

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Caracterización y seguimiento de la resistencia a linezolid en
staphylococcus epidermidis en la unidad de cuidados
intensivos del Hospital Clínico San Carlos tras la descripción
del primer brote de staphylococcus aureus linezolid resistente**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Elvira Baos Muñoz

DIRECTORES

**Juan José Picazo de la Garza
Francisco Javier Candel González
Iciar Rodríguez-Avial Infante**

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA -

Departamento de medicina -



CARACTERIZACIÓN Y SEGUIMIENTO DE LA
RESISTENCIA A LINEZOLID EN STAPHYLOCOCCUS
EPIDERMIDIS EN LA UNIDAD DE CUIDADOS
INTENSIVOS DEL HOSPITAL CLÍNICO SAN CARLOS
TRAS LA DESCRIPCIÓN DEL PRIMER BROTE DE
STAPHYLOCOCCUS AUREUS LINEZOLID RESISTENTE -

TESIS DOCTORAL -

ELVIRA BAOS MUÑOZ -

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID -
FACULTAD DE MEDICINA -
Departamento de medicina -



Juan Jose Picazo de la Garza, Jefe de Servicio de Microbiología Clínica del Hospital Clínico San Carlos, Francisco Javier Candel González, Facultativo Especialista de Área en el Servicio de Microbiología Clínica del Hospital Clínico San Carlos e Iciar Rodríguez-Avial Infante, TTS y Doctora en el Servicio de Microbiología del Hospital Clínico San Carlos

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo titulado “Caracterización y seguimiento de la resistencia a linezolid en *Staphylococcus epidermidis* en la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital Clínico San Carlos tras la descripción del primer brote de *Staphylococcus aureus* linezolid-resistente.” Ha sido realizado bajo nuestra dirección por Dña. Elvira Baos Muñoz en el Servicio de Microbiología Clínica del Hospital Clínico San Carlos de Madrid y estimando que reúne las condiciones para optar al grado de Doctor por la UCM, se solicita sea admitida a trámite para su lectura y defensa pública.

Dr. Juan J. Picazo

Dr. Fco. Javier Candel

Iciar Rodríguez-Avial

AGRADECIMIENTOS -

Ahora que este proyecto llega a su fin, me gustaría agradecer a todas aquellas personas que de una manera o de otra han ayudado a que esto sea posible.

En primer lugar, quiero agradecer en primer lugar al Dr Juan J. Picazo por haberme acogido en su Servicio y haberme dado la oportunidad de realizar en el mi trabajo de investigación.

A mi director Francisco Javier Candel, por haberme enseñado tanto a lo largo de este tiempo, por su dedicación y su confianza, sin el este trabajo no habría sido posible.

A la Dra. Iciar Rodriguez-Avial, por haber compartido conmigo su experiencia, por su constante apoyo y dedicación, por darme aliento en los momentos más duros.

A la Dra Esther Culebras, por su paciencia, por estar siempre ahí para darme consejos, por escucharme en cada momento.

A la Dra. Carmen Rodriguez-Avial, por tener siempre una palabra de ánimo, por su sabiduría y sus consejos.

Al Dr. Fernando de la Torre, por su paciencia, por ayudarme a crecer.

Al Dr.Luis Martinez, por acogerme cariñosamente en su servicio, por haberme enseñado tanto, por su colaboración y constante disposición en cada cosa que he necesitado.

A Esmeralda, por enseñarme tanto a lo largo de este tiempo, por apoyarme siempre en todo momento, por hacerme reir.

En general, a todos los compañeros del Servicio de Microbiología, porque de un modo u otro, todos forman parte de este trabajo.

A mis padres y hermanos, por quererme, por confiar en mi, por sus palabras, por su paciencia, por apoyarme en cada momento para poder llegar hasta aquí.

A Irene, por escucharme todos los días, por estar siempre conmigo en todo momento, por confiar en mi, por tus palabras constantes de ánimo, por su amistad infinita.

A Fer, por creer en mi, por darme fuerza cada día, por estar ahí en todo momento y de manera incondicional, en definitiva por hacerme feliz.

