los aislados con *Sec/SeI* que en los que no portaban este gen, reforzando nuestra teoría de que los valores de CMI próximos al límite de la sensibilidad no influyen en el riesgo de bacteriemias complicadas.



V.4 Investigar el impacto de varias características fenotípicas y genotípicas de *S. aureus* en el desarrollo de bacteriemias complicadas.

Para estudiar en qué medida afectan las características de la bacteria en la evolución de la bacteriemia realizamos un estudio retrospectivo observacional que incluyó una cohorte de 148 *S. aureus* (MSSA, n=113; MRSA, n=35) obtenidos de pacientes con bacteriemias por este microorganismo. Registramos los datos demográficos y clínicos, entre los que se incluyeron la edad, sexo, fuente de la bacteriemia, comorbilidades, tratamiento antibiótico y evolución de la enfermedad. El principal evento clínico que se analizó fue el desarrollo de bacteriemia complicada (BC), definida por la aparición de (a) endocarditis, (b) tromboflebitis séptica, (c) infección metastásica, (d) bacteriemia persistente más de >72 h después de comenzar la terapia antibiótica dirigida y (e) bacteriemia recurrente (definida en la introducción), y se analizó el impacto de las características genéticas de la bacteria en el desarrollo de bacteriemias complicadas.

De todos los episodios recogidos en el estudio, 104 se correspondieron con bacteriemias adquiridas en la comunidad y 44 nosocomiales.

Al evaluar las diferencias entre los dos grupos (los que desarrollan BC y los que no), además de las características fenotípicas de *S. aureus* (valores de CMI y KI) y de algunos rasgos genéticos que se han asociado ya con complicaciones en otros estudios, varias covariables clínicas con potencial relevancia fueron tenidas en cuenta, con el fin de controlar los posibles factores que pueden desajustar el modelo de regresión logística. Entre estas covariables se incluyeron los datos demográficos de los pacientes, categoría de la bacteriemia (comunitaria o nosocomial), comorbilidades del paciente (medidas por el índice de comorbilidad de Charlson), la gravedad de la enfermedad (presencia de shock séptico en el momento del establecimiento de la bacteriemia), la fuente de la bacteriemia, el acierto en la terapia antibiótica empírica y el manejo clínico de la fuente primaria de bacteriemia. Hay que destacar que la terapia antibiótica se estima que fue apropiada en el 50% de los episodios, y la media en el



retraso de la instauración de 1.5 días. Además, se administró terapia con beta-lactámicos en 86 casos (52.8%) y con glicopéptidos en 50 (33.7%) (Tabla V.8).

Tabla V.8: Características demográficas y clínicas de los pacientes incluidos en el estudio en función del desarrollo de complicaciones en los episodios de bacteriemia.

Características	Nº de pacientes (%) (n=148)	Bacteremia complicada (%) (n= 37)	Bacteremia no complicada (%) (n= 111)	P
Edad (años), mediana (rango)	61.41(0-91)	56.73	62.96	0.68
Sexo				0.50
Mujeres	86 (58.1)	22 (25.6)	64 (74.4)	0.85
Hombres	62 (41.9)	15 (24.2)	47 (75.8)	0.85
Comorbilidades (n=94)	80 (54.1)	18 (48.6)	62 (55.9)	0.45
Diabetes Mellitus	31 (32.9)	7 (77.4)	24 (22.6)	0.46
Enfermedad Pulmonar Crónica	11 (11.7)	4 (36.4)	7 (63.6)	0.28
Enfermedad Renal Crónica	23 (24.5)	5 (21.7)	18 (78.3)	0.46
Cáncer	29 (30.9)	5 (17.2)	24 (82.8)	0.20
Índice de Charlson (<3)	113 (76.4)	29 (25.7)	84 (74.3)	0.46
Índice de Charlson, mediana (rango)	1.70 (0-10)	1.8 (0-10)	1.4 (0-10)	0.27
Shock séptico	6 (4)	3 (50)	3 (50)	0.16
Fuente de bacteriemia		37 (25)	111 (75)	0.06
Abdominal	16 (10.8)	4 (25)	12 (75)	1.00
Cateter intravenoso	25 (16.9)	7 (29.2)	17 (70.8)	0.61
Cirugía	5 (3.4)	1 (20)	4 (80)	0.79
Desconocido	15 (10.1)	2 (13.3)	13 (86.7)	0.27
Infección de huesos o partes blandas	13 (8.8)	8 (61.5)	5 (38.5)	0.00
Infección del tracto respiratorio	34 (22.3)	5 (14.7)	29 (85.3)	0.11
Infección del tracto urinario	15 (10.1)	2 (13.3)	13 (86.7)	0.27
Piel o tejidos blandos	26 (17.6)	8 (30.8)	18 (69.2)	0.45
Mortalidad a los 14 días	16 (10.8)	1 (6.3)	15 (93.8)	0.05
Mortalidad a los 30 días	22 (14.9)	3 (13.6)	19 (86.4)	0.14
Complicaciones	37 (25)	-	-	-



Émbolos	1 (2.7)	-	-	-
Endocarditis	4 (10.8)	-	-	-
Infección osteoarticular	10 (27)	-	-	-
Bacteriemia persistente	7 (18.9)	-	-	-
Bacteriemia recurrente	4 (10.8)	-	-	-
Tromboflebitis	9 (24.3)	-	-	-
Otros	2 (5.4)	-	-	-
Resistencia a meticilina				
Si	35 (23.6)	13 (37.1)	22 (62.9)	0.06
No	113 (66.4)	24 (21.2)	89 (78.8)	0.06
Grupo agr	140 (96)	36 (25.7)	104 (74.3)	0.73
I	58 (41.4)	15 (25.9)	43 (74.1)	0.97
II	53 (37.9)	13 (24.5)	40 (75.5)	0.78
III	25 (17.9)	6 (24)	19 (76)	0.81
IV	4 (2.9)	2 (50)	2 (50)	0.25
Complejo clonal	143 (96.6)	37	106	0.55
CC5	39 (27.3)	11 (28.2)	28 (71.8)	0.69
CC8	15 (1.5)	6 (37.5)	10 (62.5)	0.26
CC15	4 (2.8)	0 (0)	4 (100)	0.23
CC22	12 (8.4)	4 (33.3)	8 (66.7)	0.54
CC30	19 (13.3)	4 (21.1)	15 (78.9)	0.61
CC45	10 (7)	3 (30)	7 (70)	0.76
CC398	8 (5.6)	3 (37.5)	5 (62.5)	0.44
Otros CC	36 (25.2)	6 (16.7)	30 (83.3)	0.31
Terapia antibiótica				
Apropiada terapia antibiótica empírica	71 (48)	17 (22.1)	60 (77.9)	0.25
Antibióticos durante el curso del tratamiento				
Glicopéptidos	50 (33.7)	13 (26)	37 (74)	0.50
Blactámicos	86 (52.8)	21 (24.4)	65 (75.6)	0.85
Otros ^a	20 (13.5)	14 (66.7)	6 (33.3)	0.03
Genes				
<i>Cap5</i>	91 (63.6)	28 (30.8)	63 (69.2)	0.08
<i>Cap8</i>	52 (36.4)	9 (17.3)	43 (82.7)	0.08
<i>PVL/</i> (lukFPV y lukSPV)	5 (3.5)	4 (80)	1 (20)	0.01
<i>Sec</i> y <i>Sel</i>	21 (14.7)	10 (47.6)	11 (52.4)	0.01
<i>ssl01set6</i> (alelos COL y RF122)	13 (9.1)	6 (46.2)	7 (53.8)	0.08
<i>Bbp</i> consensus	111 (78.7)	33 (29.7)	78 (70.3)	0.03



^a Ciprofloxacino, Clindamicina, Daptomicina, Gentamicina, Levofloxacino, Linezolid, Rifampicina, Meropenem.

Cap5, capsule type 5; *Cap8*; capsule type 8; *PVL*, Pantone-Valentine Leukocidin; *lukF-PV* y *lukS-PV*, Pantone Valentine leukocidin F and S components; *Sec* y *sel*, Enterotoxinas C y L; *ssl01set6*, staphylococcal superantigen-like protein; *Bbp* consensus, *Bone Sialoprotein-Binding Protein*.

V.4.1. Estudio de la asociación de CMI de vancomicina para *S. aureus* con complicaciones en el contexto de bacteriemias.

En nuestro estudio, en el que la mayoría de los episodios eran adquiridos en la comunidad y originados por fuentes muy heterogéneas y aislados con una gran diversidad clonal, los valores de CMI de *S. aureus* a vancomicina medidos tanto por Etest ($\leq 1 \mu\text{g/mL}$ vs. $\geq 1.5 \mu\text{g/mL}$), como por nuestro método de BMD ($<0.75 \mu\text{g/mL}$ vs. $\geq 0.75 \mu\text{g/mL}$), considerada tanto como una variable continua como dicotómica, no se asociaron con el desarrollo de complicaciones en bacteriemias ($P=0.94$ para Etest y $P=0.19$ para BMD) (Figura V.19) en concordancia con lo reportado previamente (Rojas et al., 2012, López-Cortés et al., 2015). De hecho, la determinación de un punto de corte capaz de discriminar entre aislados implicados en complicaciones o no mediante análisis de curvas ROC no fue posible. Repetimos el estudio únicamente incluyendo aislados MSSA ($n= 113$) pero los resultados no variaron ($P=0.77$ con Etest y $P=0.68$ con BMD) (Figura V.19).

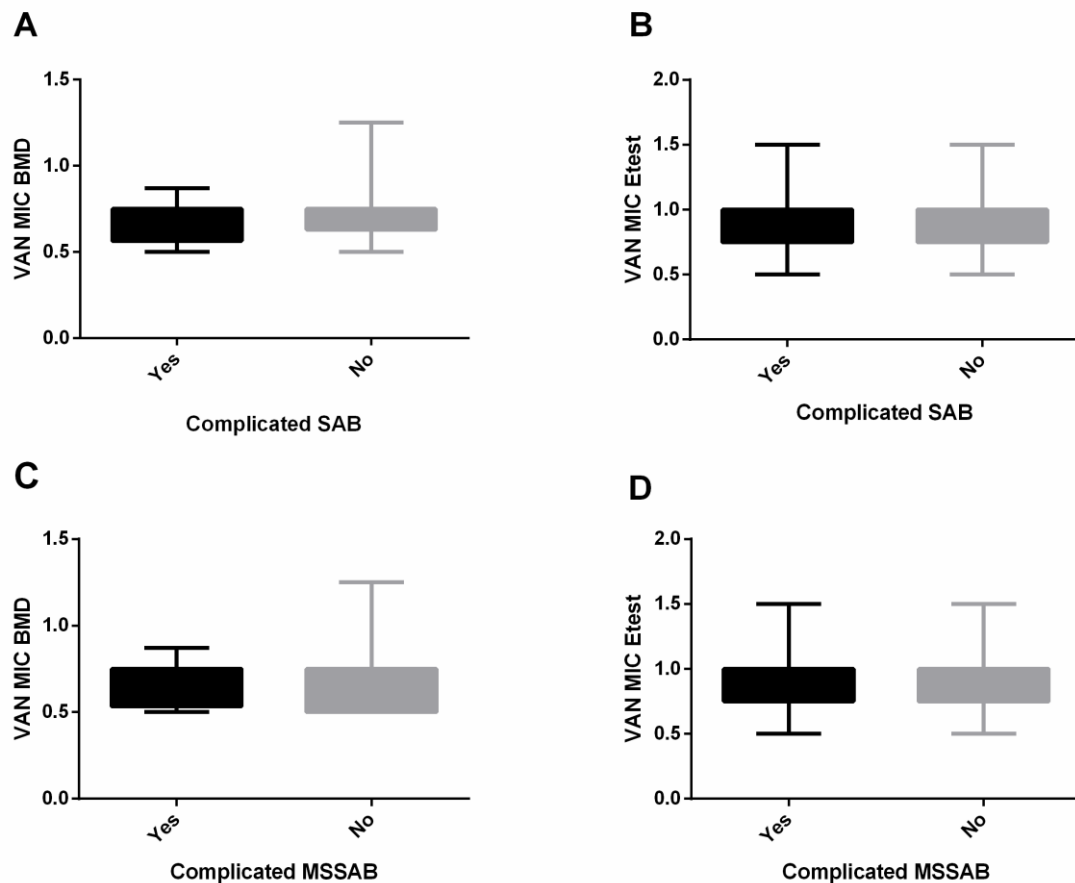


Figura V.19. Distribución de las distintas CMIs de vancomicina para *S. aureus* medidas por BMD (A y C) y Etest (B y D) según el desarrollo de complicaciones o no en el contexto de bacteriemia. No se observan diferencias entre las cepas MSSA (n=113) y el total de las muestras (n=148).

La mayoría de los estudios que evalúan el supuesto impacto de las CMIs de *S. aureus* a vancomicina en el desarrollo de complicaciones emplean la técnica del Etest. Sin embargo, como hemos expuesto anteriormente, este método es inapropiado, dado que es poco preciso y reproducible (Kruzel et al., 2011, Muñoz-Cobo et al., 2011, Charlton et al., 2014). En efecto, son pocos los estudios que evalúan las CMIs de *S. aureus* a vancomicina en relación con el desarrollo de SAB empleando métodos de BMD, pero la mayoría no encuentran asociación. En concreto, Rojas et al., (Rojas et al., 2012) no hallan correlación entre valores de CMI medidos por un método de BMD casero (considerando alta $>1 \mu\text{g/mL}$; baja $\leq 1 \mu\text{g/mL}$) y el desarrollo de infecciones



metastásicas o bacteriemia persistente causada por aislados MRSA. Adani et al., (Adani et al., 2018) reportan que valores de CMI de vancomicina (alta, $>2 \mu\text{g/mL}$; baja, $\leq 2 \mu\text{g/mL}$) determinada por métodos de BMD automatizados (MicroScan; Beckman Coulter, West Sacramento, CA, USA) no predicen bacteriemias recurrentes o persistentes producidas por MRSA. Baxi et al., (Baxi et al., 2016) estudian CMIs de vancomicina (clasificándolas en altas $>2 \mu\text{g/mL}$; baja, $\leq 2 \mu\text{g/mL}$) por Microscan, sin asociarlas tampoco con mayor riesgo de producir recurrencias, readmisiones o incluso mortalidad, en una serie que incluye MRSA y MSSA. En esta misma línea, San Juan et al., (San-Juan et al., 2017a), en un estudio en el que analizan episodios de bacteriemias relacionadas con catéteres, tampoco encuentran diferencias significativas entre aislados tanto envueltos como no envueltos en el desarrollo de endocarditis cuando el método que se emplea para determinar las CMIs a vancomicina son paneles de BMD comerciales (ESTEN 2009, Sensititre™, Izasa, Barcelona, Spain), independientemente de si se analiza la CMI como una variable continua como dicotómica ($>1.0 \leq 1.0 \mu\text{g/mL}$).

En contraste, Sullivan et al., (Sullivan et al., 2017) relacionan las SAB causadas por cepas de *S. aureus* con sensibilidad disminuida a vancomicina (definida por Microscan de $2 \mu\text{g/mL}$) con mayor riesgo de desarrollar complicaciones.

Los estudios arriba mencionados usan tanto paneles comerciales como caseros, y todos emplean métodos comerciales de BMD con diluciones dobles del antimicrobiano. La variación de una dilución de \log_2 se considera aceptable según las agencias internacionales para métodos de BMD (CLSI and EUCAST). Por ello, la falta de margen para el umbral que define baja frente a alta sensibilidad en estos estudios hace que la posibilidad de errar en la categorización de estos aislados sea muy alta.



V.4.2. Estudio de la asociación del índice de killing de *S. aureus* con complicaciones en el contexto de bacteriemias.

Con base en previas observaciones (Cui et al., 2000, Cui et al., 2003), Aguado et al., postularon que altos niveles de CMI de *S. aureus* a vancomicina, determinados por Etest, podían reflejar ciertas modificaciones estructurales (como el grosor de la pared celular) que resultaran en un aumento de la patogenicidad de la bacteria (Aguado et al., 2011). A este respecto, en el artículo II demostramos que la susceptibilidad al killing fagocítico es un ensayo in vitro relativamente simple que se puede usar como marcador subrogado de grosor de pared celular, aunque esto requiere un protocolo de medida mediante técnicas de microscopía electrónica. Sin embargo, en el estudio los aislados presentaban la misma sensibilidad al killing fagocítico independientemente de si desarrollaban complicaciones o no ($P=0.5$) (Figura V.20), lo que sugiere indirectamente que el grosor de la pared celular no es un factor patogénico relevante en cuanto al riesgo de desarrollar complicaciones. Naturalmente, la verdadera relevancia del grosor de la pared como factor de virulencia solo puede ser dilucidado mediante técnicas de microscopía electrónica. Estos resultados se mantuvieron cuando analizamos únicamente los aislados MSSA ($P= 0.71$).

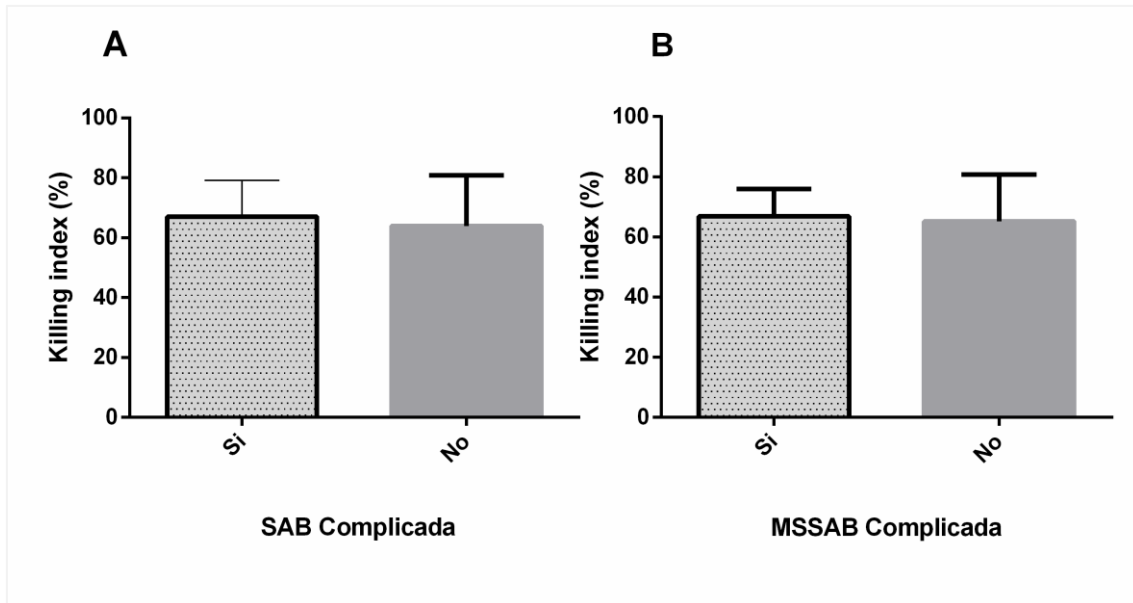


Figura V.20. Distribución del KI (mediana con rango intercuartílico) en función del desarrollo o no de complicaciones considerando A) MRSA y MSSA, ($P= 0.5$); B) únicamente MSSAB, ($P= 0.71$)

V.4.3 Análisis del perfil genético de *S. aureus* productor de bacteriemia.

Los resultados obtenidos hasta la fecha de los distintos estudios en relación a los genes de virulencia y el desarrollo de complicaciones también son discordantes.

Los factores del paciente que parecen tener mayor repercusión son la edad, comorbilidades (hemodiálisis, inmunosupresión...), uso de dispositivos médicos, persistencia de fiebre >72h después de instaurar el tratamiento, desarrollo de sepsis, adquisición del patógeno en la comunidad (por la tardanza que supone en identificar la bacteriemia y la mayor probabilidad de que el *S. aureus* contenga PVL), presencia en la piel de signos que sugieran una infección sistémica aguda y hemocultivos de control a las 48-96 horas positivos (Fowler et al., 2003). En cuanto al manejo clínico y terapéutico se han estudiado tanto las diversas fuentes y vías de adquisición como la elección del tratamiento adecuado o retraso en su instauración (>48 horas); pero todo



apunta a que son las características genéticas y fenotípicas de la bacteria las que van a determinar la evolución de la enfermedad (Recker et al., 2017).

En nuestro análisis, los aislados de *S. aureus* no fueron significativamente distintos en los dos grupos observados (bacteriemia complicada vs no complicada) en relación al CC, genes de resistencia a antibióticos (*mecA*), grupo *agr*, tipo capsular o PVL. De hecho, como se muestra en la Tabla V.9, la presencia de los genes *Sec/SeI* fue el único factor que se asoció independientemente con la aparición de complicaciones (OR, 3.45; 95% CI:1.26-9.45; $P=0.02$).

Tabla V.9: Factores de riesgo para SAB complicada: análisis univariante y multivariante.

Factor	Univariante		Multivariante	
	OR (95%CI)	P valor	OR (95%CI)	P valor
Edad (>70 vs. ≤70 años)	0.45 (0.21-0.994)	0.048	-	NS
Sexo (masculino vs. femenino)	1.08 (0.505-2.30)	0.85		
Índice de Charlson (≥3 vs. <3)	0.858 (0.35-2.10)	0.74		
Comorbilidades				
Diabetes Mellitus	0.85 (0.33-2.16)	0.73		
Enfermedad pulmonary crónica	1.80 (0.50-6.59)	0.37		
Cáncer	0.57 (0.20-1.61)	0.29		
Enfermedad renal crónica	0.80 (0.28-2.36)	0.69		
Terapia de primera línea (empírica) inapropiada	0.98 (0.36-2.74)	0.89		
Adquisición (Comunidad vs. Hospitalaria)	0.84 (0.38-1.88)	0.68		
Uso de Antibióticos				



Glicopéptidos	1.08 (0.49-2.37)	0.84		
β-lactámicos	0.93 (0.44-1.97)	0.85		
Otros agentes ^b	2.472 (1.11-5.48)	0.03	-	NS
Shock séptico	3.18 (0.61-16.48)	0.17		
Inadecuado manejo clínico^c	4.81 (0.77-29.98)	0.09	-	NS
Resistencia a meticilina	2.20 (0.97-4.98)	0.06	-	NS
CMI de Vancomycin (µg/mL)^d	1.00 (0.10-9.92)	1.00		
BMD (≥0.5 µg/mL vs. <0.5 µg/mL)	1.00 (0.42-2.38)	1.00		
BMD ≥0.75 µg/mL vs. <0.75 µg/mL)	1.11 (0.39-3.12)	0.85		
Etest (≥1.5 µg/mL vs. <1.5 µg/mL)	1.25 (0.5-3.15)	0.63		
Índice de Killing (%)^e	1.63 (0.66-4.12)	0.30		
Índice de Killing (<60% vs. 70%)	1.18 (0.53-2.63)	0.68		
Sec y Sel (Presencia vs. ausencia)	3.20 (1.23-8.33)	0.02	3.45 (1.26-9.45)	0.02

OR, Odds Ratio;

^aUso de agentes beta-lactámicos para bacteriemias causadas por MRSA, uso de Ciprofloxacino, Rifampicina o Piperacilina/Tazobactam, o ausencia de tratamiento empírico.

^bCiprofloxacino, Clindamicina, Daptomicina, Gentamicina, Levofloxacino, Linezolid, Meropenem, y Rifampicina.

^cInadecuado manejo clínico: (i) no retirada del catéter a las 72 h del establecimiento de la bacteriemia (n=2); (ii) ausencia de drenaje del lugar de la infección primaria (n=3).

^dValores de CMI de vancomicina analizados como una variable continua.

^eValores de índice de killing analizados como una variable continua.



V.4.3.1 Complejo clonal:

Parece plausible pensar que los distintos clones puedan adoptar diferentes estrategias para defenderse frente al sistema inmune y provocar distintas patologías, por ello resulta interesante estudiar la relación entre clonalidad y desarrollo de la enfermedad (Recker et al., 2017)

Todavía no se ha podido establecer una correlación evidente entre ningún grupo clonal y mala evolución de la enfermedad. Los resultados de los estudios son discordantes, tal y como se muestra en la Tabla V.10, logrando algunos vincular algunos CCs como CC5, CC8, CC12, CC15, CC20, CC30 o CC45 con invasividad (Fowler Jr et al., 2007, Foster, 2004, Melles et al., 2004), bacteriemia persistente (Xiong et al., 2009), complicaciones (Nienaber et al., 2011, Nethercott et al., 2013, Hos et al., 2015, Lalani et al., 2008, Xiong et al., 2009, Fowler Jr et al., 2007, Fernández-Hidalgo et al., 2018) o mortalidad a los 30 días (Recker et al., 2017). Sin embargo, y al igual que en nuestro estudio (Tabla V.11) son muchos los trabajos que encuentran resultados opuestos (Feil et al., 2003, Tristan et al., 2012, Chong et al., 2013, Gasch et al., 2014, Wong et al., 2014, Lilje et al., 2017, López-Cortés et al., 2015, Adani et al., 2018, Viedma et al., 2014). Estas discrepancias pueden deberse a la variedad de métodos de tipificación empleadas para clasificar a las cepas de *S. aureus*, así como a la heterogeneidad de las cohortes en cuanto a características clínicas de los pacientes o distribución de MSSA/MRSA.

Todos los grupos clonales que previamente se han asociado con complicaciones están representados en nuestro estudio (Figura V.21)

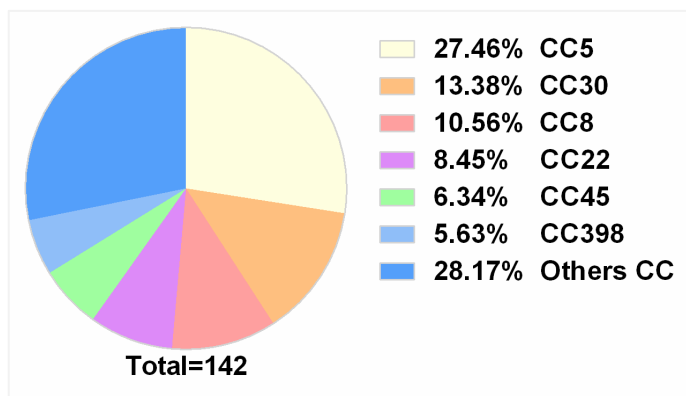


Figura V.21. Distribución de los distintos complejos clonales incluidos en nuestro estudio. *Others CCs*: CC10, CC152, CC45, CC49, CC6, CC88, CC59, CC7, CC12, CC97, CC121, CC15, CC9, CC1, CC25.

Tabla V.10: Lista de artículos que evalúan la relación de virulencia de *S. aureus* y complejos clonales.

Artículo	Estudio	Análisis genético	Resultados
(Jarraud et al., 2002)	14 <i>S. aureus</i> NC ^a , 66 STI ^b y 114 toxemias	AFLP ^c	Sí hay asociación entre linaje clonal y distintos tipos de enfermedad
(Feil et al., 2003)	179 <i>S. aureus</i> NC vs 61 <i>S. aureus</i> CA ^d invasivos y 94 HA ^e invasivos	MLST	No hay asociación entre CC e invasividad.
(Fowler Jr et al., 2007)	118 <i>S. aureus</i> NC vs 104 NCB ^f y STI vs 157 IE y osteomielitis	MLST + PFGE+ PCR	CC5 e invasividad en MSSA CC30 e invasividad en MRSA
(Lalani et al., 2008)	65 MRSAB vs 24 MRSA IE	PGFE + PCR	CC8 MRSAB e IE
(Xiong et al., 2009)	21 bacteremias persistentes vs 18 bacteriemias resueltas	MLST + <i>spa</i> typing + SCCmec typing + PCR	CC30 y SAB persistente
(Nienaber et al., 2011)	114 <i>S. aureus</i> STI vs 114 IE	MLST + PCR	CC30 e IE
(Tristan et al., 2012)	81 MSSAB vs 89 MSSA IE	MLST + DNAmicroarray	No hay asociación entre CC e IE
(Rasmussen	46 <i>S. aureus</i> NC vs	MLST + DNA	CC30 y NC



et al., 2013)	55SAB vs 33 IE	microarray	
(Nethercott et al., 2013)	24 <i>S. aureus</i> STI vs 49 SAB vs 24 IE	MLST + DNA microarray	CC12 y CC20 con IE
(Chong et al., 2013)	483 SAB	SCCmec <i>typing</i> , <i>agr</i> genotype	No hay asociación entre CC5, CC8 y CC15 y riesgo de bacteriemia persistente
(Gasch et al., 2014)	579 MRSAB	MLST + SCCmec <i>typing</i>	No hay asociación entre CC y bacteriemia
(Holmes et al., 2014)	242 SAB	DNA microarray	CC8 y bacteriemia persistente
(Wong et al., 2014)	183 pacientes con MRSAB, 14 con PB y 5 RB.	PFGE	No hay asociación
(Bouchiat et al., 2015)	54 CA SAB vs 72 CA IE	PCR + microarray + DAPC ^g	CC15 y IE
(Recker et al., 2017)	300 SAB	WSG ^h	CC22 y mortalidad

Tabla modificada de (Lilje et al., 2017)

^aNC: *Nasal carriers*; portadores nasales

^bSTI: *Skin and tissue infection*; infección de piel y tejidos blandos

^cAFLP: *Amplified fragment length polymorphism*; polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados

^dCA: *Community acquired*; adquirida en la comunidad

^eHA: *Hospital acquired*; adquirida en el hospital

^fNCB: *Non complicated bacteraemia*; bacteremia no complicada

^gDAPC: *Discriminant analysis of principal component*; análisis discriminante de los componentes principales

^hWSG: Whole genome sequencing

V.4.3.2 Genes de resistencia a antibióticos (*mecA*)

El mecanismo por el que *S. aureus* adquiere resistencia a la meticilina, además de a todos los Betalactámicos, consiste en la alteración de la proteína de unión a la penicilina PBP2 a la PBP2a o PBP2'; proteína sintetizada por el gen *mecA*, que se encuentra dentro de la isla de patogenicidad SCCmec (cromosoma en casete estafilocócico).



El impacto de la resistencia a meticilina con mortalidad en SAB ha sido analizado por numerosos estudios, los resultados de los cuales son conflictivos. El metaanálisis desarrollado por Cosgrove et al. muestra que el ratio de mortalidad es mayor en MRSA que en MSSA (OR, 1.93; 95 % CI, 1.54–2.42; $p < 0.001$) (Cosgrove et al., 2003), al igual que (Yilmaz et al., 2016). En el estudio de (Fowler Jr et al., 2005), en el que se analizaron casos de SAB asociados a catéteres intravasculares, se asoció también la presencia de *mecA* con mayor riesgo de producir complicaciones hematógenas. En este mismo estudio, encuentran que los aislados MRSA asociados con infección tienen un repertorio genético de virulencia distinto (encontrándose por ejemplo sobrerrepresentado el gen *sea*) y son más similares en cuanto a clonalidad que MSSA. Se podría explicar porque los genes accesorios pueden producir un fenotipo más virulento en los casos de bacteremias asociadas a catéter.

Sin embargo, estudios previos, al igual que nuestros resultados, muestran similitud en términos de virulencia entre MRSA y MSSA como se puede apreciar en la Figura V.19 (Schmitz et al., 1997, Duckworth and Jordens, 1990, Melzer et al., 2003), aunque es cierto que éstos últimos no incluyen únicamente episodios de enfermedades bacteriémicas en su estudio.

Se podría explicar la peor evolución de los pacientes infectados por MRSA no porque éstas cepas sean más virulentas, sino por la inefectividad del tratamiento, ya que el tratamiento con vancomicina ha sido asociado a mayores tasas de fallo clínico, bacteriemias prolongadas y recaídas (Gould, 2007). Esto debería impulsar estudios adicionales que definan el papel de tratamientos alternativos a vancomicina (como daptomicina o linezolid) como tratamientos empíricos para *S. aureus* (Fowler Jr et al., 2005).



V.4.3.3 *agr* (accessory gene regulator)

El papel de *agr* en el desarrollo de las infecciones en humanos, y más específicamente en la respuesta al tratamiento antibiótico es un tema todavía controvertido (Seidl et al., 2011).

En nuestro estudio, no hubo diferencias en cuanto al tipo de *agr* y el desarrollo de bacteriemias complicadas (Tabla V.11.)

Tabla V.11: Distribución de los aislados de *S. aureus* causantes de bacteriemias según el grupo *agr* y el complejo clonal, categorizados según el desarrollo de complicaciones o mortalidad a los 30 días.

	Bacteriemia complicada		P	Mortalidad a los 30 días		P
	Si	No		Si	No	
Grupo <i>agr</i>			0.73			0.51
I (n=58)	15 (26)	43 (74)		7 (12)	51 (87.9)	
II (n=53)	13 (25)	40 (75)		10 (18.9)	43 (81.1)	
III (n=25)	6 (24)	19 (76)		2 (8)	23 (92)	
IV (n=4)	2 (50)	2 (50)		1 (25)	3 (75)	
Complejo clonal			0.55			0.19
CC5 (n=39)	11 (28)	28 (71.8)		10 (25.6)	29 (74.4)	
CC8 (n=15)	6 (38)	10 (62)		1 (6.7)	14 (93.3)	
CC15 (n=4)	0	4 (100)		1 (25)	3 (75)	
CC22 (n=12)	4 (33)	8 (67)		1 (8.3)	11 (91.7)	
CC30 (n=19)	4 (21)	15 (79)		3 (15.8)	16 (84.2)	
CC45 (n=10)	3 (30)	7 (70)		2 (20)	8 (80)	
CC398 (n=8)	3 (38)	5 (62)		1 (12.5)	7 (87.5)	
Otros CC (n=36)	4 (17)	19 (83)		1 (2.8)	35 (97.2)	

La funcionalidad de *agr* es un proceso dinámico, que depende de las características microbiológicas específicas de la bacteria (como la posesión de determinados genes de virulencia), los niveles de expresión de los genes constitutivos y las proteínas relacionadas con el fitness (Kang et al., 2017), sin embargo, en el contexto de una bacteriemia, la densidad de bacterias en sangre es demasiado baja para activar el



quorum-sensing, lo que podría explicar que las cepas productoras de bacteriemia se asocien con baja expresión de *agr*.

Lo que sí que parece claro es que la disfunción del locus *agr* lleva a una sobreexpresión de proteínas estructurales y una inhibición de la producción de citotoxinas, promocionando potencialmente un mejor fitness y disminuyendo la toxicidad de los aislados, así como la persistencia de *S. aureus* dentro de las células, lo cual es un factor que favorece desarrollo de IE y bacteriemia persistente (Fowler Jr et al., 2004). Aún así, no resulta fácil sacar conclusiones de cómo repercute esto en la patogenicidad del microorganismo entre otras cosas, porque la virulencia es un rasgo fenotípico muy complejo de medir, ya que varía en función del contexto del estudio (in vitro, modelos en animales, un paciente individual o una población) (Giulieri et al., 2016).

V.4.1.4 Polisacárido capsular 5 y 8

Todos los *S. aureus* aislados en humanos contienen los genes que codifican para el polisacárido capsular tipo 5 o tipo 8 (CP5 o CP8, respectivamente), en nuestro caso, 91 fueron CP5+ y 52 CP8+. Aunque sí que hay un estudio que encuentra más virulentas las cepas que expresan CP5 que las CP8+ en un modelo en ratones (Watts et al., 2005), nosotros no hemos asociado esta diferencia estructural con patogenicidad (expresada en complicaciones en el transcurso de la bacteriemia).

Ambas cápsulas se encuentran formadas por las mismas subunidades de polisacáridos, difiriendo únicamente en la estructura estereoquímica de la unión glucosídica entre el azúcar y el sitio de O-acetilación (Scully et al., 2018). Se trata de un polisacárido que actúa como capsula “zwitterionica”, cargada tanto positiva como negativamente, que se comporta como una barrera antifagocítica y favorece la formación de abscesos, constituyendo un elemento clave para su patogenicidad. Ensayos in vitro demuestran que la presencia de la cápsula reduce la captura por parte de los neutrófilos en presencia de suero normal con opsoninas (Risley, Loughman, Cywes-Bentley, Foster, &



Lee, 2007) de lo que se deduce que la cápsula inhibe la opsonización (los factores del complemento se unen a la superficie de la pared celular por debajo de la cápsula polisacáridica, por lo que son inaccesibles a los receptores del complemento de la superficie de los neutrófilos impidiendo su interacción y haciendo a la bacteria resistente al killing opsonofagocítico mediado por el complemento). Por otro lado, la presencia de la capsula enmascara la acción de moléculas de adhesión claves para la interacción con el fibrinógeno y las plaquetas como *clfA* y *clbB*, disminuyendo entonces su virulencia; aunque es un tema todavía a debatir, ya que se ha visto que los mecanismos por los que *S. aureus* se une a las plaquetas y al fibrinógeno no son los mismos in vitro que in vivo (Risley et al., 2007).

La producción de esta cápsula se produce durante la fase postexponencial de crecimiento, y su composición está altamente influenciada por el ambiente y los nutrientes del medio en el que se encuentra a bacteria (Poutrel et al., 1997). Los cambios en la expresión de la cápsula pueden ser una adaptación que permite a la bacteria persistir en el torrente sanguíneo evadiendo el killing fagocítico (Howden et al., 2008).

