



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

Efecto del inóculo en la susceptibilidad a cefalotina por *Staphylococcus aureus* y *S. lugdunensis* susceptibles a meticilina en pacientes de un hospital de tercer nivel

TESIS DE POSGRADO
PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN MEDICINA
INFECTOLOGÍA

PRESENTA
Dra. María de los Ángeles Tovar Vargas

TUTORES DE TESIS
Dra. Judith Miriam Bobadilla Del Valle
Dra. María Fernanda González Lara

CIUDAD DE MÉXICO, OCTUBRE 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

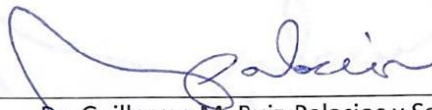
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Efecto del inóculo en la susceptibilidad a cefalotina por *Staphylococcus aureus* y *S. lugdunensis*
susceptibles a meticilina en pacientes de un hospital de tercer nivel



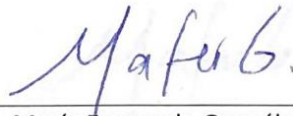
Dr. Sergio Ponce de León Rosales
Director de Enseñanza
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán



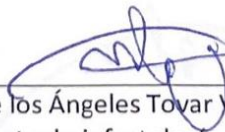
Dr. Guillermo M. Ruiz-Palacios y Santos
Profesor titular del curso de infectología
Departamento de Infectología
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán



Dra. Judith Miriam Bobadilla del Valle
Asesor de tesis
Investigadora del Departamento de Infectología del
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán



Dra. María Fernanda González Lara
Jefa del Laboratorio de Microbiología Clínica
Departamento de Infectología
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán



Dra. María de los Ángeles Tovar Vargas
Residente de infectología
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

AGRADECIMIENTOS

A mi mamá y a mi papá. No tengo palabras suficientes.

A la doctora Miriam, el doctor Alfredo y el doctor Pedro que me abrieron las puertas del INCMNSZ hace tantos años.

A todas las mujeres que han sido mi guía a lo largo de los años, en lo profesional y lo no tan profesional: Fernanda, Aurora, Mirthala y Anabel.

A Miriam, que me enseñó a trabajar en el laboratorio de microbiología.

A todos mis maestros y hermanos de la residencia.

A todos los pacientes, que han sido los mejores maestros y los ángeles de mi camino.

Al INCMNSZ, que ha sido mi roca todos estos años.

1. CONTENIDO

2. RESUMEN	1
3. MARCO TEÓRICO	3
3.1 Mecanismo de resistencia del gen <i>blaZ</i>	9
4. JUSTIFICACIÓN.....	13
5. OBJETIVOS	13
5.1 Objetivo general.....	13
5.2 Objetivos específicos	13
6. MÉTODO	14
6.1 Población de estudio	14
6.2 Metodología.....	14
6.2.1 Recuperación de los aislados de <i>S. aureus</i> y <i>S. lugdunensis</i>	14
6.2.2 Determinación del Efecto Inóculo a Cefalotina (EICEF)	14
6.2.3 Detección de <i>blaZ</i>	15
6.3 Análisis estadístico	16
7. RESULTADOS.....	17
7.1 Recuperación de los aislados de <i>S.aureus</i> y <i>S. lugdunensis</i>	17
7.2 Análisis del patrón de susceptibilidad de <i>S. aureus</i> y <i>S. lugdunensis</i>	20
7.3 Tratamiento y desenlace de los pacientes con infección por <i>Staphylococcus</i> spp.....	21
7.4 Análisis de la CIM con Inóculo estándar e inóculo alto y el gen <i>blaZ</i>	24
8. DISCUSIÓN	27
9. CONCLUSIONES	31
10. REFERENCIAS	32
11. GRÁFICAS	39

2. RESUMEN

Título: Efecto del inóculo en la susceptibilidad a cefalotina por *Staphylococcus aureus* y *S. lugdunensis* susceptibles a meticilina en pacientes de un hospital de tercer nivel.

Objetivo: Determinar la frecuencia del efecto del inóculo a cefalotina (EICEF) en aislados clínicos de *S. aureus* y *S. lugdunensis* obtenidas de muestras de pacientes del INCMNSZ, la presencia del gen *blaZ* y su posible correlación

Introducción: En años recientes se ha observado un aumento de *S. aureus* susceptible a meticilina (SAMS) como causa de infecciones invasivas potencialmente mortales. El tratamiento recomendado son penicilinas o cefalosporinas de primera generación.

El Efecto inóculo (EI) se define como un incremento de la CIM cuando se aumenta el inóculo de la prueba a 1×10^7 UFC/mL. El mecanismo principal de resistencia en MSSA para el EI en cefalosporinas es la presencia de una betalactamasa de espectro reducido, codificada por el gen *blaZ*. Los estudios actuales se enfocan en el EI de cefazolina (EICz), por ser la cefalosporina recomendada a nivel mundial. Existe información controversial sobre el impacto del EICz *in vitro* en el desenlace de los pacientes, debido a que puede ser causa de falla a tratamiento o aumento de la mortalidad.

En México, no está disponible la cefazolina ni la dicloxacilina intravenosa, por ello la cefalotina es la primera opción de tratamiento parenteral. En 1976, se describió la cefalotina como la cefalosporina más estable a la betalactamasa de *S. aureus*. Sin embargo, los estudios sobre el efecto inóculo de la cefalotina (EICEF) son escasos y fueron realizados con metodología diferente a la utilizada en la actualidad. Por otro lado, el papel del patógeno emergente *S. lugdunensis* sobre el EI la información es escasa.

Método: Estudio observacional descriptivo retrospectivo

Metodología: Se incluyeron todos los aislados clínicos de *S. aureus* y *S. lugdunensis* susceptibles a meticilina de septiembre 2015 a abril 2021, la identificación fue realizada por Bruker MALDI Biotyper y la susceptibilidad por el sistema VITEK-2.

Determinación del efecto inóculo a cefalotina e interpretación: Se determinó la CIM por el método de microdilución en caldo de acuerdo con CLSI. Se definió como efecto inóculo a la CIM ≥ 16 mg/L con el inóculo alto o al menos dos diluciones de diferencia con inóculo estándar.

Detección de *blaZ*: Se llevó a cabo por medio de PCR de punto final con los primers descritos previamente por Pereyra et al⁴³.

Resultados: El MIC₅₀ de cefalotina para las cepas analizadas con el inóculo estándar fue de 0.25 μ g/mL y de 0.5 μ g/mL con el inóculo alto. El cambio en la CIM entre el inóculo estándar y alto ocurrió en 36.5%, sin embargo, fue de una dilución en todos los casos y ninguna CIM fue >1 μ g/mL. La frecuencia del gen *blaZ* fue de 72.1%, 73.5% en *S. aureus* y 50% en *S. lugdunensis*.

Conclusiones:

No se identificó efecto inóculo para cefalotina en las cepas analizadas de *S. aureus* y *S. lugdunensis*.

Las cepas con *blaZ* positivas, se asociaron de forma significativa a resistencia a bencilpenicilina, eritromicina y clindamicina, así como al aumento en la CIM de cefalotina entre el inóculo estándar y alto fue de una dilución y al diagnóstico de endocarditis por ecocardiograma.

3. MARCO TEÓRICO

El género *Staphylococcus* spp., está formado por bacterias gram positivas, que pueden aparecer de forma aislada, en parejas, tétradas o más comúnmente formando racimos. Son cocos inmóviles, no formadores de esporas, anaerobios facultativos, catalasa positivos. En general son parte de la microbiota de piel y mucosas. El complejo *S. aureus* está formado por las especies *S. aureus*, *S. argenteus* y *S. schweitzeri*¹. *S. aureus* se considera de gran importancia debido a su capacidad de producir gran variedad de enfermedades como infecciones de piel y tejidos blandos, neumonía, absceso profundos, bacteriemia, endocarditis, artritis y osteomielitis, entre otros; tanto adquiridas en la comunidad como asociadas al cuidado de la salud². En el caso de *S. lugdunensis*, a pesar de tratarse de un estafilococo coagulasa negativo actualmente es reconocido como un patógeno emergente por su gran capacidad de virulencia y patogénica, siendo incluso comparable con *S. aureus*^{3,4}.

De acuerdo con el Instituto de estándares clínicos y de laboratorio (CLSI, por sus siglas en inglés) las pruebas de susceptibilidad para el género *Staphylococcus* spp., se pueden realizar por medio de la prueba de difusión en agar o por microdilución en caldo Mueller-Hinton. Los antibióticos recomendados para la determinación de susceptibilidad son¹:

- A. Probados y reportados de forma rutinaria: penicilina, cefoxitina (como subrogado de oxacilina), algún macrólido (azitromicina, claritromicina o eritromicina), clindamicina, rifampicina y trimetoprim/sulfametoxazol.
- B. Probados de forma rutinaria y reportados de forma selectiva: ceftarolina, vancomicina, daptomicina, tetraciclinas (tetraciclina, doxiciclina, minociclina), linezolid y lefamulina.
- C. Alternativos o suplementarios, para pruebas y reportes: lipoglicopéptidos (dalbavancina, oritovancina o telavancina), gentamicina, fluoroquinolonas (ciprofloxacino, levofloxacino, moxifloxacino) y cloranfenicol.

U. Solo probados y reportados en aislados provenientes de orina: nitrofurantoína, trimetoprim y sulfonamidas.

Hasta hace algunos años, se observó aumento sostenido de las infecciones por *S. aureus* meticilina resistentes (SAMR), sin embargo, informes más recientes de la enfermedad invasiva han reportado incremento de la prevalencia de las cepas susceptibles (42.3 – 69.2%). Un estudio realizado en 2016 en seis áreas urbanas de Estados Unidos demostró prevalencia de enfermedad invasiva por *S. aureus* meticilina susceptible (SAMS) 1.8 veces mayor comparado con las cepas resistentes (31.3 vs. 15.7 por 100,000 habitantes). Además de forma global, se observó que la incidencia de la enfermedad por SAMS fue mayor en todos los grupos etarios, siendo responsable de un mayor número de hospitalizaciones y muertes. Así, el SAMS es considerado como un problema de salud pública en Estados Unidos y otros países desarrollados⁵. Una diferencia notable es que las infecciones por SAMS fueron más frecuentes en personas sin exposición previa al medio hospitalario, ya sea por ser más jóvenes o ser previamente sanos⁵.

En las infecciones producidas por SAMS, la primera opción de tratamiento son los betalactámicos⁶. Generalmente, se recomienda el uso de penicilinas resistentes a penicilinasas como nafcilina o dicloxacilina, y las cefalosporinas de primera generación como cefalexina, cefazolina y cefalotina como alternativa. En un meta análisis publicado en 2018 sobre la seguridad de la cefazolina comparada con las penicilinas anti estafilocócicas, en 11 estudios retrospectivos de pacientes hospitalizados, se encontró que el riesgo de nefrotoxicidad (OR 0.225, IC95 0.127 – 0.513), nefritis intersticial aguda (OR 0.189, IC95 0.0053 – 0-675), hepatotoxicidad (OR 0.160, IC95 0.066 – 0.387) y suspensión de tratamiento por efectos adversos (OR 0.372, IC95 0.089 – 0.414) fueron menores con el uso de cefazolina⁷. En este mismo meta análisis en tres publicaciones sobre pacientes ambulatorios la cefazolina se asoció a menor riesgo de nefrotoxicidad (OR 0.327, IC95 0.192 – 0.722), hepatotoxicidad (OR 0.313,

IC95 0.156 – 0.627) y reacciones de hipersensibilidad (OR 0.372, IC95 0.201 – 0.687)⁷. Con base en estos datos es posible considerar a la cefazolina como opción de primera línea, por tener un menor riesgo de efectos adversos y eficacia similar al compararlo con el tratamiento con penicilina⁷.