Muchas gracias a todos

A mis padres, mis hermanos y a Fer

ÍNDICE -

Índice

I. ABREVIATURAS	3
II. SUMMARY	7
III. INTRODUCCIÓN	13
1. Género <i>Staphylococcus sp.</i>	13
1.1 Antecedentes históricos.....	13 -
1.2 Características microbiológicas.....	14 -
2. <i>Staphylococcus aureus</i>	15
2.1 Fisiología y estructura.....	15 -
2.1.1 Pared celular.....	15 -
2.1.2 Cápsula y capa de polisacárido.....	16 -
2.1.3 Peptidoglucano y enzimas asociadas.....	16 -
2.1.4 Ácidos teicoicos.....	17 -
2.1.5 Proteína A.....	17 -
2.1.6 Coagulasa.....	17 -
2.1.7 Membrana citoplasmática.....	17 -
2.2 Mecanismos de patogenicidad.....	18 -
2.2.1 Defensas contra la inmunidad innata.....	18 -
2.2.2 Proteínas de adhesión.....	19 -
2.2.3 Enzimas.....	19 -
2.2.4 Toxinas.....	19 -
2.3 Epidemiología.....	22 -
2.4 Enfermedades causadas por <i>Staphylococcus aureus</i>	23 -
2.4.1 Infecciones cutáneas.....	23 -
2.4.2 Bacteriemia y endocarditis.....	24 -
2.4.3 Neumonía y empiema.....	25 -
2.4.4 Osteomielitis y artritis séptica.....	25 -
2.5 Sensibilidad antibiótica y tratamiento.....	26 -
2.5.1 Resistencia a β -lactámicos.....	26 -
2.5.2 Resistencia a glicopéptidos.....	28 -
2.5.3 Resistencia a linezolid.....	29 -

3. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	33
3.1 Importancia clínica	33 -
3.2 Mecanismos de patogenicidad de <i>S. epidermidis</i>	33 -
3.2.1 Biopelícula.....	33 -
3.2.2 Exopolisacárido PIA.....	34 -
3.2.3 Modulinas solubles en fenol.....	34 -
3.2.4 Ácidos teicoicos.....	35 -
3.2.5 Poli- γ -glutámico (PGA).....	35 -
3.2.6 Toxinas	36 -
3.2.7 Exoenzimas.....	37 -
3.3 Formación del biofilm y sustancias implicadas	37 -
4. Epidemiología de estafilococos coagulasa negativos	39
5. Enfermedades causadas por <i>S. epidermidis</i> y otros estafilococos coagulasa-negativos	40
5.1 Infecciones de catéteres y anastomosis	40 -
5.2 Infecciones de las prótesis articulares	41 -
5.3 Otras infecciones	41 -
6. Resistencia antibiótica y tratamiento	41
7. Nuevas alternativas de tratamiento.	42
8. Principales infecciones en las unidades de críticos	44
IV. OBJETIVOS	47
V. MATERIAL Y MÉTODOS	51
1. Aislados clínicos	51
1.1 Cepas de referencia.....	51 -
2. Técnicas de identificación	52
2.1 Sistema de identificación WIDER	52 -
2.2 Sistema de identificación Vitek 2.....	52 -
3. Estudio de sensibilidad a antimicrobianos	53
3.1 Método de dilución en agar	54 -

3.2 Método de Epsilon test [®]	55 -
4. Estudios de clonalidad	56
4.1 Electroforesis en campo pulsado	56 -
4.1.1 Preparación del ADN.....	57 -
4.1.2 Lisis celular	57 -
4.1.3 Digestión enzimática	58 -
4.1.4 Preparación del gel y electroforesis.....	58 -
4.1.5 Análisis comparativo de los patrones de electroforesis.....	58 -
4.2 MLST (Multilocus Sequence Typing)	59 -
5. Extracción de ácidos nucleicos.....	60
5.1 Extracción de ácidos nucleicos en <i>S. aureus</i>	60 -
5.2 Extracción de los ácidos nucleicos en <i>S. epidermidis</i>	61 -
6. Determinación del mecanismo de resistencia a Linezolid.....	62
6.1 Detección de mutaciones en el dominio V del ARN ribosomal 23S -	
62 -	
6.1.1 Amplificación del ADN para cada alelo individual de ARNr.....	62 -
6.1.2 Amplificación del Dominio V	64 -
6.2 Detección del gen <i>cfr</i>	65 -
6.2.1 Preparación del ADN.....	65 -
6.2.2 Amplificación del gen <i>cfr</i>	65 -
7. Detección de mutaciones en las proteínas ribosomales L3 y L4.	66
8. Detección de los amplificadores	67
9. Secuenciación.....	67
10. Obtención de datos clínicos	68
11. Análisis estadístico	69
VI. RESULTADOS	73
1. Aislados clínicos	73
2. Estudio de sensibilidad antibiótica.....	75
3. Estudio genotípico.....	77