V.4.1.5 PVL

Los pocos casos de bacteriemias en los que interviene PVL (Ellington et al., 2007) (en nuestro caso únicamente (5/143)), sugieren que esta toxina tiene escasa o nula repercusión en la severidad de las bacteriemias por *S. aureus* (Tabla V.12) (Figura V.22).

Tabla V.12: CMIs de *S. aureus* a vancomicina en función de las cepas que presentan o no el gen PVL.

		CMI BMD (mediana)	Rango CMI BMD	<i>P</i>	CMI Etest (mediana)	Rango CMI Etest	<i>P</i>
<i>PVL/ (luk F-PV y luk S-PV)</i>	SI	0.5	0.5-0.87 (0.37)	0.023	1.0	0.5-1.5 (1)	0.03
	No	0.63	0.5-1.25 (0.75)		1.0	0.5-1.5 (1)	

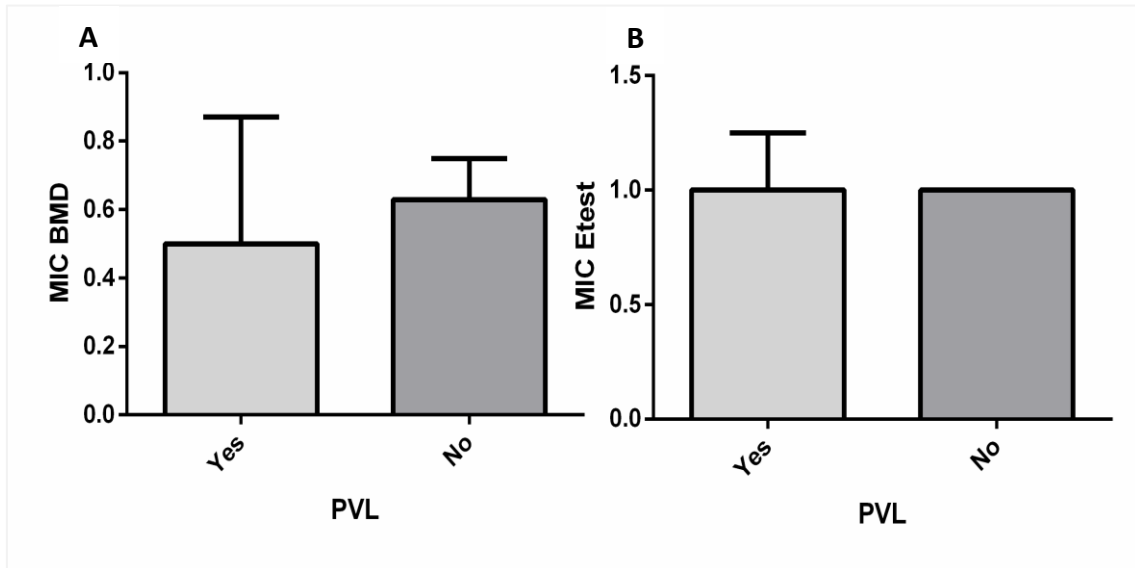


Figura V.22. CMI de vancomicina por BMD (A) y por Etest (B) en función de la presencia o no del gen de PVL.

La leucocidina de Pantón-Valentine (PVL) es una exotoxina codificada por dos genes (*lukS* y *lukF*). Dichos genes se encuentran en bacteriófagos, por lo que únicamente los poseen 1-2% de las cepas de *S. aureus*, predominantemente en CA-MRSA (Watkins et al., 2012) (Boyle-Vavra and Daum, 2007). Se trata de una toxina no hemolítica que induce cambios citotóxicos y citolíticos en las células polimorfonucleares humanas, monocitos y macrófagos (Ellington et al., 2007). No hay evidencia directa de la patogénesis de PVL. La mayoría de los estudios que analizan el papel de PVL lo enfocan en modelos de animales y en todo tipo de infecciones (piel, neumonías, abscesos...), pero hasta la fecha no se ha podido precisar si su presencia va a definir la evolución de la enfermedad. Los primeros estudios que apuntaban a que así lo hacía se basaban muchos de ellos en análisis con modelos de ratón, pero más tarde se observó que la toxina no se comportaba igual frente a los leucocitos murinos que con los humanos, de manera que no son representativos.



Históricamente, su presencia se ha asociado con infecciones de piel y tejidos blandos, neumonía necrotizante (Gillet et al., 2002) y fascitis necrosante letal (Boyle-Vavra and Daum, 2007); además, las secuelas clínicas de las infecciones pvl-positivas tienden a ser más severas, asociándose por ejemplo con mayores tasas de sepsis, fiebre alta, leucopenia, hemoptisis o muerte (Gillet et al., 2002). Sin embargo, en estudios recientes su presencia se ha asociado con mejor pronóstico en SAB (Lalani et al., 2008), e incluso un metaanálisis relaciona inversamente su presencia con infecciones invasivas (Shallcross et al., 2013).

Además de la destrucción de de PMNs y monocitos y la inducción de inflamación, PVL incrementa la virulencia por la inducción de la expresión de otros factores de virulencia, pero el camino que le lleva a producir necrosis tisular y sepsis severa está todavía por dilucidar (Boyle-Vavra and Daum, 2007). Así pues, el papel de PVL en la patogénesis de CA-MRSA resulta controvertido (Watkins et al., 2012).

V.4.1.6 Enterotoxinas

En nuestro estudio, de todos los genes que se analizaron en el array, únicamente *Sec* y *SeI* (que codifican enterotoxina C y L, respectivamente) se encontraban representados más en un grupo que en otro (sobrerrepresentado en el de bacteriemias complicadas; $P=0.01$) (Figura V.23). Además, la presencia de *Sec* y *SeI* fue el único factor que se asoció independientemente con BC en un modelo multivariado ajustado a las potenciales covariables clínicas relevantes, incluidas las características demográficas de los pacientes y comorbilidades, severidad de la infección, fuente de bacteriemia, manejo de la fuente de bacteriemia, acierto de tratamiento empírico y otros antibióticos (Tabla V.9). Como es de esperar, el uso de antibióticos no-betalactámicos y glicopeptidos se asoció independientemente con complicaciones en bacteriemias por MSSA (Tabla V.13).



Tabla V.13: Factores de riesgo para SAB complicada por MSSA: análisis univariante y multivariante.

Factor	Univariante		Multivariante	
	OR (95%CI)	P valor	OR (95%CI)	P valor
Edad (>70 vs. ≤70 años)	0.58 (0.23-1.51)	0.27		
Sexo (masculino vs. femenino)	1.13 (0.45-2.87)	0.79		
Índice de Charlson (≥3 vs. <3)	1.02 (0.36-2.88)	0.98		
Comorbilidades				
Diabetes Mellitus	0.74 (0.26-2.42)	0.62		
Enfermedad pulmonary crónica	1.23 (0.24-6.67)	0.79		
Cáncer	0.79 (0.24-2.60)	0.70		
Enfermedad renal crónica	0.65 (0.17-2.45)	0.53		
Terapia de primera línea (empírica) inapropiada	0.49 (0.10-2.31)	0.37		
Adquisición (Comunidad vs. Hospitalaria)	0.95 (0.35-2.56)	0.92		
Uso de Antibióticos				
Glicopéptidos	0.76 (0.27-2.14)	0.77		
β-lactámicos	1.24 (0.46-3.30)	0.67		
Otros agentes ^b	3.51 (1.28-9.67)	0.02	4.42 (1.50-12.99)	0.01
Shock séptico	2.6 (0.41-16.57)	0.31		
Inadecuado manejo clínico^c	6.21 (0.98-39.58)	0.05	-	NS
CMI de Vancomycin (µg/mL)^d	1.51 (0.04-55.73)	0.82		



BMD (≥ 0.5 $\mu\text{g/mL}$ vs. < 0.5 $\mu\text{g/mL}$)	1.11 (0.39-3.12)	0.85		
BMD ≥ 0.75 $\mu\text{g/mL}$ vs. < 0.75 $\mu\text{g/mL}$)	1.72 (0.66-4.479)	0.26		
Etest (≥ 1.5 $\mu\text{g/mL}$ vs. < 1.5 $\mu\text{g/mL}$)	1.69 (0.53-5.38)	0.38		
Índice de Killing (%)^e	1.53 (0.56-4.232)	0.39		
Índice de Killing ($< 60\%$ vs. 70%)	1.09 (0.44-2.72)	0.85		
Sec y Sel (Presencia vs. ausencia)	3.35 (1.27-8.80)	0.02	3.89 (1.2-12.58)	0.03

OR, Odds Ratio;

^aUso de agentes beta-lactámicos para bacteriemias causadas por MRSA, uso de Ciprofloxacino, Rifampicina o Piperacilina/Tazobactam, o ausencia de tratamiento empírico.

^bCiprofloxacino, Clindamicina, Daptomicina, Gentamicina, Levofloxacino, Linezolid, Meropenem, y Rifampicina.

^cInadecuado manejo clínico: (i) no retirada del catéter a las 72 h del establecimiento de la bacteriemia (n=2); (ii) ausencia de drenaje del lugar de la infección primaria (n=3).

^dValores de CMI de vancomicina analizados como una variable continua.

^eValores de índice de killing analizados como una variable continua.

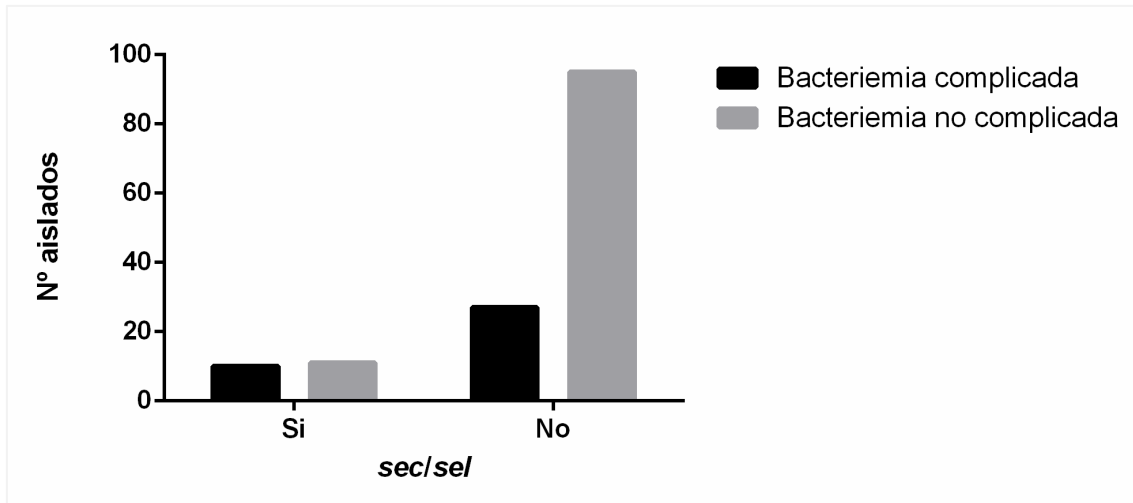


Figura V.23. Distribución del número de aislados de *S.aureus* que presentan o no el gen *Sec/Sel* en función de las complicaciones.

Los superantígenos de toxina pirogénica (PTSAgs; *pyrogenic toxin superantigens*) son un grupo de exotoxinas que engloba a TSST-1 y enterotoxinas. Como casi todas las proteínas secretadas por *S. aureus* se producen en la fase de crecimiento postexponencial. Sus genes se codifican en plásmidos, bacteriófagos o elementos genéticos móviles conocidos como islas de patogenicidad. Su expresión está controlada por tres sistemas reguladores globales: *agr* (accessory gene regulator), *sar* (staphylococcal accessory gene regulator) y “*catabolite repression system*” (sistema de represión de catabolitos).

Se han identificado distintos genes codificantes de enterotoxinas: *sea, seb, sec, sed, see, seh, sei, sej, sek, sel, seq, ser...* Todas ellas tienen características comunes entre las que se incluyen la capacidad de producir emésis y gastroenteritis, superantigenicidad, resistencia intermedia al calor y digestión de la pepsina y una estructura terciaria similar que incluye un puente disulfido intramolecular. (Dinges et al., 2000).

Los superantígenos tienen la capacidad de unirse simultáneamente a MHC de clase II y TCRs por la parte externa del surco de unión al antígeno. La especificidad de las múltiples enterotoxinas radica en este punto, ya que los aminoácidos de la cavidad de la cabeza de la molécula no están conservados entre las distintas SEs, por lo que la



interacción con los 3 loops de Vb (CDR1, CDR2 y HV4) va a ser distinta (Dinges et al., 2000). La unión con MHC de clase II y TCRs resulta en una excesiva respuesta inflamatoria que puede llevar a shock tóxico, fallo multiorgánico y muerte. (Li et al., 1999).

Estudiando las características genéticas de *S. aureus*, se han encontrado genes de enterotoxinas que están más frecuentemente representados en cepas productoras de SAB que en cepas no invasivas (Calderwood et al., 2013, Peacock et al., 2002). En concreto, (Calderwood et al., 2013) evalúan 30 genes de MRSA potencialmente asociados con invasión y virulencia y llegan a la conclusión de que el hecho de ser portadores de MRSA con *sep* (enterotoxina P) constituye un factor de riesgo para desarrollar MRSAB.

Nienhaber et al., al estudiar la diferencia entre aislados productores de infecciones de piel y EI, encontraron más frecuentemente los genes de *sea*, *sed*, *see* y *sei* en los aislados que producían endocarditis (Nienaber et al., 2011, Salgado-Pabón et al., 2013). (Rieg et al., 2013), también encuentran esta asociación, pero en concreto con enterotoxinas D, J y R. No es fácil de intuir la contribución de las enterotoxinas en la formación de EI, pero, más que una asociación causal, estos hallazgos reflejan un desequilibrio entre distintos factores de virulencia, lo que puede constituir un biomarcador de las cepas de *S. aureus* con más riesgo de producir EI (Nienaber et al., 2011).

De todos modos, no parece que la presencia de un solo gen sea un elemento causal suficiente para determinar la evolución de la enfermedad; es decir, que el marcador subrogado de virulencia parece ser más una asociación de “reordenamientos del genoma” que llevan a alteraciones epigenéticas o a la expresión del genoma central (Bouchiat et al., 2015).

A continuación, se describen los genes estudiados en los aislados de *S. aureus* productores de bacteriemia distribuidos en función de su presencia en bacteriemia complicada o no complicada (Tabla V.14).



Tabla V.14: Características genéticas de los aislados de <i>Staphylococcus aureus</i> productores de bacteriemias complicadas y no complicadas.			
Genes	Bacteriemia complicada Número de aislados (%) (n= 37)	Bacteriemia no complicada. Número de aislados (%) (n= 111)	<i>P</i> valor
MARCADORES DE ESPECIES			
<i>gapA</i>	37 (100)	106 (100)	-
<i>Kata</i>	37 (100)	106 (100)	-
<i>coA</i>	36 (97.3)	104 (99.0)	0.44
<i>nuc1</i>	37 (100)	106 (100)	-
<i>Spa</i>	37 (100)	103 (99.0)	0.55
<i>Sbi</i>	37 (100)	106 (100)	-
GENES REGULADORES			
<i>sarA</i>	37 (100)	104 (98.1)	0.40
<i>saeS</i>	37 (100)	105 (100)	-
<i>vraS</i>	37 (100)	106 (100)	-
<i>Hld</i>	37 (100)	106 (100)	-
GENES DE RESISTENCIA A METICILINA			
<i>mecA</i>	12 (32.4)	22 (21.2)	0.17
<i>plsSCC</i>	0 (0)	0 (0)	-
GENES DE RESISTENCIA: PENICILINASA			
<i>blaZ</i>	29 (78.4)	91 (85.8)	0.29
<i>blaI</i>	29 (78.4)	92 (88.5)	0.13
<i>blaR</i>	29 (78.4)	90 (84.9)	0.36
GENES DE RESISTENCIA: ANTIBIOTICOS-MLS			
<i>erm(A)</i>	3 (8.1)	6 (5.7)	0.60

<i>erm(B)</i>	37 (100)	106 (100)	-
<i>erm(C)</i>	6 (16.2)	10 (9.4)	0.26
<i>lnu(A)</i>	0 (0)	2 (1.9)	0.40
<i>msr(A)</i>	4 (10.4)	11 (10.4)	0.94
<i>mef(A)</i>	37 (100)	106 (100)	-
<i>mph(C)</i>	4 (10.8)	12 (11.4)	0.92
<i>vat(A)</i>	1 (2.7)	0 (0)	0.09
<i>vat(B)</i>	37 (100)	106 (100)	-
<i>vga(A)</i>	1 (2.7)	0 (0)	0.09
<i>vgB(A)</i>	37 (100)	106 (100)	-
GENES DE RESISTENCIA: AMINOGLICÓSIDOS			
<i>aacA-aphD</i>	4 (10.8)	7 (6.7)	0.42
<i>aadD</i>	3 (8.1)	11 (10.4)	0.69
<i>aphA3</i>	3 (8.1)	12 (11.3)	0.58
GENES DE RESISTENCIA: VARIOS			
<i>Sat</i>	3 (8.1)	11 (10.4)	0.69
<i>dfrS1</i>	37 (100)	106 (100)	-
<i>fusB</i>	37 (100)	106 (100)	-
<i>fusC</i>	0 (0)	1 (0.9)	0.55
<i>mupA</i>	2 (5.4)	2 (1.9)	0.26
<i>tet(K)</i>	1 (2.7)	3 (2.9)	0.96
<i>tet(M)</i>	1 (2.7)	1 (0.9)	0.43
<i>cat (total)</i>	37 (100)	106 (100)	-
<i>Cfr</i>	0 (0)	1 (0.9)	0.55
<i>fexA</i>	37 (100)	106 (100)	-
<i>fosB</i>	25 (67.6)	73 (70.2)	0.77



<i>fosB</i> (plasmid)	5 (13.9)	17 (16.7)	0.70
GENES DE RESISTENCIA: SISTEMAS DE EFLUJO			
<i>qacA</i>	0 (0)	2 (1.9)	0.40
<i>qacC</i> (total)	1 (2.7)	3 (2.8)	0.97
<i>sdrM</i>	32 (88.9)	99 (93.4)	0.38
GENES DE RESISTENCIA: GLICOPÉPTIDOS			
<i>vanA</i>	0 (0)	0 (0)	-
<i>vanB</i>	0 (0)	0 (0)	-
<i>vanZ</i>	0 (0)	0 (0)	-
GENES DE VIRULENCIA			
<i>tst1</i>	4 (10.8)	14 (13.2)	0.71
<i>Sea</i>	4 (1.8)	16 (15.1)	0.52
<i>Seb</i>	1 (3.0)	7 (6.7)	0.43
<i>Sec</i>	10 (27.0)	11 (10.4)	0.01
<i>Sed</i>	5 (13.5)	11 (10.4)	0.60
<i>See</i>	0 (0)	0 (0)	-
<i>Seg</i>	27 (77.1)	74 (70.5)	0.45
<i>Seh</i>	2 (5.4)	7 (6.6)	0.80
<i>Sei</i>	27 (75.0)	76 (72.4)	0.76
<i>Sej</i>	4 (11.1)	9 (8.5)	0.64
<i>Sek</i>	2 (5.4)	7 (6.6)	0.80
<i>Sel</i>	10 (27.0)	11 (10.4)	0.01
<i>Selm</i>	28 (75.7)	80 (75.5)	0.98
<i>seln</i>	28 (75.7)	75 (72.1)	0.68
<i>Selo</i>	27 (73.0)	75 (72.1)	0.92
<i>Egc</i>	28 (77.8)	80 (75.5)	0.78

<i>Seq</i>	2 (5.4)	7 (6.6)	0.80
<i>Ser</i>	4 (10.8)	8 (7.5)	0.54
<i>Selu</i>	25 (71.4)	74 (71.8)	0.96
<i>ORF CM14</i>	3 (8.1)	5 (4.7)	0.44
<i>lukF</i>	36 (97.3)	104 (100)	0.09
<i>lukS</i>	34 (94.4)	99 (96.1)	0.67
<i>hlgA</i>	34 (94.4)	100 (95.2)	0.85
<i>lukF-PV</i>	4 (10.8)	1 (0.9)	0.01
<i>lukS-PV</i>	4 (10.8)	1 (0.9)	0.01
<i>lukM</i>	0 (0)	0 (0)	-
<i>lukD</i>	20 (55.6)	62 (59.6)	0.67
<i>lukE</i>	19 (54.3)	57 (56.4)	0.83
<i>lukX</i>	29 (80.6)	81 (83.5)	0.69
<i>lukY</i>	29 (78.4)	81 (76.4)	0.81
<i>HI</i>	36 (97.3)	104 (98.1)	0.77
<i>Hla</i>	33 (94.3)	99 (96.1)	0.65
<i>Sak</i>	32 (86.5)	82 (77.4)	0.23
<i>Chp</i>	27 (75.0)	78 (74.3)	0.93
<i>Scn</i>	32 (86.5)	92 (86.8)	0.96
<i>etA</i>	0 (0)	3 (2.8)	0.30
<i>etB</i>	0 (0)	0 (0)	-
<i>etD</i>	2 (5.4)	5 (4.7)	0.87
<i>edinA</i>	0 (0)	0 (0)	-
<i>edinB</i>	3 (8.1)	5 (4.7)	0.44
<i>edinC</i>	0 (0)	0 (0)	-
<i>ACME cluster</i>	0 (0)	0 (0)	-



<i>arcA-SCC</i>	0 (0)	0 (0)	-
<i>arcB-SCC</i>	0 (0)	0 (0)	-
<i>arcC-SCC</i>	0 (0)	0 (0)	-
<i>arcD-SCC</i>	0 (0)	0 (0)	-
<i>Aur</i>	31 (93.9)	97 (96.0)	0.61
<i>splA</i>	20 (54.1)	63 (59.4)	0.57
<i>splB</i>	20 (54.1)	64 (61.0)	0.46
<i>splE</i>	11 (29.7)	42 (40.0)	0.27
<i>sspA</i>	37 (100)	106 (100)	-
<i>sspB</i>	37 (100)	106 (100)	-
<i>sspP (consensus)</i>	37 (100)	106 (100)	-
<i>setC/setx</i>	31 (86.1)	86 (82.7)	0.63
<i>ssl01/set6</i>	6 (16.2)	7 (6.6)	0.08
<i>setB3</i>	23 (62.2)	69 (65.7)	0.70
GENES DE LA CÁPSULA Y BIOFILMS			
<i>cap 1 (total)</i>	0 (0)	0 (0)	-
<i>cap 5 (total)</i>	28 (75.7)	63 (60.0)	0.09
<i>cap 8 (total)</i>	9 (25)	43 (40.6)	0.09
<i>icaA</i>	37 (100)	106 (100)	-
<i>icaC</i>	35 (94.6)	105 (99.1)	0.10
<i>icaD</i>	37 (100)	106 (100)	-
<i>Bap</i>	0 (0)	0 (0)	-
GENES DE ADHESIÓN Y MSCRAMM			
<i>bbp (total)</i>	34 (91.9)	82 (77.4)	0.05
<i>clfA (total)</i>	37 (100)	106 (100)	-
<i>clfB (total)</i>	37 (100)	106 (100)	-

<i>Cna</i>	15 (41.7)	47 (45.2)	0.71
<i>ebh</i>	33 (89.2)	87 (92.4)	0.55
<i>ebpS</i> (total)	37 (100)	105 (99.1)	0.55
<i>Eno</i>	37 (100)	106 (100)	-
<i>Fib</i>	22 (59.5)	70 (66.0)	0.47
<i>fnbA</i> (total)	36 (97.3)	105 (99.1)	0.43
<i>fnbB</i> (total)	31 (88.6)	91 (89.2)	0.92
<i>map</i> (total)	35 (94.6)	104 (8.1)	0.26
<i>sasG</i> (total)	23 (62.2)	61 (57.5)	0.62
<i>sdrC</i> (total)	36 (97.3)	106 (100)	0.90
<i>sdrD</i> (total)	36 (97.3)	94 (88.7)	0.12
<i>vwb</i> (total)	37 (100)	106 (100)	-
<i>isaB</i>	15 (60)	50 (61)	0.93
<i>mprF</i> (COL+MW2)	11 (78.6)	31 (81.6)	0.81
<i>isdA</i>	37 (100)	106 (100)	-
OTROS GENES			
<i>ImrP</i>	36 (97.3)	102 (97.1)	0.96
<i>hsdS1</i>	0 (0)	1 (0.9)	0.55
<i>hsdS2</i>	22 (59.5)	47 (44.3)	0.11
<i>hsdS3</i>	19 (51.4)	55 (53.9)	0.79
<i>hsdSx</i>	28 (84.8)	81 (79.4)	0.49
<i>Q2FXC0</i>	4 (11.1)	14 (13.5)	0.72
<i>Q2YUB3</i>	2 (7.1)	21 (25.9)	0.04
<i>Q7A4X2</i>	27 (73.0)	77 (74.0)	0.90
<i>hysA1</i>	4 (10.8)	16 (15.2)	0.51
<i>hysA2</i>	12 (36.4)	22 (22.7)	0.12



Así pues, los resultados discordantes encontrados hasta el momento pueden explicarse a) por la variabilidad que hay entre las distintas técnicas de medición de las CMI (BMD y Etest), que ya ha sido discutida en apartados anteriores y que podría implicar un importante sesgo. Se ha visto también que el efecto de una CMI de 2 µg/mL en la mortalidad se observa más fácilmente en estudios que emplean el Etest (Chen et al., 2013); b) por la disparidad de los factores que se interpretan en unos estudios y otros (resistencia a meticilina, enfermedades de base del paciente, fuente de la bacteriemia, definición de complicaciones... c) muy pocos estudios tienen en consideración el impacto de la terapia antibiótica empírica en la mortalidad, y ésta ya ha sido identificada como factor que repercute directamente en la mortalidad (Lodise et al., 2003) y d) otro factor que no se tiene en consideración en la mayoría de los estudios y que podría influir en la virulencia de las cepas es la adquisición del gen que les confiere resistencia a meticilina. Si que hay algunos autores que relacionan las infecciones por MRSA con mayores costes y limitadas opciones terapéuticas (Gordon and Lowy, 2008), pero no hay evidencias de que las cepas resistentes a meticilina sean más virulentas que las sensibles.

Además, otro aspecto a tener en cuenta es la repercusión que puede tener la exposición previa a concentraciones bajas del fármaco en cuanto a que la adaptación de las cepas les lleve a desarrollar ligera resistencia a la vancomicina, y estos mismos cambios le doten de patogenicidad. En relación a esto, está acreditado por ejemplo el aumento de la capacidad de formar biofilms con la expresión del sistema de regulación *sarA* (*staphylococcal accessory regulator A*) (Jacob and DiazGranados, 2013).

Queda así justificada la variedad de resultados obtenidos por los numerosos estudios que analizan el tema, pero el debate está todavía abierto. Todo apunta a que finalmente la CMI no es un marcador fenotípico relacionado con complicaciones y mortalidad. Es más, el hecho de que la mortalidad disminuya con altas CMIs ha sido acreditado por varios estudios (Kalil et al., 2014, van Hal et al., 2011b), en los que explican que las cepas hVISA, presentando una pared más gruesa con mayor entrecruzamiento del peptidoglicano, se asocia con menor virulencia, por lo que las



características microbiológicas que les confieren resistencia a vancomicina no se asocian con peores pronósticos.

La resistencia a vancomicina todavía resulta un suceso aislado, únicamente una pequeña proporción de las bacteriemias están causadas por MRSA y el porcentaje de cepas con CMIs en el límite de la sensibilidad es aún menor (Jacob and DiazGranados, 2013), por lo que no parece razonable el hecho de plantearse otra terapia empírica alternativa a la vancomicina. Además, no existe todavía ningún estudio de superioridad de los nuevos fármacos antiestafilocócicos: linezolid (Dennis et al., 2002), teicoplanina (Kalil et al., 2010), daptomicina (Fowler Jr et al., 2006) o telavancina (Rubinstein et al., 2011); por lo que el uso de estos agentes debe quedar todavía restringido para evitar desarrollo de resistencias.

VI. LIMITACIONES



A continuación se detallan las limitaciones que presenta este trabajo:

En primer lugar, en relación a los aislados de *S. aureus*, aunque la distribución clonal fue heterogénea, no se pueden descartar por completo sesgos de selección, sobre todo en relación a los aislados MRSA. Analizamos únicamente las cepas de nuestro centro, por lo que nuestras conclusiones pueden no hacerse extensibles a otros centros.

En segundo lugar, las cepas de *S. aureus* analizadas fueron criopreservadas. Nuestros datos no parecen indicar que la criopreservación impacte en la CMI a vancomicina medida por el método de microdilución, aunque no podemos afirmar taxativamente que así sea.

Asimismo, la edad de las colonias (es decir, la fase de crecimiento de la bacteria) no fue similar para todas las cepas (ya que los experimentos que se realizaron en paralelo se analizaron con una diferencia de 6 horas). Desconocemos cuál es el impacto que esto puede tener en la determinación de las CMIs de vancomicina.

En tercer lugar, la cohorte de pacientes que se incluye es limitada y heterogénea. Los escasos casos de complicaciones en SAB en nuestra serie conllevan una alta probabilidad de errores de tipo II y nos impide realizar análisis multivariados robustos.

En esta línea, los escasos eventos de muerte de nuestra serie imposibilitan cualquier análisis estadístico con sentido en relación al potencial efecto de las CMIs de *S. aureus* a vancomicina en mortalidad.

En cuarto lugar, los datos clínicos se recopilaron retrospectivamente, con la consiguiente posibilidad de pérdida de información. En este sentido, la incidencia de las recurrencias sólo se analizó en los pacientes hospitalizados. Por otro lado, las conclusiones deducidas del impacto de la correcta terapia antibiótica deben manejarse con cautela debido a la ausencia de control en la elección del antibiótico y la falta de datos de las concentraciones séricas de vancomicina.



VII. CONCLUSIONES





- La técnica del Etest no es un método preciso y reproducible para determinar la CMI de vancomicina para *S. aureus*.

- La CMI de vancomicina para *S. aureus* medida por un método de microdilución que incorpora un gradiente cuasicontinuo del antibiótico no se asocia al riesgo de bacteriemia complicada.

- El grosor de la pared celular de *S. aureus* inferido por el índice de killing fagocítico no se asocia con la CMI a vancomicina determinada por microdilución.

- La presencia de los genes que codifican las enterotoxinas C y L es el único parámetro (fenotípico y genotípico) que se asocia con el riesgo de bacteriemia complicada.

VIII. BIBLIOGRAFÍA





- ADANI, S., BHOWMICK, T., WEINSTEIN, M. P. & NARAYANAN, N. 2018. Impact of Vancomycin MIC on Clinical Outcomes of Patients with Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia Treated with Vancomycin at an Institution with Suppressed MIC Reporting. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 62, e02512-17.
- AGUADO, J. M., SAN-JUAN, R., FERNÁNDEZ-RUIZ, M. & CHAVES, F. 2012. Role of high vancomycin minimum inhibitory concentration in the outcome of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Journal of Infectious Diseases*, 205, 1024-1025.
- AGUADO, J. M., SAN-JUAN, R., LALUEZA, A., SANZ, F., RODRÍGUEZ-OTERO, J., GÓMEZ-GONZALEZ, C. & CHAVES, F. 2011. High vancomycin MIC and complicated methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Emerging infectious diseases*, 17, 1099.
- ANANTHA, R. V., JEGATHESWARAN, J., PEPE, D. L., PRIESTAP, F., DELPORT, J., HAERYFAR, S. M., MCCORMICK, J. K. & MELE, T. 2014. Risk factors for mortality among patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia: a single-centre retrospective cohort study. *CMAJ open*, 2, E352.
- ARCHER, G. L. 1998. *Staphylococcus aureus*: a well-armed pathogen. *Reviews of Infectious Diseases*, 26, 1179-1181.
- BABA, T., BAE, T., SCHNEEWIND, O., TAKEUCHI, F. & HIRAMATSU, K. 2008. Genome sequence of *Staphylococcus aureus* strain Newman and comparative analysis of staphylococcal genomes: polymorphism and evolution of two major pathogenicity islands. *Journal of bacteriology*, 190, 300-310.
- BAIRD-PARKER, A. 1990. The staphylococci: an introduction. *Journal of Applied Bacteriology*, 69, 1S-8S.
- BAKER, C. N., STOCKER, S. A., CULVER, D. H. & THORNSBERRY, C. 1991. Comparison of the E Test to agar dilution, broth microdilution, and agar diffusion susceptibility testing techniques by using a special challenge set of bacteria. *Journal of clinical microbiology*, 29, 533-538.
- BALOUIRI, M., SADIKI, M. & IBNSOUDA, S. K. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, 6, 71-79.
- BAXI, S. M., CLEMENZI-ALLEN, A., GAHBAUER, A., DECK, D., IMP, B., VITTINGHOFF, E., CHAMBERS, H. F. & DOERNBERG, S. 2016. Vancomycin MIC does not predict 90-day mortality, readmission, or recurrence in a prospective cohort of adults with



- Staphylococcus aureus bacteremia. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 60, 5276-5284.
- BECKER, K., SKOV, R. L. & VON EIFF, C. 2015. Staphylococcus, Micrococcus, and other catalase-positive cocci. *Manual of Clinical Microbiology, Eleventh Edition*. American Society of Microbiology.
- BENNETT, J. E., DOLIN, R. & BLASER, M. J. 2014. *Principles and practice of infectious diseases*, Elsevier Health Sciences.
- BERGHAUS, L. J., GIGUÈRE, S., GULDBECH, K., WARNER, E., UGORJI, U. & BERGHAUS, R. D. 2015. Comparison of Etest, disk diffusion, and broth macrodilution for in vitro susceptibility testing of *Rhodococcus equi*. *Journal of clinical microbiology*, 53, 314-318.
- BLASCO, A. C., ALFARO, L. A., REINOSO, J. C., MESTRE, M. J. G. & RODRÍGUEZ-GASCÓN, A. 2015. Análisis farmacocinético-farmacodinámico en microbiología: herramienta para evaluar el tratamiento antimicrobiano. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33, 48-57.
- BONAR, E., WÓJCIK, I. & WLADYKA, B. 2015. Proteomics in studies of *Staphylococcus aureus* virulence. *Acta Biochimica Polonica*, 62.
- BOUCHIAT, C., MOREAU, K., DEVILLARD, S., RASIGADE, J.-P., MOSNIER, A., GEISSMANN, T., BES, M., TRISTAN, A., LINA, G. & LAURENT, F. 2015. *Staphylococcus aureus* infective endocarditis versus bacteremia strains: subtle genetic differences at stake. *Infection, Genetics and Evolution*, 36, 524-530.
- BOUILLER, K., LABORDE, C., AHO, S. L., HOCQUET, D., PECHINOT, A., LE MOING, V., BERTRAND, X., PIROTH, L. & CHIROUZE, C. 2018. No effect of vancomycin MIC \geq 1.5 mg/L on treatment outcome in methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *International journal of antimicrobial agents*, 51, 721-726.
- BOYLE-VAVRA, S. & DAUM, R. S. 2007. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Panton–Valentine leukocidin. *Laboratory investigation*, 87, 3.
- BRINKMANN, V., REICHARD, U., GOOSMANN, C., FAULER, B., UHLEMANN, Y., WEISS, D. S., WEINRAUCH, Y. & ZYCHLINSKY, A. 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *science*, 303, 1532-1535.
- CALDERWOOD, M. S., DESJARDINS, C. A., SAKOULAS, G., NICOL, R., DUBOIS, A., DELANEY, M. L., KLEINMAN, K., COSIMI, L. A., FELDGARDEN, M. & ONDERDONK, A. B. 2013. Staphylococcal enterotoxin P predicts bacteremia in hospitalized patients colonized with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Journal of infectious diseases*, 209, 571-577.



- CAMERON, D. R., JIANG, J.-H., KOSTOULIAS, X., FOXWELL, D. J. & PELEG, A. Y. 2016. Vancomycin susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is mediated by YchI activation of the WalRK essential two-component regulatory system. *Scientific reports*, 6, 30823.
- CANTÓN, R., SÁNCHEZ, J. E., GÓMEZ-LUS, M. L., MARTÍNEZ, L. M., RODRÍGUEZ-AVIAL, C. & VILA, J. 2000. Procedimientos en microbiología clínica. *Métodos Básicos Para el Estudio de la Sensibilidad a los Antimicrobianos en Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Editor Picazo J J.
- CERVERA, C., CASTAÑEDA, X., DE LA MARIA, C. G., DEL RIO, A., MORENO, A., SOY, D., PERICAS, J. M., FALCES, C., ARMERO, Y. & ALMELA, M. 2014. Effect of vancomycin minimal inhibitory concentration on the outcome of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* endocarditis. *Clinical Infectious Diseases*, 58, 1668-1675.
- CISNEROS-HERREROS, J. M., COBO-REINOSO, J., PUJOL-ROJO, M., RODRÍGUEZ-BAÑO, J. & SALAVERT-LLETÍ, M. 2007. Guía para el diagnóstico y tratamiento del paciente con bacteriemia. Guías de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*, 25, 111-130.
- COREY, G. R. 2009. *Staphylococcus aureus* bloodstream infections: definitions and treatment. *Clinical Infectious Diseases*, 48, S254-S259.
- COSGROVE, S. E., SAKOULAS, G., PERENCEVICH, E. N., SCHWABER, M. J., KARCHMER, A. W. & CARMELI, Y. 2003. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. *Clinical infectious diseases*, 36, 53-59.
- CUI, L., IWAMOTO, A., LIAN, J.-Q., NEOH, H.-M., MARUYAMA, T., HORIKAWA, Y. & HIRAMATSU, K. 2006. Novel mechanism of antibiotic resistance originating in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50, 428-438.
- CUI, L., MA, X., SATO, K., OKUMA, K., TENOVER, F. C., MAMIZUKA, E. M., GEMMELL, C. G., KIM, M.-N., PLOY, M.-C. & EL SOLH, N. 2003. Cell wall thickening is a common feature of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical microbiology*, 41, 5-14.
- CUI, L., MURAKAMI, H., KUWAHARA-ARAI, K., HANAKI, H. & HIRAMATSU, K. 2000. Contribution of a thickened cell wall and its glutamine nonamidated component to the vancomycin resistance expressed by *Staphylococcus aureus* Mu50. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44, 2276-2285.