Sin embargo, existen algunas preocupaciones respecto al uso de la cefazolina como antibiótico de primera línea para el tratamiento de SAMS por la falta de evidencia en infecciones graves, el amplio espectro innecesario y la posible mayor susceptibilidad de las cefalosporinas de primera generación al efecto inóculo (EI); factores que podrían resultar en una falla al tratamiento⁷⁻¹⁰. En un estudio prospectivo realizado en Argentina en 2018 sobre 89 episodios de bacteriemia por SAMS, de 77 pacientes tratados con cefalosporinas, 42 cepas presentaron efecto inóculo (EI) para cefazolina, en estos casos se observó mayor riesgo de origen desconocido o asociación a catéter ($p= 0.033$) y mortalidad en 30 días ($p= 0.34$), esto último se corroboró en el análisis multivariado (RR 2.65, IC 95 1.10 – 6.42, $p 0.03$) al compararlo con pacientes con SAMS sin EI para cefazolina⁸. Por otro lado, existen estudios donde no se ha demostrado diferencia en los desenlaces clínicos a pesar del uso de cefazolina u otras cefalosporinas^{11,12}.

El EI es un fenómeno de laboratorio que describe el incremento significativo de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de un antibiótico cuando se incrementa el número de organismos inoculados¹³. Se han propuesto múltiples mecanismos para explicar este fenómeno farmacodinámico¹⁴:

Menor interacción del antibiótico por número de bacterias

Protección de las células bacterianas por formación incipiente de biopelículas

Expresión de proteínas inducidas por la alta población bacteriana

Disminución de la expresión de proteínas de unión a la penicilina (PBP, por sus siglas en inglés) durante la fase estacionaria del crecimiento bacteriano

Aumento de las subpoblaciones resistentes

Producción espontánea de mutaciones que confieren resistencia

Acción hidrolítica de las enzimas producidas por las bacterias vivas o muertas

Además, se ha observado que el EI ocurre con mayor frecuencia con betalactámicos, la explicación más común es la producción de betalactamasas asociada o no a otros mecanismos de resistencia¹⁴.

El EI ha sido descrito desde 1946 en *S. aureus*, primero a la penicilina y posteriormente a otros antibióticos como cefalosporinas de primera y segunda generación, meticilina, ampicilina, penicilinas resistentes a betalactamasas, cloranfenicol, tetraciclina, eritromicina quinolonas y aminoglucósidos¹⁵. El mecanismo más descrito por sus posibles implicaciones en la clínica, es el EI en *S. aureus* con cefazolina (EICz), que se define como un aumento significativo del CIM a este antibiótico, cuando el inóculo bacteriano se incrementa a 10^7 unidades formadoras de colonias/mL (UFC/mL), respecto al inóculo estandarizado de 10^5 UFC/mL⁹. Se ha considerado como EICz positivo al incremento en la CIM de ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$ o ≥ 4 veces a la concentración del inóculo estándar. La prevalencia del EICz en SAMS varía de acuerdo con los diferentes reportes^{14,16–18}.

La mayoría de los estudios que investiga el EI en SAMS se enfocan en el efecto *in vitro* de la cefazolina, algunas veces incluyendo a la nafcilina como antibiótico con el cual se compara¹⁴. Además, se suele buscar en los SAMS con EICz, la presencia de la betalactamasa o del gen *blaZ*, responsable de su producción. Por otro lado, la demostración de la presencia de betalactamasa o del gen *blaZ* no siempre se

manifiesta con la presencia del EI, sino que varía en diferentes estudios de forma significativa^{14,16-20}. En América Latina, la prevalencia reportada de EICz en SAMS es de 40%, incluyendo 11 cepas de México en las que la prevalencia fue de 36%¹⁹; en Trinidad, Kuwait, China y Estados Unidos la prevalencia de esta betalactamasa es de 83-91%²¹ y en República de Corea la prevalencia del gen *blaZ* es de 84.1%, en donde se caracterizó que el 43.4% de las betalactamasas fue de tipo C, y el EICz se asoció al EI de piperacilina/tazobactam y ampicilina/sulbactam²².

Desde el punto de vista funcional, la betalactamasa de *S. aureus* es considerada una penicilinasas de espectro reducido que es inhibida por ácido clavulánico y tazobactam²¹. Al igual que las betalactamasas de otros organismos gram positivos, la betalactamasa de *S. aureus* es una proteína unida a la membrana celular en el extremo N-terminal por un residuo de cisteína y una modificación del glicérido tioeter²³. En su forma madura, separada de la membrana en el medio extracelular, la betalactamasa es una enzima con masa molecular de 30kDa, que contiene 257 aminoácidos²⁴.

Respecto al efecto inóculo en otras cefalosporinas, la información es limitada. Un estudio realizado en 1976 sobre la inactivación de cefalosporinas por MSSA reportó que la cefalotina y cefoxitina eran muy poco afectadas por la penicilinasas de *S. aureus*. En este estudio se probaron ocho cefalosporinas distintas. Se utilizaron 100 cepas de *S. aureus* productores de penicilinasas, provenientes de Seattle en Washington, todos susceptibles a cefalotina y meticilina. La CIM fue determinada en caldo de Mueller-Hinton y caldo soya tripticasa, con un inóculo inicial variable aproximado de 3×10^6 UFC/mL y un inóculo alto definido como 3×10^7 UFC/mL. En el caso de la cefalotina la CIM fue $\leq 2 \mu\text{g/mL}$ en ambos medios de cultivo. La inactivación de las cefalosporinas por la betalactamasa de *S. aureus* ocurrió con el siguiente orden: cefazolina (93% en 6 horas), cefaloridina (70% en 6 horas y totalmente a las 12 horas), cefalexina (70% en 6 horas, y 18% presente a las 12 horas). En el caso de cefoxitina y cefalotina, la degradación observada a 6, 12 y 24 horas fue casi nula. En este estudio se concluyó,

que estas cefalosporinas fueron altamente resistentes a la inactivación por las betalactamasas de los MSSA ²⁵. En esa misma revisión se recomendó el uso de cefalotina para infecciones graves por MSSA, a menos que se confirmara susceptibilidad clara con CIM <8µg/mL en caldo soya tripticasa para cefaloridina y cefazolina. Sin embargo, un estudio realizado en Argentina en 2009 reportó la presencia de EI leve para cefalotina, al observar un aumento modesto pero significativo en la CIM de las cepas *blaZ* positivas comparadas con las negativas. Este fenómeno se observó en 13% de las 98 cepas estudiadas con CIM de 8 µg/mL con el inóculo alto, la mayoría de las cepas presentó *blaZ* tipo B y C ²⁶. A partir de estos estudios y con la posterior discontinuación de la cefalotina en Estados Unidos en 1993, poco se ha estudiado la posibilidad de la existencia de cepas SAMS con efecto inóculo para la cefalotina. En México, no es posible encontrar cefazolina o dicloxacilina intravenosa, siendo cefalotina la mejor opción parenteral para infecciones por SAMS, a pesar de no estar aprobada por la FDA (Food and Drug Administration). Esto se debe principalmente a que la vida media de la cefalotina es más corta que la de la cefazolina, considerada el estándar actual de cefalosporinas parenterales de primera generación en otros países.

La cefalotina, 3-(hidroximetil)-8-oxo-7-[2-2(tienil)acetamido]-5-tia-azabicyclo [4.2.0] oct-2-ene-2-carboxilato axetato, es una cefalosporina semisintética disponible en forma de sal sódica para uso intramuscular e intravenosa. Su absorción oral se considera deficiente. Tiene un peso molecular de 418 Da. Se trata de una molécula soluble en agua, que conserva su actividad en un rango amplio de pH que varía desde 4 hasta 7.5. Por medio de técnica de ultrafiltrado, se observó que posterior a su administración intravenosa o intramuscular, el 65% del fármaco se mantiene unido a las proteínas del suero humano. Además, logra concentraciones adecuadas en líquido pleural, líquido sinovial, líquido amniótico, ascitis, corazón, hígado y riñones. Sin embargo, se ha observado una concentración muy baja e incluso indetectable en líquido cefalorraquídeo, humor vítreo y corteza cerebral a pesar de administrarse en pacientes con inflamación meníngea. La eliminación de la cefalotina ocurre por

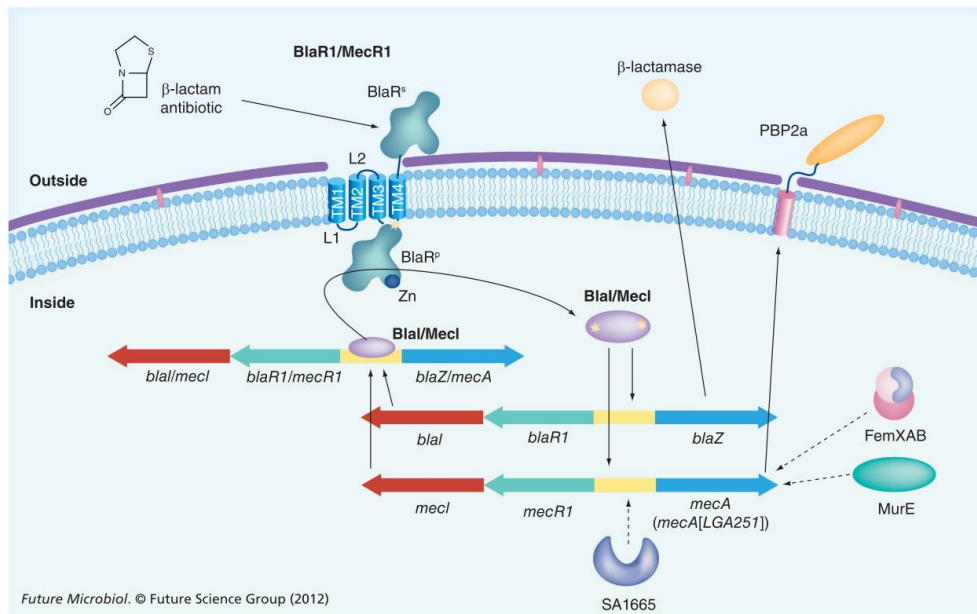
filtración glomerular en su forma intacta en un 60-95% y como su metabolito deacetil-cefalotina en 10-40%, la excreción biliar es mínima²⁷.