- CHARLTON, C. L., HINDLER, J. A., TURNIDGE, J. & HUMPHRIES, R. M. 2014. Precision of vancomycin and daptomycin MICs for MRSA and the effect of subculture and storage. *Journal of clinical microbiology*, JCM. 01571-14.
- CHEN, S.-Y., LIAO, C.-H., WANG, J.-L., CHIANG, W.-C., LAI, M.-S., CHIE, W.-C., CHANG, S.-C. & HSUEH, P.-R. 2013. Method-specific performance of vancomycin MIC susceptibility tests in predicting mortality of patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69, 211-218.
- CHONG, Y. P., PARK, S.-J., KIM, H. S., KIM, E. S., KIM, M.-N., PARK, K.-H., KIM, S.-H., LEE, S.-O., CHOI, S.-H. & JEONG, J.-Y. 2013. Persistent *Staphylococcus aureus* bacteremia: a prospective analysis of risk factors, outcomes, and microbiologic and genotypic characteristics of isolates. *Medicine*, 92, 98.
- CHOO, E. J. & CHAMBERS, H. F. 2016. Treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Infection & chemotherapy*, 48, 267-273.
- DAYAN, G. H., MOHAMED, N., SCULLY, I. L., COOPER, D., BEGIER, E., EIDEN, J., JANSEN, K. U., GURTMAN, A. & ANDERSON, A. S. 2016. *Staphylococcus aureus*: the current state of disease, pathophysiology and strategies for prevention. *Expert review of vaccines*, 15, 1373-1392.
- DENNIS, L. S., DANIEL, H., HARRY, L., JOHN, L. H., DONALD, H. B., BARRY, H. & GROUP, L. M. S. 2002. Linezolid versus vancomycin for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Clinical Infectious Diseases*, 34, 1481-1490.
- DINGES, M. M., ORWIN, P. M. & SCHLIEVERT, P. M. 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical microbiology reviews*, 13, 16-34.
- DMITRIEV, B. A., TOUKACH, F. V., HOLST, O., RIETSCHER, E. & EHLERS, S. 2004. Tertiary structure of *Staphylococcus aureus* cell wall murein. *Journal of bacteriology*, 186, 7141-7148.
- DUCKWORTH, G. J. & JORDENS, J. Z. 1990. Adherence and survival properties of an epidemic methicillin-resistant strain of *Staphylococcus aureus* compared with those of methicillin-sensitive strains. *Journal of Medical Microbiology*, 32, 195-200.
- EDWARDS, B., MILNE, K., LAWES, T., COOK, I., ROBB, A. & GOULD, I. 2011. Is Vancomycin MIC 'creep' method dependent? Analysis of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) susceptibility trends in blood isolates from North East Scotland, 2006-10. *Journal of clinical microbiology*, JCM. 05520-11.



- ELLINGTON, M. J., HOPE, R., GANNER, M., GANNER, M., EAST, C., BRICK, G. & KEARNS, A. M. 2007. Is Panton–Valentine leucocidin associated with the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* bacteraemia in the UK? *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 60, 402-405.
- FEIL, E. J., COOPER, J. E., GRUNDMANN, H., ROBINSON, D. A., ENRIGHT, M. C., BERENDT, T., PEACOCK, S. J., SMITH, J. M., MURPHY, M. & SPRATT, B. G. 2003. How clonal is *Staphylococcus aureus*? *Journal of bacteriology*, 185, 3307-3316.
- FERNÁNDEZ-HIDALGO, N., RIBERA, A., LARROSA, M., VIEDMA, E., ORIGÜEN, J., DE ALARCÓN, A., FARIÑAS, M., SÁEZ, C., PEÑA, C. & MÚÑEZ, E. 2018. Impact of *Staphylococcus aureus* phenotype and genotype on the clinical characteristics and outcome of infective endocarditis. A multicentre, longitudinal, prospective, observational study. *Clinical Microbiology and Infection*, 24, 985-991.
- FOSTER, T. J. 2004. The *Staphylococcus aureus* “superbug”. *The Journal of clinical investigation*, 114, 1693-1696.
- FOSTER, T. J. 2005. Immune evasion by staphylococci. *Nature reviews microbiology*, 3, 948.
- FOWLER JR, V. G., BOUCHER, H. W., COREY, G. R., ABRUTYN, E., KARCHMER, A. W., RUPP, M. E., LEVINE, D. P., CHAMBERS, H. F., TALLY, F. P. & VIGLIANI, G. A. 2006. Daptomycin versus standard therapy for bacteremia and endocarditis caused by *Staphylococcus aureus*. *New England Journal of Medicine*, 355, 653-665.
- FOWLER JR, V. G., JUSTICE, A., MOORE, C., BENJAMIN JR, D. K., WOODS, C. W., CAMPBELL, S., RELLER, L. B., COREY, G. R., DAY, N. P. & PEACOCK, S. J. 2005. Risk Factors For Hematogenous Complications of Intravascular Catheter—Associated *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Clinical infectious diseases*, 40, 695-703.
- FOWLER JR, V. G., NELSON, C. L., MCINTYRE, L. M., KREISWIRTH, B. N., MONK, A., ARCHER, G. L., FEDERSPIEL, J., NAIDICH, S., REMORTEL, B. & RUDE, T. 2007. Potential associations between hematogenous complications and bacterial genotype in *Staphylococcus aureus* infection. *The Journal of infectious diseases*, 196, 738-747.
- FOWLER JR, V. G., SAKOULAS, G., MCINTYRE, L. M., MEKA, V. G., ARBEIT, R. D., CABELL, C. H., STRYJEWSKI, M. E., ELIOPOULOS, G. M., BARTH RELLER, L. & RALPH COREY, G. 2004. Persistent bacteremia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection is associated with agr dysfunction and low-level in vitro resistance to thrombin-induced platelet microbicidal protein. *The Journal of infectious diseases*, 190, 1140-1149.



- FOWLER, V. G., OLSEN, M. K., COREY, G. R., WOODS, C. W., CABELL, C. H., RELLER, L. B., CHENG, A. C., DUDLEY, T. & ODDONE, E. Z. 2003. Clinical identifiers of complicated *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Archives of internal medicine*, 163, 2066-2072.
- GARRITY, G. M., BELL, J. A. & LILBURN, T. 2004. Taxonomic outline of the prokaryotes. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Springer, New York, Berlin, Heidelberg.
- GASCH, O., CAMOEZ, M., DOMINGUEZ, M., PADILLA, B., PINTADO, V., ALMIRANTE, B., MARTÍN-GANDUL, C., LÓPEZ-MEDRANO, F., DE GOPEGUI, E. R. & RAMÓN BLANCO, J. 2014. Lack of association between genotypes and haematogenous seeding infections in a large cohort of patients with methicillin-resistant *S* taphylococcus aureus bacteraemia from 21 Spanish hospitals. *Clinical Microbiology and Infection*, 20, 361-367.
- GILLET, Y., ISSARTEL, B., VANHEMS, P., FOURNET, J.-C., LINA, G., BES, M., VANDENESCH, F., PIÉMONT, Y., BROUSSE, N. & FLORET, D. 2002. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *The Lancet*, 359, 753-759.
- GIULIERI, S. G., HOLMES, N. E., STINEAR, T. P. & HOWDEN, B. P. 2016. Use of bacterial whole-genome sequencing to understand and improve the management of invasive *Staphylococcus aureus* infections. *Expert review of anti-infective therapy*, 14, 1023-1036.
- GORDON, R. J. & LOWY, F. D. 2008. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clinical infectious diseases*, 46, S350-S359.
- GOULD, I. M. 2007. MRSA bacteraemia. *International journal of antimicrobial agents*, 30, 66-70.
- GUDIOL, C., CUERVO, G., SHAW, E., PUJOL, M. & CARRATALÀ, J. 2017. Pharmacotherapeutic options for treating *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 18, 1947-1963.
- GUDIOL, F., AGUADO, J. M., ALMIRANTE, B., BOUZA, E., CERCENADO, E., DOMÍNGUEZ, M. Á., GASCH, O., LORA-TAMAYO, J., MIRÓ, J. M. & PALOMAR, M. 2015. 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). *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*, 33, 625. e1-625. e23.
- GUPTA, P., KHARE, V., KUMAR, D., AHMAD, A., BANERJEE, G. & SINGH, M. 2015. Comparative evaluation of disc diffusion and E-test with broth micro-dilution in



- susceptibility testing of amphotericin B, voriconazole and caspofungin against clinical *Aspergillus* isolates. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, 9, DC04.
- HIDAYAT, L. K., HSU, D. I., QUIST, R., SHRINER, K. A. & WONG-BERINGER, A. 2006. High-dose vancomycin therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: efficacy and toxicity. *Archives of internal medicine*, 166, 2138-2144.
- HOLMES, N. E., TONG, S. Y., DAVIS, J. S. & VAN HAL, S. J. Treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: vancomycin and beyond. *Seminars in respiratory and critical care medicine*, 2015. Thieme Medical Publishers, 017-030.
- HOLMES, N. E., TURNIDGE, J. D., MUNCKHOF, W. J., ROBINSON, J. O., KORMAN, T. M., O'SULLIVAN, M. V., ANDERSON, T. L., ROBERTS, S. A., WARREN, S. J. & COOMBS, G. W. 2014. Genetic and molecular predictors of high vancomycin minimum inhibitory concentration in *Staphylococcus aureus* bacteremia isolates. *Journal of clinical microbiology*, JCM. 01320-14.
- HOLMES, N. E., TURNIDGE, J. D., MUNCKHOF, W. J., ROBINSON, J. O., KORMAN, T. M., O'SULLIVAN, M. V., ANDERSON, T. L., ROBERTS, S. A., GAO, W. & CHRISTIANSEN, K. J. 2011. Antibiotic choice may not explain poorer outcomes in patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia and high vancomycin minimum inhibitory concentrations. *Journal of Infectious Diseases*, 204, 340-347.
- HOLUBAR, M., MENG, L. & DERESINSKI, S. 2016. Bacteremia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: new therapeutic approaches. *Infectious Disease Clinics*, 30, 491-507.
- HOLLAND, T. L., ARNOLD, C. & FOWLER, V. G. 2014. Clinical management of *Staphylococcus aureus* bacteremia: a review. *Jama*, 312, 1330-1341.
- HOLLAND, T. L. & FOWLER JR, V. G. 2011. Vancomycin minimum inhibitory concentration and outcome in patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia: pearl or pellet? : Oxford University Press.
- HOS, N. J., JAZMATI, N., STEFANIK, D., HELLMICH, M., ALSAEL, H., KERN, W. V., RIEG, S., WISPLINGHOFF, H., SEIFERT, H. & KAASCH, A. J. 2017. Determining vancomycin Etest MICs in patients with MRSA bloodstream infection does not support switching antimicrobials. *Journal of Infection*, 74, 248-259.
- HOS, N. J., RIEG, S., KERN, W. V., JONAS, D., FOWLER JR, V. G., HIGGINS, P. G., SEIFERT, H. & KAASCH, A. J. 2015. Amino acid alterations in fibronectin binding protein A (FnBPA) and bacterial genotype are associated with cardiac device related



- infection in *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *Journal of Infection*, 70, 153-159.
- HOWDEN, B. P., DAVIES, J. K., JOHNSON, P. D., STINEAR, T. P. & GRAYSON, M. L. 2010. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. *Clinical microbiology reviews*, 23, 99-139.
- HOWDEN, B. P., JOHNSON, P. D., WARD, P. B., STINEAR, T. P. & DAVIES, J. K. 2006. Isolates with low-level vancomycin resistance associated with persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50, 3039-3047.
- HOWDEN, B. P., SMITH, D. J., MANSELL, A., JOHNSON, P. D., WARD, P. B., STINEAR, T. P. & DAVIES, J. K. 2008. Different bacterial gene expression patterns and attenuated host immune responses are associated with the evolution of low-level vancomycin resistance during persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *BMC microbiology*, 8, 39.
- HSU, D. I., HIDAYAT, L. K., QUIST, R., HINDLER, J., KARLSSON, A., YUSOF, A. & WONG-BERINGER, A. 2008. Comparison of method-specific vancomycin minimum inhibitory concentration values and their predictability for treatment outcome of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections. *International journal of antimicrobial agents*, 32, 378-385.
- HU, Q., PENG, H. & RAO, X. 2016. Molecular events for promotion of vancomycin resistance in vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in microbiology*, 7, 1601.
- IBRAHIM, E. H., SHERMAN, G., WARD, S., FRASER, V. J. & KOLLEF, M. H. 2000. The influence of inadequate antimicrobial treatment of bloodstream infections on patient outcomes in the ICU setting. *Chest*, 118, 146-155.
- JACOB, J. T. & DIAZGRANADOS, C. A. 2013. High vancomycin minimum inhibitory concentration and clinical outcomes in adults with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: a meta-analysis. *International Journal of Infectious Diseases*, 17, e93-e100.
- JARRAUD, S., MOUGEL, C., THIOULOUSE, J., LINA, G., MEUGNIER, H., FOREY, F., NESME, X., ETIENNE, J. & VANDENESCH, F. 2002. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. *Infection and immunity*, 70, 631-641.



- JOKINEN, E., LAINE, J., HUTTUNEN, R., LYTIKÄINEN, O., VUENTO, R., VUOPIO, J. & SYRJÄNEN, J. 2018. Trends in incidence and resistance patterns of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Infectious Diseases*, 50, 52-58.
- KALIL, A. C., MURTHY, M. H., HERMSEN, E. D., NETO, F. K., SUN, J. & RUPP, M. E. 2010. Linezolid versus vancomycin or teicoplanin for nosocomial pneumonia: a systematic review and meta-analysis. *Critical care medicine*, 38, 1802-1808.
- KALIL, A. C., VAN SCHOONEVELD, T. C., FEY, P. D. & RUPP, M. E. 2014. Association between vancomycin minimum inhibitory concentration and mortality among patients with *Staphylococcus aureus* bloodstream infections: a systematic review and meta-analysis. *Jama*, 312, 1552-1564.
- KANG, C., KIM, Y., JUNG, S.-I., PARK, W., SONG, K.-H., PARK, K.-H., CHOE, P., JANG, H.-C., LEE, S. & KIM, Y.-S. 2017. agr functionality affects clinical outcomes in patients with persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 36, 2187-2191.
- KEEL, R. A., SUTHERLAND, C. A., ASLANZADEH, J., NICOLAU, D. P. & KUTI, J. L. 2010. Correlation between vancomycin and daptomycin MIC values for methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by 3 testing methodologies. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 68, 326-329.
- KEYNAN, Y. & RUBINSTEIN, E. 2013. *Staphylococcus aureus* bacteremia, risk factors, complications, and management. *Critical care clinics*, 29, 547-562.
- KHATIB, R., RIEDERER, K., SHEMES, S., MUSTA, A. & SZPUNAR, S. 2013. Correlation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* vancomycin minimal inhibitory concentration results by Etest and broth microdilution methods with population analysis profile: lack of Etest overestimation of the MIC. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 32, 803-806.
- KIEDROWSKI, M. R., KAVANAUGH, J. S., MALONE, C. L., MOOTZ, J. M., VOYICH, J. M., SMELTZER, M. S., BAYLES, K. W. & HORSWILL, A. R. 2011. Nuclease modulates biofilm formation in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PloS one*, 6, e26714.
- KOLLEF, M. H., WARD, S., SHERMAN, G., PRENTICE, D., SCHAFF, R., HUEY, W. & FRASER, V. J. 2000. Inadequate treatment of nosocomial infections is associated with certain empiric antibiotic choices. *Critical care medicine*, 28, 3456-3464.
- KRUZEL, M. C., LEWIS, C. T., WELSH, K. J., LEWIS, E. M., DUNDAS, N. E., MOHR, J. F., ARMITIGE, L. Y. & WANGER, A. 2011. Determination of vancomycin and daptomycin MICs by different testing methods for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical microbiology*, 49, 2272-2273.



- LALANI, T., FEDERSPIEL, J. J., BOUCHER, H. W., RUDE, T. H., BAE, I.-G., RYBAK, M. J., TONTHAT, G. T., COREY, G. R., STRYJEWSKI, M. E. & SAKOULAS, G. 2008. Associations between the genotypes of *Staphylococcus aureus* bloodstream isolates and clinical characteristics and outcomes of bacteremic patients. *Journal of clinical microbiology*, 46, 2890-2896.
- LAUPLAND, K. B., LYYTIKÄINEN, O., SGAARD, M., KENNEDY, K., KNUDSEN, J. D., OSTERGAARD, C., GALBRAITH, J., VALIQUETTE, L., JACOBSSON, G. & COLLIGNON, P. 2013. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus* bloodstream infection: a multinational population-based surveillance study. *Clinical microbiology and infection*, 19, 465-471.
- LAUTENSCHLAGER, S., HERZOG, C. & ZIMMERLI, W. 1993. Course and outcome of bacteremia due to *Staphylococcus aureus*: evaluation of different clinical case definitions. *Clinical Infectious Diseases*, 16, 567-573.
- LE MOING, V., ALLA, F., DOCO-LECOMPTE, T., DELAHAYE, F., PIROTH, L., CHIROUZE, C., TATTEVIN, P., LAVIGNE, J.-P., ERPELDING, M.-L. & HOEN, B. 2015. *Staphylococcus Aureus* bloodstream infection and Endocarditis-a prospective cohort study. *PloS one*, 10, e0127385.
- LEE, L. Y., HÖÖK, M., HAVILAND, D., WETSEL, R. A., YONTER, E. O., SYRIBEYS, P., VERNACHIO, J. & BROWN, E. L. 2004. Inhibition of complement activation by a secreted *Staphylococcus aureus* protein. *Journal of Infectious Diseases*, 190, 571-579.
- LI, H., LLERA, A., MALCHIODI, E. L. & MARIUZZA, R. A. 1999. The structural basis of T cell activation by superantigens. *Annual review of immunology*, 17, 435-466.
- LI, M., DIEP, B. A., VILLARUZ, A. E., BRAUGHTON, K. R., JIANG, X., DELEO, F. R., CHAMBERS, H. F., LU, Y. & OTTO, M. 2009. Evolution of virulence in epidemic community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 5883-5888.
- LILJE, B., RASMUSSEN, R. V., DAHL, A., STEGGER, M., SKOV, R. L., FOWLER JR, V. G., NG, K. L., KIIL, K., LARSEN, A. R. & PETERSEN, A. 2017. Whole-genome sequencing of bloodstream *Staphylococcus aureus* isolates does not distinguish bacteraemia from endocarditis. *Microbial genomics*, 3.
- LIU, C., BAYER, A., COSGROVE, S. E., DAUM, R. S., FRIDKIN, S. K., GORWITZ, R. J., KAPLAN, S. L., KARCHMER, A. W., LEVINE, D. P. & MURRAY, B. E. 2011. Clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children. *Clinical infectious diseases*, 52, e18-e55.



- LIU, Y., DU, F.-L., LIU, P.-P., MEI, Y.-F., WAN, L.-G., WEI, D.-D., XU, H.-Y. & ZHANG, W. 2018. Molecular Epidemiology and Virulence Features of *Staphylococcus aureus* Bloodstream Isolates in a Regional Burn Center in China, 2012–2016. *Microbial Drug Resistance*.
- LODISE, T. P., MCKINNON, P. S., SWIDERSKI, L. & RYBAK, M. J. 2003. Outcomes analysis of delayed antibiotic treatment for hospital-acquired *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clinical infectious diseases*, 36, 1418-1423.
- LONGO, D. L. 2012. *Harrison: principios de medicina interna (18a)*, McGraw Hill Mexico.
- LÓPEZ-CORTÉS, L., VELASCO, C., RETAMAR, P., DEL TORO, M., GALVEZ-ACEBAL, J., DE CUETO, M., GARCIA-LUQUE, I., CABALLERO, F., PASCUAL, A. & RODRIGUEZ-BANO, J. 2015. Is reduced vancomycin susceptibility a factor associated with poor prognosis in MSSA bacteraemia? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70, 2652-2660.
- LOWY, F. D. 1998. *Staphylococcus aureus* infections. *New England journal of medicine*, 339, 520-532.
- LUDWIG, F., EDWARDS, B., LAWES, T. & GOULD, I. M. 2012. Effects of Storage on Vancomycin and Daptomycin MIC in 'susceptible' blood isolates of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical microbiology*, JCM. 01158-12.
- MALACHOWA, N., WHITNEY, A. R., KOBAYASHI, S. D., STURDEVANT, D. E., KENNEDY, A. D., BRAUGHTON, K. R., SHABB, D. W., DIEP, B. A., CHAMBERS, H. F. & OTTO, M. 2011. Global changes in *Staphylococcus aureus* gene expression in human blood. *PloS one*, 6, e18617.
- MARBACH, H., BOAKES, E., LYNHAM, S., WARD, M., OTTER, J. A. & EDGEWORTH, J. D. 2017. Identification of a distinctive phenotype for endocarditis-associated clonal complex 22 MRSA isolates with reduced vancomycin susceptibility. *Journal of medical microbiology*, 66, 584-591.
- MASON, E. O., LAMBERTH, L. B., HAMMERMAN, W. A., HULTEN, K. G., VERSALOVIC, J. & KAPLAN, S. L. 2009. Vancomycin MICs for *Staphylococcus aureus* vary by detection method and have subtly increased in a pediatric population since 2005. *Journal of Clinical Microbiology*, 47, 1628-1630.
- MATHER, C. A., WERTH, B. J., SIVAGNANAM, S., SENGUPTA, D. J. & BUTLER-WU, S. M. 2016. Rapid Detection of Vancomycin Intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) by Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). *Journal of clinical microbiology*, JCM. 02428-15.



- MCGUINNESS, W. A., MALACHOWA, N. & DELEO, F. R. 2017. Focus: Infectious Diseases: Vancomycin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *The Yale journal of biology and medicine*, 90, 269.
- MÉHES, L., TASKÓ, S., SZÉKELY, A., TÓTH, Á., UNGVÁRI, E., ERDEI, I., DOMBRÁDI, Z., SZABÓ, J. & MARÓDI, L. 2012. Phagocytosis and intracellular killing of heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of medical microbiology*, 61, 198-203.
- MELZER, M., EYKYN, S., GRANSDEN, W. & CHINN, S. 2003. Is methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* more virulent than methicillin-susceptible *S. aureus*? A comparative cohort study of British patients with nosocomial infection and bacteremia. *Clinical Infectious Diseases*, 37, 1453-1460.
- MELLES, D. C., GORKINK, R. F., BOELENS, H. A., SNIJDERS, S. V., PEETERS, J. K., MOORHOUSE, M. J., VAN DER SPEK, P. J., VAN LEEUWEN, W. B., SIMONS, G. & VERBRUGH, H. A. 2004. Natural population dynamics and expansion of pathogenic clones of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of clinical investigation*, 114, 1732-1740.
- MITCHELL, D. & HOWDEN, B. 2005. Diagnosis and management of *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *Internal medicine journal*, 35, S17-S24.
- MOELLERING JR, R. C. 2006. Vancomycin: a 50-year reassessment. The University of Chicago Press.
- MOISE-BRODER, P. A., SAKOULAS, G., ELIOPOULOS, G. M., SCHENTAG, J. J., FORREST, A. & MOELLERING JR, R. C. 2004. Accessory gene regulator group II polymorphism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is predictive of failure of vancomycin therapy. *Clinical infectious diseases*, 38, 1700-1705.
- MOISE, P. A. & SAKOULAS, G. 2015. *Staphylococcus aureus* bacteraemia management: where do we stand and where are we going? *BMJ Evidence-Based Medicine*, 20, 126-126.
- MOISE, P. A., SMYTH, D. S., ROBINSON, D. A., EL-FAWAL, N., MCCALLA, C. & SAKOULAS, G. 2009. Genotypic and phenotypic relationships among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from three multicentre bacteraemia studies. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 63, 873-876.
- MONECKE, S., BERGER-BÄCHI, B., COOMBS, G., HOLMES, A., KAY, I., KEARNS, A., LINDE, H., O'BRIEN, F., SLICKERS, P. & EHRLICH, R. 2007. Comparative genomics and DNA array-based genotyping of pandemic *Staphylococcus aureus* strains encoding Panton-Valentine leukocidin. *Clinical Microbiology and Infection*, 13, 236-249.



- MONECKE, S., SLICKERS, P., HOTZEL, H., RICHTER-HUHN, G., POHLE, M., WEBER, S., WITTE, W. & EHRLICH, R. 2006. Microarray-based characterisation of a Pantón-Valentine leukocidin-positive community-acquired strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical microbiology and infection*, 12, 718-728.
- MUÑOZ-COBO, B., SANCHO-TELLO, S., COSTA, E., BRAVO, D., TORREGROSA, I., DE LOMAS, J. G. & NAVARRO, D. 2011. Differences in vancomycin minimum inhibitory concentrations for *Staphylococcus aureus* obtained with the automated Phoenix™ system, the Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution method and the standard Etest. *International journal of antimicrobial agents*, 37, 278-279.
- MURCIANO, C., YÁÑEZ, A., O'CONNOR, J. E., GOZALBO, D. & GIL, M. L. 2008. Influence of aging on murine neutrophil and macrophage function against *Candida albicans*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 53, 214-221.
- NETHERCOTT, C., MABBETT, A. N., TOSHIKA, M., PETERS, P., ORTIZ, J. C., NIMMO, G. R., COOMBS, G. W., WALKER, M. J. & SCHEMBRI, M. A. 2013. Molecular characterization of endocarditis-associated *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical microbiology*, JCM. 00651-13.
- NIENABER, J. J., SHARMA KUINKEL, B. K., CLARKE-PEARSON, M., LAMLERTTHON, S., PARK, L., RUDE, T. H., BARRIERE, S., WOODS, C. W., CHU, V. H. & MARÍN, M. 2011. Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* endocarditis isolates are associated with clonal complex 30 genotype and a distinct repertoire of enterotoxins and adhesins. *Journal of Infectious Diseases*, 204, 704-713.
- PAINTER, K. L., KRISHNA, A., WIGNESHWERARAJ, S. & EDWARDS, A. M. 2014. What role does the quorum-sensing accessory gene regulator system play during *Staphylococcus aureus* bacteremia? *Trends in microbiology*, 22, 676-685.
- PARK, S.-Y., CHONG, Y., PARK, H., PARK, K.-H., MOON, S., JEONG, J.-Y., KIM, M.-N., KIM, S.-H., LEE, S.-O. & CHOI, S.-H. 2013. agr dysfunction and persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia in patients with removed eradicable foci. *Infection*, 41, 111-119.
- PEACOCK, S., DAY, N., THOMAS, M., BERENDT, A. & FOSTER, T. 2000. Clinical isolates of *Staphylococcus aureus* exhibit diversity in fnb genes and adhesion to human fibronectin. *Journal of Infection*, 41, 23-31.
- PEACOCK, S. J., MOORE, C. E., JUSTICE, A., KANTZANO, M., STORY, L., MACKIE, K., O'NEILL, G. & DAY, N. P. 2002. Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. *Infection and immunity*, 70, 4987-4996.



- PELEG, A. Y., MONGA, D., PILLAI, S., MYLONAKIS, E., MOELLERING JR, R. C. & ELIOPOULOS, G. M. 2009. Reduced susceptibility to vancomycin influences pathogenicity in *Staphylococcus aureus* infection. *The Journal of infectious diseases*, 199, 532-536.
- PHILLIPS, C. J., WELLS, N. A., MARTINELLO, M., SMITH, S., WOODMAN, R. J. & GORDON, D. L. 2016. Optimizing the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with elevated vancomycin minimum inhibitory concentrations within the susceptible range. *Infection and drug resistance*, 9, 87.
- POUTREL, B., RAINARD, P. & SARRADIN, P. 1997. Heterogeneity of cell-associated CP5 expression on *Staphylococcus aureus* strains demonstrated by flow cytometry. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 4, 275-278.
- POWERS, M. E. & WARDENBURG, J. B. 2014. Igniting the fire: *Staphylococcus aureus* virulence factors in the pathogenesis of sepsis. *PLoS pathogens*, 10, e1003871.
- PRAKASH, V., LEWIS, J. & JORGENSEN, J. 2008. Vancomycin MICs for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates differ based upon the susceptibility test method used. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52, 4528-4528.
- RASMUSSEN, G., MONECKE, S., EHRLICH, R. & SÖDERQUIST, B. 2013. Prevalence of clonal complexes and virulence genes among commensal and invasive *Staphylococcus aureus* isolates in Sweden. *PloS one*, 8, e77477.
- RECKER, M., LAABEI, M., TOLEMAN, M. S., REUTER, S., SAUNDERSON, R. B., BLANE, B., TÖRÖK, M. E., OUADI, K., STEVENS, E. & YOKOYAMA, M. 2017. Clonal differences in *Staphylococcus aureus* bacteraemia-associated mortality. *Nature microbiology*, 2, 1381.
- RIEG, S., JONAS, D., KAASCH, A. J., PORZELIUS, C., PEYERL-HOFFMANN, G., THEILACKER, C., KÜPPER, M.-F., SCHNEIDER, C., SEIFERT, H. & KERN, W. V. 2013. Microarray-based genotyping and clinical outcomes of *Staphylococcus aureus* bloodstream infection: an exploratory study. *PLoS One*, 8, e71259.
- RIGBY, K. M. & DELEO, F. R. Neutrophils in innate host defense against *Staphylococcus aureus* infections. *Seminars in immunopathology*, 2012. Springer, 237-259.
- RISLEY, A. L., LOUGHMAN, A., CYWES-BENTLEY, C., FOSTER, T. J. & LEE, J. C. 2007. Capsular polysaccharide masks clumping factor A-mediated adherence of *Staphylococcus aureus* to fibrinogen and platelets. *Journal of Infectious Diseases*, 196, 919-927.
- RODRÍGUEZ DÍAZ, J., GUNA SERRANO, R., LARROSA ESCARTÍN, N. & MARÍN ARRIAZA, M. 2017. Diagnóstico microbiológico de la bacteriemia y la fungemia:



- hemocultivos y métodos moleculares. 2017. 62. Rodríguez Díaz JC (coordinador). *Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (eds). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).*
- ROJAS, L., BUNSOW, E., MUNOZ, P., CERCENADO, E., RODRÍGUEZ-CRÉIXEMS, M. & BOUZA, E. 2012. Vancomycin MICs do not predict the outcome of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream infections in correctly treated patients. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 67, 1760-1768.
- RONGPHARPI, S. R., DUGGAL, S., KALITA, H. & DUGGAL, A. K. 2014. *Staphylococcus aureus* bacteremia: targeting the source. *Postgraduate medicine*, 126, 167-175.
- ROOIJAKKERS, S. H., RUYKEN, M., VAN ROON, J., VAN KESSEL, K. P., VAN STRIJP, J. A. & VAN WAMEL, W. J. 2006. Early expression of SCIN and CHIPS drives instant immune evasion by *Staphylococcus aureus*. *Cellular microbiology*, 8, 1282-1293.
- RUBINSTEIN, E., LALANI, T., COREY, G. R., KANAFANI, Z. A., NANNINI, E. C., ROCHA, M. G., RAHAV, G., NIEDERMAN, M. S., KOLLEF, M. H. & SHORR, A. F. 2011. Telavancin versus vancomycin for hospital-acquired pneumonia due to gram-positive pathogens. *Clinical Infectious Diseases*, 52, 31-40.
- RYBAK, M., LOMAESTRO, B., ROTSCHAFFER, J. C., MOELLERING, R., CRAIG, W., BILLETER, M., DALOVISIO, J. R. & LEVINE, D. P. 2009a. Therapeutic monitoring of vancomycin in adult patients: a consensus review of the American Society of Health-System Pharmacists, the Infectious Diseases Society of America, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 66, 82-98.
- RYBAK, M. J., LOMAESTRO, B. M., ROTSCAFFER, J. C., MOELLERING JR, R. C., CRAIG, W. A., BILLETER, M., DALOVISIO, J. R. & LEVINE, D. P. 2009b. Vancomycin therapeutic guidelines: a summary of consensus recommendations from the infectious diseases Society of America, the American Society of Health-System Pharmacists, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists. *Clinical infectious diseases*, 49, 325-327.
- SADER, H. S., RHOMBERG, P. R. & JONES, R. N. 2009. Nine-hospital study comparing broth microdilution and Etest method results for vancomycin and daptomycin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53, 3162-3165.
- SAKOULAS, G., ELIOPOULOS, G. M., MOELLERING, R. C., WENNERSTEN, C., VENKATARAMAN, L., NOVICK, R. P. & GOLD, H. S. 2002. Accessory gene regulator (*agr*) locus in geographically diverse *Staphylococcus aureus* isolates



- with reduced susceptibility to vancomycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46, 1492-1502.
- SAKOULAS, G., MOISE-BRODER, P. A., SCHENTAG, J., FORREST, A., MOELLERING, R. C. & ELIOPOULOS, G. M. 2004. Relationship of MIC and bactericidal activity to efficacy of vancomycin for treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Journal of clinical microbiology*, 42, 2398-2402.
- SALGADO-PABÓN, W., BRESHEARS, L., SPAULDING, A. R., MERRIMAN, J. A., STACH, C. S., HORSWILL, A. R., PETERSON, M. L. & SCHLIEVERT, P. M. 2013. Superantigens are critical for *Staphylococcus aureus* Infective endocarditis, sepsis, and acute kidney injury. *MBio*, 4, e00494-13.
- SAN-JUAN, R., FERNÁNDEZ-RUIZ, M., GASCH, O., CAMOEZ, M., LÓPEZ-MEDRANO, F., DOMÍNGUEZ, M. Á., ALMIRANTE, B., PADILLA, B., PUJOL, M. & AGUADO, J. M. 2017a. High vancomycin MICs predict the development of infective endocarditis in patients with catheter-related bacteraemia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72, 2102-2109.
- SAN-JUAN, R., PÉREZ-MONTARELO, D., VIEDMA, E., LALUEZA, A., FORTÚN, J., LOZA, E., PUJOL, M., ARDANUY, C., MORALES, I. & DE CUETO, M. 2017b. Pathogen-related factors affecting outcome of catheter-related bacteremia due to methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in a Spanish multicenter study. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 36, 1757-1765
- .
SCULLY, I. L., PAVLIAK, V., TIMOFEYEVA, Y., LIU, Y., SINGER, C. & ANDERSON, A. S. 2018. O-Acetylation is essential for functional antibody generation against *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharide. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 14, 81-84.
- SCHMITZ, F.-J., MACKENZIE, C. R., GEISEL, R., WAGNER, S., IDEL, H., VERHOEF, J., HADDING, U. & HEINZ, H.-P. 1997. Enterotoxin and toxic shock syndrome toxin-1 production of methicillin resistant and methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* strains. *European journal of epidemiology*, 13, 699-708.
- SCHWEIZER, M. L., FURUNO, J. P., SAKOULAS, G., JOHNSON, J. K., HARRIS, A. D., SHARDELL, M. D., MCGREGOR, J. C., THOM, K. A. & PERENCEVICH, E. N. 2011. Increased mortality with accessory gene regulator (*agr*) dysfunction in *Staphylococcus aureus* among bacteremic patients. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55, 1082-1087.
- SEIDL, K., CHEN, L., BAYER, A. S., HADY, W. A., KREISWIRTH, B. N. & XIONG, Y. Q. 2011. Relationship of *agr* expression and function with virulence and vancomycin treatment outcomes in experimental endocarditis due to methicillin-resistant



- Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, AAC. 05251-11.
- SERRANO, M. R. G., ESCARTÍN, N. L., ARRIAZA, M. M. & DÍAZ, J. C. R. 2018. Diagnóstico microbiológico de la bacteriemia y la fungemia: hemocultivos y métodos moleculares. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*.
- SHALLCROSS, L. J., FRAGASZY, E., JOHNSON, A. M. & HAYWARD, A. C. 2013. The role of the Panton-Valentine leucocidin toxin in staphylococcal disease: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet infectious diseases*, 13, 43-54.
- SHOJI, H., MAEDA, M., SHIRAKURA, T., TAKUMA, T., UGAJIN, K., FUKUCHI, K., ISHINO, K. & NIKI, Y. 2015. More accurate measurement of vancomycin minimum inhibitory concentration indicates poor outcomes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *International journal of antimicrobial agents*, 46, 532-537.
- SORIANO, A., MARCO, F., MARTÍNEZ, J. A., PISOS, E., ALMELA, M., DIMOVA, V. P., ALAMO, D., ORTEGA, M., LOPEZ, J. & MENSA, J. 2008. Influence of vancomycin minimum inhibitory concentration on the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clinical Infectious Diseases*, 46, 193-200.
- SULLIVAN, S. B., AUSTIN, E. D., STUMP, S., MATHEMA, B., WHITTIER, S., LOWY, F. D. & UHLEMANN, A.-C. 2017. Reduced vancomycin susceptibility of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*: no significant impact on mortality but increase in complicated infection. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, AAC. 00316-17.
- SWENSON, J. M., ANDERSON, K. F., LONSWAY, D. R., THOMPSON, A., MCALLISTER, S. K., LIMBAGO, B. M., CAREY, R. B., TENOVER, F. C. & PATEL, J. B. 2009. Accuracy of commercial and reference susceptibility testing methods for detecting vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical microbiology*, 47, 2013-2017.
- TONG, S. Y., DAVIS, J. S., EICHENBERGER, E., HOLLAND, T. L. & FOWLER, V. G. 2015. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical microbiology reviews*, 28, 603-661.
- TRISTAN, A., RASIGADE, J.-P., RUIZENDAAL, E., LAURENT, F., BES, M., MEUGNIER, H., LINA, G., ETIENNE, J., CELARD, M. & TATTEVIN, P. 2012. Rise of CC398 lineage of *Staphylococcus aureus* among infective endocarditis isolates revealed by two consecutive population-based studies in France. *PLoS One*, 7, e51172.
- VAN HAL, S., LODISE, T. P. & PATERSON, D. L. 2012a. The clinical significance of vancomycin minimum inhibitory concentration in *Staphylococcus aureus*



- infections: a systematic review and meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases*, 54, 755-771.
- VAN HAL, S. J., BARBAGIANNAKOS, T., JONES, M., WEHRHAHN, M. C., MERCER, J., CHEN, D., PATERSON, D. L. & GOSBELL, I. B. 2011a. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* vancomycin susceptibility testing: methodology correlations, temporal trends and clonal patterns. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 66, 2284-2287.
- VAN HAL, S. J. & FOWLER JR, V. G. 2013. Is it time to replace vancomycin in the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections? *Clinical infectious diseases*, 56, 1779-1788.
- VAN HAL, S. J., JENSEN, S. O., VASKA, V. L., ESPEDIDO, B. A., PATERSON, D. L. & GOSBELL, I. B. 2012b. Predictors of mortality in *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clinical microbiology reviews*, 25, 362-386.
- VAN HAL, S. J., JONES, M., GOSBELL, I. B. & PATERSON, D. L. 2011b. Vancomycin heteroresistance is associated with reduced mortality in ST239 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* blood stream infections. *PLoS one*, 6, e21217.
- VAN HEIJENOORT, J. & GUTMANN, L. 2000. Correlation between the structure of the bacterial peptidoglycan monomer unit, the specificity of transpeptidation, and susceptibility to β -lactams. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 5028-5030.
- VIEDMA, E., SANZ, F., ORELLANA, M. A., SAN JUAN, R., AGUADO, J. M., OTERO, J. R. & CHAVES, F. 2014. Relationship between agr dysfunction and reduced vancomycin susceptibility in methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* causing bacteraemia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69, 51-58.
- VOYICH, J. M., OTTO, M., MATHEMA, B., BRAUGHTON, K. R., WHITNEY, A. R., WELTY, D., LONG, R. D., DORWARD, D. W., GARDNER, D. J. & LINA, G. 2006. Is Pantone-Valentine leukocidin the major virulence determinant in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease? *The Journal of infectious diseases*, 194, 1761-1770.
- WANG, G., HINDLER, J. F., WARD, K. W. & BRUCKNER, D. A. 2006. Increased vancomycin MICs for *Staphylococcus aureus* clinical isolates from a university hospital during a 5-year period. *Journal of clinical microbiology*, 44, 3883-3886.
- WATKINS, R. R., DAVID, M. Z. & SALATA, R. A. 2012. Current concepts on the virulence mechanisms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of medical microbiology*, 61, 1179-1193.