3.1 Mecanismo de resistencia del gen *blaZ*

La betalactamasa de *S. aureus* puede ser expresada constitutiva o mayormente inducible. Actualmente, se reconoce que está codificada por la familia de genes estructurales *blaZ*²³. Los estudios filogenéticos recientes sugieren que *blaZ* fue transferido de manera lateral desde *Geobacillus stearothermophilus*²⁸. El gen *blaZ* está regulado por las proteínas de unión al ADN Blal y un transductor de señal BlaR1, de la que solo pocas copias están presentes en la membrana. En ausencia de betalactámicos el homodímero de Blal de 14KD se une a la región operadora de *blaZ*, formando un dímero que reprime su transcripción. En presencia del betalactámico, el antibiótico produce la acetilación del dominio de unión a penicilina de la proteína BlaR1. Dicha unión promueve la ruptura rápida auto catalítica de BlaR1, por un mecanismo de tipo pro-metaloproteasa dependiente de Zinc. La metaloproteasa activada (porción de BlaR1) se une a Blal y actúa como proteasa, generando un fragmento de 11KD con la capacidad de unirse al ADN y un fragmento de 3KD que contiene el dominio de dimerización, así interfiere en la formación del dímero que conforma Blal. Sin la unión de Blal al sitio operador de *blaZ*, inicia la transcripción de *blaZ* y *blaR1-blal*, lo que permite la síntesis de la betalactamasa, y las proteínas Blal y BlaR1. Una vez que BlaR1 es activada a su forma de proteasa no es capaz de seguir produciendo la señal para mantener activa la síntesis de la betalactamasa, por lo que es indispensable la generación continua de BlaR1 para detectar el antibiótico en el ambiente de la bacteria. Esto explica, por qué su producción también es inducible. Cuando la concentración de antibiótico disminuye, BlaR1 deja de ser auto activada y, Blal deja de ser escindida, se dimeriza nuevamente, se une al ADN y recobra su capacidad como represor de *blaZ*²⁹. Existe otro producto conocido como BlaR2, cuyo papel en la regulación de la síntesis de betalactamasas aún no ha sido aclarado³⁰. Debido a la relación estrecha entre los genes reguladores de *mecA*, presente en la

mayoría de las cepas de SAMR, esencialmente todos los SAMR tienen penicilinasas²¹.
 Figura 1.

Figura 1. Regulación del gen *blaZ* para la expresión de betalactamasa en *S. aureus* (tomado de: HaoH, Dai M, Wang Y, Huang L, Yuan Z. Key genetic elements and regulation systems in methicillin-resistant. *Future Microbiol.* 2012;7(11):1315-1329)



Se ha demostrado la influencia del locus *agr* (accessory gene regulator), que funciona como sensor de quorum y regulador de virulencia, en la expresión del gen *mecA*. Por lo que se comenzó a investigar la posibilidad de que dicho locus afectara también a *blaZ*, la síntesis de betalactamasa y el EI en SAMS. Hasta el momento la evidencia no es concluyente, ya que originalmente se asoció el EI a un *agr* disfuncional, mientras que en un estudio reciente el *agr* tipo III se relacionó con el incremento en la resistencia a eritromicina y clindamicina, la presencia del gen *blaZ*, la expresión de betalactamasa tipo A o C y el EICz positivo³¹.

De acuerdo con su estructura molecular, las betalactamasas de *S. aureus* forman parte del grupo A de Ambler (serina-penicilinasas) y 2a de Bush^{32,33}. Las

betalactamasas, fueron divididas de acuerdo con un método serológico producido por Richmond en 1965, desafortunadamente este método fue difícil de replicar, por lo que fue abandonado³⁴. Posteriormente, se clasificaron en cuatro grupos (A, B, C y D) con base a sus propiedades cinéticas y la capacidad relativa de hidrolizar a distintos betalactámicos³⁵. Las betalactamasas de *S. aureus* de tipo A y C son fáciles de distinguir desde el punto de vista cinético, tanto por los sustratos que hidrolizan como por su constante de Michaelis-Menten (K_m) y su constante catalítica (K_{cat})³⁶.

Las penicilinasas de tipo A, C y D normalmente son codificadas por un plásmido de aproximadamente 30Kb, que además incluye genes de resistencia a iones como cadmio, hierro, antimonio, mercurio, arseniato y arsenito.^{23,24,37} A pesar de ser parte de un plásmido, se ha observado una baja transmisión a otras especies bacterianas, siendo el más importante un brote clonal en enterococos en la década de 1980²¹. Otras bacterias en las que se ha identificado *blaZ* son estafilococo coagulasa negativos como *S. hyicus*, *S. xylosus*, *S. haemolyticus*, *S. chromogenes*, *S. epidermidis* y más recientemente *S. lugdunensis*³⁸. Por otro lado, la betalactamasa de tipo B es de localización cromosómica²⁴. En el caso de *S. lugdunensis*, se pensaba que no producía betalactamasa, si bien cada día existen más publicaciones al respecto de la presencia de EICz asociado a *blaZ* en esta especie. Normalmente se considera que posee una baja resistencia a betalactámicos (33-25%) y una prevalencia muy baja de *mecA*. Por lo anterior en muchos sitios se recomienda la penicilina como tratamiento de primera línea^{3,39,40}. Sin embargo, un estudio realizado en Taiwan en 2016 informó una prevalencia de resistencia a penicilina alta (76 - 52%) dependiendo de si era una infección asociada a cuidados de la salud o comunitaria, respectivamente⁴¹.

La búsqueda de betalactamasas en los SAMS es muy importante en infecciones graves o profundas en las que se plantea dar tratamiento con penicilina o cefalosporinas de primera generación, cuando se aísla la bacteria de forma repetitiva. La prueba de difusión en agar con discos y la microdilución para la determinación de

la CIM a penicilina, no siempre detectan la resistencia a betalactámicos por betalactamasas, por ello, la CLSI sugiere medir la susceptibilidad de penicilina en todos los aislados sensibles a meticilina. Se recomienda siempre que la CIM de penicilina sea $\leq 0.12 \mu\text{g/mL}$ o el halo de inhibición sea $\geq 29 \text{ mm}$. Además, se deberá examinar el borde de la zona de inhibición alrededor del disco de penicilina; un borde difuso indica la ausencia de betalactamasa mientras que un borde definido es indicador de su presencia. En otros *Staphylococcus* spp., se ha utilizado el disco de cefinasa (o nitrocefina) para identificar la presencia de betalactamasas^{42,43}. Varios estudios han comparado la efectividad de diferentes métodos fenotípicos para la detección de betalactamasa de *S. aureus*, siendo la sensibilidad menor de 72%⁴³⁻⁴⁹ comparado con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar el gen *blaZ*, por lo que en casos de alta sospecha, donde las implicaciones clínicas se consideren mayores, el uso de esta prueba debe ser considerada^{1,39}.

4. JUSTIFICACIÓN

Identificar la presencia del efecto inóculo en cefalotina, la cefalosporina de primera generación que está disponible en México y conocer la frecuencia de la betalactamasa en las especies de *S.aureus* y *S. lugdunensis* sensibles a meticilina, lo cual podría ayudar a orientar de forma adecuada el tratamiento para infecciones graves producidas por estos microorganismos.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar la frecuencia del efecto inóculo a cefalotina en aislados clínicos de *S. aureus* y *S. lugdunensis* obtenidas de muestras de pacientes del instituto Nacional Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ)

5.2 Objetivos específicos

- Determinar la frecuencia del efecto del inóculo a cefalotina en aislados clínicos de *S. aureus* y *S. lugdunensis* obtenidos de muestras de pacientes del INCMNSZ, mediante pruebas de susceptibilidad por el método de microdilución
- Determinar la presencia del gen *blaZ* en el DNA de los aislados clínicos de *S. aureus* y *S. lugdunensis*
- Determinar la correlación entre el efecto inóculo a cefalotina y el gen *blaZ*
- Describir los patrones de resistencia de los aislados de *S. aureus* y *S. lugdunensis*
- Describir los sitios de infección, síndrome infeccioso, tratamiento recibido, duración del tratamiento, días de estancia hospitalaria y desenlaces de los pacientes

6. MÉTODO

Diseño del estudio: estudio observacional descriptivo retrospectivo.

6.1 Población de estudio

Todos los aislados clínicos de *S. aureus* y *S. lugdunensis* sensibles a meticilina, aislados de muestras de pacientes del INCMNSZ, obtenidos durante el período de septiembre 2015 a abril 2021.

6.2 Metodología

6.2.1 Recuperación de los aislados de *S. aureus* y *S. lugdunensis*

Se recuperaron los aislados clínicos de *S. aureus* y *S. lugdunensis* susceptibles a meticilina del cepario del laboratorio de microbiología clínica. Solo se incluyó el primer aislado de cada episodio clínico.

Todos los aislados fueron identificados por el método de BD™ Bruker MALDI Biotyper™ (Bruker Daltonic Inc. Billerica, MA, USA.). Además, se les realizaron pruebas de susceptibilidad con el sistema VITEK-2 (Biomérieux, Marcy-L'Etoile, France). Todos los datos fueron capturados en una base de datos.

6.2.2 Determinación del Efecto Inóculo a Cefalotina (EICEF)

La CIM a cefalotina (Fresenius Kabi, Milano Italy) fue determinada utilizando el método de microdilución en caldo Mueller-Hinton II ajustado con cationes (DIFCO, Becton Dickinson and Company, Heidelberg, Germany) con inóculo estándar de 10^5 UFC/mL. De forma simultánea se realizó la determinación de la CIM con inóculo de 10^7 UFC/mL. Las placas se incubaron a $35\pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 horas y se leyeron en un espejo.

Interpretación. La CIM se determinó como la concentración de antibiótico en donde no se observó crecimiento bacteriano. Se compararon los resultados de la CIM obtenida con inóculo estándar e inóculo alto de cada aislado. Se determinó como efecto de inóculo cuando la CIM con inóculo alto fue ≥ 16 mg/L o con al menos dos diluciones de diferencia con la CIM del inóculo estándar ^{14,16-18}.

Control de calidad. Se utilizó como control para el efecto del inóculo la cepa *S. aureus* ATCC 25923.

6.2.3 Detección de *blaZ*

Se realizó la búsqueda del gen *blaZ* en todos los aislados. La extracción de ADN se llevó a cabo a partir de aislados cultivados en agar sangre de carnero incubados a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24h. Se tomaron de dos a cinco colonias de *Staphylococcus* spp., y fueron suspendidas en microtubos con 1mL de agua estéril y colocados en baño de agua a ebullición por 10 minutos; posteriormente, se centrifugaron por 2 minutos y se tomaron 5 μ L del sobrenadante como templado para la PCR. Los primers utilizados fueron previamente descritos por Pereyra et al⁴³ que son *stau-blaZ* forward (5'-CAAAGATGATATAFTTGCTTATTCTCC) y *stau-blaZ* reverse (5'-TGCTTGACCACTTTTATCAGC) a concentración de 1 μ M. La PCR se realizó en 50 μ L de volumen final, 200 μ M de dNTP's (GIBCO, Thermo Scientific, Carlsbad, California), buffer 1x y 1.25 U de *Taq* polimerasa (GIBCO). Las condiciones de la PCR fueron: un ciclo a 94 $^\circ\text{C}$ por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 94 $^\circ\text{C}$ por 30 segundos, 50 $^\circ\text{C}$ por 30 segundos y 72 $^\circ\text{C}$ por 30 segundos y una extensión final a 72 $^\circ\text{C}$ por 7 minutos. El proceso de amplificación se llevó a cabo en un termociclador (Thermo Scientific).

Se utilizó como control positivo la cepa *S. aureus* ATCC 29213, productora de betalactamasa *blaZ* y como control negativo la cepa *S. aureus* ATCC 25923.

6.3 Análisis estadístico

Se utilizó el software SPSS versión 26. Los datos cuantitativos que no tenían distribución normal se reportaron como mediana, con rangos intercuartílicos (RIC) entre percentiles 5 y 95, o como media y desviación estándar en caso de presentar distribución normal. Para determinar la distribución de los datos se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov. En el caso de los datos cualitativos se reportaron las frecuencias y los porcentajes. Para las comparativas de datos cuantitativos no paramétricos se utilizó U de Mann-Whitney y en los datos cualitativos chi cuadrada o exacta de Fisher.

Las gráficas se realizaron con el programa Graphpad Prism versión 8.4.3

7. RESULTADOS

7.1 Recuperación de los aislados de *S.aureus* y *S. lugdunensis*

Se recuperaron 171 aislados de *S. aureus* y 10 de *S. lugdunensis* susceptibles a meticilina, del cepario del laboratorio de microbiología clínica del INCMNSZ de septiembre 2015 a abril 2021. Estas cepas pertenecían a 168 pacientes, con 181 episodios distintos de infecciones de diferentes sitios anatómicos Tabla 1.

Tabla 1. Sitios anatómicos de la recuperación de los aislados clínicos de *S. aureus* y *S. lugdunensis* analizados

Especie (n)	Sitio de aislamiento	n (%)
<i>S. aureus</i> (171)	Sangre	124 (72.5%)
	Biopsia de hueso	13 (7.6%)
	Líquido articular	11 (6.4%)
	Líquido pleural	11 (6.4%)
	Absceso	4 (2.3%)
	Punta de catéter	4 (2.3%)
	Aspirado traqueal o lavado bronquial	3 (1.8%)
	Líquido cefalorraquídeo	1 (0.5%)
<i>S. lugdunensis</i> (10)	Sangre	8 (80.0%)
	Hueso	1 (10.0%)
	Punta de catéter	1 (10.0%)

De los 181 aislados, solo 23 (12.7%) presentaron cultivos mixtos con otras bacterias, las más comunes fueron *Pseudomonas aeruginosa* (5), *Enterococcus faecalis* (5) y *Escherichia coli* (5).

La distribución de los 181 episodios fue la siguiente: 5 (2.8%) de septiembre de 2015, 21 (11.6%) en 2016, 34 (18.8%) en 2017, 37 (20.4%) en 2018, 53 (29.3%) en 2019, 17 (9.4%) en 2020 y 14 (7.7%) hasta abril de 2021. Cada una de las 181 cepas correspondía a un episodio de hospitalización y proceso infeccioso, algunos casos fueron de enfermedad diseminada, por lo que se logró el aislamiento de *Staphylococcus* spp., en varios sitios. Tabla 2.

Tabla 2. Síndromes más frecuentes en pacientes con infección por *Staphylococcus* spp.

Sitio de infección	n (%)	<i>S. aureus</i> n=171 n (%)	<i>S. lugdunensis</i> n=10 n (%)
Bacteriemia	143 (79.0)	134 (78.4)	9 (90.0)
Bacteriemia asociada a catéter	59 (32.6)	53 (31.0)	6 (60.0)
Endocarditis	23 (12.7)	23 (13.5)	-
Pulmonar: neumonía o empiema	54 (29.8)	53 (31.0)	-
Osteomielitis o espondilodiscitis	38 (21.0)	37 (21.6)	1 (10.0)
Infección de tejidos blandos	37 (20.4)	36 (21.0)	1 (10.0)
Artritis séptica	33 (18.2)	32 (18.7)	1 (10.0)
Miositis o abscesos musculares	24 (13.3)	24 (14.0)	-
Émbolos sépticos a hígado o bazo	3 (1.7)	3 (1.8)	-
Peritonitis	2 (1.1)	2 (1.2)	-
Infección de vías urinarias	17 (9.4)	17 (9.9)	-
Meningitis o émbolos sépticos	7 (3.9)	7 (4.8%)	-

La presencia de cultivos positivos en más de dos sitios por paciente fue la siguiente: un sitio, la mayoría en sangre periférica o de catéter venoso central (38.7%), dos sitios (33.7%), tres sitios (12.2%) y cuatro o más sitios (16.3%). Gráfica 1.

De la población estudiada, el 63.5% (115) fueron hombres, la mediana de edad fue de 50 años (RIC 21 - 75 años), las medias de peso 67 kg (\pm 16.5kg) y estatura 164 cm (\pm 11.2 cm), la mediana de índice de masa corporal fue de 23.9 kg/m² (RIC 17.5 - 35), la mediana índice de comorbilidad de Charlson de 4 puntos (RIC 1 - 8 puntos). De las enfermedades del índice de comorbilidades de Charlson, las más frecuentes fueron: enfermedad renal crónica (37%) de las cuales 76.1% (51/67) se encontraba en terapia sustitutiva renal con hemodiálisis, diabetes mellitus 35.9% (65/181) y enfermedades del tejido conectivo 25.9% (47/181), siendo lupus eritematoso generalizado 10.4% (19/181) y artritis reumatoide 8.2% (15/181,) las más frecuentes. Tabla 3.

Tabla 3. Frecuencia de las comorbilidades en los pacientes con infecciones por *S. aureus* y *S. lugdunensis*

Enfermedad	n (%)	Enfermedad	n (%)
Enfermedad renal crónica	67 (37.0)	Trasplante de órgano sólido	16 (8.8)
Diabetes mellitus	65 (35.9)	Cirrosis hepática	15 (8.2)
Enfermedad tejido conectivo	47 (25.9)	Infarto agudo al miocardio	10 (5.5)
Enfermedades hematológicas	30 (16.6)	Neumopatía crónica	6 (3.3)
Tumor de órgano sólido	21 (11.6)	Evento vascular cerebral o AIT	2 (1.1)
Enfermedad vascular periférica	21 (11.6)	Demencia	1 (0.6)
Insuficiencia cardíaca	17 (9.4)	Infección por VIH	6 (3.3)

Además, 84 (46.4%) de los pacientes tenía tratamiento con al menos algún medicamento inmunosupresor: esteroides 37.6% (68/181), quimioterapia 14.9% (27/181) y otros 16.6% (30/181).

Los factores asociados a las bacteriemias no relacionadas a catéter fueron: infecciones monobacterianas (77/103 vs. 9/19, $p= 0.02$), infecciones distintas a espondilodiscitis/osteomielitis (70/88 vs. 16/34, $p < 0.05$), no tener VIH (84/115 vs. 2/6, $p= 0.04$) y uso de esteroides (39/48 vs. 45/71, $p= 0.04$).

De las 143 bacteriemias, se encontraron hemocultivos de seguimiento con persistencia de crecimiento de *S. aureus* en 43 pacientes (30.1%), la mediana de días para el último hemocultivo positivo fue de 5 días, (RIC 1 - 14 días). La persistencia de hemocultivos positivos se asoció a sexo femenino (22/47 vs. 27/96, $p= 0.03$), portadores de catéteres endovasculares (25/57 vs. 24/86, $p= 0.05$), infecciones musculares o absceso de psoas (10/18 vs. 39/125, $p= 0.04$), realización de ecocardiograma (45/112 vs. 4/31, $p= 0.005$), detección de endocarditis (15/23 vs. 30/90, $p= 0.005$), resistencia a tetraciclina (6/6 vs. 47/128, $p= 0.001$) y tratamiento con cefalotina (25/54 vs. 24/89, $p= 0.02$). Sin embargo, los hemocultivos positivos persistentes no se asociaron a mayor mortalidad intrahospitalaria o presencia del gen *blaZ*.

En cuanto a los 143 episodios de bacteriemia por *Staphylococcus* spp., se realizó ecocardiograma transtorácico en 126/143 pacientes (88.1%). Entre los 126 pacientes se detectaron 11(8.7%) casos de endocarditis. Debido a un alto índice de sospecha clínica, de los 115 pacientes restantes se complementó con ecocardiograma transesofágico en 38 (33.0%). De los 38 ecocardiogramas realizados se realizó diagnóstico de endocarditis en 12 pacientes (31.5%). En total, se encontraron 23 (16.1%) pacientes con endocarditis entre 143 bacteriemias. Los factores asociados a diagnóstico de endocarditis por ecocardiograma fueron: antecedente de enfermedad renal crónica (15/50 vs. 8/63, $p= 0.02$), presencia de émbolos sépticos en hígado o bazo (2/2 vs. 21/111, $p <0.05$), émbolos sépticos a sistema nervioso central o meningitis (4/5 vs. 19/108, $p <0.05$), foco de infección no urinario (23/99 vs. 0/14, $p= 0.04$), resistencia a levofloxacino (1/1 vs. 21/107, $p= 0.05$) y a clindamicina (9/27 vs. 13/81, $p= 0.05$).

7.2 Análisis del patrón de susceptibilidad de *S. aureus* y *S. lugdunensis*

Para el análisis de la susceptibilidad de los aislados de *Staphylococcus* spp., se probaron antibióticos dependiendo del sitio de aislamiento. Encontramos que todas las cepas fueron sensibles a vancomicina y linezolid. Para quinupristina/dalfopristina se probaron 96 aislados, cefazolina 92, teicoplanina 90, daptomicina 87, tigeciclina 86 y doxiciclina 86, todos susceptibles a dichos antibióticos. Además, el 95% de las cepas fueron sensibles a rifampicina, nitrofurantoína, trimetoprim/sulfametoxazol y tetraciclina. Por otro lado, los antibióticos con mayor resistencia fueron bencilpenicilina (34.3%), clindamicina (21%) y eritromicina (17.7%). Tabla 4.

Tabla 4. Patrón de susceptibilidad de *Staphylococcus aureus* y *S. lugdunensis* a distintos antibióticos

Clase de antibiótico	Antibiótico	Resistente n (%)	Intermedio n (%)	Sensible n (%)	No disponible n (%)
Betalactámicos	Bencilpenicilina	62 (34.3)	-	30 (16.6)	89 (69.2)
	Oxacilina	-	-	181 (100)	-
	Cefazolina	-	-	92 (50.8)	89 (49.2)
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacino	9 (5.0)	3 (1.7)	169 (93.4)	-
	Levofloxacino	2 (1.1)	84 (46.4)	-	95 (52.5)
	Moxifloxacino	9 (5.0)	2 (1.1)	170 (93.9)	-
Aminoglucósidos	Gentamicina	11 (6.1)	8 (4.4)	162 (89.5)	-
Macrólidos	Eritromicina	32 (17.7)	5 (2.8)	144 (79.6)	-
Glicopéptidos	Vancomicina	-	-	181 (100)	-
	Teicoplanina	2 (1.1)	-	90 (49.7)	89 (49.2)
Tetraciclinas	Doxiciclina	-	-	86 (47.5)	95 (52.5)
	Tetraciclina	8 (4.4)	-	173 (95.6)	-
Otros	Linezolid	-	-	181 (100)	-
	Daptomicina	-	-	87 (48.1)	94 (51.9)
	Tigeciclina	-	-	86 (47.5)	95 (52.2)
	Clindamicina	38 (21.0)	-	143 (79)	-
	Quinupristina /dalfopristina	-	-	92 (50.8)	89 (49.2)
	Nitrofurantoina	-	2 (1.1)	177 (97.8)	2 (1.1)
	Rifampicina	-	-	180 (99.4)	1 (0.6)
	Trimetoprim /sulfametoxazol	8 (4.4)	-	172 (95)	1 (0.6)

7.3 Tratamiento y desenlace de los pacientes con infección por *Staphylococcus* spp.

De los 181 pacientes, desconocemos datos sobre el manejo de 16 (8.8%) debido a que fueron referidos, mientras que 163 (90.1%) fueron hospitalizados y dos (1.1%) recibieron manejo de forma ambulatoria. El tratamiento recibido fue con los antibióticos: vancomicina (53%), dicloxacilina (40.3%), cefalotina (33.7%) y algún carbapenémico (22.6%). Tabla 5.