- WATTS, A., KE, D., WANG, Q., PILLAY, A., NICHOLSON-WELLER, A. & LEE, J. C. 2005. Staphylococcus aureus strains that express serotype 5 or serotype 8 capsular polysaccharides differ in virulence. *Infection and immunity*, 73, 3502-3511.
- WAYNE, P. 2014. Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-fourth informational supplement, M100-S24. *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*, 34.
- WILLIAMS, R. 1963. Healthy carriage of Staphylococcus aureus: its prevalence and importance. *Bacteriological reviews*, 27, 56.
- WONG, H., WATT, C., ELSAYED, S., JOHN, M., JOHNSON, G., KATZ, K., KRAJEN, S., LEE, C., MAZZULLI, T. & OSTROWSKA, K. 2014. Characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates from patients with persistent or recurrent bacteremia. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 25, 83-86.
- XIONG, Y. Q., FOWLER JR, V. G., YEAMAN, M. R., PERDREAU-REMINGTON, F., KREISWIRTH, B. N. & BAYER, A. S. 2009. Phenotypic and genotypic characteristics of persistent methicillin-resistant Staphylococcus aureus bacteremia in vitro and in an experimental endocarditis model. *The Journal of infectious diseases*, 199, 201-208.
- YARWOOD, J. M., MCCORMICK, J. K. & SCHLIEVERT, P. M. 2001. Identification of a novel two-component regulatory system that acts in global regulation of virulence factors of Staphylococcus aureus. *Journal of Bacteriology*, 183, 1113-1123.
- YILMAZ, M., ELALDI, N., BALKAN, İ. İ., ARSLAN, F., BATIREL, A. A., BAKICI, M. Z., GOZEL, M. G., ALKAN, S., ÇELİK, A. D. & YETKIN, M. A. 2016. Mortality predictors of Staphylococcus aureus bacteremia: a prospective multicenter study. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 15, 7.

IX. ANEXOS



Staphylococcus aureus (*S. aureus*) se encuentra ampliamente distribuido por todo el mundo, comportándose tanto como patógeno como comensal. Se estima que entre un 25-50% de personas sanas puede colonizarse de manera persistente o transitoria (Longo, 2012). Este microorganismo constituye una de las principales causas de infecciones nosocomiales, siendo una de las primeras causas de bacteriemias primarias (Rigby and DeLeo, 2012) y encabezando la lista de los productores de infecciones de piel y tejidos blandos, heridas quirúrgicas, endocarditis y sepsis relacionada con catéter (Seidl et al., 2011).

La bacteriemia se define como la presencia de bacterias viables en sangre; ésta puede o no estar asociada a enfermedad (Rongpharpi et al., 2014). *S. aureus* es el responsable del 10-30% de todas ellas (Van Hal et al., 2012b), predominando MSSA (*S. aureus* sensible a meticilina) sobre MRSA (*S. aureus* resistente a meticilina) (Jokinen et al., 2018, Laupland et al., 2013). La distinción entre bacteriemia complicada y no complicada es clave en el manejo de la SAB, ya que modula el seguimiento clínico, la duración de terapia antibiótica y el pronóstico de la enfermedad (Tong et al., 2015, Gudiol et al., 2017).

El correcto manejo terapéutico de SAB debe ser individualizado para cada paciente y está determinado por la susceptibilidad antibiótica del aislado, la fuente de SAB, la presencia de endocarditis y/o infección metastásica y factores de base del hospedador como enfermedades de bases o alergias a los antibióticos (Mitchell and Howden, 2005, Corey, 2009). El retraso en la instauración del tratamiento es una de las principales causas que se ha relacionado con peores pronóstico en SAB (Lodise et al., 2003, Kollef et al., 2000, Mather et al., 2016, Ibrahim et al., 2000), además de aumentar el tiempo de hospitalización; de ahí la importancia de un precoz y preciso diagnóstico microbiológico para establecer un rápido control de la fuente e inicio de terapia efectiva. El tratamiento de elección para cubrir tanto MSSA como MRSA ha sido tradicionalmente la vancomicina (Moise and Sakoulas, 2015, Holland et al., 2014, Mitchell and Howden, 2005).

Hace algunos años, el preocupante aumento de las infecciones causadas por MRSA que demostró expandirse con gran rapidez, incentivó la búsqueda de factores que predijesen un peor pronóstico en el contexto de las bacteriemias causadas por este microorganismo.

Asimismo, se observó que las cepas de *S. aureus* que presentan sensibilidad disminuida a vancomicina es decir, una CMI próxima al límite de la sensibilidad ($\geq 1.5\text{g/mL}$ y $< 2\text{ g/mL}$), estaban relacionadas con una peor respuesta al tratamiento y evolución de la enfermedad (Sakoulas et al., 2004, Moise-Broder et al., 2004, Hidayat et al., 2006, Aguado et al., 2011).

Parece plausible pensar que la causa de estas complicaciones sea un tratamiento inefectivo, por la manifiesta dificultad de alcanzar óptimos niveles terapéuticos de vancomicina cuando la CMI está próxima a 2. Sin embargo, (Holmes et al., 2011) demostraron que esta evolución era independiente del tratamiento (se asociaba tanto en MSSAB como en MRSAB, es decir, tanto si se trataba con betalactámicos o con vancomicina), dejando entonces abierta la posibilidad de que esta CMI alta de vancomicina se corresponda, más que a una resistencia a la acción del tratamiento, a determinadas características fenotípicas de la bacteria que la hacen más virulenta; es decir, que la CMI no sólo es un parámetro que oriente hacia un correcto manejo terapéutico, sino que puede también ser un marcador subrogado de virulencia del microorganismo, manifestado en el desarrollo de complicaciones en SAB o mortalidad (Soriano et al., 2008).

En este sentido, se ha visto que las cepas que presentan sensibilidad disminuida a vancomicina (RSV; *reduced sensitivity to vancomycin*) se caracterizaban por presentar variaciones en el grosor de la pared celular, disminución de la autólisis y alteraciones metabólicas, de lo que se puede inferir que los cambios que afectan a la biología de la pared celular o de la membrana celular pueden potenciar la virulencia del *S. aureus* y conceptualmente afectar a la CMI de vancomicina (Howden et al., 2010, Holland and Fowler Jr, 2011).

De hecho, hay estudios que relacionan directamente un engrosamiento de la pared celular con CMIs altas de vancomicina (Cui et al., 2003). Este engrosamiento de la pared celular, además de suponer un inconveniente para la penetración de los fármacos, también supondrá un inconveniente para la acción del killing de los granulocitos, aumentando su resistencia a la opsonofagocitosis y el killing de fagocitos profesionales (Méhes et al., 2012, Cui et al., 2003).

En definitiva, se producen una serie de cambios en la estructura de *S. aureus* que alteran su interacción con el hospedador y que podrían explicar su habilidad para evadir el SI y la persistencia y complicaciones que se observan clínicamente (Cameron et al., 2016) pero no se ha llegado a ninguna conclusión hasta el momento. El esclarecimiento del verdadero impacto de los valores de las CMIs de las cepas de *S. aureus* sensibles a vancomicina en el desenlace

final de las bacteriemias es de una relevada trascendencia si consideramos que puede influenciar críticamente en el manejo terapéutico de esta entidad clínica.

RESULTADOS:

1. Evaluación analítica del Etest para la determinación de la sensibilidad de *S. aureus* a vancomicina.

1.1. Determinación de la varianza intra-ensayo del análisis.

Al estudiar la varianza en la categorización de 20 aislados de *S. aureus* no se observaron discrepancias mayores.

1.2. Determinación de la reproducibilidad de los resultados obtenidos por Etest.

Se midió la reproducibilidad intra-ensayo alterando únicamente la variable de la lectura. Se analizó la concordancia inter-observador comparando los valores de las 100 medidas determinados por dos observadores distintos en ambos centros (HCU y HGU). La media en cada centro fue comparable ($P > 0.5$).

Por otro lado, se estudió la reproducibilidad inter-centro realizando este procedimiento en el HCV y HGU en paralelo. Ésta resultó prácticamente nula, ya que la concordancia entre los valores medidos en los dos centros (utilizando como valor de CMI la media de los valores obtenidos por los 2 observadores) resultó ser muy baja ($\kappa = 0.112$).

1.3. Evaluación del efecto de la congelación en la CMI de vancomicina para *S. aureus* determinada por Etest.

Los valores de CMIs de los cultivos primarios (en el momento del aislamiento) fueron significativamente menores que los obtenidos en el momento del estudio ($P < 0.001$; t test). Se observó que este efecto era más evidente cuanto mayor era el tiempo de congelación, observándose más diferencias en aislados que se preservaron durante 1 año que los que se congelaron 6 meses. Estos resultados, sin embargo, no descartan necesariamente la asociación entre altos valores de CMIs y mala evolución de la enfermedad invasiva.

2. Desarrollo de un método robusto de microdilución para la determinación de la CMI de vancomicina para *S. aureus* que incluya un gradiente cuasi continuo de concentraciones del antimicrobiano.

El desarrollo de un método reproducible de microdilución (BMD) que incluya diluciones inter \log_2 del antimicrobiano en el límite de los valores de sensibilidad constituye una herramienta clave para clarificar el impacto de la CMI de vancomicina en la evolución de las bacteriemias por *S. aureus*. En el artículo III presentamos el desarrollo de una técnica de microdilución que incorpora concentraciones crecientes de vancomicina tales como 0.50, 0.62, 0.75, 0.87, 1.0, 1.25, 1.40, 1.50, 1.60, 1.75 y 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

2.1. Determinación de la precisión y robustez del método desarrollado

a) Evaluación de la precisión intra-ensayo:

Los 50 aislados se estudiaron por cuadruplicado. El coeficiente de variación (CV) de cada aislado se calculó dividiendo la desviación estándar (SD) de las cuatro medidas de cada aislado entre la media de las cuatro medidas y multiplicando por 100. El CV fue 22.4% y 20.9% en los ensayos 1 y 2, respectivamente, siendo la desviación estándar de 0.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en ambos ensayos.

b) Evaluación de la precisión inter-ensayo:

Se repitió el ensayo 6 horas más tarde para estudiar la variación inter-ensayo. La media de las diferencias de los valores de CMI entre los 2 ensayos de todos los aislados fue 0.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (95% CI, 0.011–0.07 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y la desviación estándar de las diferencias fue 0.119 $\mu\text{g}/\text{mL}$. De hecho, los valores de CMI difirieron menos de 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para la mayoría de aislados ($n = 36$), y no más de 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ entre todos los aislados, por lo que la precisión de éste método excede la aceptada (± 1 dilución \log_2).

2.2. Comparación del método desarrollado de BMD con el Etest

La media de los valores de CMI obtenidos por Etest con inóculo 0.5 McFarland (1.13 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 95% CI, 0.98–1.29 $\mu\text{g}/\text{mL}$) fue significativamente mayor ($P \leq 0.001$) que la medida por BMD (0.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 95% CI, 0.70–0.79 $\mu\text{g}/\text{mL}$), y la correlación entre los dos métodos fue muy baja (Rho, 0.319; $P = 0.148$). Sin embargo, la media de los valores de CMI obtenidos por Etest con inóculos menores (0.77 y 0.74 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para 10^7 o 10^6 CFU/mL, respectivamente), y los medidos

por Etest sí que fue comparable y con una correlación significativa ($P= 0.004$ para 10^7 CFU/mL y $P= 0.029$ para 10^6 CFU/mL).

La obtención de CMI's más altas cuando se emplea Etest con respecto al BMD puede deberse al alto inóculo que se usa (Charlton et al., 2014), y de hecho, así lo comprobamos, pudiéndose equiparar los valores de ambos métodos utilizando inóculos menores en el Etest. Además se mejoró también la precisión del Etest disminuyendo el inóculo. Esto parece de especial relevancia para futuros estudios ya que los métodos de microdilución no son muy útiles para detectar subpoblaciones de *S.aureus* que desarrollan ligera resistencia a vancomicina (por ejemplo hVISA).

2.3. Estudio del efecto de congelación en la reproducibilidad del ensayo

La media de las CMI's antes de la congelación, tras un mes y a los 3 meses, fue $0.62 \mu\text{g/mL}$ ($P = 0.569$ y $P = 0.924$ en las diferencias entre las CMI's antes de la congelación y un mes, y antes de la congelación y 3 meses, respectivamente), por lo que parece que el efecto de la congelación cuando se emplea BMD es inexistente.

Por otro lado, se evaluó el posible efecto de la criopreservación en la acción del antimicrobiano. Para ello, 34 cepas de *S. aureus* fueron testados por cuadruplicado tras la congelación de los paneles (criopreservados a -20°C durante 1-3 meses), observándose CV comparables intra e inter-ensayo (21.9% y 22.1%), respectivamente, cuando se utilizaron placas congeladas. Los valores de CMI medidos con las placas congeladas (media $0.74 \mu\text{g/mL}$; 95% CI, $0.68- 0.79 \mu\text{g/mL}$) fue similar al medido entre los dos ensayos, por lo que el almacenamiento a -20°C hasta 3 meses demostró no tener impacto en los valores de CMI.

3. Determinar si existe algún rasgo fenotípico/genotípico vinculado a las cepas de *S. aureus* con concentraciones mínimas inhibitorias (CMI's) a vancomicina en el límite alto de sensibilidad medidas por Etest ($\text{CMI} \geq 1,5 \mu\text{g/mL}$).

Las cepas de *S. aureus* que presentan valores de CMI a vancomicina en el límite de la sensibilidad ($\geq 1.5 \mu\text{g/mL}$), medidos por el método del Etest, se han asociado con mayores tasas de morbimortalidad que los que están causadas por cepas más sensibles ($\text{MIC} \leq 1 \mu\text{g/mL}$) (Soriano et al., 2008, Holmes et al., 2011, Aguado et al., 2011, Aguado et al., 2012, Cervera et

al., 2014, Bouiller et al., 2018, San-Juan et al., 2017a), aunque esta afirmación ha sido contradicha (Rojas et al., 2012, López-Cortés et al., 2015).

De esta forma, la CMI de vancomicina para *S. aureus* en el límite alto de la sensibilidad (≥ 1.5 $\mu\text{g/mL}$), medida por Etest, podría reflejar una ventaja fenotípica en términos de virulencia, previsiblemente relacionado con estrategias de supervivencia de la bacteria como la evasión del sistema inmune (en concreto a la lisis bacteriana (“killing”) por parte de los fagocíticos); de hecho, hay estudios que afirman que los aislados hVISA son más resistentes a la opsonofagocitosis y a la lisis fagocítica que los VSSA, al menos bajo ciertas condiciones (Méhes et al., 2012), en relación con cambios estructurales tales como el aumento del grosor de la pared celular que le llevan también a desarrollar resistencias antibióticas.

Por ello, estudiamos la posibilidad de que altas CMIs de vancomicina dentro del límite de la sensibilidad en bacteriemias causadas por *S. aureus* se asocien con un incremento del grosor de la pared celular y una internalización o killing subóptimo por parte de los fagocitos humanos.

3.1 Estudio de la CMI de vancomicina como marcador subrogado de resistencia a la lisis por fagocitos.

Para ello, desarrollamos un ensayo in vitro con sangre total basándonos en un modelo diseñado para determinar el índice de killing (%) (KI; *Killing index*) para *Candida albicans* (Murciano et al., 2008) y adaptándolo para *S. aureus*.

Clasificamos la sensibilidad de las bacterias a la lisis fagocítica en dos grupos, catalogando a los aislados que se lisan eficazmente en el grupo de killing alto ($>70\%$), y a los que presentan un killing subóptimo en el grupo de killing bajo ($<70\%$). Dentro de este grupo diferenciamos también entre los que presentan un killing apenas imperceptible ($<30\%$) y los que presentan un killing intermedio (>30 y <70). Como se muestra en la Figura V.12, la mayoría de las cepas ($n= 61$) se lisaron tan eficazmente como el control (KI $>70\%$). Las cepas restantes ($n=34$) se categorizaron en el grupo de killing bajo (KI $<70\%$). El rango resultó ser de 91.84 (mínimo= 3.77 y máximo= 95.61)

Una vez categorizadas en función del killing, investigamos la medida en que este parámetro se relaciona con la CMI de vancomicina. Este experimento lo realizamos dos veces (artículo II y

artículo IV), dado que en el momento del primer análisis no disponíamos de un método preciso de microdilución para determinar la CMI de vancomicina, por lo que el experimento se realizó empleando la técnica del Etest, con las consiguientes limitaciones. Posteriormente, en el artículo IV, una vez desarrollado y validado el método casero de BMD, se modificaron ciertas variables del estudio como el método de detección de CMI y el número de muestras, estudiándose un total de 148 aislados de *S. aureus* (MSSA n= 113; MRSA n= 35).

Para el análisis de la CMI se excluyeron las cepas que presentaban un KI de 60%-70% con el fin de minimizar el impacto de la variación intra-ensayo (<10%) en la categorización de los aislados.

Todos los aislados resultaron sensibles a vancomicina ($\leq 2 \mu\text{g/mL}$), y ninguno fue categorizado como hVISA. Los valores modales de los aislados MRSA coincidieron con los de MSSA (0.63 $\mu\text{g/mL}$ por BMD y 1.00 $\mu\text{g/mL}$ por Etest). Los valores mínimos que se obtuvieron fueron 0.5 $\mu\text{g/mL}$ por ambos métodos, y los valores máximos 1.25 $\mu\text{g/mL}$ por BMD y 1.5 $\mu\text{g/mL}$ por Etest. Se observó una correlación muy pobre ($\rho=0.291$) entre los valores obtenidos por ambos métodos. Tal y como se observa en la Figura V.13., no se encontró ninguna correlación significativa independientemente del método analizado ($P =0.79$ para BMD y $P =0.09$ para Etest).

3.2 Estudio de la internalización de *S. aureus* en el proceso de fagocitosis.

Para averiguar si las diferencias observadas en el KI entre las cepas se debía a la variación en el proceso de lisis, estudiamos también la internalización de los aislados de *S. aureus* por los fagocitos humanos midiendo la eficiencia con la que los aislados en ambos grupos de killing son internalizados. Estudiamos 10 aislados, de los cuales 6 presentaban un KI bajo (<30%), y 4 KI alto (>80%), obteniendo la misma eficacia en relación a la internalización de los aislados de la bacteria por parte de ambas poblaciones celulares (monocitos y neutrófilos) ($P =0.08$ para KI <30% y $P=0.14$ para KI >80%).

3.2 Evaluación de la repercusión del grosor de la pared celular de *S. aureus*

Las cepas de *S. aureus* que presentan sensibilidad intermedia a vancomicina (VISA), así como las hVISA y las VRSA exhiben un aumento en la síntesis de su pared celular y una pared celular significativamente engrosada en comparación con las cepas VSSA. (Cui et al., 2000, Cui et al., 2003). En este sentido, el engrosamiento de la pared se plantea como un determinante de baja sensibilidad o resistencia a la vancomicina por parte de *S. aureus* (Cui et al., 2000).

Para investigar si las cepas que presentan un engrosamiento de la pared celular son lisadas ineficazmente por los neutrófilos humanos (KI) y si esta característica está relacionada con la CMI de vancomicina, realizamos un estudio morfométrico de 26 aislados (13 MSSA and 13 MRSA) mediante microscopía electrónica de transmisión.

15 aislados pertenecían al grupo de killing bajo (incluyendo 8 con KI <30%) y 11 al alto. El grosor de la pared celular se correlacionó inversamente con el KI (Figura V.16.), siendo la pared significativamente más gruesa en los aislados del grupo del killing bajo ($P=0.03$).

De nuestros resultados se puede inferir que el grosor de la pared celular no impide la ingestión de las bacterias, pero podría actuar como impedimento para la correcta formación del fagosoma o ayudar a liberación de la bacteria e intervenir en los procesos de evasión del killing intracelular (ROS, NETs y proteínas microbicidas). A pesar de que nuestros datos no prueban que la relativa refractariedad de ciertos aislados a la lisis por los fagocitos se deba al grosor de la pared, esto parece una teoría plausible ya que una característica de todos los aislados que presentan baja sensibilidad al killing fue un elevado grosor de la pared celular.

3.3 Estudio de factores genotípicos de *S. aureus* asociados a CMIs elevadas de vancomicina.

La posibilidad de que el desarrollo del fenotipo RVS esté determinado por la presencia de ciertos genes específicos resulta factible, y ha sido postulada ya por algunos autores (Lalani et al., 2008, Viedma et al., 2014, San-Juan et al., 2017b, Holmes et al., 2014), de manera que uno de los objetivos que desarrollamos en el artículo IV fue el estudio del impacto de la carga genética de los aislados de *S. aureus* productores de bacteriemia en cuanto a su comportamiento ante la vancomicina.

Estudiamos la presencia de determinados genes mediante la tecnología de hibridación utilizando *S. aureus* DNA microarray y reactivos de Clondiag (*Staphylococcus aureus* Genotyping Kit 2.0; Clondiag, Jena, Germany), el cual incluye 333 secuencias diana correspondientes a 170 genes y sus variantes alélicas.

Algunos determinantes genotípicos de *S. aureus* como el CC, la presentación de CP5+ o el tipo de *agr* ya han sido considerados como responsables de virulencia (Seidl et al., 2011, Watts et al., 2005, Recker et al., 2017), sin embargo en nuestro análisis, la distribución entre los valores de CMI de *S. aureus* a vancomicina medidos por ambos métodos y entre los dos grupos de killing de dichos genes fue homogénea.

4 Investigar el impacto de varias características fenotípicas y genotípicas de *S. aureus* en el desarrollo de bacteriemias complicadas.

Para estudiar en qué medida afectan las características de la bacteria en la evolución de la bacteriemia realizamos un estudio retrospectivo observacional que incluyó una cohorte de 148 *S. aureus* (MSSA, n=113; MRSA, n=35) obtenidos de pacientes con bacteriemias por este microorganismo. Registramos los datos demográficos y clínicos, entre los que se incluyeron la edad, sexo, fuente de la bacteriemia, comorbilidades, tratamiento antibiótico y evolución de la enfermedad. El principal evento clínico que se analizó fue el desarrollo de bacteriemia complicada (BC), definida por la aparición de (a) endocarditis, (b) tromboflebitis séptica, (c) infección metastásica, (d) bacteriemia persistente más de >72 h después de comenzar la terapia antibiótica dirigida y (e) bacteriemia recurrente (definida en la introducción), y se analizó el impacto de las características genéticas de la bacteria en el desarrollo de bacteriemias complicadas.

Al evaluar las diferencias entre los dos grupos (los que desarrollan BC y los que no), además de las características fenotípicas de *S. aureus* (valores de CMI y KI) y de algunos rasgos genéticos que se han asociado ya con complicaciones en otros estudios, varias covariables clínicas con potencial relevancia fueron tenidas en cuenta, con el fin de controlar los posibles factores que pueden desajustar el modelo de regresión logística. Entre estas covariables se incluyeron los datos demográficos de los pacientes, categoría de la bacteriemia (comunitaria o nosocomial), comorbilidades del paciente (medidas por el índice de comorbilidad de Charlson), la gravedad de la enfermedad (presencia de shock séptico en el momento del establecimiento de la bacteriemia), la fuente de la bacteriemia, el acierto en la terapia antibiótica empírica y el manejo clínico de la fuente primaria de bacteriemia. Hay que destacar que la terapia antibiótica se estima que fue apropiada en el 50% de los episodios, y la media en el retraso de la instauración de 1.5 días. Además, se administró terapia con beta-lactámicos en 86 casos (52.8%) y con glicopéptidos en 50 (33.7%).

4.1. Estudio de la asociación de CMI de vancomicina para *S. aureus* con complicaciones en el contexto de bacteriemias.

En nuestro estudio , los valores de CMI de *S. aureus* a vancomicina medidos tanto por Etest ($\leq 1 \mu\text{g/mL}$ vs. $\geq 1.5 \mu\text{g/mL}$), como por nuestro método de BMD ($<0.75 \mu\text{g/mL}$ vs. $\geq 0.75 \mu\text{g/mL}$), considerada tanto como una variable continua como dicotómica, no se asociaron con el desarrollo de complicaciones en bacteriemias ($P=0.94$ para Etest y $P=0.19$ para BMD) Repetimos el estudio unicamente incluyendo aislados MSSA ($n= 113$) pero los resultados no variaron ($P=0.77$ con Etest y $P=0.68$ con BMD).

4.2. Estudio de la asociación del índice de killing de *S. aureus* con complicaciones en el contexto de bacteriemias.

En el estudio los aislados presentaban la misma sensibilidad al killing fagocítico independientemente de si desarrollaban complicaciones o no ($P=0.5$), lo que sugiere indirectamente que el grosor de la pared celular no es un factor patogénico relevante en cuanto al riesgo de desarrollar complicaciones. Naturalmente, la verdadera relevancia del grosor de la pared como factor de virulencia solo puede ser dilucidado mediante técnicas de microscopía electrónica. Estos resultados se mantuvieron cuando analizamos únicamente los aislados MSSA ($P= 0.71$).

4.3 Análisis del perfil genético de *S. aureus* productor de bacteriemia

Los resultados obtenidos hasta la fecha de los distintos estudios en relación a los genes de virulencia y el desarrollo de complicaciones tambien son discordantes.

En nuestro análisis, los aislados de *S. aureus* no fueron significativamente distintos en los dos grupos observados (bacteriemia complicada vs no complicada) en relación al CC, genes de resistencia a antibióticos (*mecA*), grupo *agr*, tipo capsular o PVL. De hecho, la presencia de los genes *Sec/Sel* fue el único factor que se asoció independientemente con la aparición de complicaciones (OR, 3.45; 95% CI:1.26-9.45; $P=0.02$).

Así pues, los resultados discordantes encontrados hasta el momento pueden explicarse a) por la variabilidad que hay entre las distintas técnicas de medición de las CMIs (BMD y Etest), que ya ha sido discutida en apartados anteriores y que podría implicar un importante sesgo. Se ha visto también que el efecto de una CMI de $2 \mu\text{g/mL}$ en la mortalidad se observa más fácilmente en estudios que emplean el Etest (Chen et al., 2013); b) por la disparidad de los

factores que se interpretan en unos estudios y otros (resistencia a meticilina, enfermedades de base del paciente, fuente de la bacteriemia, definición de complicaciones... c) muy pocos estudios tienen en consideración el impacto de la terapia antibiótica empírica en la mortalidad, y ésta ya ha sido identificada como factor que repercute directamente en la mortalidad (Lodise et al., 2003) y d) otro factor que no se tiene en consideración en la mayoría de los estudios y que podría influir en la virulencia de las cepas es la adquisición del gen que les confiere resistencia a meticilina. Sí que hay algunos autores que relacionan las infecciones por MRSA con mayores costes y limitadas opciones terapéuticas (Gordon and Lowy, 2008), pero no hay evidencias de que las cepas resistentes a meticilina sean más virulentas que las sensibles.

Además, otro aspecto a tener en cuenta es la repercusión que puede tener la exposición previa a concentraciones bajas del fármaco en cuanto a que la adaptación de las cepas les lleve a desarrollar ligera resistencia a la vancomicina, y estos mismos cambios le doten de patogenicidad. En relación a esto, está acreditado por ejemplo el aumento de la capacidad de formar biofilms con la expresión del sistema de regulación *sarA* (*staphylococcal accessory regulator A*) (Jacob and DiazGranados, 2013).

Queda así justificada la variedad de resultados obtenidos por los numerosos estudios que analizan el tema, pero el debate está todavía abierto. Todo apunta a que finalmente la CMI no es un marcador fenotípico relacionado con complicaciones y mortalidad. Es más, el hecho de que la mortalidad disminuya con altas CMIs ha sido acreditado por varios estudios (Kalil et al., 2014, van Hal et al., 2011b), en los que explican que las cepas hVISA, presentando una pared más gruesa con mayor entrecruzamiento del peptidoglicano, se asocia con menor virulencia, por lo que las características microbiológicas que les confieren resistencia a vancomicina no se asocian con peores pronósticos.

La resistencia a vancomicina todavía resulta un suceso aislado, únicamente una pequeña proporción de las bacteriemias están causadas por MRSA y el porcentaje de cepas con CMIs en el límite de la sensibilidad es aún menor (Jacob and DiazGranados, 2013), por lo que no parece razonable el hecho de plantearse otra terapia empírica alternativa a la vancomicina. Además, no existe todavía ningún estudio de superioridad de los nuevos fármacos antiestafilocócicos: linezolid (Dennis et al., 2002), teicoplanina (Kalil et al., 2010), daptomicina (Fowler Jr et al., 2006) o telavancina (Rubinstein et al., 2011); por lo que el uso de estos agentes debe quedar todavía restringido para evitar desarrollo de resistencias.

CONCLUSIONES:

1- La técnica del Etest no es un método preciso y reproducible para determinar la CMI de vancomicina para *S. aureus*.

2- La CMI de vancomicina para *S. aureus* medida por un método de microdilución que incorpora un gradiente cuasicontinuo del antibiótico no se asocia al riesgo de bacteriemia complicada.

3- El grosor de la pared celular de *S. aureus* inferido por el índice de killing fagocítico no se asocia con la CMI a vancomicina determinada por microdilución.

4- La presencia de los genes que codifican las enterotoxinas C y L es el único parámetro (fenotípico y genotípico) que se asocia con el riesgo de bacteriemia complicada.



I. Introducción

Tabla I.1: Factores de virulencia de <i>S. aureus</i>	19
Tabla I.2: Infecciones causadas por <i>S.aureus</i>	29
Tabla I.3: Perfil de agentes antimicrobianos empleados para el tratamiento de las infecciones por MRSA.....	39
Tabla I.4: Puntos de corte de vancomicina para <i>S. aureus</i> según los distintos organismos internacionales.....	43

V. Resultados y discusión.

Tabla V.1: Valores definidos por el CLSI de CMI de vancomicina para categorizar a los aislados de <i>S. aureus</i> en función de las distintas técnicas para determinarla.....	86
Tabla V.2: Variables que intervienen en la técnica de microdilución.....	88
Tabla V.3: Datos obtenidos de los 26 aislados estudiados en relación al grosor de la pared celular y el % de Killing por parte de los fagocitos y la CMI de vancomicina (Etest)	97
Tabla V.4: Valores de CMI de vancomicina (Etest) y grosor de la pared celular de aislados de <i>S. aureus</i> que presentan alta o baja sensibilidad al killing por fagocitos humanos.....	100
Tabla V.5: Valores de CMIs de vancomicina ($\mu\text{g}/\text{mL}$) medidos por BMD de las cepas de <i>S. aureus</i> incluidos en el estudio según los grupos clonales.....	103
Tabla V.6: Valores de CMIs de vancomicina ($\mu\text{g}/\text{mL}$) medidos por Etest de las cepas de <i>S. aureus</i> incluidos en el estudio según los grupos clonales.....	103
Tabla V.7: Valores de CMI de vancomicina determinados por las dos técnicas (BMD y Etest) en función del grupo <i>agr</i>	105
Tabla V.8: Características demográficas y clínicas de los pacientes incluidos en el estudio en función del desarrollo de complicaciones en los episodios de bacteriemia.....	108

Tabla V.9: Factores de riesgo para SAB complicada: análisis univariante y multivariante.....	115
Tabla V.10: Lista de artículos que evalúan la relación de virulencia de <i>S. aureus</i> y complejos clonales	118
Tabla V.11: Distribución de los aislados de <i>S. aureus</i> causantes de bacteriemias según el grupo agr y el complejo clonal, categorizados según el desarrollo de complicaciones o mortalidad a los 30 días	121
Tabla V.12: CMIs de vancomicina para <i>S. aureus</i> de acuerdo con la presencia o ausencia del gen PVL	123
Tabla V.13: Factores de riesgo para SAB complicada por MSSA: análisis univariante y multivariante	126
Tabla V.14: Características genéticas de los aislados de <i>S. aureus</i> productores de bacteriemias complicadas y no complicadas.....	130



I. Introducción

Figura I.1. Estructura de la pared celular de <i>S. aureus</i>	16
Figura I.2. Factores de virulencia de <i>S. aureus</i>	18
Figura I.3. Representación del proceso de fagocitosis de las células bacterianas por parte de los neutrófilos y mecanismos de killing.....	22
Figura I.4. Representación de la formación de poros heptaméricos en las membranas celulares eucariotas por las toxinas estafilocócicas.....	25
Figura I.5. Características generales de la estructura de las enterotoxinas.....	27
Figura I.6. Estructura química de la vancomicina.....	42

IV. Metodología

Figura IV.1. Panel de microdilución con concentraciones cuasicontinuas de vancomicina.....	62
Figura IV.2. Fotografías de <i>S. aureus</i> obtenidas mediante microscopía electrónica en las que se mide el grosor de la pared celular.....	65
Figura IV.3. Matriz en la que se realiza el proceso de hibridación.....	67
Figura IV.4. Imagen digitalizada y procesada de la micromatriz de hibridación.....	68

V. Resultados y discusión

Figura V.1. Imagen de una tira de Etest de vancomicina en la que se determina la CMI de vancomicina para <i>S. aureus</i>	73
Figura V.2. Valores de CMI de vancomicina para <i>S. aureus</i> (MSSA, MRSA y todos) medidas por Etest.	74
Figura V.3. Precisión del intra-ensayo determinada por la desviación estándar de los valores de CMI de vancomicina para <i>S. aureus</i> de 20 cepas (10 MRSA y 10 MSSA).....	75
Figura V.4. Discrepancias en los valores de CMI de vancomicina para <i>S. aureus</i> determinadas por dos observadores en los dos centros (HGU y HCV).....	76
Figura V.5. Valores de CMI de vancomicina (VAN MIC) para <i>S. aureus</i> medidas por Etest en el HCU y HGU (media y desviación estándar).....	77
Figura V.6. Discrepancias en los valores de CMI obtenidas en los dos centros.....	77
Figura V.7. Valores de CMI de vancomicina (VAN MIC Etest) de <i>S. aureus</i> medidas por Etest en los diferentes momentos del análisis (precongelación (“Pre”), y tras 6 meses de congelación (“Post”)) (media y desviación estándar).....	78
Figura V.8. Diferencias de los valores de CMI medidos en el momento del aislamiento de <i>S. aureus</i> vs los valores obtenidos en los subcultivos primarios en el HCU (media de los valores determinados por dos observadores).....	79
Figura V.9. Distribución de los valores de CMI de vancomicina ($\mu\text{g/ml}$) de los aislados de <i>S. aureus</i> (n=50) en el primer experimento (A) y en el segundo (B). Los valores que se muestran de de CMI corresponden a la media de los cuatro valores obtenidos de cada aislado.....	81
Figura V.10. Valores de CMI medidos por BMD y Etest (empleando 3 inóculos distintos). Los valores de CMI de BMD se corresponden a la media de los 4 replicados testados de cada aislado.....	83

Figura V.11. Efecto de la congelación en los valores de la CMI de vancomicina para <i>S. aureus</i> . Se muestran los valores de la CMI de vancomicina medidas en el momento del aislamiento, tras 1 mes y tras 3 meses de congelación a -20°C . El valor de la CMI que se muestra es la media de los cuatro valores determinados para cada aislado.....	85
Figura V.12. Distribución de los aislados de <i>S. aureus</i> en los diferentes grupos de killing (KI) (categorizados en KI bajo ($< 30\%$), KI intermedio ($\leq 30\%$ y $> 70\%$), y KI alto ($\geq 70\%$)).....	92
Figura V.13. Valores de la CMI de vancomicina tanto por el método de BMD (media= 0.65; mediana=0.63 para <60 y media= 0.66 y mediana= 0.63 para >70) (A) y por Etest (media= 0.97; mediana=1.0 para <60 y media= 1.02 y mediana= 1 para >70) (B) en función de la resistencia que presentan a la fagocitosis mediada por neutrófilos medida en Killing index (%).....	93
Figura V.14. Ensayo de fagocitosis.....	94
Figura V.15. Grosor de la pared celular de las cepas de <i>S. aureus</i> (media) en función de la CMI a vancomicina y al grupo de killing al que pertenecen (Alto $>70\%$; Bajo $\leq 70\%$).....	98
Figura V.16. Correlación de los valores del grosor de la pared celular con el índice de killing.....	99
Figura V.17. Distribución de los valores de CMI de vancomicina para <i>S. aureus</i> medidos por BMD y Etest de los distintos complejos clonales estudiados.....	104
Figura V.18. Valores de CMI de las cepas de vancomicina para <i>S. aureus</i> de los distintos grupos de <i>agr</i>	106
Figura V.19. Distribución de las distintas CMIs de vancomicina para <i>S. aureus</i> medidas por BMD (A y C) y Etest (B y D) según el desarrollo de complicaciones o no en el contexto de bacteriemia.....	111
Figura V.20. Distribución del KI (mediana con rango intercuartílico) en función del desarrollo o no de complicaciones considerando A) MRSA y MSSA, ($P= 0.5$); B) únicamente MSSAB, ($P= 0.71$).....	113
Figura V.21. Distribución de los distintos complejos clonales incluidos en nuestro estudio....	118

Figura V.22. CMI de vancomicina A) por BMD y B) por Etest; en función de la presencia o no del gen de PVL..... 124

Figura V.23. Distribución del número de aislados de *S.aureus* que presentan o no el gen *Sec/SeI* en función de las complicaciones..... 128



Genes diana de S. aureus Genotyping kit 2.0 (Alere[®])	
MARCADORES DE ESPECIES	
Dominio 1 de 23S-rRNA	<i>rrnD1</i>
Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa	<i>gapA</i>
Catalasa A	<i>KatA</i>
Coagulasa	<i>coA</i>
Nucleasa extracelular termoestable	<i>nuc1</i>
Proteína A estafilocócica	<i>Spa</i>
Proteína unión a IgG	<i>Sbi</i>
GENES REGULADORES	
Gen regulador A accesorio estafilocócico	<i>sarA</i>
histidina proteín-quinasa	<i>saeS</i>
Proteína sensor	<i>vraS</i>
Hemolisina delta	<i>Hld</i>
GENES DE RESISTENCIA A METICILINA	
Proteína alternativa de unión a penicilina (2')	<i>mecA</i>
Proteína de superficie sensible a plasmina	<i>plsSCC</i>
GENES DE RESISTENCIA: PENICILINASA	
Gen de beta-lactamasa	<i>blaZ</i>
Gen inhibidor de beta-lactamasa	<i>blaI</i>
Proteína reguladora de beta-lactamasa	<i>blaR</i>
GENES DE RESISTENCIA: ANTIBIOTICOS-MLS	
rRNA metiltransferasa asociada a resistencias con macrólidos/lincosamidas	<i>erm(A)</i>

rRNA metiltransferasa asociada a resistencias con macrólidos/lincosamidas	<i>erm(B)</i>
rRNA metiltransferasa asociada a resistencias con macrólidos/lincosamidas	<i>erm(C)</i>
Lincosaminida nucleotidiltransferasa	<i>lnu(A)</i>
Bomba de eflujo de macrólidos	<i>msr(A)</i>
Proteína A de eflujo de macrólidos	<i>mef(A)</i>
Fosfotranferasa II de macrólidos	<i>mph(C)</i>
Virginiamicina A acetiltransferasa	<i>vat(A)</i>
Acetiltransferasa inactivadora de estreptogramina A	<i>vat(B)</i>
Transportador ABC de resistencia a estreptogramina A	<i>vga(A)</i>
Virginiamicina B hidrolasa	<i>vgB(A)</i>
GENES DE RESISTENCIA: AMINOGLICÓSIDOS	
Aminoglicosido adenilfosfotranferasa	<i>aacA-aphD</i>
Aminoglicosido adeniltransferasa	<i>aadD</i>
Aminoglicósido fosfotranferasa	<i>aphA3</i>
GENES DE RESISTENCIA: VARIOS	
Estreptotricina acetiltransferasa	<i>Sat</i>
Dihidrofolato reductasa mediadora de resistencia de trimetoprim	<i>dfrS1</i>
Gen de resistencia a ácido fusídico	<i>fusB</i>
Gen de resistencia a ácido fusídico	<i>fusC</i>
Isoleucil-tRNA sintetasa asociada a resistencia con mupirocina	<i>mupA</i>
Proteína de eflujo de tetraciclinas	<i>tet(K)</i>
Proteína de protección ribosomal asociada a resistencia de tetraciclinas	<i>tet(M)</i>
<i>Cloranfenicol acetiltransferasa</i>	<i>cat (total)</i>
<i>23S rRNA metiltransferasa</i>	<i>Cfr</i>
<i>Exportador de cloranfenicol</i>	<i>fexA</i>

<i>Metalotioltransferasa</i>	<i>fosB</i>
<i>Metalotioltransferasa</i>	<i>fosB (plasmid)</i>
GENES DE RESISTENCIA: SISTEMAS DE EFLUJO	
Componente de amonio cuaternario/Proteína C de eflujo	<i>qacA</i>
Componente de amonio cuaternario/Proteína C de eflujo	<i>qacC (total)</i>
Proteína de transporte putativo	<i>sdrM</i>
GENES DE RESISTENCIA: GLICOPÉPTIDOS	
Gen de resistencia a vancomicina	<i>vanA</i>
Gen de resistencia a vancomicina de enterococci y Clostridium	<i>vanB</i>
Gen de resistencia a Teicoplanina de enterococci	<i>vanZ</i>
GENES DE VIRULENCIA	
Toxina del síndrome del shock tóxico 1	<i>tst1</i>
Enterotoxina A	<i>Sea</i>
Enterotoxina B	<i>Seb</i>
Enterotoxina C	<i>Sec</i>
Enterotoxina D	<i>Sed</i>
Enterotoxina E	<i>See</i>
Enterotoxina G	<i>Seg</i>
Enterotoxina H	<i>Seh</i>
Enterotoxina I	<i>Sei</i>
Enterotoxina J	<i>Sej</i>
Enterotoxina K	<i>Sek</i>
Enterotoxina L	<i>Sel</i>
Proteína M ("enterotoxine-like)	<i>Selm</i>
Proteína N ("enterotoxine-like)	<i>seln</i>
Proteína O ("enterotoxine-like)	<i>Selo</i>

Enterotoxina	<i>Egc</i>
Enterotoxina Q	<i>Seq</i>
Enterotoxina R	<i>Ser</i>
Proteína U ("enterotoxine-like)	<i>Selu</i>
Proteína ORF ("enterotoxine-like)	<i>ORF CM14</i>
<i>Hemolisina gamma/ componente B de leucocidina (F)</i>	<i>lukF</i>
<i>Hemolisina gamma/ componente C de leucocidina (S)</i>	<i>lukS</i>
<i>Hemolisina gamma, componente A</i>	<i>hlgA</i>
<i>Leucocidina de Panton Valentine, componente F</i>	<i>lukF-PV</i>
<i>Leucocidina de Panton Valentine, componente S</i>	<i>lukS-PV</i>
<i>Leucocidina de rumiantes, componente S</i>	<i>lukM</i>
<i>Leucocidina, componente D</i>	<i>lukD</i>
<i>Leucocidina, componente E</i>	<i>lukE</i>
<i>Proteína de familia de las toxinas leucocidina/hemolisina</i>	<i>lukX</i>
<i>Proteína de familia de las toxinas leucocidina/hemolisina</i>	<i>lukY</i>
<i>Proteína de membrana</i>	<i>HI</i>
<i>Hemolisina alpha</i>	<i>Hla</i>
Estafiloquinasa	<i>Sak</i>
Proteína inhibidora de quimiotaxis	<i>Chp</i>
Inhibidor estafilocócico del complemento	<i>Scn</i>
Toxina exfoliativa serotipo A	<i>etA</i>
Toxina exfoliativa serotipo B	<i>etB</i>
Toxina exfoliativa D	<i>etD</i>
Inhibidor de diferenciación celular epidérmico	<i>edinA</i>
Inhibidor de diferenciación celular epidérmico B	<i>edinB</i>
Inhibidor de diferenciación celular epidérmico C	<i>edinC</i>

Elemento móvil del catabolismo de arginina	<i>ACME cluster</i>
Argininasaminasa	<i>arcA-SCC</i>
Ornitilcarbamoiltransferasa	<i>arcB-SCC</i>
Carbamatoquinasa	<i>arcC-SCC</i>
Arginina/ornitina antitransportador	<i>arcD-SCC</i>
aureolisina	<i>Aur</i>
Serinproteasa A	<i>spIA</i>
Serinproteasa B	<i>spIB</i>
Serinproteasa E	<i>spIE</i>
Glutamilendopeptidasa	<i>sspA</i>
Proteasa estafofaina B	<i>sspB</i>
Proteasa estafofaina A	<i>sspP (consensus)</i>
Exotoxina estafilocócica	<i>setC/setx</i>
Proteína estafilocócica (“exotoxin-like”)	<i>ssl01/set6</i>
Proteína estafilocócica (“exotoxin-like”)	<i>setB3</i>
GENES DE LA CÁPSULA Y BIOFILMS	
Tipo capsular 1	<i>cap 1 (total)</i>
Tipo capsular 5	<i>cap 5 (total)</i>
Tipo capsular 8	<i>cap 8 (total)</i>
Proteína A de adhesión intracelular	<i>icaA</i>
Proteína C de adhesión intracelular	<i>icaC</i>
Proteína D de síntesis de biofilm	<i>icaD</i>
Proteína de superficie implicada en formación de biofilm	<i>bap</i>
GENES DE ADHESIÓN Y MSCRAMM	
Proteína de unión a sialoproteínas	<i>bbp (total)</i>
Clumping factor A	<i>clfA (total)</i>

Clumping factor B	<i>clfB</i> (total)
Adhesina de unión al colágeno	<i>cna</i>
Proteína de unión a la fibronectina	<i>ebh</i>
Proteína de unión a la elastina	<i>ebpS</i> (total)
Enolasa	<i>eno</i>
Proteína de unión al fibrinógeno	<i>fib</i>
Proteína A de unión a la fibronectina	<i>fnbA</i> (total)
Proteína B de unión a la fibronectina	<i>fnbB</i> (total)
Proteína análoga al complejo mayor de histocompatibilidad de clase II	<i>map</i> (total)
Proteína G de superficie	<i>sasG</i> (total)
Proteína C de unión a sialoproteína	<i>sdrC</i> (total)
Proteína D de unión a sialoproteína	<i>sdrD</i> (total)
Proteína de unión al factor de van willebrand	<i>vwb</i> (total)
Antígeno B inumodominante	<i>isaB</i>
Proteína de resistencia a defensina	<i>mprF</i> (COL+MW2)
Proteína de unión a transferrina	<i>isdA</i>
OTROS GENES	
Proteína LmrP similar a la membrana integral	<i>lmrP</i>
Subunidad desoxiribonucleasa tipo I (primer locus)	<i>hds1</i>
Subunidad desoxiribonucleasa tipo I (segundo locus)	<i>hds2</i>
Subunidad desoxiribonucleasa tipo I (tercer locus)	<i>hds3</i>
Subunidad desoxiribonucleasa tipo I (locus desconocido)	<i>hdsx</i>
Proteína hipotética, próxima al operon serin proteasa	<i>Q2FXC0</i>
Transportador de eflujo inespecífico	<i>Q2YUB3</i>
Proteína hipotética	<i>Q7A4X2</i>

Hialuronatoliasa (primer locus)	<i>hysA1</i>
Hialuronatoliasa (segundo locus)	<i>hysA2</i>



ESCRITO DEL DIRECTOR DE LA TESIS DOCTORAL SOBRE EL FACTOR DE IMPACTO DE LAS PUBLICACIONES QUE SE RECOGEN EN LA TESIS DOCTORAL.

Los factores de impacto de las revistas en las que se han publicado los trabajos compendiados en esta tesis doctoral se presentan en la siguiente tabla:

Artículo	Revista	Año de publicación	Factor de Impacto
I	Clinical Infectious Diseases	2015	9.11
II	International journal of antimicrobial agents	2016	4.21
III	European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases	2017	2.54
IV	European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases	2019	2.54

D. David Navarro Ortega,

Catedrático, Facultad de Medicina

Departamento de Microbiología y Ecología

Universidad de Valencia

Valencia, a 24 de Abril de 2019

X. ARTÍCULOS

in patients infected by MSSA isolates with vancomycin minimum inhibitory concentrations (MICs) in the upper end of the susceptible range ($\geq 1.5 \mu\text{g/mL}$) as measured by Etest [1]. As pointed out by Kaasch and colleagues in their comment to the above-referenced work [2], the reproducibility of Etest results and interobserver variance of the assay were not investigated. Given the narrow MIC margin for isolate categorization as high susceptible ($\leq 1 \mu\text{g/mL}$) vs low susceptible ($\geq 1.5 \mu\text{g/mL}$), knowledge of the precision and reproducibility of vancomycin MICs measured by Etest seems of paramount relevance. Our study aimed to address this issue.

A total of 100 consecutive cryopreserved (-70°C) *S. aureus* isolates (MSSA, $n = 65$; methicillin-resistant *S. aureus* [MRSA], $n = 35$) isolated from blood cultures between 2012 and 2015 at the Hospital Clínico Universitario (HCU) were evaluated. Primary subcultures were made on 2 sheep blood agar plates (BD [Beckton Dickinson, Sparks, Maryland]), 1 of which was shipped to the Consorcio Hospital General (HGU) for parallel testing. The Etest was performed simultaneously at both institutions using a 0.5 McFarland standard inoculum (0.98×10^8 and 1.3×10^8 colony-forming units/mL) streaked on Mueller-Hinton agar (BD), followed by the application of vancomycin Etest strips (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France). The MIC measurements were made using the same lots of media and Etest strips. The plates were read visually by 2 of the authors (blinded to each other) at each center after 24 hours of incubation at 35°C in ambient air. Twenty randomly chosen isolates were tested in quintuplicate at HCU for the assessment of within-run precision. The *S. aureus* American Type Culture Collection 25923 quality-control strain was run in parallel. Minor and major discrepancies were defined when MIC values were within the same or within a distinct susceptibility category (low vs high), respectively.

All *S. aureus* strains evaluated in this study were susceptible to vancomycin.

Intra- and Interinstitutional Evaluation of an Etest for Vancomycin Minimum Inhibitory Concentration Measurement in *Staphylococcus aureus* Blood Isolates

TO THE EDITOR—We read with great interest the study by Cervera and colleagues on the clinical outcome of patients with left-sided endocarditis due to methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) [1]. They showed a 3-fold higher mortality

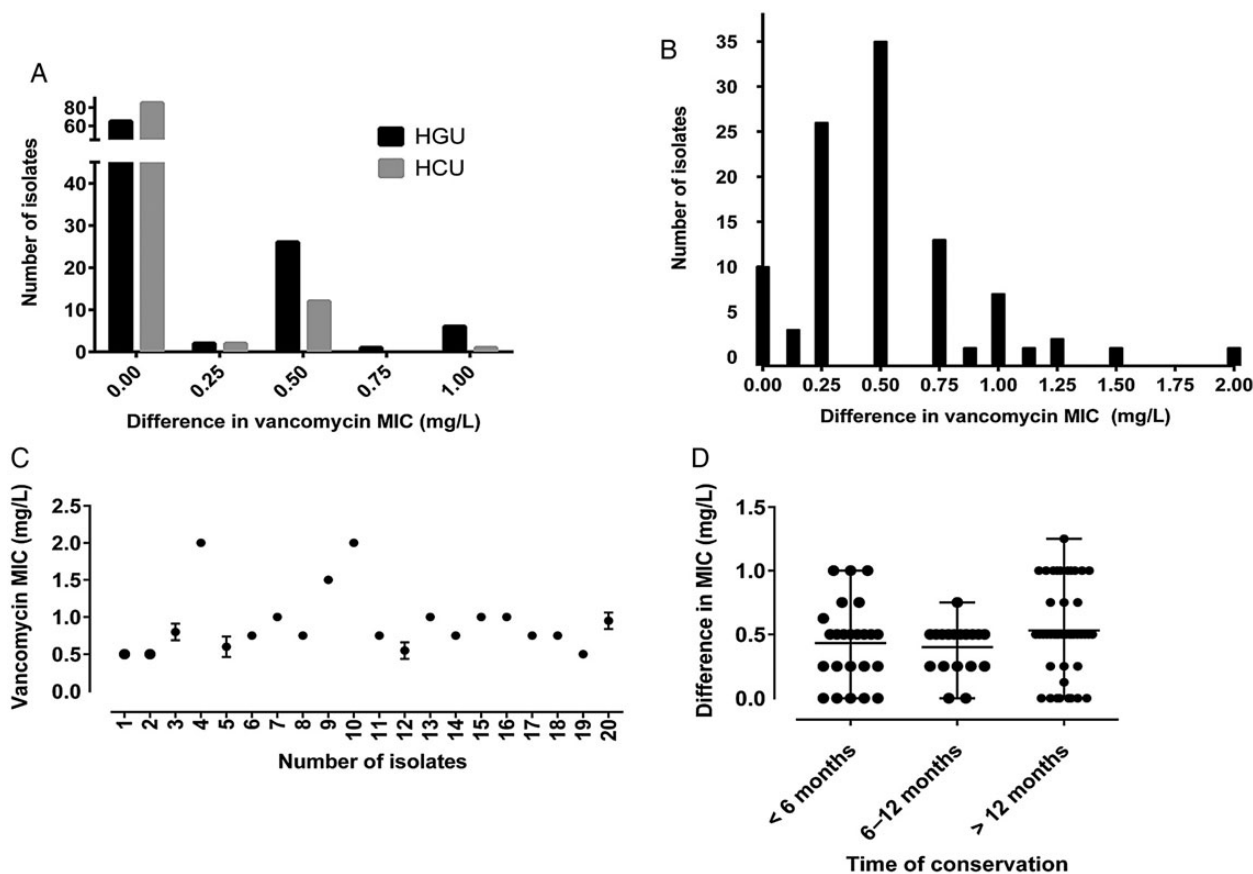


Figure 1. A, Differences in vancomycin minimum inhibitory concentration (MIC) values measured by 2 observers (interobserver reproducibility) at the participating centers (Hospital Clínico Universitario [HCU], Valencia, Spain, and Consorcio Hospital General Universitario [HGU], Valencia, Spain). The interobserver agreement for categorical vancomycin MIC stratification (low vs high susceptible) was fair at both centers (κ , 0.79 at HCU and κ , 0.66 at HGU). B, Differences in vancomycin MIC values measured at the 2 participating centers (mean of 2 readings at each center; interinstitution reproducibility). MIC values at HCU (mean MIC, 1.20 $\mu\text{g}/\text{mL}$; standard deviation [SD], 0.36) were significantly lower ($P < .0001$; t test) than those measured at HGU (mean MIC, 1.67 $\mu\text{g}/\text{mL}$; SD, 0.44). C, Interassay (within-run) precision of the vancomycin Etest for 20 *Staphylococcus aureus* isolates (10 methicillin-susceptible *S. aureus* and 10 methicillin-resistant *S. aureus*). D, Differences between vancomycin MIC values measured at the time of *S. aureus* isolation vs MIC values obtained for primary subcultures of *S. aureus* isolates at HCU (mean of MIC values measured by the 2 observers). MIC values for primary subcultures of *S. aureus* isolates were significantly lower ($P < .001$; t test) than those measured at the time of isolation. This effect could be evidenced for isolates cryopreserved less than 6 months, although it was more pronounced for isolates preserved longer than 1 year.

Mean MIC values measured by the 2 observers at each center were comparable ($P = >.05$; t test; Figure 1A), yet major discrepancies were observed: 10 at HCU involving 9 MSSA and 1 MRSA isolates and 11 at HGU involving 6 MRSA and 5 MSSA isolates. Overall, the mean difference between vancomycin MIC values measured at the participating institutions was 0.468 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (95% confidence interval, .541–.39; Figure 1B). Fifty-three and 37 major and minor discrepancies, respectively, were annotated; among the former, 44 involved MSSA isolates and

9 involved MRSA isolates. The inter-within-run precision of the vancomycin Etest was ± 1.03 -fold (mean of the standard deviation, 0.023 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Figure 1C). In support of previously published data [3,4], MIC values for primary subcultures of *S. aureus* isolates (mode, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$; range, 0.5–3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were significantly lower ($P < .001$; t test) than those measured at the time of isolation (Figure 1D). These differences translated into 40 major discrepancies (28 corresponding to MSSA isolates and 12 to MRSA isolates).

While the data presented herein do not necessarily dismiss the association between high vancomycin MICs and the poor clinical outcome of *S. aureus* invasive infections [5–10], they should be taken into consideration in future studies that address this issue in order to minimize the possibility of an erroneous categorization of *S. aureus* isolates as being “low” vs “high susceptible” or vice versa.

Notes

Acknowledgments. We thank Estela Giménez for technical assistance.

Financial support. This work was supported, in part, by a grant from Pfizer Pharmaceuticals.

Potential conflicts of interest. All authors: No potential conflicts of interest.

All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

Rocío Falcón,^{1,a} Silvia Madrid,^{1,a} Nuria Tormo,² Cristina Casañ,² Eliseo Albert,¹ Concepción Gimeno,^{2,3} and David Navarro^{1,3}

¹Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario, Fundación Instituto de Investigación Sanitaria Hospital Clínico de Valencia, ²Microbiology Service, Consorcio Hospital General Valencia, and ³Department of Microbiology, School of Medicine, University of Valencia, Spain

References

1. Cervera C, Castañeda X, García de la María C, et al. Effect of vancomycin minimal inhibitory concentration on the outcome of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* endocarditis. *Clin Infect Dis* **2014**; 58:1668–75.
2. Kaasch AJ, Jung N, Fätkenheuer G, Seifert H. Vancomycin minimum inhibitory concentration in methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* and mortality: more than handwaving? *Clin Infect Dis* **2015**; 60:668.
3. Charlton CL, Hindler JA, Turnidge J, Humphries RM. Precision of vancomycin and daptomycin MICs for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and effect of subculture and storage. *J Clin Microbiol* **2014**; 52:3898–905.
4. Ludwig F, Edwards B, Lawes T, Gould IM. Effects of storage on vancomycin and daptomycin MIC in susceptible blood isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* **2012**; 50:3383–7.
5. Soriano A, Marco F, Martínez JA, et al. Influence of vancomycin minimum inhibitory concentration on the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Infect Dis* **2008**; 46:193–200.
6. Holmes NE, Turnidge JD, Munckhof WJ, et al. Antibiotic choice may not explain poorer outcomes in patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia and high vancomycin minimum inhibitory concentrations. *J Infect Dis* **2011**; 204:340–7.
7. Aguado JM, San-Juan R, Lalueza A, et al. High vancomycin MIC and complicated methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Emerg Infect Dis* **2011**; 17:1099–102.
8. Aguado JM, San-Juan R, Fernández-Ruiz M, Chaves F. Role of high vancomycin minimum inhibitory concentration in the outcome of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia. *J Infect Dis* **2012**; 205:1024–5.
9. van Hal SJ, Fowler VG Jr. Is it time to replace vancomycin in the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections? *Clin Infect Dis* **2013**; 56:1779–88.
10. Kalil AC, Van Schooneveld TC, Fey PD, Rupp ME. Association between vancomycin minimum inhibitory concentration and mortality among patients with *Staphylococcus aureus* bloodstream infections: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* **2014**; 312:1552–64.

^aR. F. and S. M. contributed equally to this work.

Correspondence: David Navarro, MD, PhD, Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario and Department of Microbiology, School of Medicine, Av. Blasco Ibáñez 17, 46010 Valencia, Spain (david.navarro@uv.es).

Clinical Infectious Diseases® 2015;61(9):1490–2

© The Author 2015. Published by Oxford University Press on behalf of the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. For Permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com.

DOI: 10.1093/cid/civ583



High vancomycin MICs within the susceptible range in *Staphylococcus aureus* bacteraemia isolates are associated with increased cell wall thickness and reduced intracellular killing by human phagocytes

Rocío Falcón^{a,1}, Alba Martínez^{b,1}, Eliseo Albert^a, Silvia Madrid^a, Rosa Oltra^c, Estela Giménez^a, Mario Soriano^d, Víctor Vinuesa^a, Daniel Gozalbo^b, María Luisa Gil^e, David Navarro^{a,f,*}

^a Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario de Valencia, Fundación INCLIVA, Valencia, Spain

^b Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Valencia, Spain

^c Unit of Infectious Diseases, Hospital Clínico Universitario de Valencia, Fundación INCLIVA, Valencia, Spain

^d Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia, Spain

^e Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, University of Valencia, Valencia, Spain

^f Department of Microbiology, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 November 2015

Accepted 29 January 2016

Keywords:

Vancomycin

Minimum inhibitory concentration (MIC)

Staphylococcus aureus

Intracellular killing

Cell wall thickness

Human phagocytes

ABSTRACT

Vancomycin minimum inhibitory concentrations (MICs) at the upper end of the susceptible range for *Staphylococcus aureus* have been associated with poor clinical outcomes of bloodstream infections. We tested the hypothesis that high vancomycin MICs in *S. aureus* bacteraemia isolates are associated with increased cell wall thickness and suboptimal bacterial internalisation or lysis by human phagocytes. In total, 95 isolates were evaluated. Original vancomycin MICs were determined by Etest. The susceptibility of *S. aureus* isolates to killing by phagocytes was assessed in a human whole blood assay. Internalisation of bacterial cells by phagocytes was investigated by flow cytometry. Cell wall thickness was evaluated by transmission electron microscopy. Genotypic analysis of *S. aureus* isolates was performed using a DNA microarray system. Vancomycin MICs were significantly higher ($P=0.006$) in isolates that were killed suboptimally (killing index <60%) compared with those killed efficiently (killing index >70%) and tended to correlate inversely ($P=0.08$) with the killing indices. Isolates in both killing groups were internalised by human neutrophils and monocytes with comparable efficiency. The cell wall was significantly thicker ($P=0.03$) in isolates in the low killing group. No genotypic differences were found between the isolates in both killing groups. In summary, high vancomycin MICs in *S. aureus* bacteraemia isolates were associated with increased cell wall thickness and reduced intracellular killing by phagocytes.

© 2016 Elsevier B.V. and the International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

1. Introduction

Staphylococcus aureus bacteraemia is a common nosocomial and community-acquired infection associated with high morbidity and mortality [1]. Vancomycin minimum inhibitory concentrations (MICs) at the upper end of the susceptible range ($\text{MIC} \geq 1.5 \text{ mg/L}$) as measured by Etest both for methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA)

and methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) isolates have been associated with poor clinical outcomes of bloodstream infections treated with vancomycin and even with β -lactam antibiotics [2–9]. Based on these observations, a debate has emerged over whether the use of alternative agents, such as linezolid or daptomycin, as first-line agents or in combined therapies in this particular setting is clinically justified [10–13]. Other studies, however, failed to reproduce these findings [14,15]. Vancomycin treatment failures of bacteraemia episodes caused by MRSA isolates with high MICs have been postulated to occur due to the impossibility of achieving drug concentrations within the therapeutic range [3]. However, this could not be demonstrated in a recent study [14]. Moreover, bacteraemia episodes caused by MSSA isolates displaying high vancomycin MICs, even those not treated with this drug, have been

* Corresponding author. Present address: Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario de Valencia and Department of Microbiology, School of Medicine, Av. Blasco Ibáñez 17, 46010 Valencia, Spain. Tel.: +34 96 386 4657; fax: +34 96 386 4173.

E-mail address: david.navarro@uv.es (D. Navarro).

¹ These two authors contributed equally to this work.

reported to have a worse clinical outcome [2,4,5,9]. In these latter studies, it was hypothesised that a high vancomycin MIC may be a marker for certain inherent organism characteristics linked to poor outcomes. In this context, accessory gene regulator (*agr*) dysfunction or carrying *agr* genotype II have been associated with an elevated vancomycin MIC [16,17]. Nevertheless, data contradicting these findings have recently been published [15]. Furthermore, a number of specific resistance and virulence genes have been also linked to an elevated vancomycin MIC [16,17].

It is well known that vancomycin-intermediate *S. aureus* (VISA), heterogeneous VISA (hVISA) and vancomycin-resistant *S. aureus* (VRSA) isolates have increased cell wall synthesis and significantly thickened cell walls compared with vancomycin-susceptible control strains [18,19]. Cell wall thickness appears to correlate with vancomycin MICs; thus, thickening of the cell wall may be a phenotypic determinant for low susceptibility or resistance to vancomycin in *S. aureus* [18]. By analogy, the occurrence of this phenomenon might also account to some extent for treatment failures of MSSA bacteraemia with β -lactams, as cell wall thickening could promote entrapment of the antibiotics by the cell wall thereby hampering its access to the target. This possibility, however, has not been proven to occur. Alternatively or concomitantly, cell wall thickening may result in reduced uptake or intracellular killing of bacterial cells by phagocytes. If true, this would help to explain why systemic infections caused by *S. aureus* with reduced susceptibility to vancomycin might have a poorer clinical outcome, as neutrophil phagocytosis and killing of bacteria are critical for host defence against *S. aureus* [20]. Here we hypothesised that high vancomycin MICs within the susceptible range in *S. aureus* bacteraemia isolates may be associated with increased cell wall thickness and suboptimal bacterial internalisation or lysis by human phagocytes.

2. Patients and methods

2.1. Study population

Ninety-five patients were included in the study. The diagnoses on hospital admission were as follows: bone and joint infection ($n=3$; 3.2%); cardiovascular disease ($n=4$; 4.2%); central nervous system disease ($n=8$; 8.4%); central venous catheter infection ($n=4$; 4.2%); fever ($n=11$; 11.6%); gastrointestinal disorder ($n=4$; 4.2%); haematological malignancy ($n=2$; 2.1%); lower respiratory tract infection ($n=16$; 16.8%); renal disease ($n=2$; 2.1%); severe sepsis or septic shock ($n=11$; 11.6%); solid malignancy ($n=4$; 4.2%); urinary tract infection ($n=5$; 5.3%); others ($n=15$; 15.8%); and unknown ($n=6$; 6.3%). Vancomycin was administered to 40 patients (23 with MRSA and 17 with MSSA infections). Ten patients were treated with vancomycin prior to bacterial isolation in blood cultures.

2.2. Bacterial isolates

Ninety-five *S. aureus* isolates (60 MSSA and 35 MRSA) recovered from blood cultures (BACTEC™ FX Instrument; BD Diagnostic Systems, Sparks, MD) from unique patients between 2012 and 2015 at the Microbiology Service of the Hospital Clínico Universitario de Valencia (Valencia, Spain) were evaluated in this study. All primary isolates had been cryopreserved at -70°C in glycerol containing Bacto™ brain–heart infusion (BHI) broth (BD Diagnostic Systems) for a median of 349.5 days (range, 16–976 days). The criteria for isolate selection were the availability of cryopreserved bacterial cells and the availability of a vancomycin MIC result for primary (original) isolates measured by Etest.

2.3. Determination of vancomycin minimum inhibitory concentrations

Vancomycin MICs were determined by Etest at the time of bacterial isolation. Etest was performed using a 0.5 McFarland standard inoculum, as determined by turbidity measurement using a VITEK DensiChek nephelometer (BD Diagnostic Systems), streaked on Mueller–Hinton agar (BD Diagnostic Systems) followed by the application of vancomycin Etest strips (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France). Viable colony counts to verify the density of the inoculum suspension in terms of CFU/mL were performed regularly. The plates were read visually by the same observer throughout the study period (DN) using a magnifying glass after 24 h incubation at 35°C in ambient air. The MIC was defined as the value at which the inhibition zone intersected the scale of the Etest strip. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 was used as a quality control strain. All isolates were screened for vancomycin heteroresistance (hVISA) by means of the Etest macromethod, which was performed using a 2.0 McFarland inoculum on BHI agar plates (BD Diagnostic Systems) using vancomycin and teicoplanin Etest strips (bioMérieux). Heteroresistance by the Etest macromethod was defined as MICs for vancomycin and teicoplanin of $\geq 8 \mu\text{g/mL}$, or a teicoplanin MIC of $\geq 12 \text{ mg/L}$ regardless of the vancomycin MIC.

2.4. Bactericidal activity of human blood cells

These experiments were performed following a published protocol originally designed for *Candida albicans*, which was adapted and optimised for *S. aureus* [21]. Briefly, whole blood was obtained from healthy volunteers (four individuals throughout the study period) by venipuncture using heparinised syringes (Lithium Heparin; BD Diagnostic Systems) and was immediately used in the experimental assays. All donors completed a health questionnaire. An aliquot of heparinised blood was centrifuged for 5 min at $3000 \times g$ to obtain the plasma fraction. Primary subcultures of the isolates were made on sheep's blood agar plates (BD Diagnostic Systems). Bacterial cells were grown in BHI broth at 37°C to exponential growth phase [absorbance at 600 nm (A_{600}) of ~ 0.25 – 0.35] and were then collected, washed in phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.4) and re-suspended in RPMI-1640 culture medium (Gibco, Barcelona, Spain). Then, 0.5×10^6 cells were inoculated in parallel into 100 μL of human whole blood or plasma (both previously diluted 1:2 into RPMI) and were incubated for 1 h at 37°C . The final ratio between bacterial cells/human leukocytes was 1:1. At the desired times (0 and 1 h), samples were diluted in pyrogen-free distilled water (pH 4.5–6.5), were left for 5 min at room temperature and were vortexed vigorously for ca. 5 s. Viable bacterial cells were determined by plating serial dilutions (in triplicate) on Mueller–Hinton agar followed by overnight incubation at 37°C . The percentage survival was calculated as follows: % CFU in blood = [CFU blood (1 h)/CFU blood (0 h)] $\times 100$; % CFU in plasma = [CFU plasma (1 h)/CFU plasma (0 h)] $\times 100$; % survival = (% CFU in blood/% CFU plasma) $\times 100$; % killing = 100 –% survival. A number of isolates were tested in two or three independent runs using blood from different donors; in these cases the mean value of the experiments were taken for the analyses. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Etest vancomycin MIC = 1 mg/L), which was previously shown to be killed efficiently (ca. 80%) by human neutrophils, was used as a control strain [22]. Preliminary experiments indicated that: (i) the coefficient of variation between replicates and the interassay coefficient of variation using blood from different donors were $< 10\%$; and (ii) cryopreservation had no effect on the susceptibility of *S. aureus* isolates to killing by human phagocytes (data not shown).