Tabla 5. Antibióticos recibidos por los pacientes con infecciones por *Staphylococcus* spp. sensibles a meticilina

Antibiótico	n (%)	Antibiótico	n (%)
Vancomicina	96 (53.0)	Carbapenémico	50 (27.6)
Linezolid	12 (6.6)	Piperacilina/tazobactam	39 (21.5)
Fluoroquinolonas	12 (6.6)	Dicloxacilina	73 (40.3)
Trimetoprim/Sulfametoxazol	23 (12.7)	Ceftriaxona	12 (6.6)
Rifampicina	7 (3.9)	Cefalotina	61 (33.7)
Otros	14 (7.7)	Otros betalactámicos	16 (8.8)

Encontramos 163 pacientes hospitalizados, de los cuales 39 (23.9%) fallecieron durante la estancia hospitalaria. La mediana de duración del tratamiento antimicrobiano fue 19 días (RIC 2 - 84 días), cinco pacientes recibieron tratamiento por tiempo indefinido. Además 61 (33.7%) pacientes recibieron algún procedimiento invasivo para el control del foco infeccioso. La mediana de días de estancia hospitalaria entre los pacientes fue de 18 días (RIC 4 - 87 días); en los pacientes que sobrevivieron la mediana fue de 19 días (RIC 7 - 90 días) comparado con una mediana de 16 días (RIC 2 - 88 días) en los pacientes que fallecieron. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (χ^2 , $p= 0.49$).

El tratamiento de primera línea con dicloxacilina o cefalotina, 62 (34.3%) recibieron dicloxacilina, 50 (27.6%) cefalotina y 11 (6.1%) ambos antibióticos. Se observó que 58 pacientes (32%) no recibieron ninguno de los dos antibióticos, por diferentes causas: en 18 pacientes, se ignora el tratamiento debido a que fueron referidos a otras instituciones, 23 pacientes, requerían tratamiento de amplio espectro por infección polimicrobiana, nueve pacientes fallecieron en las primeras 48 horas del tratamiento, etc. Un factor determinante en la elección de dicloxacilina o cefalotina podría ser el año en que se aisló el germen, debido a la poca disponibilidad de dicloxacilina intravenosa en los años recientes. Tabla 6.

Tabla 6. Distribución del tratamiento en los pacientes con infección por *Staphylococcus spp.*, con dicloxacilina o cefalotina en base a la disponibilidad del antibiótico.

Antibiótico	2015 n (%)	2016 n (%)	2017 n (%)	2018 n (%)	2019 n (%)	2020 n (%)	2021 n (%)
Dicloxacilina	2 (40.0)	12 (57.1)	7 (20.6)	22 (59.5)	19 (35.8)	0	0
Cefalotina	2 (40.0)	2 (9.5)	14 (41.2)	4 (10.8)	10 (18.8)	10 (58.8)	8 (57.1)
Ambos	0	1 (4.7)	0	0	4 (7.5)	2 (11.8)	2 (14.3)
Otros	1 (20.0)	6 (28.6)	12 (35.2)	10 (27.1)	20 (37.7)	5 (29.4)	4 (28.5)
Total/año	5	21	34	37	53	17	14

Cuando se analizaron los 112 pacientes que recibieron dicloxacilina o cefalotina específicamente, las variables asociadas al tratamiento con cefalotina fueron: miositis o absceso de psoas (13/50 vs. 4/62, $p= 0.004$), infección polimicrobiana (7/50 vs. 2/62, $p= 0.037$) y el antecedente de diabetes mellitus (23/50 vs. 13/62, $p= 0.018$).

Se realizó análisis univariado para buscar asociaciones con mortalidad. Se incluyeron el tipo de *Staphylococcus* spp., sitio de dónde se cultivó la bacteria, infección polimicrobiana, resistencia a antibióticos, edad, sexo, índice de masa corporal, comorbilidades, uso de medicamentos inmunosupresores, tratamiento recibido, duración de tratamiento, procedimientos de control de foco, días de hospitalización, presencia del gen *blaZ*, determinación de CIM con inóculo estándar e inóculo alto, o incremento de la CIM ≥ 1 dilución con el cambio del inóculo. Las variables asociadas a mortalidad fueron: edad, resistencia a eritromicina, resistencia a clindamicina, cirrosis hepática, diabetes mellitus, uso de linezolid, uso de carbapenémicos y duración de tratamiento antibiótico. Los factores que se asociaron con la disminución de la mortalidad fueron: uso de dicloxacilina y uso de piperacilina/tazobactam. En el análisis multivariado, sólo la variable de duración de tratamiento conservó la significancia estadística ($p= 0.037$), esto probablemente influido por los días que sobrevivieron los pacientes. Tabla 7.

Tabla 7. Variables asociadas a la mortalidad de pacientes con infecciones por *Staphylococcus* spp. sensibles a metilicina

Variable	Pacientes fallecidos n (%)	Pacientes sobrevivientes n (%)	p
Edad, años (RIC)	53 (23 - 75)	49 (21 - 78)	0.013**
Resistencia a eritromicina	11/27 (40.7)	27/130 (20.8)	0.027*
Resistencia a clindamicina	12/32 (37.5)	26/125 (20.8)	0.05*
Cirrosis hepática	6/13 (46.2)	33/152 (21.7)	0.03*
Diabetes mellitus	20/60 (33.3)	19/105 (18.1)	0.04*
Tratamiento			
Linezolid	6/12 (50.0)	33/153 (21.6)	0.02*
Carbapenémicos	23/50 (46.0)	16/115 (13.9)	<0.005*
Dicloxacilina	10/73 (13.7)	29/92 (31.5)	0.007*
Piperacilina/tazobactam	4/38 (10.5)	35/127 (27.6)	0.03*
Duración de tratamiento antibiótico, días (RIC)	9 (0 - 60)	19 (18 - 35)	0.001**

*Chi cuadrada, **U de Mann-Whitney

A pesar de que el uso de dicloxacilina se asoció a menor mortalidad, al separar específicamente los pacientes que recibieron cefalotina o dicloxacilina (no ambas), se observó que la proporción de las defunciones no presentó una diferencia significativa

(11/50 defunciones con cefalotina vs. 10/62 defunciones con dicloxacilina, $p= 0.43$). Gráficas 2 y 3.

7.4 Análisis de la CIM con Inóculo estándar e inóculo alto y el gen *blaZ*

Respecto al análisis de la CIM de cefalotina, con el inóculo estándar (1×10^5 UFC) la CIM₅₀ fue de 0.25 µg/mL (RIC 0.25 - 1 µg/mL) y la media geométrica fue de 0.36 µg/mL; mientras que con el inóculo alto (1×10^7 UFC) la CIM₅₀ fue de 0.5 µg/mL (RIC 0.25 - 1 µg/mL) y la media geométrica de 0.45 µg/mL. El cambio en la CIM entre el inóculo estándar y el inóculo alto ocurrió en 66 (36.5%) de los aislados. La diferencia de la CIM entre ambos inóculos fue de una dilución en todos los casos y en ninguna de ellas la CIM fue mayor a 1 µg/mL.

Las variables asociadas a las cepas que presentaron diferencia de una dilución entre el inóculo estándar y el inóculo alto fueron: resistencia a penicilina, resistencia a gentamicina, endocarditis, tratamiento con carbapenémicos, no tratamiento con piperacilina/tazobactam y fluoroquinolonas. Tabla 8.

Tabla 8. Análisis de la diferencia de la CIM entre el inóculo estándar y alto, y su asociación con otras variables de los pacientes con infección por *Staphylococcus aureus* y *S. lugdunensis*

Antibiótico	Cepas con diferencia de CIM entre inóculos n (%)	Cepas sin diferencia de CIM entre inóculos n (%)	p*
Resistencia a penicilina	29/61 (47.5)	28/110 (25.5)	0.003
Resistencia a gentamicina	0/61 (0)	11/110 (10.0)	0.011
Endocarditis	12/45 (26.7)	10/81 (12.3)	0.042
Tratamiento			
Carbapenémicos	29/65 (44.6)	21/115 (18.3)	<0.005
Piperacilina/tazobactam	8/65 (12.3)	31/115 (26.9)	0.022
Fluoroquinolonas	1/65 (1.5)	11/115 (9.6)	0.038

*Chi cuadrada

Se analizaron 172 cepas para búsqueda del gen *blaZ* por medio de PCR. De las cuales 162 fueron *S. aureus* y 10 *S. lugdunensis*; 124/172 (72.1%) fueron positivos para el gen *blaZ* y 48 (27.9%) fueron negativas. Del total de los aislados 73.5%

(119/162) fueron *S. aureus* y 50% (5/10) *S. lugdunensis* tenían el gen *blaZ*, no hubo diferencia significativa ($p= 0.11$).

La media geométrica de la CIM de los aislados sin *blaZ* fue de 0.31 $\mu\text{g/mL}$ para el inóculo estándar y 0.36 para el inóculo alto. La media geométrica para las cepas con *blaZ* fue de 0.38 para el inóculo estándar y de 0.49 para el inóculo alto. La distribución de la frecuencia de la CIM entre los aislados fue diferente de acuerdo con la presencia de *blaZ*, tanto para el inóculo estándar ($p= 0.001$) como para el inóculo alto ($p< 0.001$).

Tabla 9, gráfica 4.

Tabla 9. Distribución de la frecuencia de la CIM de los aislados clínicos de *S. aureus* y *S. lugdunensis* de acuerdo con la presencia de *blaZ*

Inóculo	CIM	<i>blaZ</i> negativo n (%)	<i>blaZ</i> positivo n (%)	p*
Estándar	0.125	4 (8.3)	0 (0)	0.001
	0.250	28 (58.3)	58 (46.8)	
	0.500	13 (27.1)	58 (46.8)	
	1.000	3 (6.3)	8 (6.5)	
Alto	0.125	1 (2.1)	0 (0)	<0.001
	0.250	23 (47.9)	20 (16.1)	
	0.500	20 (41.4)	86 (69.4)	
	1.000	4 (8.3)	18 (14.5)	

*Exacta de Fisher

Se realizó un análisis de la susceptibilidad a otros antibióticos para observar si había diferencia de acuerdo con la presencia del gen *blaZ*. En el análisis se encontró diferencia con bencilpenicilina (44.0% para *blaZ* positivo vs. 6.3% para *blaZ* negativo, $p\leq 0.005$), eritromicina (22.6% vs. 6.3%, $p\leq 0.01$) y clindamicina (27.4% vs. 6.3%, $p= 0.002$). Fueron excluidos del análisis oxacilina, vancomicina, daptomicina y linezolid debido a que hubo un 100% de sensibilidad en las cepas en ambos grupos. Además, cefazolina, quinupristina/dalfopristina, doxiciclina, tigeciclina, nitrofurantoina y rifampicina fueron excluidos debido a que los datos sobre resistencia fueron muy escasos. Tabla 10.