2.5. Phagocytosis assay

Staphylococcus aureus isolates were grown to mid-log phase [optical density at 600 nm (OD_{600}) of ~ 0.7] in BHI broth, were collected by centrifugation at $10,000 \times g$ for 10 min, were washed twice with PBS and were re-suspended in PBS at the desired concentration. An aliquot of the suspension (2.0×10^7 bacterial cells in 1 mL) was incubated at 37°C in the dark for 30 min with $5.0 \mu\text{M}$ carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFDA-SE) (Molecular Probes, Eugene, OR) according to the manufacturer's instructions. Cells were washed twice with PBS, were re-suspended in fixation buffer (BD Diagnostic Systems) and were maintained for 30 min at room temperature. After fixation, cells were washed twice with PBS and were quantified using a BD FACSVerse™ Flow Cytometer (BD Biosciences, San José, CA). Labelled *S. aureus* cells (6×10^6 bacteria in $5 \mu\text{L}$) were inoculated into $100 \mu\text{L}$ of whole blood, obtained as described above, and were incubated at 37°C for 15 min. Neutrophils and monocytes were then labelled according to standard procedures using the following antibodies (all purchased from BD Biosciences): phycoerythrin-labelled anti-CD15 (clone W6D3); and allophycocyanin-labelled anti-CD14 (clone M5E2), respectively. Samples were then fixed and erythrocytes were lysed using BD FACS Lysing Buffer (BD Biosciences). Neutrophils and monocytes were gated based on their CD15 and CD14 expression, respectively, and the extent of phagocytosis was determined by analysing the percentage of green (CFDA-SE-labelled) cells and by measuring the mean geometric intensity of green fluorescence. Flow cytometry analyses were performed on an LSRFortessa analyser (BD Biosciences) and the data were analysed with FACSDiVa (BD Biosciences) and FlowJo 10 software (Tree Star Inc., San Carlos, CA).

2.6. Transmission electron microscopy (TEM)

Preparation for and examination of *S. aureus* isolates by TEM was performed based on a previously described protocol [18,19] with some modification mostly involving the morphometric evaluation of cell wall thickness. Briefly, bacterial cells were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) for 24 h at 4°C and were then washed three times with 0.1 M phosphate buffer. A single drop of 1.5% agar was then added. Cells were post-fixed in 2% OsO_4 for 1 h at room temperature and were stained with 1% uranyl acetate at 4°C for 2 h in the dark. Cells were then rinsed in distilled water, were dehydrated in ethanol and were embedded overnight in Durcupan™ resin (Fluka, Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Following polymerisation, ultrathin sections ($0.07\text{--}0.08 \mu\text{m}$) were cut with a diamond knife, were stained with lead citrate (Reynolds solution) and were examined under a transmission electron microscope (FEI Tecnai G2 Spirit; FEI Europe, Eindhoven, The Netherlands). All images were acquired as 1336×1336 pixels using a digital camera (Morada; Olympus Soft Image Solutions GmbH, Münster, Germany) and analysed with iTEM software (Olympus Soft Imaging Solutions). Twenty bacterial cells of each isolate with nearly equatorial cut surfaces were selected for analyses. Cell wall thickness was measured at four different points on the wall (always in the same positions: up, down, left and right), i.e. those in which the resolution of the plasma membrane and the surface of the bacteria was sharper. The wall thickness for each isolate was calculated by averaging the values (the mean of these four measurements) obtained for each of the 20 bacterial cells.

2.7. DNA microarray

The *S. aureus* isolates were genotyped using an *S. aureus* DNA microarray (*S. aureus* Genotyping Kit 2.0; Clondiag, Jena, Germany) strictly following the recommendations of the manufacturer, and as previously described [23]. Extraction of bacterial DNA from

primary subcultures on sheep's blood agar plates (BD Diagnostic Systems) was performed using DNA extraction reagents from QIAGEN (Valencia, CA) and the automated device EZ1 (QIAGEN).

2.8. Statistical analysis

Univariate analyses were performed using the χ^2 test. Median values were compared by means of the Mann–Whitney *U*-test. The correlation between continuous variables was determined by means of the Spearman's rank test. Two-sided *P*-values of <0.05 were deemed significant. Statistical analyses were performed using IBM SPSS Statistics for Windows v.20.0 (IBM Corp., Armonk, NY).

3. Results

3.1. Susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates to vancomycin

Vancomycin MICs of the isolates are shown in Fig. 1. The modal vancomycin MIC was 2.0 mg/L both for MSSA and MRSA. One isolate displayed an MIC of 3.0 mg/L. This vancomycin MIC value fell between the susceptible (≤ 2 mg/L) and intermediate (≥ 4 mg/L) categories according to regulatory agencies (based on broth microdilution testing). The isolate was re-tested by broth microdilution and was found to be susceptible to vancomycin (MIC = 2 mg/L). The remaining isolates were not re-tested by broth microdilution. Thus, all *S. aureus* isolates included in this study were susceptible to vancomycin. No isolate was categorised as hVISA.

3.2. Vancomycin minimum inhibitory concentrations and *Staphylococcus aureus* killing by human phagocytes

We first investigated whether the *S. aureus* isolates were killed with different efficiency by human phagocytes in a whole blood assay. In this in vitro model, all of the isolates were capable of growing in plasma (not shown), likely reflecting the refractoriness of *S. aureus* to lysis by the complement system [24]. Most isolates ($n=61$) were killed as efficiently as the control strain ($>70\%$; high killing group). The remaining 34 isolates were killed to a lesser extent.

Of the latter isolates, eight were barely killed (killing indices $<30\%$). Designation of the isolates to either category was not influenced by the source of blood (volunteer from whom blood was obtained) (data not shown). Overall, MSSA isolates were killed more efficiently than their MRSA counterparts; the difference, however, did not reach statistical significance ($P=0.098$). Next we investigated whether the extent to which the isolates were killed was related to the vancomycin MIC. For this analysis, 16 isolates displaying killing indices between 60% and 70% were excluded to minimise as much as possible the impact of the intrarun and interassay coefficient of variation of the killing assay ($<10\%$) on the categorisation of the isolates. Thus, a total of 79 isolates were included. It was found that vancomycin MICs were significantly higher ($P=0.006$) in isolates that were killed suboptimally ($<60\%$; low killing group) than in those that were killed efficiently ($>70\%$; high killing group) (Fig. 2; Table 1). When MSSA and MRSA isolates were analysed independently, the same difference was observed for both isolate types, which approached but did not reach statistical significance (Fig. 2; Table 1). Overall, a trend towards a correlation between vancomycin MICs and killing indices was found (Fig. 3A).

3.3. Uptake of *Staphylococcus aureus* isolates by human phagocytes

In the next set of experiments, the efficiency at which isolates in both killing groups were internalised by human neutrophils

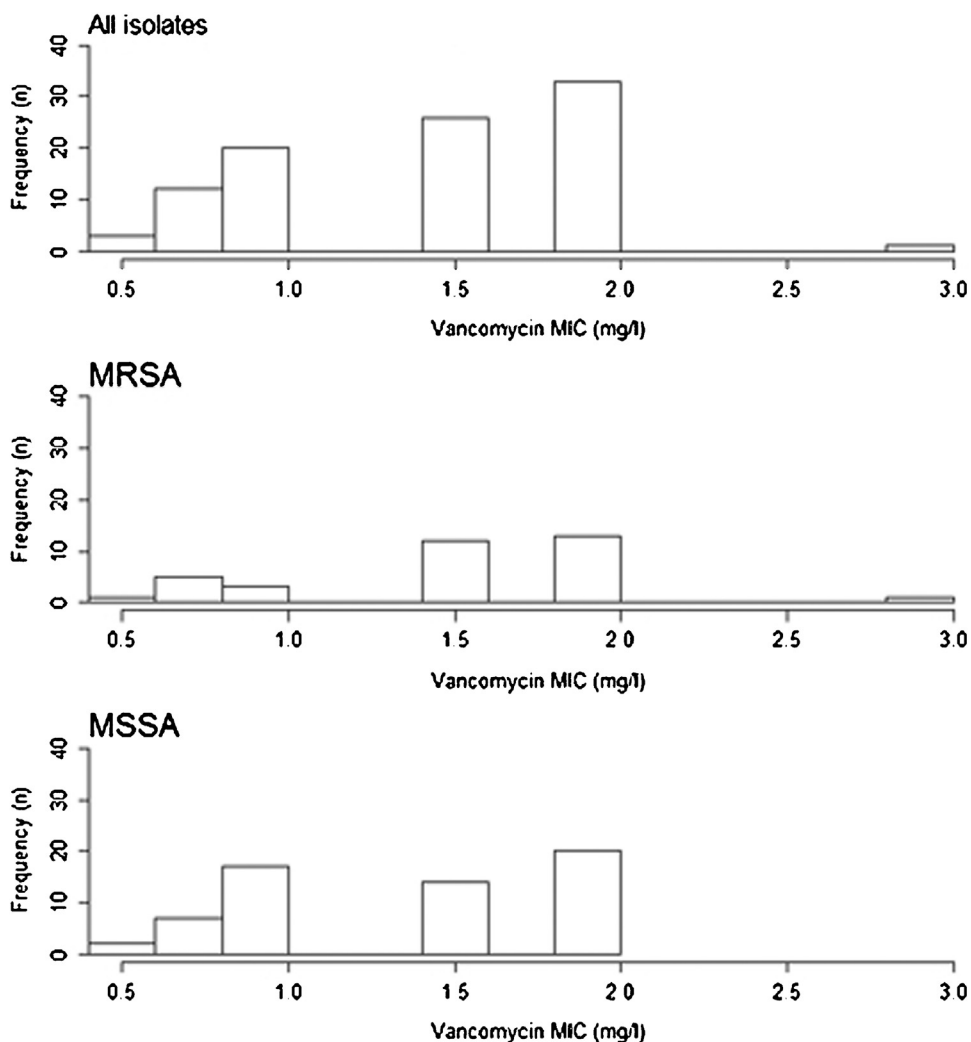


Fig. 1. Distribution of vancomycin minimum inhibitory concentrations (MICs), as determined by Etest, among *Staphylococcus aureus* isolates included in the study. MICs measured at the time of bacterial isolation for all isolates and separately for methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) and methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) isolates are shown.

and monocytes was assessed. Preliminary experiments indicated that both cell types remained viable following staining (data not shown). Ten isolates were run in these experiments, including six isolates with killing rates <30% and four isolates with killing indices >80%. Flow cytometry plots of a representative isolate are shown in Fig. 4. Both neutrophils and monocytes appeared to internalise *S. aureus* isolates displaying low and high killing indices with comparable efficiency ($P=0.08$ and $P=0.14$, respectively). In turn, the number of bacterial cells taken up by both cell types was also comparable ($P=0.64$ for neutrophils and $P=0.84$ for monocytes).

3.4. Genotypic analysis of *Staphylococcus aureus* isolates

Of the 79 isolates in the genotypic analyses, 68 could be genotyped using a DNA gene microarray system. We were interested in determining whether relevant differences existed regarding the clonality, capsular type and *agr* allele type distribution of the isolates between the two killing groups. As shown in Table 2, a wide variety of clonal complex types were found and these were distributed comparably among isolates in both killing groups. In addition, all isolates belonged to capsular type 5 or 8, and these

Table 1
Vancomycin minimum inhibitory concentrations (MICs) and cell wall thickness of *Staphylococcus aureus* isolates displaying high or low susceptibility to killing by human phagocytes.

Parameter	High killing index (>70%)			Low killing index (<60%)		
	All isolates	MSSA	MRSA	All isolates	MSSA	MRSA
Median (range) vancomycin MIC (mg/L)	1.50 (0.50–2.00)	1.50 (0.50–2.00)	1.50 (0.50–2.00)	2.00 (0.75–3.00)	1.75 (1.50–2.00)	2.00 (0.75–3.00)
Median (range) cell wall thickness (nm)	17.89 (15.83–21.60)	17.51 (15.83–18.82)	20.53 (17.31–21.60)	20.90 (15.61–51.28)	18.79 (18.47–51.28)	21.09 (15.61–37.68)

MSSA, methicillin-susceptible *S. aureus*; MRSA, methicillin-resistant *S. aureus*.

Table 2Clonal complex type, capsular types and accessory gene regulator (*agr*) allele genotypes of *Staphylococcus aureus* isolates according to their susceptibility to killing by human phagocytes.

Parameter		Susceptibility to killing [n (%)]		P-value
		Low killing index (<60%) (n = 20)	High killing index (>70%) (n = 48)	
Clonal complex type	1	1 (5.0)	1 (2.1)	0.486
	12	2 (10.0)	2 (4.2)	
	121	1 (5.0)	1 (2.1)	
	15	0 (0.0)	2 (4.2)	
	152	0 (0.0)	1 (2.1)	
	22	1 (5.0)	3 (6.3)	
	25	0 (0.0)	2 (4.2)	
	30	1 (5.0)	7 (14.6)	
	30 (ST34/42)	0 (0.0)	1 (2.1)	
	398	0 (0.0)	4 (8.3)	
	45 (<i>agr</i> I)	1 (5.0)	4 (8.3)	
	5	9 (45.0)	16 (33.3)	
	59	1 (5.0)	1 (2.1)	
	6	1 (5.0)	0 (0.0)	
	8	0 (0.0)	2 (4.2)	
	88	1 (5.0)	0 (0.0)	
	9	0 (0.0)	1 (2.1)	
97	1 (5.0)	0 (0.0)		
Capsular type	5	11 (55.0)	29 (60.4)	0.679
	8	9 (45.0)	19 (39.6)	
<i>agr</i> allele genotype	I	5 (25.0)	17 (35.4)	0.712
	II	11 (55.0)	21 (43.8)	
	III	3 (15.0)	9 (18.8)	
	IV	1 (5.0)	1 (2.1)	

were also distributed evenly in both killing groups. Likewise, no significant differences were found between the groups with respect to the *agr* allele type distribution of the isolates.

3.5. Bacterial cell wall thickness and *Staphylococcus aureus* killing by human phagocytes

In total, 26 isolates (13 MSSA and 13 MRSA) were subjected to morphometric study using TEM. For these analyses, 15 isolates in the low killing group (including the 8 isolates with killing indices <30%) and 11 in the high killing group were selected. Fig. 5 shows micrographs of four representative strains. Overall, the cell wall thickness of the isolates correlated inversely with the killing index (Fig. 3B). Furthermore, the cell wall was significantly thicker ($P=0.03$) in isolates in the low killing group (Table 1). This difference also stood when MSSA and MRSA isolates were considered independently, although statistical significance was not reached ($P \geq 0.1$). Interestingly, no correlation was observed between the

length of cryopreservation, which has been shown to have a great impact on MICs measured by Etest, and cell wall thickness ($P=0.14$).

4. Discussion

Emerging data suggest that bacteraemia caused by MRSA and MSSA strains displaying vancomycin MICs at the upper end of the susceptibility range ($\text{MIC} \geq 1.5 \text{ mg/L}$), as determined by Etest, may be associated with higher morbidity and mortality rates than those caused by highly susceptible strains ($\text{MIC} \leq 1 \text{ mg/L}$). Here we tested the hypothesis that the former isolates could be lysed suboptimally by human phagocytes. This would potentially account, at least in part, for the poorer clinical outcomes, as neutrophil phagocytosis and killing of bacteria are critical for host defence against *S. aureus* [20]. The plausibility of the hypothesis was supported by recent data suggesting that hVISA isolates may be more resistant to opsonophagocytosis and killing than vancomycin-susceptible isolates, at least under certain conditions [22]. In the current study

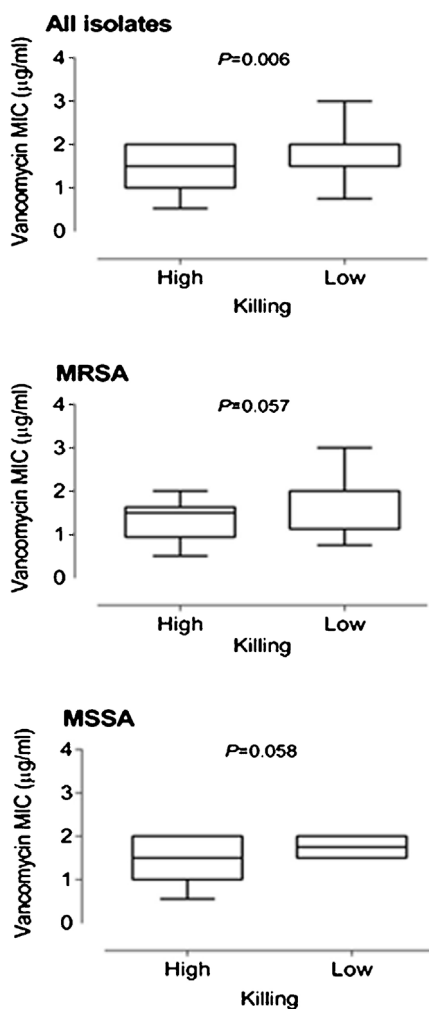


Fig. 2. Box-and-whisker plot (interquartile range) depicting vancomycin minimum inhibitory concentrations (MICs), as determined by Etest, among *Staphylococcus aureus* isolates displaying either high or low susceptibility to killing by human phagocytes in a whole blood assay (killing indices >70% or <60%, respectively). MICs measured at the time of bacterial isolation for all isolates and separately for methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) and methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) are shown. Median values were compared by means of the Mann–Whitney *U*-test. A two-sided *P*-value of <0.05 was deemed significant.

it observed that *S. aureus* isolates differed in their susceptibility to killing by phagocytes in a whole blood system, with most of them being killed efficiently (at the same level as the control strain). Thus, we next investigated whether an association existed between the killing indices and the vancomycin MICs measured at the time of bacterial isolation. In this context, we and others previously showed that vancomycin MICs for cryopreserved *S. aureus* isolates were significantly lower than the MICs measured at the time of isolation [25–27]. However, cryopreservation did not affect the susceptibility of the *S. aureus* isolates to killing in our system. These data indicated that *S. aureus* isolates (either MSSA or MRSA) that were killed suboptimally displayed higher vancomycin MICs than those that were killed efficiently. Furthermore, a trend towards a correlation between vancomycin MICs and the killing indices was found. Interestingly, isolates in both killing categories appeared to be internalised by human neutrophils and monocytes with comparable efficiency. The clonal complex distribution among isolates in both killing groups was not significantly different. Furthermore, representation of capsular type 5 (CP5+) in both groups was comparable. This is of great relevance as the CP5+ Reynold strain has been shown to display enhanced virulence in a murine model compared

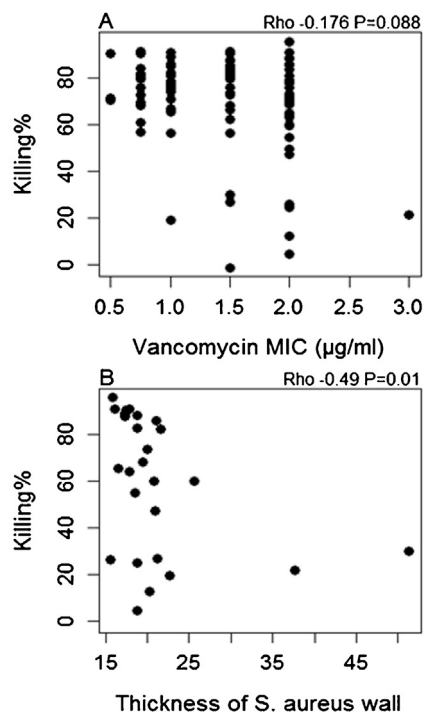


Fig. 3. (A) Correlation between vancomycin minimum inhibitory concentrations (MICs), as measured by Etest at the time of bacterial isolation, and the killing indices for all *Staphylococcus aureus* isolates included in the study. (B) Correlation between cell wall thickness, as measured by transmission electron microscopy, and the killing indices of *S. aureus* isolates. Correlation between these variables was evaluated by means of the Spearman's rank test. A two-sided *P*-value of <0.05 was deemed significant.

with the CP8+ strain, which correlates with their greater resistance to in vitro killing in whole mouse blood [28]. Likewise, the CP5+ strain displays greater survival in in vitro opsonophagocytic killing assays with human neutrophils and serum [28]. Finally, isolates in both killing groups did not differ in their *agr* allele type distribution. This is also of relevance as certain *agr* polymorphisms may have a dramatic impact on the biosynthesis of the *S. aureus* capsule [29].

Thickening of the cell wall is a common phenotype of clinical hVISA and VRSA strains, with the cell wall thickness highly correlating with vancomycin MICs [18,19]. Inasmuch as hVISA isolates may be more resistant to phagocyte killing than vancomycin-susceptible isolates [22], we investigated whether isolates with low killing indices had thicker cell walls than isolates highly susceptible to killing. This indeed appeared to be the case. In effect, the cell wall thickness of the isolates correlated inversely with the killing index and, overall, the cell wall was discreetly, but also significantly, thicker in isolates in the low killing group, irrespective of their susceptibility to methicillin. It is relevant to stress the fact that exposure to vancomycin prior to bacterial isolation in blood cultures was uncommon in this cohort.

In summary, we found an association between *S. aureus* vancomycin MICs and the susceptibility of the isolates to killing by human phagocytes. A hallmark of most of the isolates exhibiting low susceptibility to killing was increased cell wall thickness. Nevertheless, these data do not prove that the relative refractoriness of certain isolates to killing by phagocytes was due to increased cell wall thickness, although this possibility seems plausible. Other, as yet unknown, bacterial factors may also be involved in modulating the bacterial susceptibility to killing. The apparent relationship between vancomycin MICs and susceptibility to killing reported here should be validated using the broth microdilution method for

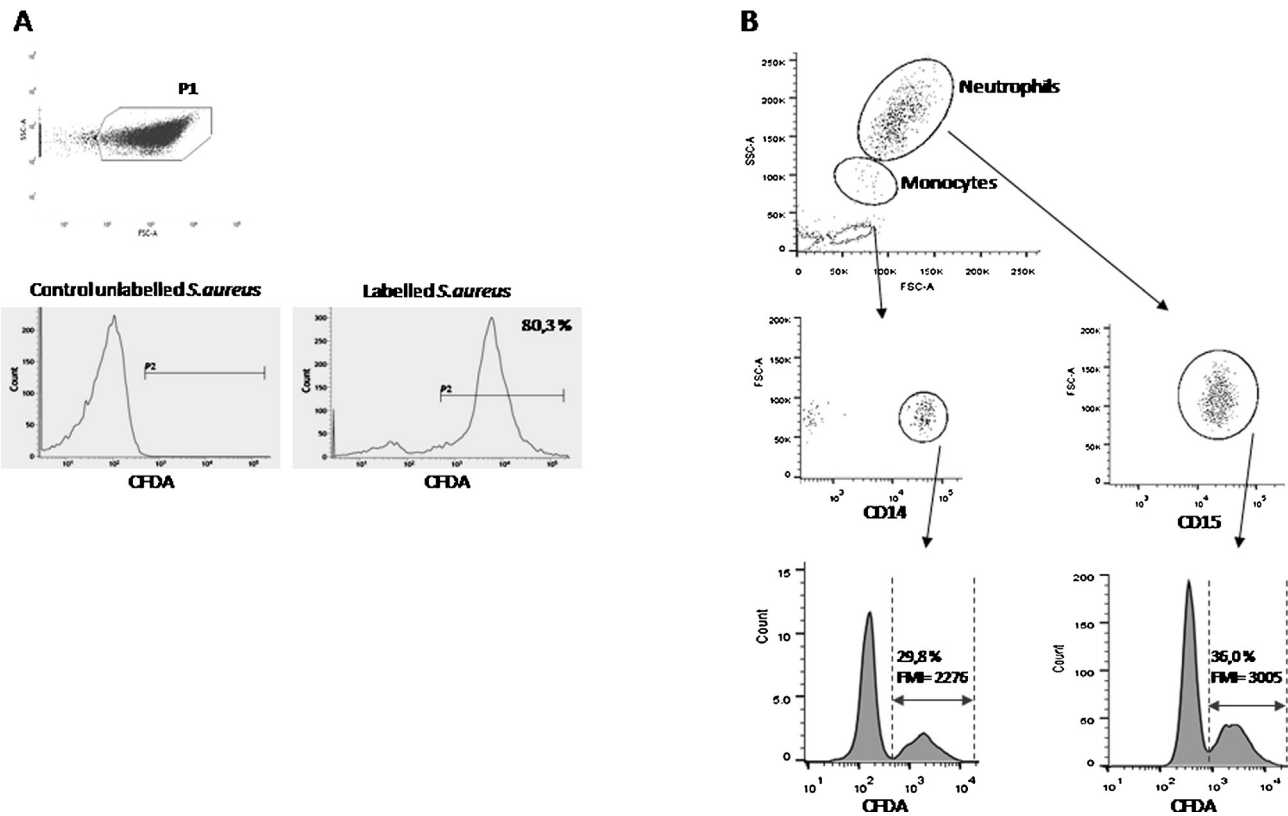


Fig. 4. Phagocytosis assay. Flow cytometry plots of a representative *Staphylococcus aureus* isolate. (A) Bacterial cells were labelled with carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFDA-SE) and were quantified using a BD FACSVerse™ Flow Cytometer (BD Biosciences). Forward and side scatter parameters (FSC/SSC) were used to gate bacterial cells (P1), and these cells were then analysed for the intensity of green fluorescence. The percentage of labelled bacteria (P2) is indicated. (B) Phagocyte populations were gated by their FSC/SSC properties. Neutrophils and monocytes were then gated based on their CD15 and CD14 expression, respectively, and the extent of phagocytosis was determined by analysing the percentage of green (CFDA-SE-labelled) cells and by measuring the mean intensity of green fluorescence (FMI). Flow cytometry analyses were performed on an LSRFortessa analyser (BD Biosciences).

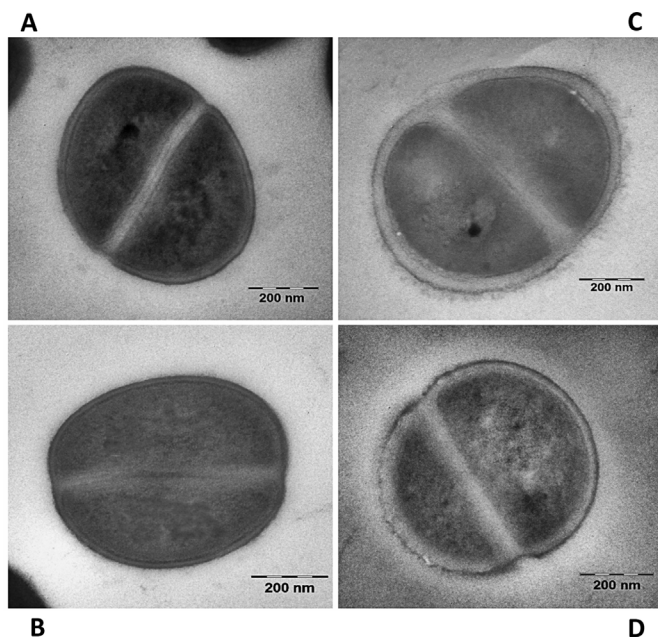


Fig. 5. Transmission electron microscopy of representative *Staphylococcus aureus* isolates displaying (A, B) high (>80%) and (C, D) low (<30%) susceptibility to killing by human phagocytes. The cell wall thickness of these isolates was: (A) 15.61 ± 0.59 nm; (B) 15.8 ± 1.18 nm; (C) 37.6 ± 4.5 nm; and (D) 22.6 ± 2.0 nm.

vancomycin MIC assessment, as this is the method recommended by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) and Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), particularly given the fact that the reproducibility and precision of the Etest for vancomycin MIC determination are rather suboptimal [27]. In this sense, testing ‘interdilution’ MICs in addition to the classical serial two-fold dilutions rather than the latter exclusively [25] appears more appropriate for that purpose in light of our findings using vancomycin MIC Etest values. In addition, a larger number of isolates must be analysed by electron microscopy to confirm the results and to rule out that these are spurious in nature.

The heterogeneity and relatively limited size of the cohort precluded the performance of a robust and meaningful analysis of the impact of *S. aureus* susceptibility to killing on clinical variables such as all-cause mortality and the incidence rate of complicated bacteraemia (25 and 17 cases, respectively), thus the pathogenetic relevance of the finding remains to be proven. In our opinion, further studies involving adequately powered cohorts are warranted to validate these findings and to gauge the clinical impact of the biological phenomenon reported herein.

5. Conclusion

High vancomycin MICs in *S. aureus* bacteraemia isolates may be associated with increased cell wall thickness and reduced intracellular killing by phagocytes.

Acknowledgments

The authors thank all members of the Blood Culture Unit of the Microbiology Service and those of the Infectious Diseases Unit of Hospital Clínico Universitario de Valencia (Valencia, Spain) for contributing to making this work possible.

Funding: This study was supported in part by a grant from Pfizer Pharmaceuticals.


Competing interests: None declared.

Ethical approval: Not required.

References

- [1] Rodríguez-Créixems M, Alcalá L, Muñoz P, Cercenado E, Vicente T, Bouza E. Bloodstream infections: evolution and trends in the microbiology workload, incidence, and etiology, 1985–2006. *Medicine (Baltimore)* 2008;87:234–49.
- [2] Soriano A, Marco F, Martínez JA, Pisos E, Almela M, Dimova VP, et al. Influence of vancomycin minimum inhibitory concentration on the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Infect Dis* 2008;46:193–200.
- [3] Pea F, Viale P. Is the minimum inhibitory concentration of vancomycin an infallible predictor of the clinical outcome of *Staphylococcus aureus* bacteremia treated with vancomycin? *Clin Infect Dis* 2009;49:642–3.
- [4] Holmes NE, Turnidge JD, Munchhof WJ, Robinson JO, Korman TM, O'Sullivan MV, et al. Antibiotic choice may not explain poorer outcomes in patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia and high vancomycin minimum inhibitory concentrations. *J Infect Dis* 2011;204:340–7.
- [5] Aguado JM, San-Juan R, Lalueza A, Sanz F, Rodríguez-Otero J, Gómez-González C, et al. High vancomycin MIC and complicated methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Emerg Infect Dis* 2011;17:1099–102.
- [6] Holland TL, Fowler Jr VG. Vancomycin minimum inhibitory concentration and outcome in patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia: pearl or pellet? *J Infect Dis* 2011;204:329–31.
- [7] Aguado JM, San-Juan R, Fernández-Ruiz M, Chaves F. Role of high vancomycin minimum inhibitory concentration in the outcome of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia. *J Infect Dis* 2012;205:1024–5.
- [8] Gould IM. Vancomycin minimum inhibitory concentrations and outcome in patients with severe *Staphylococcus aureus* infection. *J Infect Dis* 2012;205:864–5.
- [9] Cervera C, Castañeda X, García de la María C, del Rio A, Moreno A, Soy D, et al. Effect of vancomycin minimal inhibitory concentration on the outcome of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* endocarditis. *Clin Infect Dis* 2014;58:1668–75.
- [10] Weston A, Boucher HW. Early high-dose daptomycin for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream infections with elevated vancomycin minimum inhibitory concentrations: ready for prime time? *Clin Infect Dis* 2013;56:1570–2.
- [11] van Hal SJ, Fowler Jr VG. Is it time to replace vancomycin in the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections? *Clin Infect Dis* 2013;56:1779–88.
- [12] Jacob JT, Diaz Granados CA. High vancomycin minimum inhibitory concentration and clinical outcomes in adults with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: a meta-analysis. *Int J Infect Dis* 2013;17:e93–100.
- [13] Kalil AC, Van Schooneveld TC, Fey PD, Rupp ME. Association between vancomycin minimum inhibitory concentration and mortality among patients with *Staphylococcus aureus* bloodstream infections: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2014;312:1552–64.
- [14] Rojas L, Bunsow E, Muñoz P, Cercenado E, Rodríguez-Créixems M, Bouza E. Vancomycin MICs do not predict the outcome of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream infections in correctly treated patients. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:1760–8.
- [15] López-Cortés LE, Velasco C, Retamar P, del Toro MD, Gálvez-Acebal J, de Cueto M, et al. Is reduced vancomycin susceptibility a factor associated with poor prognosis in MSSA bacteraemia? *J Antimicrob Chemother* 2015;70:2652–60.
- [16] Holmes NE, Turnidge JD, Munchhof WJ, Robinson JO, Korman TM, O'Sullivan MV, et al. Genetic and molecular predictors of high vancomycin MIC in *Staphylococcus aureus* bacteremia isolates. *J Clin Microbiol* 2014;52:3384–93.
- [17] Viedma E, Sanz F, Orellana MA, San Juan R, Aguado JM, Otero JR, et al. Relationship between *agr* dysfunction and reduced vancomycin susceptibility in methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* causing bacteraemia. *J Antimicrob Chemother* 2014;69:51–8.
- [18] Cui L, Murakami H, Kuwahara-Arai K, Hanaki H, Hiramatsu K. Contribution of a thickened cell wall and its glutamine nonamidated component to the vancomycin resistance expressed by *Staphylococcus aureus* Mu50. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:2276–85.
- [19] Cui L, Ma X, Sato K, Tenover FC, Mamizuka EM, Gemmell CG, et al. Cell wall thickening is a common feature of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2003;41:5–14.
- [20] Rigby K, DeLeo F. Neutrophils in innate host defense against *Staphylococcus aureus* infections. *Semin Immunopathol* 2012;34:237–59.
- [21] Murciano C, Yáñez A, O'Connor JE, Gozalbo D, Gil ML. Influence of aging on murine neutrophil and macrophage function against *Candida albicans*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008;53:214–21.
- [22] Méhes L, Taskó S, Székely A, Tóth A, Ungvári E, Erdei I, et al. Phagocytosis and intracellular killing of heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* strains. *J Med Microbiol* 2012;61:198–203.
- [23] Chaves F, García-Martínez J, de Miguel S, Sanz F, Otero JR. Epidemiology and clonality of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* causing bacteremia in a tertiary-care hospital in Spain. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2005;26:150–6.
- [24] Lawrence YL, Lee MH, Haviland D, Lawrence YL, Lee MH, Haviland D. Inhibition of complement activation by a secreted *Staphylococcus aureus* protein. *J Infect Dis* 2004;190:571–9.
- [25] Charlton CL, Hindler JA, Turnidge J, Humphries RM. Precision of vancomycin and daptomycin MICs for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and effect of subculture and storage. *J Clin Microbiol* 2014;52:3898–905.
- [26] Ludwig F, Edwards B, Lawes T, Gould IM. Effects of storage on vancomycin and daptomycin MIC in susceptible blood isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2012;50:3383–7.
- [27] Falcón R, Madrid S, Tormo N, Casañ C, Albert E, Gimeno C, et al. Intra- and interinstitutional evaluation of an Etest for vancomycin minimum inhibitory concentration measurement in *Staphylococcus aureus* blood isolates. *Clin Infect Dis* 2015;61:1490–2.
- [28] Watts A, Ke D, Wang Q, Pillay A, Nicholson-Weller A, Lee JC. *Staphylococcus aureus* strains that express serotype 5 or serotype 8 capsular polysaccharides differ in virulence. *Infect Immun* 2005;73:3502–11.
- [29] Fisher J, Lee JC, Peters G, Kahl BC. Acapsular clinical *Staphylococcus aureus* isolates lack *agr* function. *Clin Microbiol Infect* 2014;20:414–7.

Reproducible measurement of vancomycin MICs within the susceptible range in *Staphylococcus aureus* by a broth microdilution method with a “quasi-continuum” gradient of antibiotic concentrations

R. Falcón¹ · E. M. Mateo¹ · A. Talaya¹ · E. Giménez¹ · V. Vinuesa¹ · M. Á. Clari² · D. Navarro^{1,3} 

Received: 23 May 2017 / Accepted: 11 July 2017
© Springer-Verlag GmbH Germany 2017

Abstract The availability of reproducible broth microdilution (BMD) methods including inter log₂ antibiotic dilutions for measuring *Staphylococcus aureus* (SA) vancomycin minimum inhibitory concentrations (MICs) within the susceptible range is needed to elucidate the impact of vancomycin MICs on clinical outcomes of invasive SA infections. Here, we report on the development of a very precise BMD method that incorporates the following incremental antibiotic concentrations: 0.50, 0.62, 0.75, 0.87, 1.0, 1.25, 1.40, 1.50, 1.60, 1.75, and 2.0 µg/mL. The intra- and inter-assay coefficients of variation of this method were around 20%. The mean of the differences in MIC values for all isolates obtained across two independent runs performed at one center was 0.04 µg/mL [95% confidence interval (CI), 0.011–0.07 µg/mL] and that for ten isolates measured at two different centers was 0.04 µg/mL (95% CI, 0–13 µg/mL). Vancomycin MIC values differed by less than 0.1 µg/mL between runs for most isolates. Storage of isolates at –20 °C for up to 3 months had no impact on the vancomycin MIC values. The mean vancomycin MIC values obtained by the Etest using a standard inoculum (0.5 McFarland) were significantly higher ($p \leq 0.001$) than those measured by BMD and the MIC values measured by the two methods correlated poorly (Rho, 0.319; $p = 0.148$). Nevertheless, the mean MIC values

measured by the Etest using lower inocula (10^7 or 10^6 CFU/mL) and those measured by BMD were comparable and correlated significantly ($p = 0.004$ for 10^7 CFU/mL and $p = 0.029$ for 10^6 CFU/mL).

Introduction

Bloodstream infections caused by *Staphylococcus aureus* (SA), which are either susceptible (MSSA) or resistant to methicillin (MRSA), carry high morbidity and mortality rates [1]. There has been controversy in recent years as to whether or not bacteremia and endocarditis due to SA strains with elevated vancomycin minimum inhibitory concentration (MIC) values, but within the susceptible range (≥ 1.5 µg/mL), as measured by the Etest, are associated with poorer clinical outcomes (see [2–4] for systematic reviews and meta-analyses). These studies are methodologically flawed owing to the suboptimal intra- and inter-assay precision of the vancomycin Etest method [5], so that miscategorization of isolates as having low (≤ 1 µg/mL) versus high (≥ 1.5 µg/mL) susceptibility could well have occurred [5]. In addition, it is well known that vancomycin MIC values measured by the Etest correlate poorly with those determined by broth microdilution (BMD) and agar dilution assays, these currently being the reference methods according to international agencies (i.e., Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI, and the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST) [6–8]. Conventional BMD methods use serial 2-fold doubling dilutions of antimicrobials, whereas the Etest method provides additional MICs that fall between these concentrations. Thus, given the narrow MIC margin for isolate categorization (low vs. highly susceptible), the BMD method, as traditionally performed, is inappropriate for

✉ D. Navarro
david.navarro@uv.es

¹ Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario, Institute for Research INCLIVA, Valencia, Spain

² Microbiology Unit, Hospital San Francisco de Borja, Gandía, Spain

³ Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario, and Department of Microbiology, School of Medicine, University of Valencia, Av. Blasco Ibáñez 17, 46010 Valencia, Spain

shedding light on the above issue. Here, we report on the development of a robust BMD method that incorporates several “inter log₂ dilution” concentrations of vancomycin.

Materials and methods

Bacterial isolates

In total, 50 SA isolates (MSSA, $n = 28$ and MRSA, $n = 22$) recovered from blood cultures (BD BACTEC™ Plus Aerobic/F and Plus Anaerobic/F medium bottles incubated in an automated continuous monitoring blood culturing instrument, BACTEC™ FX, Becton Dickinson, BD Diagnostics, Franklin Lakes, USA) at the Microbiology Service of Hospital Clínico Universitario (HCU) were selected for this study. These isolates had been cryopreserved at -70 °C in glycerol-containing brain-heart infusion (BHI) broth for a median of 556 days (524–588 days). The isolates were genotypically characterized by means of a commercially available DNA gene microarray (*Staphylococcus aureus* Genotyping Kit 2.0; Clondiag, Jena, Germany), as previously described [9]. For the current study, care was taken to include a wide variety of SA clonal types; namely, among MSSA isolates: CC5 ($n = 2$), CC6 ($n = 2$), CC9 ($n = 1$), CC12 ($n = 3$), CC15 ($n = 2$), CC22 ($n = 1$), CC30 ($n = 8$), CC45 ($n = 7$), CC97 ($n = 1$), and CC121 ($n = 1$), and among MRSA, CC5 ($n = 14$), CC8 ($n = 2$), CC22 ($n = 3$), and CC88 ($n = 1$). All isolates were susceptible to vancomycin as determined by the Etest and none were heteroresistant as assessed by the Etest macromethod using a 2.0 McFarland inoculum [9].

Measurement of vancomycin MICs by a BMD method

Frozen stocks were thawed and the isolates were subcultured overnight on trypticase soy agar plates with 5% sheep’s blood (BD). Vancomycin MICs were measured by using BMD panels prepared in-house following CLSI recommendations [10, 11]. Vancomycin powder (100 mg) with a potency of $\geq 900\text{ }\mu\text{g}$ of vancomycin per mg was obtained from Sigma Aldrich Chemicals (St. Louis, MO, USA). Vancomycin was redissolved in sterile water and used to prepare antimicrobial solutions at concentrations of 0.50, 0.62, 0.75, 0.87, 1.0, 1.25, 1.40, 1.50, 1.60, 1.75, and 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in cation-adjusted Mueller–Hinton broths (Sigma Aldrich). A volume of 100 μL of each vancomycin solution was dispensed into U-bottomed 96-well sterile plates (Greiner CELLSTAR, Bio-One from Sigma Aldrich). Isolates were resuspended in sterile demineralized water to achieve a 0.5 McFarland standard as measured by the Vitek DensiCheck nephelometer (bioMérieux diagnostics, Marcy-l’Étoile, France) and then diluted in Mueller–Hinton broth (Sigma Aldrich) to achieve a $10^5\text{ CFU}/\text{mL}$ suspension. A volume of 100 μL of the

appropriate antibiotic dilution was dispensed per well. Then, a volume of 5 μL of each isolate suspension was transferred to each well. The BMD results were read visually after 24 h of incubation at 35 °C in ambient air. We found no inter-observer variability in MIC readings (all authors examined BMD plates while optimizing the assay). ATCC 29213 was used for quality control. MICs were recorded as the lowest concentrations that inhibited bacterial growth.

Measurement of vancomycin MICs by broth Etest

The Etest was performed using Etest strips from bioMérieux (Marcy-l’Étoile, France) on Muller–Hinton agar (BD), as previously reported [5]. Three different bacterial inocula were used in these experiments: $1 \times 10^8\text{ CFU}/\text{mL}$ (0.5 McFarland), $1 \times 10^7\text{ CFU}/\text{mL}$, and $1 \times 10^6\text{ CFU}/\text{mL}$. The plates were read visually by EMM and RF after 24 h of incubation at 35 °C in ambient air. SA ATCC 29213 was used for quality control.

Testing schedule and data analysis

For the assessment of the intra-assay (within-run) and inter-assay precision of the BMD method, all 50 SA isolates were tested in quadruplicate in two different runs (run 1 and run 2). The time elapsed between the two runs was 6 h. The same SA subcultures were used for runs 1 and 2. Out of the 50 SA isolates, 34 were retested in quadruplicate using frozen panels (cryopreserved at -20 °C during 1 month). To evaluate the inter-center reproducibility of the assay, ten isolates (five MSSA and five MRSA) were tested (in quadruplicate) in parallel (same subculture, same day) at the Microbiology Unit of Hospital San Francisco de Borja (HSFB) and at the Microbiology Service of HCU. To assess the potential effect of bacterial cryopreservation on vancomycin MIC values measured by the BMD method, bacterial isolates were frozen at -20 °C , recovered from storage at 1 and 3 months, and subcultured once prior to repeat BMD testing (in quadruplicate). The intra-assay (within-run) coefficient of variation (CV) was calculated as follows: the CV for each isolate was calculated by dividing the standard deviation (SD) of the set of measurements (four for each isolate) by the mean (of four measurements) and multiplying by 100. Finally, the average of the individual CVs was denoted as the intra-assay CV. The inter-assay and inter-center coefficients of variation were calculated using the pooled standard deviation divided by the overall mean of all duplicated samples (run 1 and run 2, or run at HCU and run at HSFB) and then multiplying by 100. A number of isolates were tested by the Etest (three different inocula) in singlets in two different runs in order to determine the inter-assay CV of the method. The degree of correlation between vancomycin MIC values obtained by the BMD method and the Etest were analyzed by the Spearman’s rank test.

The Wilcoxon signed-rank test was used for the analyses of differences between paired samples (non-parametric distribution). *p*-Values <0.05 were deemed to be statistically significant. Statistical analyses were performed with the aid of the software SPSS version 23.

Results

Precision assessment of the BMD assay

The original vancomycin MIC values of the isolates selected for this study, as measured by the Etest, are shown in Fig. 1a. Likewise, the vancomycin MIC values distribution of isolates measured in the first and second runs are depicted in Fig. 1b, c, respectively. The modal MIC value was 0.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in both runs, and the mean MIC values obtained in the first and second runs were 0.70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [95% confidence interval (CI), 0.65–0.74 $\mu\text{g}/\text{mL}$] and 0.74 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (95% CI, 0.70–0.79 $\mu\text{g}/\text{mL}$), respectively. The intra-assay CVs were 22.4% and 20.9% in runs 1 and 2, respectively, the standard deviation being 0.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in both runs. The mean of the differences of MIC values for all isolates obtained across the two runs was

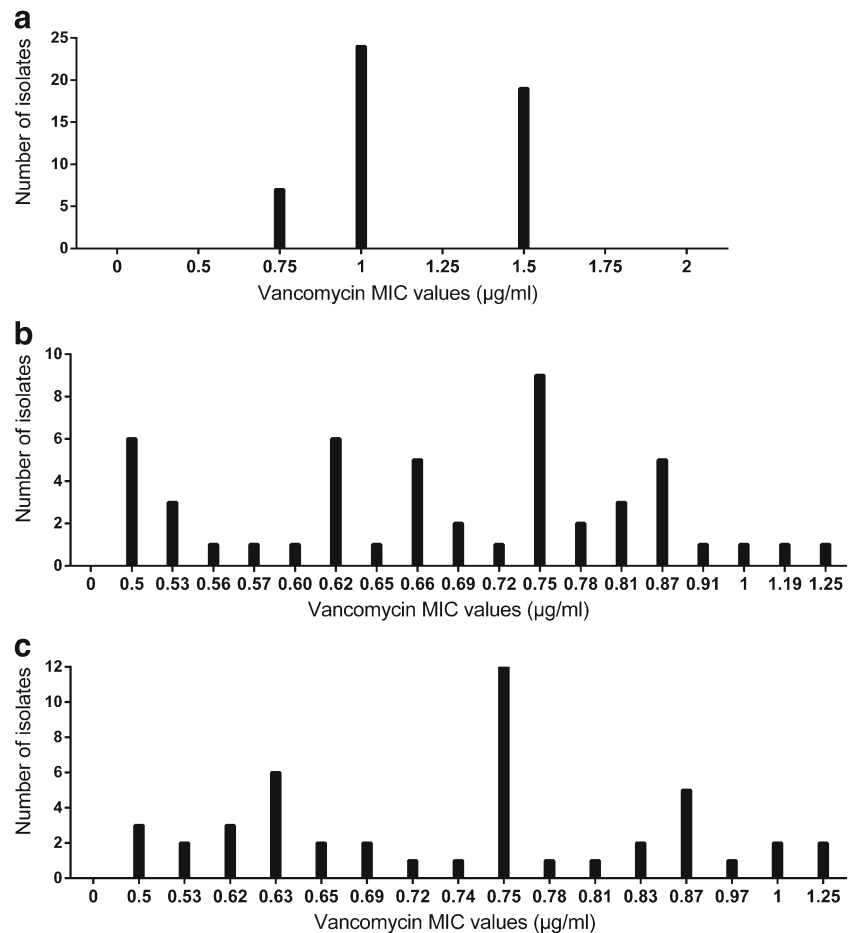
0.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (95% CI, 0.011–0.07 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and the standard deviation of the differences was 0.119 $\mu\text{g}/\text{mL}$. In fact, the vancomycin MIC values differed less than 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ between runs for most isolates ($n = 36$) and no more than 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for all isolates. The inter-assay CV was 21.7%. The mean of the differences of MIC values for ten isolates obtained across a single run performed in parallel at two different centers (HCU and HSFb) was also 0.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (95% CI, 0–0.08 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and the standard deviation of the differences was 0.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Comparable intra- and inter-assay CVs were observed when frozen vancomycin plates were used for vancomycin MIC measurements (intra-assay CV of 21.9% and inter-assay CV of 22.1%). In addition, the MIC values measured when using frozen plates (mean, 0.74 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 95% CI, 0.68–0.79 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were similar to those measured in the two runs.

Effect of cryopreservation on vancomycin MIC values

A decrease in vancomycin MIC values measured by BMD methods has been reported to occur following SA cryopreservation for a variable period of time [8, 12]. We evaluated whether this was the case in our experimental conditions. A

Fig. 1 Distribution of vancomycin minimum inhibitory concentration (MIC) values among isolates used in the study ($n = 50$). **a** Original MIC values measured by the Etest. Vancomycin MIC values measured by broth microdilution (BMD) in the first (**b**) and second (**c**) runs. The MICs of each isolate in **b** and **c** are the mean values of four replicates



total of 15 SA isolates (MSSA, $n = 9$ and MRSA, $n = 6$) were cryopreserved for 1 or 3 months, then thawed and reassayed in quadruplicate. As shown in Fig. 2, cryopreservation had no impact on vancomycin MIC values [median of the mean vancomycin MIC values for each isolate: 0.62 $\mu\text{g}/\text{mL}$ at baseline previous to cryopreservation, 1 month, and 3 months ($p = 0.569$ and $p = 0.924$ for the differences between baseline and 1 month and baseline and 3 months values, respectively)].

Correlation between vancomycin MIC values measured by BMD and the Etest

A total of 17 SA isolates (MSSA, $n = 8$ and MRSA, $n = 9$) were tested by the Etest method at the time of the second BMD run using three different inocula. The data are shown in Fig. 3. The mean vancomycin MIC values obtained by the Etest using a standard inocula (0.5 McFarland) (mean, 1.13 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 95% CI, 0.98–1.29 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were significantly higher ($b \leq 0.001$) than those measured by BMD (mean 0.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 95% CI, 0.70–0.79 $\mu\text{g}/\text{mL}$), and the MIC values measured by the two methods correlated poorly (Rho, 0.319; $p = 0.148$). Nevertheless, the mean MIC values obtained by the Etest using lower inocula (mean of 0.77 and 0.74 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 10^7 or 10^6 CFU/mL, respectively) and those measured by BMD were comparable and correlated significantly ($p = 0.004$ for 10^7 CFU/mL and $p = 0.029$ for 10^6 CFU/mL).

Inter-assay coefficient of variation of the Etest method

The precision of the Etest for SA vancomycin MIC measurement using three different bacterial inocula was evaluated next. The vancomycin MICs of 17 SA isolates (see above) were measured in two different runs using the same SA subcultures. We observed that the inter-assay CV of the Etest decreased steadily in parallel to that of bacterial inocula. Specifically, the mean of the differences between runs was

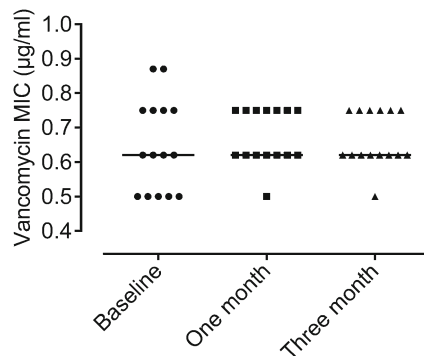


Fig. 2 Effect of cryopreservation on vancomycin MIC values. Baseline MIC values and those measured after 1 month and 3 months of storage at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ are shown. The MIC value of each isolate is the mean of four replicates. The bars indicate median values

0.133 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (95% CI, -0.061 to 0.168 $\mu\text{g}/\text{mL}$) when the standard inoculum was used, 0.057 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (95% CI, -0.051 to 0.167 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for a 1×10^7 inoculum, and 0.034 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (95% CI, -0.006 to 0.075 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for a 1×10^6 inoculum.

Discussion

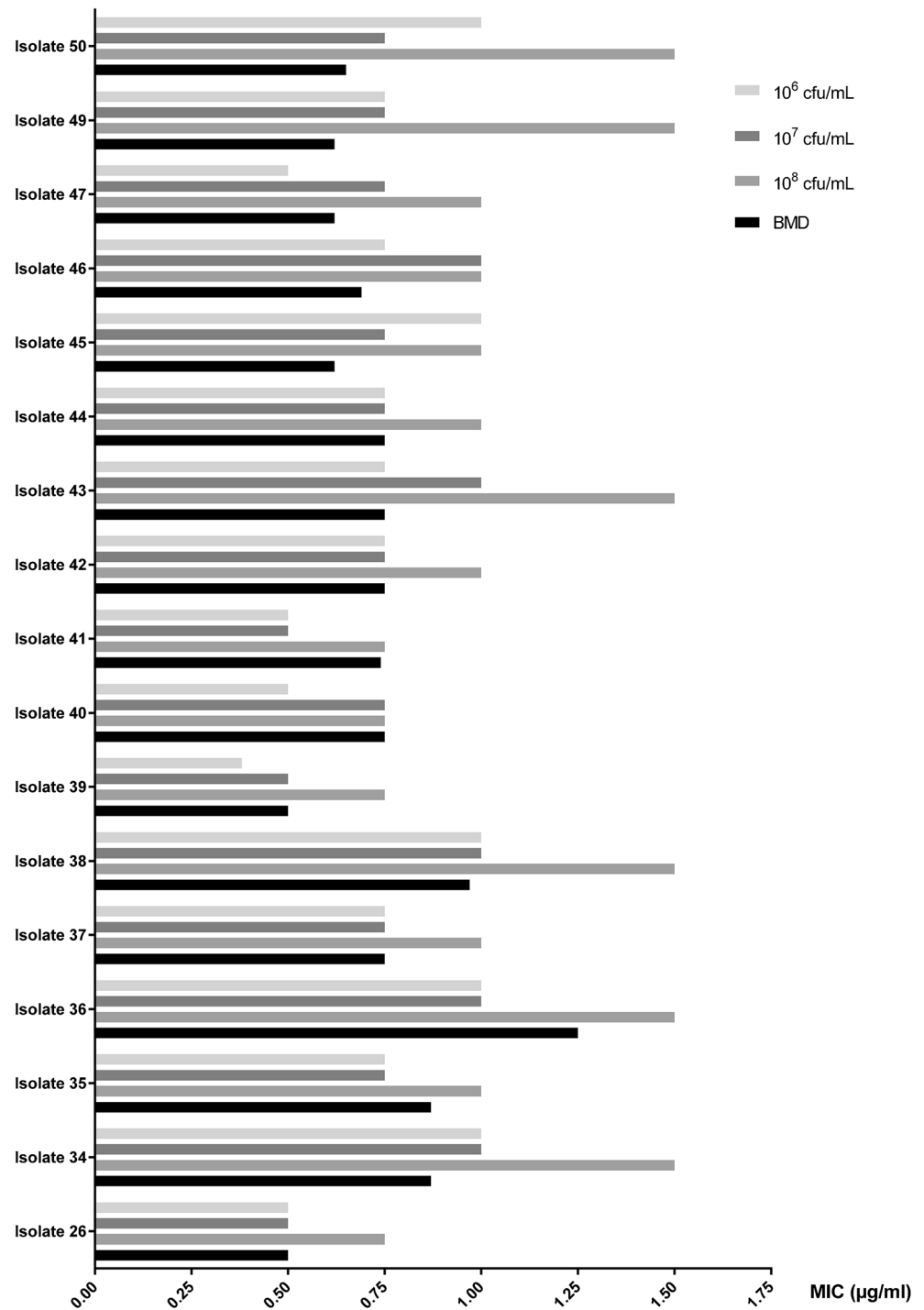
Here, we report on the development of a BMD method that incorporates incremental vancomycin concentrations within the susceptible range not only in between the conventional \log_2 dilutions, but also in between those on the Etest scale, whose precision and repeatability exceeds by far that generally accepted for dilution-based reference MIC methods ($\pm 1 \log_2$ dilution). In fact, the vancomycin MIC values measured within individual runs, across the two runs at one center, and across one run performed at two different centers differed by less than 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for most isolates and no more than 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for all isolates. BMD assays measuring vancomycin MICs at 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ intervals, thus mimicking vancomycin concentrations on Etest strips, have been previously developed [8, 13, 14]. In one of these studies [8], the authors evaluated the standard deviation of the \log_2 MICs obtained by testing five isolates in quintuplicate in the same day (within-run precision) and found that this was below 1, this being slightly higher than observed in the current study. In addition, the intra- and inter-assay CVs for our BMD method were around 20%, which is an acceptable figure when handling discrete variables [15].

It is of interest the fact that vancomycin MIC values measured when using frozen plates were comparable to those determined in non-cryopreserved plates. Thus, MIC plate batches may be prepared using the same lots of reagents, stored, and used at the investigators' convenience, with no impact on vancomycin MIC values.

Previously published data indicated that cryopreservation of SA isolates beyond 6–12 months resulted in significant decreases of vancomycin MIC values with respect to those measured at baseline [8, 12]. This effect is noticeable even after 3 months of storage when the Etest is used for vancomycin MIC measurements [5]. With the idea of conducting a prospective multicenter study to evaluate the impact of vancomycin MICs, as measured by our BMD method, on SA bacteremia clinical outcome, and considering that MIC testing of cryopreserved isolates every 1–3 months would be a feasible schedule, we evaluated the effect of storage at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ during 1 and 3 months on vancomycin MIC values. We found this storage period to have no impact on the vancomycin MIC values. This finding is of relevance to surveillance programs handling frozen isolates.

In agreement with previous studies [6–8, 13, 16], vancomycin MIC values measured by the Etest using a standard

Fig. 3 Vancomycin MIC values measured by BMD and the Etest (using three different inocula). The BMD MIC values depicted for each isolate is the mean of four replicates measured in run 2



inoculum (0.5 McFarland) were higher than and correlated poorly with those measured by BMD. We tested the hypothesis that this is the result of the higher inoculum density used in the former method, as hinted by Charlton et al. [8]. To our knowledge, here, we show, for the first time, that this was, indeed, the case. In effect, vancomycin MIC values measured by the Etest when using lower inocula (either 10⁷ or 10⁶ CFU/mL) were comparable to and correlated significantly with

those measured by BMD. Thus, vancomycin MIC values measured by the Etest and BMD can be harmonized simply by using smaller inocula in the former assay. This is, in our opinion, a relevant finding that must be taken into consideration in future prospective studies aimed at elucidating the impact of vancomycin MIC values on clinical outcomes, clarifying treatment decisions based upon vancomycin MICs within the susceptible range, and interpreting experimental

evidences of vancomycin MIC creep. In addition, an improvement in the precision of the Etest method was achieved by decreasing the bacterial inocula.

Our study has several limitations. First, despite the inclusion of a wide range of SA clonal types in this study, selection biases cannot be completely ruled out (in particular for MRSA isolates). Second, the age of the colonies (and, thus, the phase of bacterial growth) used for BMD testing were not similar (the time elapsed between runs was 6 h). It is uncertain as to what extent this may have influenced vancomycin MIC measurements.

In summary, we developed a robust BMD assay for measuring SA vancomycin MICs within the susceptible range. Methods such as the one described herein, which certainly requires extensive inter-center validation, are needed to elucidate the impact of vancomycin MICs on the clinical outcomes of invasive SA infections.

Acknowledgments We are grateful to the residents of the Microbiology Service of Hospital Clínico Universitario. Estela Giménez holds a Río Hortega research contract from the Carlos III Health Institute (ISCIII) (ref. CM16/00200). Eva María Mateo is grateful to the Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO, Spanish Government) for a postdoctoral contract “Juan de la Cierva” (ref. FJCI-2015-25992).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors have no conflict of interest.

Ethical statement This work uses clinical bacterial isolates from human infections. No tissue material or other biological material was stored from the patients, only subcultured bacterial isolates. This local ethical committee does not require approval for the type of study in our setting. All information regarding these isolates was anonymized.

Funding The current study received no direct funding.

Informed consent Not applicable (as discussed with the institutional medical ethical committee).

References

- Rodríguez-Crèixems M, Alcalá L, Muñoz P, Cercenado E, Vicente T, Bouza E (2008) Bloodstream infections: evolution and trends in the microbiology workload, incidence, and etiology, 1985–2006. *Medicine (Baltimore)* 87:234–249
- van Hal SJ, Lodise TP, Paterson DL (2012) The clinical significance of vancomycin minimum inhibitory concentration in *Staphylococcus aureus* infections: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis* 54:755–771
- Jacob JT, DiazGranados CA (2013) High vancomycin minimum inhibitory concentration and clinical outcomes in adults with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: a meta-analysis. *Int J Infect Dis* 17:e93–e100
- Kalil AC, Van Schooneveld TC, Fey PD, Rupp ME (2014) Association between vancomycin minimum inhibitory concentration and mortality among patients with *Staphylococcus aureus* bloodstream infections: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 312:1552–1564
- Falcón R, Madrid S, Tormo N, Casañ C, Albert E, Gimeno C, Navarro D (2015) Intra- and interinstitutional evaluation of an Etest for vancomycin minimum inhibitory concentration measurement in *Staphylococcus aureus* blood isolates. *Clin Infect Dis* 61:1490–1492
- Kruzel MC, Lewis CT, Welsh KJ, Lewis EM, Dundas NE, Mohr JF, Armitige LY, Wanger A (2011) Determination of vancomycin and daptomycin MICs by different testing methods for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 49:2272–2273
- Muñoz-Cobo B, Sancho-Tello S, Costa E, Bravo D, Torregrosa I, de Lomas JG, Navarro D (2011) Differences in vancomycin minimum inhibitory concentrations for *Staphylococcus aureus* obtained with the automated Phoenix™ system, the Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution method and the standard Etest. *Int J Antimicrob Agents* 37:278–279
- Charlton CL, Hindler JA, Turnidge J, Humphries RM (2014) Precision of vancomycin and daptomycin MICs for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and effect of subculture and storage. *J Clin Microbiol* 52:3898–3905
- Falcón R, Martínez A, Albert E, Madrid S, Oltra R, Giménez E, Soriano M, Vinuesa V, Gozalbo D, Gil ML, Navarro D (2016) High vancomycin MICs within the susceptible range in *Staphylococcus aureus* bacteraemia isolates are associated with increased cell wall thickness and reduced intracellular killing by human phagocytes. *Int J Antimicrob Agents* 47:343–350
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2012) Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard—Ninth edition. CLSI document M07-A9. CLSI, Wayne
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2014) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-fourth informational supplement. CLSI document M100-S24. CLSI, Wayne
- Ludwig F, Edwards B, Lawes T, Gould IM (2012) Effects of storage on vancomycin and daptomycin MIC in susceptible blood isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 50:3383–3387
- Shoji H, Maeda M, Shirakura T, Takuma T, Ugajin K, Fukuchi K, Ishino K, Niki Y (2015) More accurate measurement of vancomycin minimum inhibitory concentration indicates poor outcomes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *Int J Antimicrob Agents* 46:532–537
- Hos NJ, Jazmati N, Stefanik D, Hellmich M, AlSael H, Kern WV, Rieg S, Wisplinghoff H, Seifert H, Kaasch AJ (2017) Determining vancomycin Etest MICs in patients with MRSA bloodstream infection does not support switching antimicrobials. *J Infect* 74:248–259
- Reed GF, Lynn F, Meade BD (2002) Use of coefficient of variation in assessing variability of quantitative assays. *Clin Diagn Lab Immunol* 9:1235–1239
- Rybak MJ, Vidailac C, Sader HS, Rhomberg PR, Salimnia H, Briski LE, Wanger A, Jones RN (2013) Evaluation of vancomycin susceptibility testing for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: comparison of Etest and three automated testing methods. *J Clin Microbiol* 51:2077–2081



Vancomycin MICs and risk of complicated bacteremia by glycopeptide-susceptible *Staphylococcus aureus*

Rocío Falcón¹ · Eva Mateo¹ · Rosa Oltra² · Estela Giménez¹ · Eliseo Albert¹ · Ignacio Torres¹ · David Navarro^{1,3} 

Received: 24 December 2018 / Accepted: 28 January 2019
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

Vancomycin (VAN) minimum inhibitory concentrations (MICs) at the upper end of the susceptible range for *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), as measured by the Etest method, have been associated with poor clinical outcomes of *S. aureus* bloodstream infections, as has the isolate's genetic background. Here, we assessed the impact of VAN MICs, as determined by a broth microdilution method (BMD) that incorporates incremental VAN concentrations between the conventional log₂ dilutions, isolate susceptibility to killing by human phagocytes, acting as a surrogate marker for bacterial cell wall thickness, and *S. aureus* genetic composition, on the development of complicated *S. aureus* bacteremia (SAB). We carried out a retrospective, observational single-center cohort study of 148 consecutive patients with SAB caused by methicillin-susceptible (MSSA) isolates ($n = 113$) or methicillin-resistant (MRSA) isolates ($n = 35$). *S. aureus* isolates were genotyped using a commercially available DNA microarray. Overall, VAN MICs of *S. aureus* isolates taken from complicated and uncomplicated SAB were comparable, irrespective of the testing method ($P = 0.19$ with BMD, and $P = 0.94$ with Etest). Likewise, *S. aureus* isolates in both comparison groups had the same susceptibility to killing by human phagocytes ($P = 0.5$). Among the genes screened by the *S. aureus* DNA array, only *Sec* and *Sel* were differentially present among *S. aureus* isolates in both groups (overrepresented in those causing complications) and their presence was associated independently with complicated SAB in multivariate models adjusted for potentially relevant clinical covariates. Separate analysis of MSSA SAB episodes yielded similar results.

Keywords Vancomycin · Minimum inhibitory concentration (MIC) · *Staphylococcus aureus* · Broth microdilution method · Complicated bacteremia

Introduction

The debate as to whether or not *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) vancomycin (VAN) minimum inhibitory concentration (MIC) at the upper end of the susceptible range impacts adversely on clinical outcomes of methicillin-resistant

(MRSA) and methicillin-susceptible (MSSA) *S. aureus* bloodstream infections remains unsettled [1–20]. Most studies supporting this assumption used the Etest method for VAN MIC assessment, uniformly showing that bacteremic infections caused by *S. aureus* isolates displaying MICs ≥ 1.5 mg/L are associated with an increased risk of complications, mortality, or both [1, 3, 4, 6, 8, 16, 18]. Nevertheless, *S. aureus* VAN MICs provided by the Etest method are poorly reproducible and lack precision [21], potentially hampering comparison of experiences across centers. In this context, we recently developed a broth microdilution method (BMD) that incorporates incremental VAN concentrations within the susceptible range, not only between the conventional log₂ dilutions, but also between those on the Etest scale, which permits robust and precise measurement of VAN MIC [22], and in our view may contribute toward elucidating the true relevance of this *S. aureus* phenotypic trait in clinical outcomes.

The possibility that high *S. aureus* VAN MICs, as measured by Etest, reflect a phenotypic advantage in terms of

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s10096-019-03500-7>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ David Navarro
david.navarro@uv.es

¹ Microbiology Service, Fundación INCLIVA, Hospital Clínico Universitario, Av. Blasco Ibáñez 17, 46010 Valencia, Spain

² Unit of Infectious Diseases, Fundación INCLIVA, Hospital Clínico Universitario, Valencia, Spain

³ Department of Microbiology, School of Medicine, University of Valencia, Av. Blasco Ibáñez 17, 46010 Valencia, Spain

virulence has been postulated [4, 6]. In this sense, hVISA and *S. aureus* VAN-resistant strains exhibit a thicker cell wall and as a result may be suboptimally phagocytosed [23, 24]. In line with this, we previously found an inverse relationship between the susceptibility of the isolates to killing by human phagocytes and cell wall thickness for VAN-susceptible *S. aureus* isolates [25], thus suggesting that the killing index may be used as a surrogate marker for this structural bacterial phenotypic feature. Furthermore, a number of studies suggest that the ability of *S. aureus* to cause complicated bacteremia is notably influenced by the isolate's genetic background [26–29]. In this context, a number of specific resistance and virulence genes have been linked to elevated VAN MICs in the Etest [26–29]. Here, we assessed the impact of VAN MICs as measured by our BMD method, as well as isolate susceptibility to killing by human phagocytes and bacterial genetic characteristics, on the development of complicated *S. aureus* bacteremia (SAB).

Patients and methods

Study population

We carried out a retrospective, observational single-center cohort study of 148 consecutive patients (median age, 66.5 years; range, 1 to 91 years), of which 139 were adults (≥ 18 years old) and 9 children, with bloodstream infections caused by *S. aureus* within the period January 2013 to May 2018. Only patients with first episodes of SAB were considered. An infectious disease specialist (RO) reviewed all chart information focusing on demographics and relevant clinical data including age, sex, source of bacteremia, co-morbid conditions, antibiotic treatment, and outcome. The study was approved by the Ethics Committee of the Hospital Clínico Universitario INCLIVA, which waived requirement of informed consent.

Bacterial isolates

A total of 148 *S. aureus* isolates (MSSA, $n = 113$; MRSA, $n = 35$) recovered from first positive blood cultures (BACTEC™ FX Instrument; Beckton Dickinson-BD-, Sparks, MD) from unique patients at the Microbiology Service of the Hospital Clínico Universitario of Valencia were evaluated in this study. *S. aureus* were primarily identified by colony morphology, Gram staining, and a positive slide coagulase test [21]. Bacterial identity was confirmed by MALDI-TOF MS analysis. MRSA were detected by the standard disc diffusion method using a 30-mg cefoxitin disc (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, MD, USA). All primary isolates had been cryopreserved at -70 °C in glycerol containing Bacto-Brain Heart Infusion broth-BHI- (BD) and were retrieved for the analyses described herein.

Determining *Staphylococcus aureus* vancomycin MIC values

Frozen stocks were thawed and the isolates were subcultured overnight on trypticase soy agar plates with 5% sheep's blood (BD). VAN MICs were measured using in-house prepared BMD panels that included the following antibiotic concentrations: 0.50, 0.62, 0.75, 0.87, 1.0, 1.25, 1.40, 1.50, 1.60, 1.75, and 2.0 $\mu\text{g/ml}$ in cation-adjusted Mueller-Hinton broth [22], and by Etest, which was performed using a standard procedure as previously reported [21]. All isolates were screened for VAN heteroresistance (hVISA) at time of isolation using the Etest macromethod, performed using a 2.0 McFarland inoculum on BHI agar plates (BD), using vancomycin and teicoplanin Etest strips (bioMérieux) [21]. Heteroresistance by the Etest macromethod was defined as MICs for vancomycin and teicoplanin of ≥ 8 mg/L or a teicoplanin MIC of ≥ 12 mg/L regardless of the vancomycin MIC.

Staphylococcus aureus killing assay

These experiments were performed following a published protocol [23]. Briefly, whole blood was obtained from healthy volunteers by venipuncture using heparinized syringes (Lithium Heparin, BD). An aliquot of heparinized blood was centrifuged 5 min at $3000\times g$ to obtain the plasma fraction. Primary subcultures of the isolates were made on sheep's blood agar plates (BD). Bacterial cells were grown at 37 °C to the exponential growth phase and then collected, washed in phosphate-buffered saline pH, 7.4 (PBS), and resuspended in RPMI 1640 culture medium (Gibco, Barcelona, Spain). Cells (0.5×10^6) were inoculated in parallel into 100 μl of human whole blood or plasma and incubated for 1 h at 37 °C. At the desired times (t_0 and t_1), samples were diluted in pyrogen-free distilled water (pH 4.5–6.5), left for 5 min at room temperature, and vortexed vigorously for ~ 5 s. Viable bacterial cells were determined by plating serial dilutions (in triplicate) on Mueller Hinton agar followed by overnight incubation at 37 °C. The survival percentage was calculated as follows: % CFU in blood = [CFU blood (1 h) / CFU blood (0 h)] $\times 100$; % CFU in plasma = [CFU plasma (1 h) / CFU plasma (0 h)] $\times 100$; % survival = (% CFU in blood / % CFU plasma) $\times 100$; % killing =: 100 - % survival. Low and high susceptibility to killing were defined as % killing $< 60\%$ and $> 70\%$, respectively [25].

Staphylococcus aureus genetic composition analysis

S. aureus isolates were genotyped using the *S. aureus* DNA microarray from Clondiag (*S. aureus* Genotyping Kit 2.0 Jena, Germany), strictly following the manufacturer's recommendations, and as previously detailed [23]. Extraction of bacterial DNA from primary subcultures on sheep's blood

agar plates (BD) was performed using DNA extraction reagents and the EZ1 automated device (Qiagen, CA, USA).

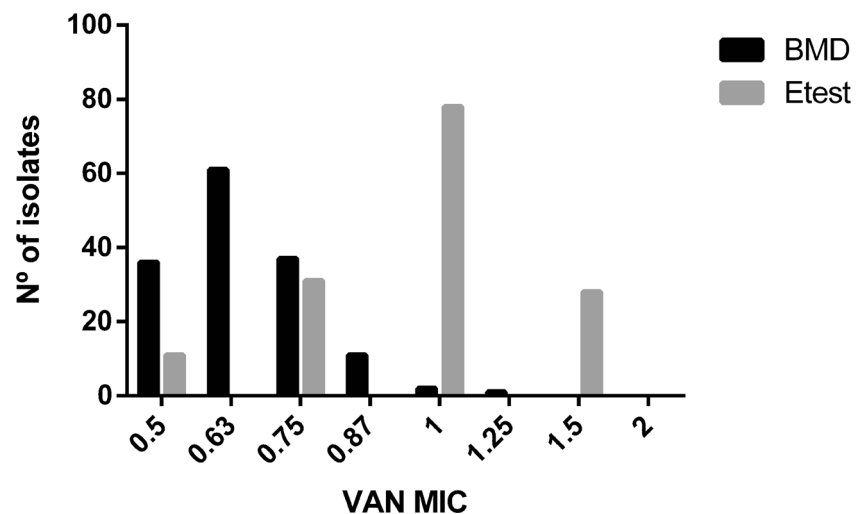
Clinical outcomes

The main outcome variable was the development of complicated SAB, which was defined by the following events, as previously reported [4, 6, 11, 28]: (i) endocarditis, (ii) septic thrombophlebitis, (iii) metastatic infection, (iv) persistent bacteremia for > 72 h after initiating active antimicrobial drug therapy, and (v) recurrent bacteremia, defined as the presence of subsequent blood cultures positive for *S. aureus* within 30 days of the index blood culture after initial clearance of bacteremia. Nosocomial and community SAB were those diagnosed after at least or within 48 h after hospital admission, respectively. Empirical (first-line) treatment was defined as any antibiotic regimen administered within 48 h after bloodstream infection diagnosis in the absence of antimicrobial susceptibility data.