Tabla 10. Análisis de la presencia del gen *blaZ* y su asociación con la resistencia de *S. aureus* y *S. lugdunensis* a distintos antibióticos

Clase de antibiótico	Antibiótico	Total n (%)	<i>blaZ</i> positivo n (%)	<i>blaZ</i> negativo n (%)	p*
Betalactámicos	Bencilpenicilina	58 (33.7)	55 (44)	3 (6.3)	<0.005
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacino	9 (5.2)	9 (7.3)	0	0.06
	Levofloxacino	2 (1.2)	2 (1.6)	0	0.38
	Moxifloxacino	9 (5.2)	9 (7.3)	0	0.06
Otros	Gentamicina	11 (6.4)	9 (7.3)	2 (4.2)	0.46
	Eritromicina	31 (18)	28 (22.6)	3 (6.3)	0.01
	Teicoplanina	1 (0.6)	1 (0.8)	-	0.53
	Tetraciclina	8 (4.7)	7 (5.6)	1 (2.1)	0.32
	Clindamicina	37 (21.5)	34 (27.4)	3 (6.3)	0.002
	Trimetoprim /sulfametoxazol	8 (4.7)	8 (6.5)	-	0.07

*Chi-cuadrada

Se realizó el análisis entre el gen *blaZ* positivo y el efecto del aumento de la CIM en una dilución a cefalotina con un inóculo alto. Dentro de las cepas sin gen *blaZ*, sólo 12 (25%) presentaron el fenómeno de aumento de la CIM, mientras que en el grupo de las cepas con gen *blaZ* hubo aumento de la CIM en una dilución en 50 (40.3%) aislados. Esta diferencia no fue significativa ($p= 0.06$). Las variables asociadas a la presencia del gen *blaZ* fueron: diagnóstico de endocarditis y recibir tratamiento distinto a ceftriaxona Tabla 11.

Tabla 11. Variables asociadas a la presencia del gen *blaZ* en aislados *Staphylococcus* spp. sensibles a meticilina

Variable	Cepas <i>blaZ</i> positivas n (%)	Cepas <i>blaZ</i> negativas n (%)	p*
Endocarditis	21/89 (23.6)	1/33 (3.0)	0.009
Tratamiento con ceftriaxona	5/124 (4.0)	7/48 (14.6)	0.01

*Chi cuadrada

8. DISCUSIÓN

La búsqueda del efecto inóculo es importante, debido a que ha sido asociado con falla al tratamiento y aumento de la mortalidad, sobre todo el en caso de cefazolina. Sin embargo, en México, la cefalotina es el betalactámico parenteral de elección para infecciones invasivas por SAMS y la información de la existencia del efecto inóculo con este antibiótico y el posible impacto en los desenlaces clínicos es escasa. En este estudio se analizaron 181 aislados clínicos de *S. aureus* y *S. lugdunensis*, y encontramos que la CIM₅₀ de cefalotina fue 0.25 µg/mL y de 0.5 µg/mL para el inóculo estándar y alto respectivamente. Además 1 µg/mL fue la la CIM máxima. Por lo anterior, es posible afirmar que ninguno de los aislados clínicos de *S. aureus* y *S. lugdunensis* de muestras de pacientes del INCMNSZ presentó efecto inóculo para cefalotina.

En estudios previos se ha observado que la cefalotina es una de las cefalosporinas más estables a la acción de las betalactamasas de SAMS. Sin embargo, otros estudios han reportado que hasta 13% de las cepas con presencia de *blaZ* pueden alcanzar CIM de 8 µg/mL, lo que ha sido llamado como “leve efecto inóculo a cefalotina”^{10,25}.

De los 181 aislados clínicos analizados en este estudio, 172 se analizaron para la búsqueda del gen *blaZ*, de las cuales 72.1% fueron positivas, 73.5% de *S. aureus* y 50% *S. lugdunensis*. Los estudios previos para *S. aureus* en América Latina han informado de hasta un 81% de aislados *blaZ* positivas, siendo el tipo C la más frecuente (37%)¹⁹. En el caso de *S. lugdunensis*, se pensaba que no era portador de *blaZ*, aunque estudios más recientes han encontrado resistencia a penicilina entre 51-76% y el gen *blaZ* entre 7-40% dependiendo de la zona geográfica^{4,39,41}. Por lo tanto, la frecuencia de *blaZ* positiva encontradas en este estudio, coinciden con la frecuencia previamente descrita en América Latina para *S. aureus* y en informes recientes en Taiwan para *S. lugdunensis*.

Existen al menos dos explicaciones para la ausencia del efecto inóculo a cefalotina. Primero se ha informado que la betalactamasa de *Staphylococcus* spp. puede expresarse de forma constitutiva o inducible. Segundo, aún en las cepas que son capaces de expresar la betalactamasa, existen varios tipos, conocidas por las letras A, B, C y D. Estas enzimas tienen distinta afinidad para hidrolizar a cada uno de los betalactámicos. En la actualidad se clasifican por serología o secuenciación nucleotídica. Las bases moleculares de estas diferencias no han sido bien elucidadas, pero los estudios previos han mostrado que el orden de mayor afinidad por la cefalotina como sustrato es para el tipo C, seguido de B, A y D. Sin embargo, en estudios previos se ha demostrado una prevalencia de la betalactamasa tipo C de hasta 40% en Argentina pero sólo 13% de efecto inóculo a cefalotina ^{10,25}. Debido a esto, el estudio del efecto inóculo y las betalactamasas es un fenómeno complejo que debería involucrar la CIM, el gen *blaZ* y su tipificación.

De las 124 cepas positivas para *blaZ*, 55/63 (87%) fueron resistentes a penicilina, lo cual resulta esperado ya que la betalactamasa es el principal mecanismo de resistencia de *Staphylococcus* ⁵⁰⁻⁵². Además, se encontró que 28 (22.6%) eran resistentes a eritromicina y 34 (27.4%) a clindamicina, con una diferencia al compararlo con aislados *blaZ* negativos. Este fenómeno es debido a que el plásmido que codifica *blaZ* contiene otros genes de resistencia a otros antibióticos, desinfectantes y metales pesados ^{51,52}.

Los patrones de susceptibilidad más comúnmente identificados en este estudio, fueron la resistencia a bencilpenicilina (34.3%), clindamicina (21%) y eritromicina (17.7%). Los datos contrastan con lo reportado en otros países donde la susceptibilidad es menor: 31-13.5% a penicilina, 74% a clindamicina y 71% a eritromicina ⁵³⁻⁵⁵. Sin embargo, en este estudio no se conocía de forma sistemática la susceptibilidad a todos los antibióticos de las 181 cepas, por lo que esta información no es realmente representativa de la epidemiología local de los SAMS.

De las características clínicas, la mayoría fueron de infecciones monomicrobianas (87.3%). Los síndromes infecciosos más frecuentemente encontrados fueron bacteriemia, bacteriemia asociada a catéter, neumonía o empiema, osteomielitis o espondilodiscitis, infecciones de tejidos blandos y artritis séptica. Además, la mayoría fueron hombres, con una mediana de edad de 50 años y un índice de comorbilidad de Charlson de 4 puntos. Las comorbilidades más frecuentes fueron enfermedad renal crónica diabetes mellitus, enfermedades del tejido conectivo y hematológicas. Esto es similar a lo reportado en estudios recientes sobre infecciones invasivas por *S. aureus*^{5,8} y *S. lugdunensis*⁴¹. Algunas diferencias importantes son la alta frecuencia de enfermedades del tejido conectivo, trastornos hematológicos y endocarditis^{5,8,41}. Esto podría ser derivado de la alta concentración de patologías específicas y la disponibilidad para realizar estudios de abordaje diagnóstico en el INCMNSZ por tratarse de un hospital de tercer nivel.

En este estudio, encontramos asociación entre el gen *blaZ* y el diagnóstico de endocarditis, pero no en otros sitios anatómicos involucrados en las infecciones o la mortalidad intrahospitalaria. La publicaciones que buscan asociación entre mortalidad y la presencia del gen *blaZ* o la resistencia a penicilina informan de resultados heterogéneos por lo que se necesitan más estudios para resolver esta pregunta^{8,12}.

Los antibióticos más utilizados dentro del INCMNSZ para el tratamiento de estas infecciones fueron vancomicina (53%), dicloxacilina (40.3%), cefalotina (33.7%) y algún carbapenémico (22.6%). Respecto a los desenlaces de los pacientes, 90.1% recibió tratamiento intrahospitalario, con una mediana de estancia de 18 días. El porcentaje de pacientes hospitalizados y el número de días resulta muy similar a lo publicado en otras series recientes⁵.

La mortalidad de los pacientes hospitalizados por infecciones invasivas por SAMS en el INCMNSZ fue de 23.9%, que es similar a lo informado en otros estudios^{5,8,56,57}. Los factores asociados a mortalidad fueron mayor edad, menor duración de tratamiento, cepas con resistencia a eritromicina o clindamicina, antecedente de cirrosis hepática o diabetes mellitus. Estos datos coinciden de forma parcial con una revisión sistemática de los estudios publicados^{8,57}. No obstante, la naturaleza retrospectiva del estudio podría resultar inexacto para calcular las escalas tradicionalmente asociadas a mortalidad como McCabe Jackson o Pittsburg^{8,57}. Por otro lado, recibir tratamiento con carbapenémicos se asoció a mayor mortalidad, probablemente como reflejo de la gravedad de los pacientes al ser utilizados en pacientes con infecciones graves por su amplio espectro antimicrobiano y poca toxicidad⁵⁸. Recibir linezolid también se asoció a mortalidad, debido a la gran proporción de bacteriemias y la evidencia de una menor respuesta microbiológica, éxito terapéutico y mayor mortalidad al compararlo con vancomicina o teicoplanina en estas infecciones⁵⁹. A diferencia de otros estudios, el tratamiento con vancomicina no se asoció a mayor mortalidad. Esto probablemente debido a la posibilidad de detectar de forma rápida el gen *mecA*, lo que podría disminuir el tiempo de tratamiento inadecuado^{60,61}. El uso de dicloxacilina se asoció a menor mortalidad, sin embargo, al separar a los pacientes que recibieron cefalotina o dicloxacilina no se observó diferencia en la proporción de defunciones. Estos resultados son diferentes a lo reportado en algunos estudios donde la cefazolina se asoció a mayor mortalidad comparado con oxacilina para tratamiento de las infecciones invasivas por *S. aureus*. Sin embargo, debido a que la cefalotina ha sido reemplazada por cefazolina como la cefalosporina de primera línea recomendada para SAMS, no existen estudios comparativos entre ambos medicamentos y esta información debe tomarse únicamente como algo descriptivo de los pacientes analizados.

9. CONCLUSIONES

No se identificó efecto inóculo para cefalotina en las cepas analizadas fue de *S. aureus* y *S. lugdunensis*

Los antibióticos cuya resistencia se asoció de forma significativa a la presencia de *blaZ* fueron bencilpenicilina, eritromicina y clindamicina.

Los aislados de *S. aureus* y *S. lugdunensis* con *blaZ* positivo, presentaron aumento de una dilución en las CIM de cefalotina entre el inóculo estándar y el inóculo alto.

Los aislados de *S. aureus* y *S. lugdunensis* *blaZ* positivo, se asociaron de forma significativa a endocarditis demostrada por ecocardiograma.