Statistical analysis

The Mann-Whitney *U* test was used to compare continuous variables with non-normal distribution. Correlation between variables was assessed by the Spearman Rank test. The chi-square test was used to compare proportions. All statistical tests were two-tailed and the threshold for statistical significance was $P < 0.05$. To analyze the risk factors for developing complicated bacteremia, we performed a multivariate forward stepwise logistic regression model including all the clinically relevant variables with a *P* value of < 0.05 and possible confounding factors with a *P* value of < 0.1 detected in the univariate analysis. All the statistical analyses were performed using SPSS version 20.0 (SPSS, Chicago, IL, USA).

Fig. 1 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) vancomycin (VAN) MIC values measured by broth microdilution (BMD) and Etest



Results

Staphylococcus aureus bacteremia episodes

A total of 148 episodes of SAB were included in the current study. Of these, 113 were caused by MSSA and 35 by MRSA. There were 104 community-acquired episodes and 44 nosocomial episodes. The probable sources of SAB were low respiratory tract infection ($n = 34$; 22.3%), skin and soft tissues ($n = 26$; 17.6%), vascular catheter ($n = 25$; 16.9%), intra-abdominal ($n = 15$; 10.1%), urinary tract ($n = 15$; 10.1%), and osteoarticular ($n = 13$; 8.8%) and surgical site infection ($n = 5$; 3.4%). The primary site of infection was unknown in the remaining 15 patients (10.1%). Thirty-seven patients (25%) developed complicated SAB; in detail, 11 patients had suppurative thrombophlebitis, 10 metastatic osteoarticular infection, 7 persistent bacteremia, 4 recurrent bacteremia, 4 endocarditis, and 1 embolic infection.

Staphylococcus aureus vancomycin MIC values

All *S. aureus* isolates were susceptible to vancomycin (≤ 2 mg/L). No isolate was categorized as hVISA. VAN MIC values of the isolates as determined by BMD and Etest are shown in Fig. 1. Modal vancomycin BMD MIC was 0.63 mg/L for both MSSA and MRSA isolates. Modal Etest MIC value was 1 mg/L for both MSSA and MRSA isolates. Poor correlation was seen between VAN MIC values measured by BMD and Etest ($\rho = 0.291$). *S. aureus* isolates in our series were genetically diverse, as inferred by the wide variety of clonal complex (CC) types documented (21 types). The most prevalent clonal types were CC5 ($n = 39$), CC30 ($n = 19$), CC8 ($n = 15$), CC22 ($n = 12$), CC45 ($n = 9$), and CC398 ($n = 8$). As shown in Fig. 2, *S. aureus* VAN MIC values were comparable across the clonal complex types, regardless of the method

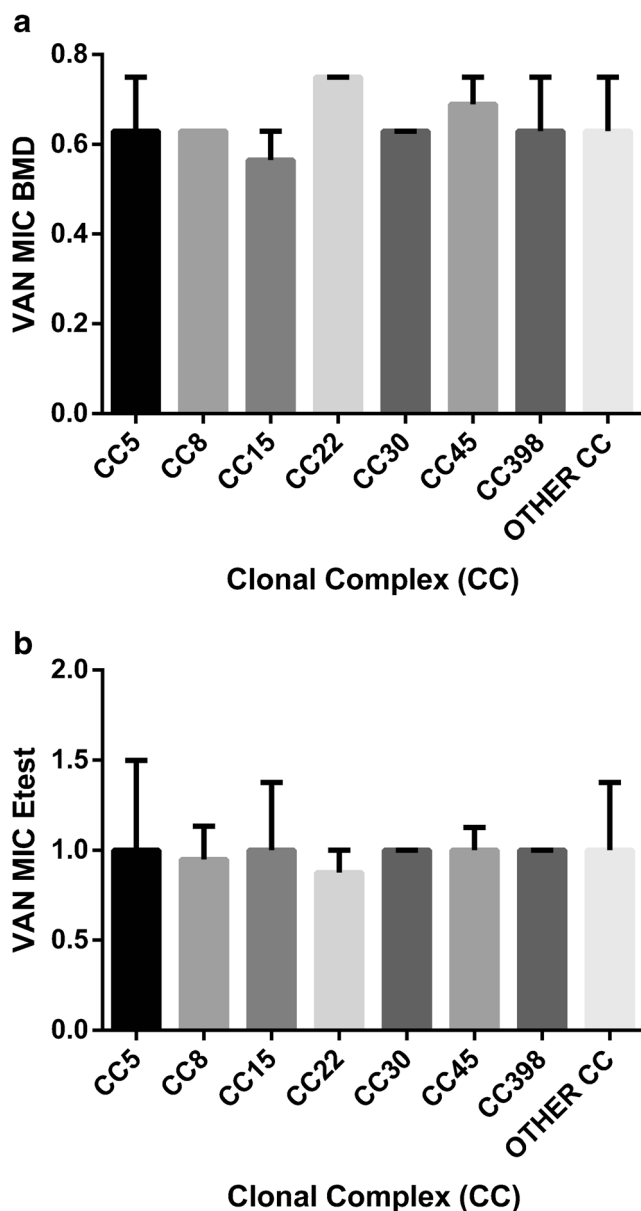


Fig. 2 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) vancomycin (VAN) MIC values measured by broth microdilution (BMD) (panel a) and Etest (panel b) according to *S. aureus* clonal type (CC)

employed for VAN MIC determination ($P=0.61$ with BMD and $P=0.51$ with Etest).

Phenotypic and genotypic features of *Staphylococcus aureus* isolates and development of complicated bacteremia

Overall, VAN MICs of *S. aureus* isolates recovered from complicated and uncomplicated bacteremia episodes were comparable (Fig. 3), irrespective of the testing method ($P=0.19$ for BMD and $P=0.94$ for Etest). Likewise, as shown in Fig. 4, *S. aureus* isolates in both comparison groups had the same susceptibility to killing by human phagocytes ($P=0.5$). In

fact, ROC curve analyses failed to identify a cut-off value for both parameters to discriminate reliably between *S. aureus* isolates either involved or not involved in complicated bacteremic episodes (not shown). These observations stood when MSSA isolates were analyzed separately ($P=0.68$ with BMD and $P=0.77$ with Etest; $P=0.71$ for the killing index). *S. aureus* isolates in the comparison groups were not significantly different regarding clonal complex type, capsular type, or accessory gene regulator (*agr*) group (Table 1). Among the genes screened by the *S. aureus* DNA array, only *Sec* and *Sel* were differentially present among *S. aureus* isolates in both groups (overrepresented in those causing complications; $P=0.01$) (Table 1 and Supplementary Table 1).

Risk factors for developing complicated *Staphylococcus aureus* bacteremia

In addition to *S. aureus* phenotypic features (VAN MIC value and killing index) and genetic traits found to be associated with complications in frequency comparison analyses (Table 1), several clinical covariates with potential relevance were recorded in order to assess differences between comparison groups, as well as to control for potential confounding factors by logistic regression modeling. Clinical covariates included patient's demographics, acquisition category (community vs. nosocomial) co-morbidities (measured by the Charlson comorbidity index), severity of illness (presence of septic shock at bacteremia onset), source of bacteremia, suitability of first-line antibiotic therapy, overall antibiotic use, and clinical management of the primary source of bacteremia. Note that (i) initial antibiotic therapy was deemed appropriate in 50% of episodes and the median delay in starting it was 1.5 days (IQR, 0–3 days); (ii) β -lactam antibiotics were administered in 86 episodes (52.8%) and glycopeptides in 50 episodes (33.7%). As shown in Table 2, the presence of *Sec* and *Sel* genes was the only factor independently associated with the occurrence of complicated SAB (OR, 3.45; 95% CI 1.26–9.45; $P=0.02$). When considering only MSSA isolates for the analyses, both the presence of *sec* and *sel* genes and the use of non β -lactam agents were associated with increased risk of complicated SAB (Supplementary Table 2).

Discussion

Elucidation of the true impact of glycopeptide-susceptible *S. aureus* VAN MIC values on SAB outcomes is of indisputable relevance, as it may critically influence therapeutic management of this clinical entity. VAN MIC values at the upper end of the susceptibility range (≥ 1.5 mg/L), using the Etest method, have been associated with higher morbimortality rates than those caused by highly susceptible strains (MIC ≤ 1 mg/mL) [1, 3, 4, 6, 8, 16, 18], although this assumption has

Fig. 3 *Staphylococcus aureus* (S. aureus) vancomycin (VAN) MIC values measured by broth microdilution (BMD) (panel a) and Etest (panel b) in isolates either involved or not involved in complicated bacteremia episodes (SAB). Data restricted to methicillin-susceptible (MSSA) isolates are shown in panels c and d

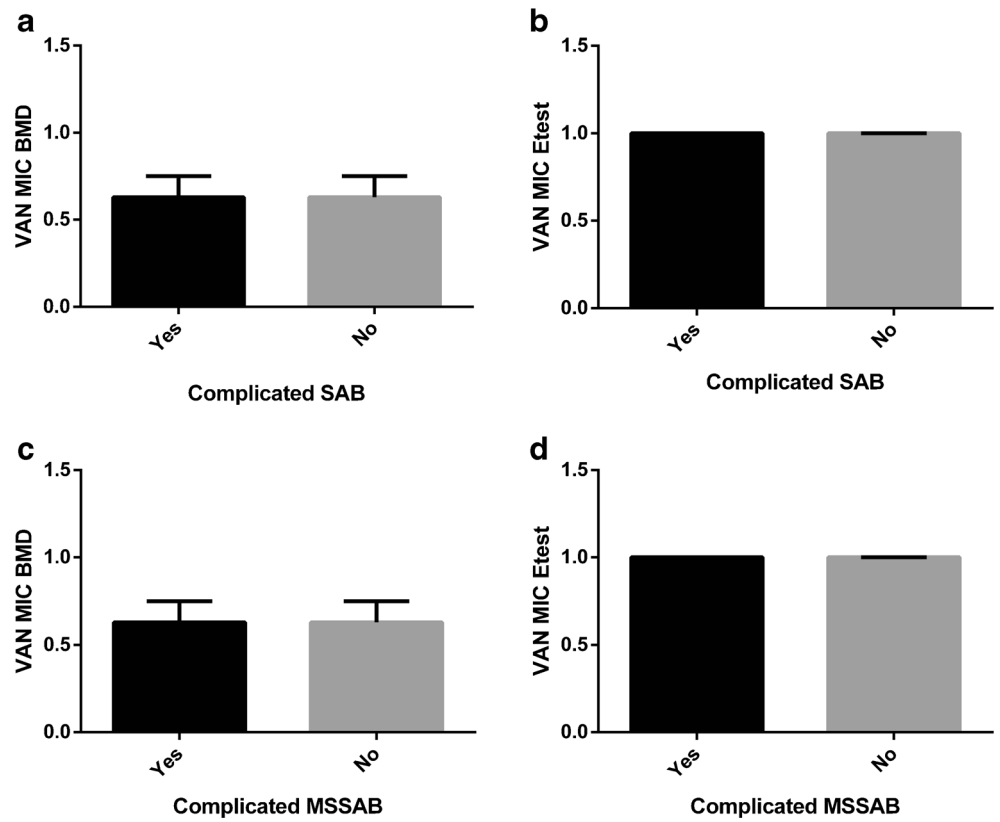


Fig. 4 Distribution of killing indices in *Staphylococcus aureus* isolates (a) and b killing indices of *Staphylococcus aureus* isolates either involved or not involved in complicated bacteremia episodes (SAB). Data restricted to methicillin-susceptible (MSSA) isolates are shown in panels c and d

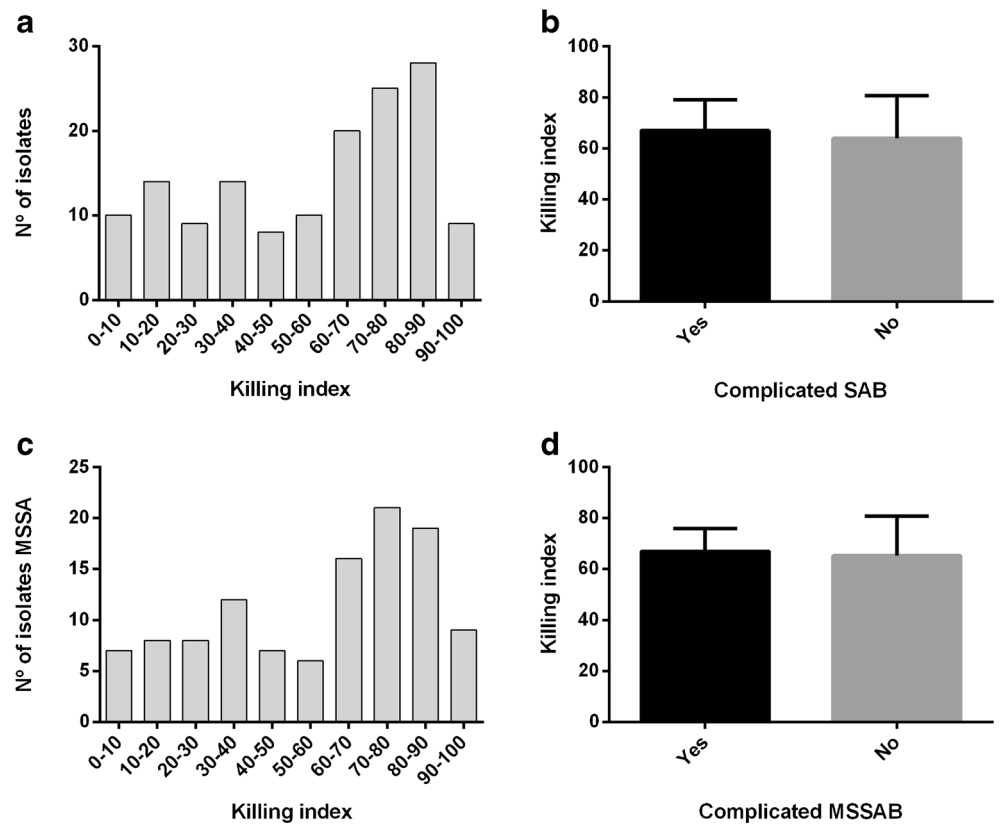


Table 1 Genetic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from patients with or without complicated bacteremia

<i>Staphylococcus aureus</i> genetic characteristics	Complicated bacteremia. Number of isolates (%) (<i>n</i> = 37)	Uncomplicated bacteremia. Number of isolates (%) (<i>n</i> = 111)	<i>P</i> value
Accessory gene regulator (<i>agr</i>) group ^a			
I	15 (40.5)	43 (38.7)	0.97
II	13 (35.1)	40 (36.6)	0.78
III	6 (16.2)	19 (17.1)	0.81
IV	2 (5.4)	2 (1.80)	0.25
Clonal Complex (CC) ^b			
CC5	11 (29.7)	28 (25.2)	0.69
CC8	6 (16.2)	10 (9.0)	0.26
CC15	0 (0)	4 (3.6)	0.23
CC22	4 (10.8)	8 (7.20)	0.54
CC30	4 (10.8)	15 (13.5)	0.61
CC45	3 (8.1)	7 (6.3)	0.76
CC398	3 (8.1)	5 (4.5)	0.44
Other CC	6 (16.2)	30 (27.0)	0.31
Genes ^c			
<i>Sec</i> and <i>Sel</i>	10 (27.0)	11 (9.9)	0.01

Sec and *sel*, Enterotoxin C and L.

^a The *agr* group could not be determined for 8 isolates

^b The clonal complex type could not be determined for 5 isolates

^c Only genes differentially expressed in isolates linked to complicated *Staphylococcus aureus* bacteremia are shown

been disputed [11, 12]. In our view, the Etest method is inappropriate for evaluating the attributable impact of *S. aureus* VAN MICs on outcomes in any clinical setting, owing to the method's low reproducibility and lack of precision [21]; in fact, *S. aureus* VAN MIC values measured by Etest correlate poorly with those determined by BMD and agar dilution assays, the methods of choice according to international agencies (i.e., Clinical Laboratory Standard Institute-CLSI, and the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing-EUCAST-) [30–32] and are uniformly reported to be higher. We recently developed a BMD method incorporating several “inter log₂ dilution” concentrations of VAN, which permits a robust and precise determination of VAN MICs with intra- and inter-assay CVs below 20%, which could be instrumental for shedding light on the above issue [22]. Here, we found that *S. aureus* VAN MIC values within the susceptible range measured with our BMD method were not predictive of complicated SAB as defined herein, either as a continuous or dichotomous variable, in a series including mostly community-acquired episodes originating from a highly heterogeneous source and caused by clonally diverse isolates. In our experience, *S. aureus* VAN MIC values measured by Etest (≥ 1.5 mg/L vs. ≤ 1 mg/mL) were also not associated with developing SAB complications, in line with previous reports [11, 12]. The limited number of death events in this series

precluded any statistically meaningful analysis as to the potential effect of *S. aureus* VAN MIC values on mortality.

A few studies have assessed the relationship between *S. aureus* VAN MICs, as measured by BMD methods, and complicated SAB, most failing to find an association. Specifically, Rojas and colleagues [11] found no correlation between VAN MIC values (high, > 1 mg/L; low, ≤ 1 mg/L), measured by an in-house BMD method, and the development of metastatic infection or persistent bacteremia caused by MRSA isolates. Adani et al. [15] reported that VAN MIC values (high levels 2 mg/L; low levels ≤ 2 mg/L), as determined by a commercially available automated BMD method (MicroScan; Beckman Coulter, West Sacramento, CA, USA) were not predictive of persistent or recurrent bacteremia due to MRSA. Baxi et al. [33] reported that high (2 mg/L vs. low, ≤ 2 mg/L) VAN MIC values determined by Microscan were not associated with greater risk of a composite outcome of mortality, readmission, and recurrence in a series including cases due to MSSA and MRSA. Likewise, San-Juan et al. [18], in a study including catheter-related MSSA bacteremia episodes, found no significant differences between isolates either involved or not involved in the development of endocarditis when VAN susceptibility testing was performed using commercial BMD panels (ESTEN 2009, Sensititre™, Izasa, Barcelona, Spain), irrespective of whether VAN MIC values

Table 2 Risk factors for *Staphylococcus aureus* complicated bacteremia: univariate and multivariate analysis

Factor	Univariate		Multivariate	
	OR (95%CI)	P value	OR (95%CI)	P value
Age (> 70 vs. ≤ 70 years)	0.45 (0.21–0.994)	0.048	–	NS
Sex (male vs. female)	1.08 (0.505–2.30)	0.85		
Charlson Index (≥ 3 vs. < 3)	0.858 (0.35–2.10)	0.74		
Comorbidity				
Diabetes mellitus	0.85 (0.33–2.16)	0.73		
Chronic pulmonary disease	1.80 (0.50–6.59)	0.37		
Malignancy	0.57 (0.20–1.61)	0.29		
Chronic renal disease	0.80 (0.28–2.36)	0.69		
Acquisition (community vs. hospital)	0.84 (0.38–1.88)	0.68		
Inappropriate first-line (empirical) therapy ^a	0.98 (0.36–2.74)	0.89		
Acquisition (community vs. hospital)	0.84 (0.38–1.88)	0.68		
Antibiotic use				
Glycopeptides	1.08 (0.49–2.37)	0.84		
β-lactams	0.93 (0.44–1.97)	0.85		
Other agents ^b	2.472 (1.11–5.48)	0.03	–	NS
Septic shock	3.18 (0.61–16.48)	0.17		
Inadequate clinical management ^c	4.81 (0.77–29.98)	0.09	–	NS
Meticillin resistance	2.20 (0.97–4.98)	0.06	–	NS
Vancomycin MIC (mg/L) ^d	1.00 (0.10–9.92)	1.00		
BMD (≥ 0.5 mg/L vs. < 0.5 mg/mL)	1.00 (0.42–2.38)	1.00		
BMD ≥ 0.75 mg/mL vs. < 0.75 mg/mL)	1.11 (0.39–3.12)	0.85		
Etest (≥ 1.5 mg/mL vs. < 1.5 mg/mL)	1.25 (0.5–3.15)	0.63		
Killing index (%) ^e	1.63 (0.66–4.12)	0.30		
Killing index (< 60% vs. 70%)	1.18 (0.53–2.63)	0.68		
<i>Sec</i> and <i>Sel</i> (presence vs. absence)	3.20 (1.23–8.33)	0.02	3.45 (1.26–9.45)	0.02

BMD broth microdilution, OR odds ratio, *Sec* and *Sel* Enterotoxin C and L, respectively

^a Use of beta-lactam agents for MRSA bacteremia, use of ciprofloxacin, rifampin, or piperacilin/tazobactam, or no empirical treatment

^b Ciprofloxacin, clindamycin, daptomycin, gentamicin, levofloxacin, linezolid, meropenem, and rifampin

^c Inadequate clinical management: (i) lack of catheter removal within 72 h of bacteremia onset ($n = 2$); (ii) lack of drainage of primary infection site ($n = 3$)

^d VAN MIC values analyzed as a continuous variable

^e Killing index values analyzed as a continuous variable

were analyzed as a continuous or dichotomized (> 1.0 ≤ 1.0 mg/L) variable. In contrast, Sullivan et al. [20] reported that SAB due to reduced VAN susceptibility, as defined by Microscan MIC of 2 mg/L, was associated with increased risk of complications in adjusted analyses. The above studies used either commercially available or in-house prepared panels, and all employed conventional BMD methods using serial twofold doubling dilutions of antimicrobials. Between- and within-run variation of 1 log₂ dilution is considered acceptable for BMD methods by international agencies (CLSI and EUCAST). Thus, the lack of margin for VAN MIC thresholds defining low vs. high susceptibility in these studies makes the possibility of isolate miscategorization relatively high.

Based on previous observations [23, 24], Aguado and colleagues hypothesized that high *S. aureus* VAN MIC levels, as determined by Etest, may reflect certain structural modifications (i.e., thicker cell wall), which may result in increased bacterial pathogenicity [4]. In this respect, we previously showed that *S. aureus* isolates' susceptibility to killing by human phagocytes in a relatively simple in vitro assay may be used as a surrogate marker for *S. aureus* cell wall thickness, which requires a rather elaborate measurement protocol involving the use of electronic microscopy [25]. We specifically found the cell wall to be significantly thicker in isolates displaying low killing indices (< 60%) than in ones exhibiting high killing indices (> 70%), irrespective of their

susceptibility to methicillin [25]. In this study, we found no association between the killing group to which the isolates belonged and the development of complicated SAB, thus indirectly suggesting that cell wall thickness might not be a relevant pathogenetic factor accounting for increased risk of these clinical events. Naturally, the true relevance of cell wall thickness as a virulence trait in this clinical setting can only be elucidated by electronic microscopy assessment.

The isolate's genetic background has been suggested as modulating the ability of *S. aureus* to cause complicated bacteremia; namely, *S. aureus* isolates belonging to certain genotypic (clonal) types, such as CC5, CC8, CC12, CC15, CC20, CC30, or CC45, have been shown to exhibit a significant trend toward increasing levels of persistent bacteremia or endocarditis [17, 26, 28, 29, 34–38]. Nevertheless, in line with previous reports [12, 19, 27, 39, 40], we failed to find any such associations. Of interest, CCs associated with complicated SAB in the aforementioned studies were well represented in our panel (almost 50%). In addition to substantial differences among cohorts in terms of patients' clinical characteristics and distribution of MSSA and MRSA isolates, a variety of genotypic typing methods were used in these studies, which may account, at least in part, for the discrepant findings.

Conflicting data have been published on the potential association between *S. aureus* genotypic traits including the *agr* type, capsular type, and a wide variety of bacterial genes and the development of complicated SAB [11, 12, 17, 19, 26–29, 34, 35, 37, 38, 40]. Here, only *sec* and *sel* genes (coding for enterotoxin C and L, respectively) were found to be differentially present among *S. aureus* isolates depending on whether they caused complicated SAB or not (overrepresented in the former isolates). Furthermore, the presence of *Sec* and *Sel* genes was the only factor independently associated with complicated SAB in multivariate models adjusted for potentially clinical relevant covariates including patient's demographics and co-morbidities, severity of illness, source of bacteremia, management of the primary source of bacteremia, suitability of first-line antibiotic therapy, and overall antibiotic use. As for the latter variable, as expected, use of antibiotics other than β -lactams and glycopeptides was also independently associated with complicated SAB caused by MSSA. Enterotoxins C and L exhibit superantigenic properties [41]. Superantigens bind simultaneously to MHC class II (MHC-II) and TCRs, outside their antigen-binding groove, resulting in an excessive inflammatory response that can lead to toxic shock, multiorgan failure, and death [42]. The pathogenetic relevance of *S. aureus* enterotoxins in the development of endocarditis has also recently been suggested [43]. Notably, *S. aureus* VAN MIC values were significantly lower in isolates harboring the *sec* and *sel* genes than ones in which these genes were absent (not shown), further reinforcing our assumption that VAN MIC values within the susceptibility range may not impact on the risk of complicated SAB.

The current study has a number of limitations deserving mention: (i) clinical data were retrospectively collected and thus possibly subject to information bias; (ii) our single-center design precludes generalizing the study's conclusions to other communities; (iii) the relatively scarce number and heterogeneity of SAB complications in our series may have resulted in a high probability of type II errors and prevented us from performing robust multivariate analyses; (iv) different sources of SAB; (v) occurrence of recurrent SAB was only assessed through inpatient hospitalization at our center; (vi) conclusions regarding the impact of antibiotic therapy should be taken cautiously due to lack of control over choice of antibiotics and lack of data on vancomycin serum levels; (vii) cryopreserved isolates were used for *S. aureus* VAN MICs testing; in this sense, we are not certain how long-term storage may impact on MIC values measured by our BMD method. In summary, the data presented herein argue against a potential impact of VAN MIC values on risk of complicated bacteremia due to glycopeptide-susceptible *S. aureus*, regardless of isolate susceptibility to methicillin. In addition, although firm conclusions on the relevance of *sec* and *sel* genes as pathogenetic factors predisposing to complicated SAB cannot be drawn here, our data warrant further studies to explore the possibility.

Acknowledgements Estela Giménez holds a Río Hortega research contract from the Carlos III Health Institute (Ref. CM16/00200). Eva María Mateo is grateful to the Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO, Spanish Government) for the “Juan de la Cierva” postdoctoral contract (Ref. FJCI-2015-25992).

Compliance with ethical standards

Transparency declarations None to declare

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

References

1. Soriano A, Marco F, Martínez JA, Pisos E, Almela M, Dimova VP et al (2008) Influence of vancomycin minimum inhibitory concentration on the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Infect Dis* 46:193–200
2. Pea F, Viale P (2009) Is the minimum inhibitory concentration of vancomycin an infallible predictor of the clinical outcome of *Staphylococcus aureus* bacteremia treated with vancomycin? *Clin Infect Dis* 49:642–643
3. Holmes NE, Turnidge JD, Munckhof WJ, Robinson JO, Korman TM, O'Sullivan MV et al (2011) Antibiotic choice may not explain poorer outcomes in patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia and high vancomycin minimum inhibitory concentrations. *J Infect Dis* 204:340–347
4. Aguado JM, San-Juan R, Lalueza A, Sanz F, Rodríguez-Otero J, Gómez-González C et al (2011) High vancomycin MIC and

- complicated methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Emerg Infect Dis* 17:1099–1102
5. Holland TL, Fowler VG Jr (2011) Vancomycin minimum inhibitory concentration and outcome in patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia: pearl or pellet? *J Infect Dis* 204:329–331
 6. Aguado JM, San-Juan R, Fernández-Ruiz M, Chaves F (2012) Role of high vancomycin minimum inhibitory concentration in the outcome of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia. *J Infect Dis* 205:1024–1025
 7. Gould IM (2012) Vancomycin minimum inhibitory concentrations and outcome in patients with severe *Staphylococcus aureus* infection. *J Infect Dis* 205:864–865
 8. Cervera C, Castañeda X, García de la María C, del Rio A, Moreno A, Soy D et al (2014) Effect of vancomycin minimal inhibitory concentration on the outcome of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* endocarditis. *Clin Infect Dis* 58:1668–1675
 9. Jacob JT, Diaz Granados CA (2013) High vancomycin minimum inhibitory concentration and clinical outcomes in adults with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: a meta-analysis. *Int J Infect Dis* 17:e93–e100
 10. Kalil AC, Van Schooneveld TC, Fey PD, Rupp ME (2014) Association between vancomycin minimum inhibitory concentration and mortality among patients with *Staphylococcus aureus* bloodstream infections: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 312:1552–1564
 11. Rojas L, Bunsow E, Muñoz P, Cercenado E, Rodríguez-Crèixems M, Bouza E (2012) Vancomycin MICs do not predict the outcome of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream infections in correctly treated patients. *J Antimicrob Chemother* 67:1760–1768
 12. López-Cortés LE, Velasco C, Retamar P, del Toro MD, Gálvez-Acebal J, de Cueto M et al (2015) Is reduced vancomycin susceptibility a factor associated with poor prognosis in MSSA bacteraemia? *J Antimicrob Chemother* 70:2652–2660
 13. Chen SY, Liao CH, Wang JL, Chiang WC, Lai MS, Chie WC et al (2014) Method-specific performance of vancomycin MIC susceptibility tests in predicting mortality of patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *J Antimicrob Chemother* 69:211–218
 14. Shoji H, Maeda M, Shirakura T, Takuma T, Ugajin K, Fukuchi K et al (2015) More accurate measurement of vancomycin minimum inhibitory concentration indicates poor outcomes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *Int J Antimicrob Agents* 46:532–537
 15. Adani S, Bhowmick T, Weinstein MP, Narayanan N (2018) Impact of vancomycin MIC on clinical outcomes of patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia treated with vancomycin at an institution with suppressed MIC reporting. *Antimicrob Agents Chemother* 62:e02512–e02517
 16. Bouiller K, Laborde C, Aho SL, Hocquet D, Pechinot A, Le Moing V et al (2018) No effect of vancomycin MIC ≥ 1.5 mg/L on treatment outcome in methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *Int J Antimicrob Agents* 51:721–726
 17. Fernández-Hidalgo N, Ribera A, Larrosa MN, Viedma E, Origüen J, de Alarcón A et al (2018) Impact of *Staphylococcus aureus* phenotype and genotype on the clinical characteristics and outcome of infective endocarditis. A multicentre, longitudinal, prospective, observational study. *Clin Microbiol Infect* 24:985–991
 18. San-Juan R, Fernández-Ruiz M, Gasch O, Camoez M, López-Medrano F, Domínguez MÁ et al (2017) High vancomycin MICs predict the development of infective endocarditis in patients with catheter-related bacteraemia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 72:2102–2109
 19. Gasch O, Camoez M, Domínguez MA, Padilla B, Pintado V, Almirante B et al (2013) Predictive factors for mortality in patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream infection: impact on outcome of host, microorganism and therapy. *Clin Microbiol Infect* 19:1049–1057
 20. Sullivan SB, Austin ED, Stump S, Mathema B, Whittier S, Lowy FD et al (2017) Reduced vancomycin susceptibility of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* has no significant impact on mortality but results in an increase in complicated infection. *Antimicrob Agents Chemother* 61:e00316–e00317
 21. Falcón R, Madrid S, Tormo N, Casañ C, Albert E, Gimeno C et al (2015) Intra- and interinstitutional evaluation of an Etest for vancomycin minimum inhibitory concentration measurement in *Staphylococcus aureus* blood isolates. *Clin Infect Dis* 61:1490–1492
 22. Falcón R, Mateo EM, Talaya A, Giménez E, Vinuesa V, Clari MÁ et al (2017) Reproducible measurement of vancomycin MICs within the susceptible range in *Staphylococcus aureus* by a broth microdilution method with a “quasi-continuum” gradient of antibiotic concentrations. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 36:2355–2360
 23. Cui L, Murakami H, Kuwahara-Arai K, Hanaki H, Hiramatsu K (2000) Contribution of a thickened cell wall and its glutamine nonamidated component to the vancomycin resistance expressed by *Staphylococcus aureus* Mu50. *Antimicrob Agents Chemother* 44:2276–2285
 24. Cui L, Ma X, Sato K, Tenover FC, Mamizuka EM, Gemmell CG et al (2003) Cell wall thickening is a common feature of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 41:5–14
 25. Falcón R, Martínez A, Albert E, Madrid S, Oltra R, Giménez E et al (2016) High vancomycin MICs within the susceptible range in *Staphylococcus aureus* bacteraemia isolates are associated with increased cell wall thickness and reduced intracellular killing by human phagocytes. *Int J Antimicrob Agents* 47:343–350
 26. Lalani T, Federspiel JJ, Boucher HW, Rude TH, Bae IG, Rybak MJ et al (2008) Associations between the genotypes of *Staphylococcus aureus* bloodstream isolates and clinical characteristics and outcomes of bacteremic patients. *J Clin Microbiol* 46:2890–2896
 27. Viedma E, Sanz F, Orellana MA, San Juan R, Aguado JM, Otero JR et al (2014) Relationship between agr dysfunction and reduced vancomycin susceptibility in methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* causing bacteraemia. *J Antimicrob Chemother* 69:51–58
 28. Holmes NE, Turnidge JD, Munckhof WJ, Robinson JO, Korman TM, O’Sullivan MV et al (2014) Genetic and molecular predictors of high vancomycin MIC in *Staphylococcus aureus* bacteremia isolates. *J Clin Microbiol* 52:3384–3393
 29. San-Juan R, Pérez-Montarelo D, Viedma E, Lalueza A, Fortún J, Loza E et al (2017) Pathogen-related factors affecting outcome of catheter-related bacteremia due to methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in a Spanish multicenter study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 36:1757–1765
 30. Kruzel MC, Lewis CT, Welsh KJ, Lewis EM, Dundas NE, Mohr JF et al (2011) Determination of vancomycin and daptomycin MICs by different testing methods for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 49:2272–2273
 31. Muñoz-Cobo B, Sancho-Tello S, Costa E, Bravo D, Torregrosa I, de Lomas JG et al (2011) Differences in vancomycin minimum inhibitory concentrations for *Staphylococcus aureus* obtained with the automated Phoenix™ system, the clinical and laboratory standards institute broth microdilution method and the standard Etest. *Int J Antimicrob Agents* 37:278–279
 32. Charlton CL, Hindler JA, Turnidge J, Humphries RM (2014) Precision of vancomycin and daptomycin MICs for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and effect of subculture and storage. *J Clin Microbiol* 52:3898–3905
 33. Baxi SM, Clemenzi-Allen A, Gahbauer A, Deck D, Imp B, Vittinghoff E et al (2016) Vancomycin MIC does not predict 90-day mortality, readmission, or recurrence in a prospective cohort of

- adults with *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother* 60:5276–5284
34. Fowler VG Jr, Nelson CL, McIntyre LM, Kreiswirth BN, Monk A, Archer GL et al (2007) Potential associations between hematogenous complications and bacterial genotype in *Staphylococcus aureus* infection. *J Infect Dis* 196:738–747
 35. Xiong YQ, Fowler VG, Yeaman MR, Perdreaux-Remington F, Kreiswirth BN, Bayer AS (2009) Phenotypic and genotypic characteristics of persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia in vitro and in an experimental endocarditis model. *J Infect Dis* 199:201–208
 36. Nienaber JJ, Sharma Kuinkel BK, Clarke-Pearson M, Lamlertson S, Park L, Rude TH et al (2011) Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* endocarditis isolates are associated with clonal complex 30 genotype and a distinct repertoire of enterotoxins and adhesins. *J Infect Dis* 204:704–713
 37. Nethercott C, Mabbett AN, Totsika M, Peters P, Ortiz JC, Nimmo GR et al (2013) Molecular characterization of endocarditis-associated *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 51:2131–2138
 38. Bouchiat C, Moreau K, Devillard S, Rasigade JP, Mosnier A, Geissmann T et al (2015) *Staphylococcus aureus* infective endocarditis versus bacteremia strains: subtle genetic differences at stake. *Infect Genet Evol* 36:524–530
 39. Wong H, Watt C, Elsayed S, John M, Johnson G, Katz K et al (2014) Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from patients with persistent or recurrent bacteremia. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 25:83–86
 40. Lilje B, Rasmussen RV, Dahl A, Stegger M, Skov RL, Fowler VG, et al. (2017) Whole-genome sequencing of bloodstream *Staphylococcus aureus* isolates does not distinguish bacteraemia from endocarditis. *Microb Genom*. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000138>
 41. Spaulding AR, Salgado-Pabon W, Kohler PL, Horswill AR, Leung DY, Schlievert PM (2013) Staphylococcal and streptococcal superantigen exotoxins. *Clin Microbiol Rev* 26:422–447
 42. Li H, Llera A, Malchiodi EL, Mariuzza RA (1999) The structural basis of T cell activation by superantigens. *Annu Rev Immunol* 17: 435–466
 43. Salgado-Pabón W, Breshears L, Spaulding AR, Merriman JA, Stach CS, Horswill AR et al. (2013) Superantigens are critical for *Staphylococcus aureus* infective endocarditis, sepsis, and acute kidney injury. *MBio*. <https://doi.org/10.1128/mBio.00494-13>