10. REFERENCIAS

1. Weistein M, Lewis II J, Bobenchik A, et al. *M100 Performance Standards for Antimicrobial*. 31st Editi. (CLSI, ed.); 2021.
2. Dayan G, Naglaa M, Scully I, et al. Staphylococcus aureus : The current state of disease , pathophysiology and strategies for prevention. *Expert Rev Vaccines*. 2016;0584(April). doi:10.1080/14760584.2016.1179583
3. Taha L, Stegger M, Söderquist B. Staphylococcus lugdunensis: antimicrobial susceptibility and optimal treatment options. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2019;38(8):1449-1455. doi:10.1007/s10096-019-03571-6
4. Frank KL, Del Pozo JL, Patel R. From clinical microbiology to infection pathogenesis: How daring to be different works for Staphylococcus lugdunensis. *Clin Microbiol Rev*. 2008;21(1):111-133. doi:10.1128/CMR.00036-07
5. Jackson KA, Gokhale RH, Nadle J, et al. Public Health Importance of Invasive Methicillin-sensitive Staphylococcus aureus Infections: Surveillance in 8 US Counties, 2016. *Clin Infect Dis*. 2020;70(6):1021-1028. doi:10.1093/cid/ciz323
6. Lambert M. IDSA guidelines on the treatment of MRSA infections in adults and children. *Am Fam Physician*. 2011;84(4):455-456.
7. Eljaaly K, Alsherhri S, Erstad BL. Systematic Review and Meta-analysis of the Safety of Antistaphylococcal Penicillins Compared to Cefazolin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62(4):1-10. doi:10.1128/AAC.01816-17
8. Miller WR, Seas C, Carvajal LP, et al. The Cefazolin Inoculum Effect Is Associated With Increased Mortality in Methicillin-Susceptible Staphylococcus aureus Bacteremia. *Open Forum Infect Dis*. 2018:1-9. doi:10.1093/ofid/ofy123
9. Reyes J, Carvajal LP, Rojas N, et al. Cefazolin high-inoculum effect in methicillin-susceptible Staphylococcus aureus from South American hospitals. *J Antimicrob Chemother*. 2013;(June):2773-2778. doi:10.1093/jac/dkt254
10. Nannini EC, Stryjewski ME, Singh K V, et al. Inoculum Effect with Cefazolin

among Clinical Isolates of Methicillin-Susceptible Staphylococcus aureus : Frequency and Possible Cause of Cefazolin Treatment Failure □. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(8):3437-3441. doi:10.1128/AAC.00317-09

11. Chong YP, Park SJ, Kim ES, Bang K. Prevalence of blaZ gene types and the cefazolin inoculum effect among methicillin-susceptible Staphylococcus aureus blood isolates and their association with multilocus sequence types and clinical outcome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2015;34:349-355. doi:10.1007/s10096-014-2241-5

12. Hagstrand Aldman M, Skovby A, I. Pählman L. Penicillin-susceptible Staphylococcus aureus: susceptibility testing, resistance rates and outcome of infection. *Infect Dis (Auckl).* 2017;49(6):454-460. doi:10.1080/23744235.2017.1280617

13. Brook I. Inoculum Effect. *Rev Infect Dis.* 1989;11(3):361-368.

14. Lenhard JR, Bulman ZP. Inoculum effect of b -lactam antibiotics. *J antim.* 2019;74(June):2825-2843. doi:10.1093/jac/dkz226

15. Luria S. A test for penicillin sensitivity and resistance in Staphylococcus. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1946;Jan(61):46-51. doi:10.3181/00379727-61-15222

16. Livorsi DJ, Crispell E, Satola SW, et al. Prevalence of blaZ Gene Types and the Inoculum Effect with Cefazolin among Bloodstream Isolates of Methicillin-Susceptible Staphylococcus aureus. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(8):4474-4477. doi:10.1128/AAC.00052-12

17. Wang SK, Gilchrist A, Loukicheva A, et al. Prevalence of a Cefazolin Inoculum Effect Associated with blaZ Gene Types among Methicillin-Susceptible Staphylococcus aureus Isolates from Four Major Medical Centers in Chicago. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62(8):1-11.

18. Song K, Jung S, Lee S, et al. Characteristics of cefazolin inoculum effect-positive methicillin-susceptible staphylococcus aureus infection in a multicentre bacteraemia cohort. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2017;36:285-294.

doi:10.1007/s10096-016-2799-1

19. Carvajal LP, Rincon S, Echeverri AM, et al. Novel Insights into the Classification of Staphylococcal B-Lactamases in Relation to the Cefazolin Inoculum Effect. *Antimicrob Agents Chemother.* 2020;64(5):1-11. doi:10.1128/AAC.02511-19
20. Ferreira AM, Martins KB, Silva VR da, Mondelli AL, Cunha M de LR de S da. Correlation of phenotypic tests with the presence of the blaZ gene for detection of beta-lactamase. *Brazilian J Microbiol.* 2017;48(1):159-166. doi:10.1016/j.bjm.2016.10.011
21. Bush K, Bradford PA. Epidemiology of B-Lactamase-Producing Pathogens. *Clin Microbiol Rev.* 2020;33(2):1-37.
22. Song K, Jung S, Lee S, et al. Inoculum effect of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* against broad-spectrum beta-lactam antibiotics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2019;38:67-74. doi:10.1007/s10096-018-3392-6
23. East AK, Duke KGH. Cloning and sequence determination of six *Staphylococcus aureus* β -lactamases and their expression in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Gen Microbiol.* 1989;135(4):1001-1015. doi:10.1099/00221287-135-4-1001
24. Voladri RKR, Tummuru MKR, Kernodle DS. Structure-function relationships among wild-type variants of *Staphylococcus aureus* β -lactamase: Importance of amino acids 128 and 216. *J Bacteriol.* 1996;178(24):7248-7253. doi:10.1128/jb.178.24.7248-7253.1996
25. Fong IW, Engelking ER, Kirby WMM. Relative inactivation by *Staphylococcus aureus* of eight cephalosporin antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* 1976;9(6):939-944. doi:10.1128/AAC.9.6.939
26. Nannini EC, Stryjewski ME, Singh K V, et al. Determination of an Inoculum Effect with Various Cephalosporins among Clinical Isolates of Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* □. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(5):2206-2208.

doi:10.1128/AAC.01325-09

27. Nighthingale C, Greene D, Quintilliani R. Pharmacokinetics and Clinical Use of Cephalosporin Antibiotics. *Pharm Sci*. 2016;22(1):1. doi:10.15171/PS.2016.01
28. John J, George S, Ravi S, Nori C, Nelson-sathi S. Phylogenomic Analysis Reveals the Evolutionary Route of Resistant Genes in *Staphylococcus aureus*. *Genome Biol Evol*. 2019;11(10):2917-2926. doi:10.1093/gbe/evz213
29. Zhang HZ, Hackbarth CJ, Chansky KM, Chambers HF. A proteolytic transmembrane signaling pathway and resistance to β -lactams in staphylococci. *Science (80-)*. 2001;291(5510):1962-1965. doi:10.1126/science.1055144
30. Hao H, Dai M, Wang Y, Huang L, Yuan Z. Key genetic elements and regulation systems in methicillin-resistant. *Future Microbiol*. 2012;7(11):1315-1329.
31. Lee SO, Lee S, Park S, Lee JE, Lee SH. The Cefazolin Inoculum Effect and the Presence of type A bla_Z Gene according to agr Genotype in Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Infect Chemother*. 2019;51(4):376-385. doi:10.3947/ic.2019.51.4.376
32. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(3):969-976. doi:10.1128/AAC.01009-09
33. Ambler RP. The amino acid sequence of *Staphylococcus aureus* penicillinase. *Biochem J*. 1975;151(2):197-218. doi:10.1042/bj1510197
34. Richmond MH. Wild-Type Variants of Exopenicillinase From *Staphylococcus Aureus*. *Biochem J*. 1965;94:584-593. doi:10.1042/bj0940584
35. Kernodle DS, Stratton CW, McMurray LW, Chipley JR, Mcgraw PA. Differentiation of β -Lactamase Variants of *Staphylococcus aureus* by Substrate Hydrolysis Profiles. *J Infect Dis*. 1989;159(1):103-108. doi:10.1093/infdis/159.1.103
36. Zygmunt DJ, Stratton CW, Kernodle DS. Characterization of four β -lactamases produced by *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1992;36(2):440-445. doi:10.1128/AAC.36.2.440

37. Peyru G, Wexler LF, Novick RP. Naturally occurring penicillinase plasmids in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 1969;98(1):215-221. doi:10.1128/jb.98.1.215-221.1969
38. Olsen JE, Christensen H, Aarestrup FM. Diversity and evolution of bla_Z from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *J Antimicrob Chemother*. 2006;57(3):450-460. doi:10.1093/jac/dki492
39. Mchardy IH, Veltman J, Hindler J, Bruxvoort K, Carvalho MM, Humphries RM. Clinical and microbiological aspects of β -lactam resistance in *Staphylococcus lugdunensis*. *J Clin Microbiol*. 2017;55(2):585-595. doi:10.1128/JCM.02092-16
40. Hagstrand Aldman M, Pålman LI. Evaluation of penicillin G susceptibility testing methods for *Staphylococcus lugdunensis*. *J Antimicrob Chemother*. 2020;75(5):1206-1211. doi:10.1093/jac/dkaa004
41. Yeh CF, Chang SC, Cheng CW, Lin JF, Liu TP, Lu JJ. Clinical features, outcomes, and molecular characteristics of community-and health care-associated *Staphylococcus lugdunensis* infections. *J Clin Microbiol*. 2016;54(8):2051-2057. doi:10.1128/JCM.00847-16
42. Selepak ST, Witebsky FG. β -Lactamase detection in nine staphylococcal species. *J Clin Microbiol*. 1984;20(6):1200-1201. doi:10.1128/jcm.20.6.1200-1201.1984
43. Rincon S, Carvajal LP, Gomez-villegas SI, et al. A Test for the Rapid Detection of the Cefazolin Inoculum Effect in Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 2021;59(4):1-11. doi:https://doi.org/10.1128/JCM.01938-20
44. Kaase M, Lenga S, Friedrich S, et al. Comparison of phenotypic methods for penicillinase detection in *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14(6):614-616. doi:10.1111/j.1469-0691.2008.01997.x
45. Petersson AC, Eliasson I, Kamme C, Miörner H. Evaluation of four qualitative methods for detection of beta-lactamase production in *Staphylococcus* and

Micrococcus species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1989;8(11):962-967.
doi:10.1007/BF01967566

46. Pereira LA, Harnett GB, Hodge MM, Cattell JA, Speers J. Real-Time PCR Assay for Detection of bla_Z Genes in Staphylococcus aureus Clinical Isolates. *J Clin Microbiol*. 2014;52(4):1259-1261. doi:10.1128/JCM.03413-13

47. Takayama Y, Tanaka T, Oikawa K, Fukano N, Goto M, Takahashi T. Prevalence of bla_Z Gene and Performance of Phenotypic Tests to Detect Penicillinase in Staphylococcus aureus Isolates from Japan. *Ann Lab Med*. 2018;38:155-159. doi:10.3343/alm.2018.38.2.155

48. El Feghaly RE, Stamm JE, Fritz SA, Burnham CAD. Presence of the bla_Z beta-lactamase gene in isolates of Staphylococcus aureus that appear penicillin susceptible by conventional phenotypic methods. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012;74(4):388-393. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2012.07.013

49. Papanicolas LE, Bell JM. Performance of Phenotypic Tests for Detection of Penicillinase in Staphylococcus aureus Isolates from Australia. *J Clin Microbiol*. 2014;52(4):1136-1138. doi:10.1128/JCM.03068-13

50. Livermore DM. B-Lactamases in Laboratory and Clinical Resistance. *Clin Microbiol Rev*. 1995;8(4):557-584. doi:10.1128/cmr.8.4.557-584.1995

51. Pantosti A, Sanchini A, Monaco M. Mechanisms of antibiotic resistance in Staphylococcus aureus. *Future Microbiol*. 2007;2(3):323-334.
doi:10.2217/17460913.2.3.323

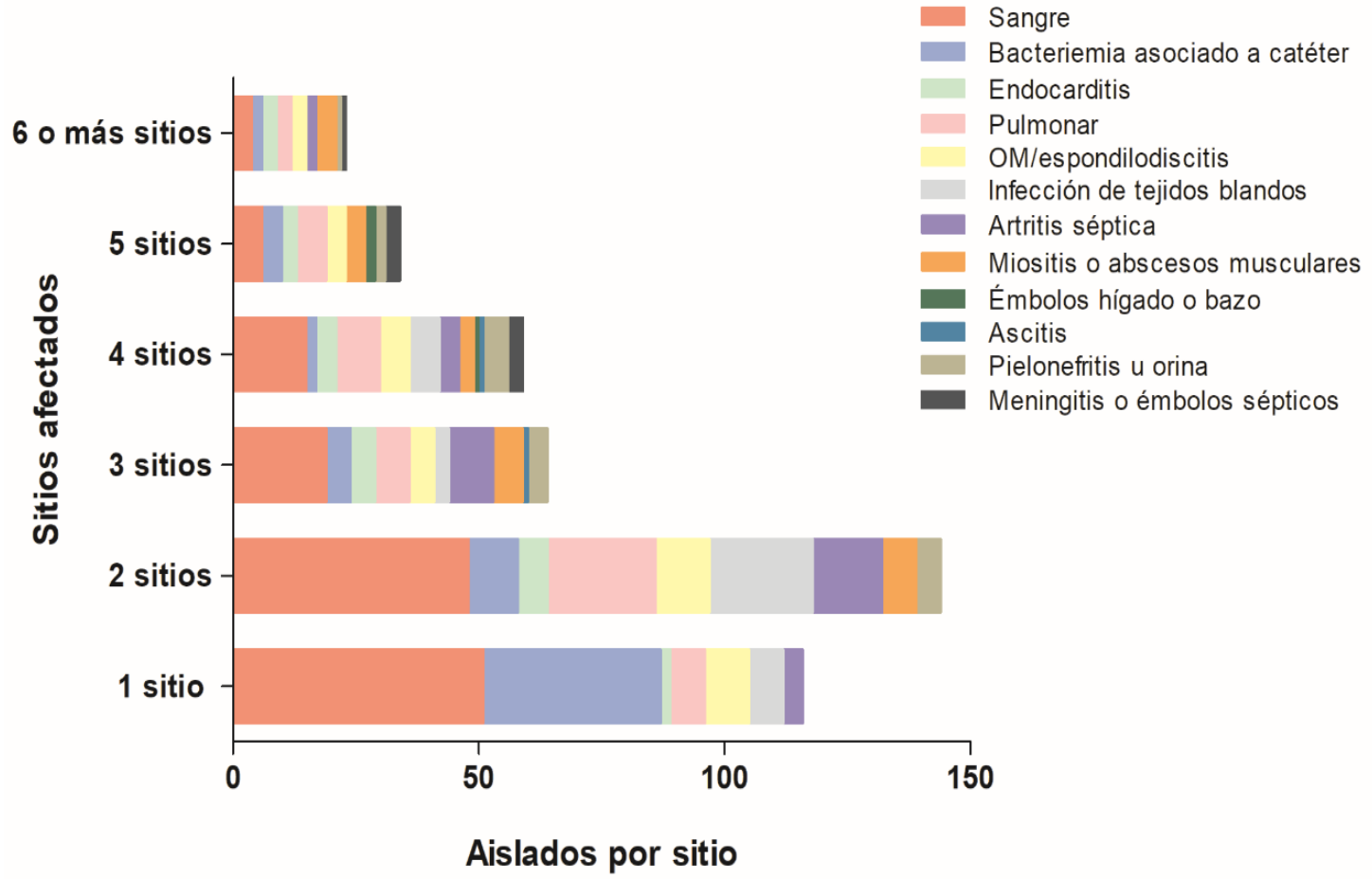
52. Lyon BR, Skurray R. Antimicrobial resistance of Staphylococcus aureus: Genetic basis. *Microbiol Rev*. 1987;51(1):88-134. doi:10.1128/mmbr.51.1.88-134.1987

53. Cheng MP, René P, Cheng AP, Lee TC. Back to the Future: Penicillin-Susceptible Staphylococcus aureus. *Am J Med*. 2016;129(12):1331-1333.
doi:10.1016/j.amjmed.2016.01.048

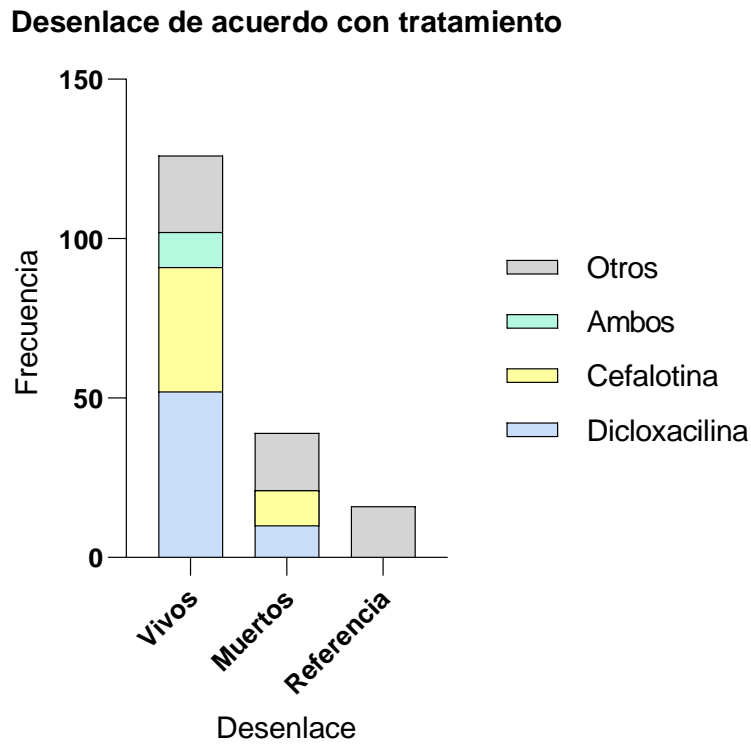
54. Resman F, Thegerström J, Månsson F, Ahl J, Tham J, Riesbeck K. The prevalence, population structure and screening test specificity of penicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia isolates in Malmö, Sweden. *J Infect*. 2016;73(2):129-135. doi:10.1016/j.jinf.2016.05.011
55. Richter SS, Doern G V., Heilmann KP, et al. Detection and Prevalence of Penicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* in the United States in 2013. *J Clin Microbiol*. 2016;54(3):812-814. doi:10.1128/JCM.03109-15
56. S.I. B, K.H. V, E.A. H, F.A. C. Outcome and attributable mortality in critically ill patients with bacteremia involving methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Arch Intern Med*. 2002;162(19):2229-2235. <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed5&NEWS=N&AN=2002383391>.
57. van Hal SJ, Jensen SO, Vaska VL, Espedido BA, Paterson DL, Gosbell IB. Predictors of mortality in staphylococcus aureus bacteremia. *Clin Microbiol Rev*. 2012;25(2):362-386. doi:10.1128/CMR.05022-11
58. J G-P, P P. Antibiotics in critically ill patients: a systematic review of the pharmacokinetics of beta-lactams. *Crit Care*. 2011;15:R206-R206.
59. Holland TL, Arnold C, Fowler VG. Clinical management of staphylococcus aureus bacteremia: A review. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2014;312(13):1330-1341. doi:10.1001/jama.2014.9743
60. Chen SY, Wang JT, Chen THH, et al. Impact of traditional hospital strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and community strain of MRSA on mortality in patients with community-onset *S aureus* bacteremia. *Medicine (Baltimore)*. 2010;89(5):285-294. doi:10.1097/MD.0b013e3181f1851e
61. Chang FY, MacDonald BB, Peacock JE, et al. A prospective multicenter study of staphylococcus aureus bacteremia: Incidence of endocarditis, risk factors for mortality, and clinical impact of methicillin resistance. *Medicine (Baltimore)*. 2003;82(5):322-332. doi:10.1097/01.md.0000091185.93122.40

11. GRÁFICAS

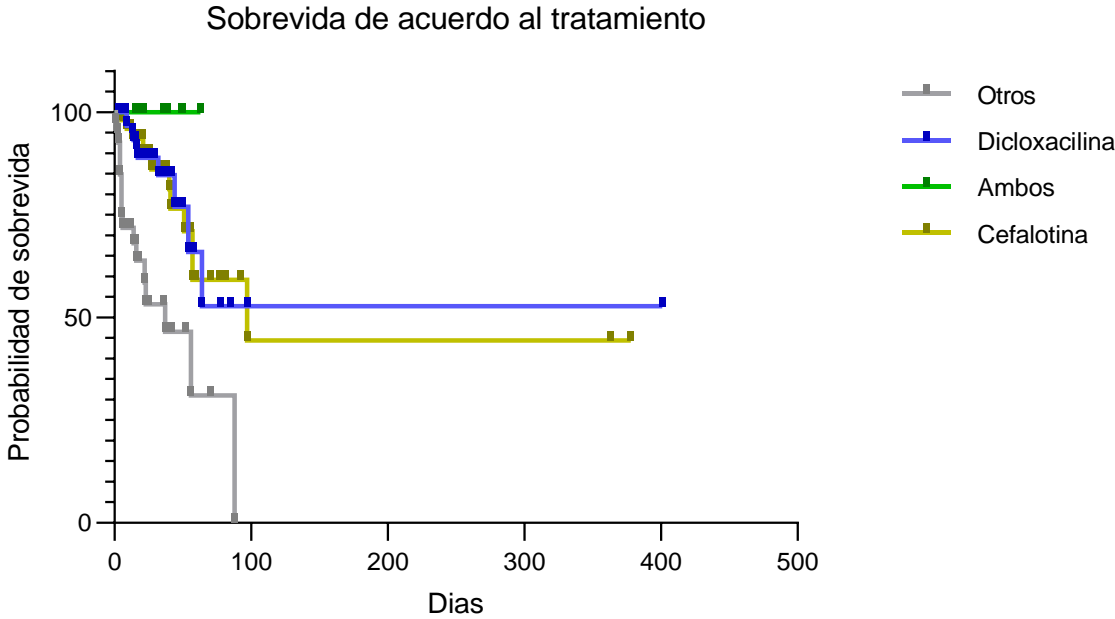
Grafica 1. Cantidad de aislados por el número de sitios afectados



Gráfica 2. Desenlace de acuerdo con tratamiento



Grafica 3. Sobrevida de acuerdo con el tratamiento, dividido en cefalotina, dicloxacilina, ambas u otros



Grafica 4. Distribución de la frecuencia de la CIM de los aislados clínicos de acuerdo con la presencia de *blaZ* y el inóculo

Distribución de la frecuencia de la CIM de los aislados clínicos de acuerdo con la presencia de *blaZ* y el inóculo