3.1 Obtención de perfiles electroforéticos.....	77 -
3.1.1 MLST	81 -
3.1.2 Identificación del mecanismo de resistencia de SALR	82 -
4. Caracterización y seguimiento de cepas de SELR aisladas en la UCI.....	83
4.1 Datos epidemiológicos	83 -
4.2 Datos clínicos	86 -
4.3 Detección de mecanismos de resistencia a linezolid.....	98 -
4.3.1 Detección del gen <i>cfr</i>	98 -
4.3.2 Detección de mutaciones nucleotídicas en el dominio V del ARNr 23S99	
4.3.3 Detección de mutaciones en proteínas ribosomales	102 -
VII. DISCUSIÓN.....	111
VIII. CONCLUSIONES	129
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	133

ABREVIATURAS -

I. Abreviaturas

HCSC: Hospital Clínico San Carlos

UCI: Unidad de Cuidados Intensivos

SAMR: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

SEMR: *Staphylococcus epidermidis* resistente a meticilina

SALR: *Staphylococcus aureus* resistente a linezolid

SELR: *Staphylococcus epidermidis* resistente a linezolid

SCN: Estafilococos coagulasa negativo

SCNLR: Estafilococos coagulasa negativo resistente a linezolid

CMI: Concentración mínima inhibitoria

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

PMN: Polimorfonucleares

MSCRAMM: moléculas de la matriz adhesivas que reconocen a los componentes de la superficie microbiana

PVL: Leucocidina de Pantón-Valentine

SPEE: Síndrome de la piel escaldada

TSST: Toxina del Síndrome del shock tóxico

STT: Síndrome del shock tóxico

VISA: *S. aureus* con resistencia intermedia a vancomicina

GISA: *S. aureus* con resistencia intermedia glucopéptidos

PBP: Proteína ligadora de penicilina

EEUU: Estados Unidos

SAVR: *S. aureus* con resistencia a vancomicina

SAVS: *S. aureus* sensible a vancomicina

PSM: Modulinas solubles en fenol

PGA: poli- γ -glutámico

AMP: péptidos antimicrobianos

EVP: endocarditis de válvula protésica

ATCC: American Type Culture Collection

NCTC: National Collection of Type Cultures

PFGE: Electroforesis en gel en campo pulsado

MLST: Multilocus Sequence Typing

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

BAS: Broncoaspirado

LCR: Líquido cefalorraquídeo

LCOR: Líquido corporal

SUMMARY -

II. Summary

Linezolid is an oxazolidinone with antimicrobial activity against resistant gram-positive bacteria, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), vancomycin-resistant enterococci, and *Streptococcus* species. The drug binds to domain V of the 23S ribosomal RNA (rRNA) of the 50S subunit of bacterial ribosomes, thus inhibiting protein synthesis. Three classes of oxazolidinone resistance mechanisms have been previously characterized: mutations in the domain V region of 23S rRNA genes, acquisition of the ribosomal methyltransferase gene *cf*r, and mutations in the *rplD* and *rplC* gene encoding the 50S ribosomal protein L4 and L3 respectively. The first reports of bacteria resistant to linezolid showed the presence of point mutations at the drug target site. The most frequent mutation is G2576T although other mutations have been found in clinical isolates and in vitro indicating that resistance was apparently generated de novo through spontaneous mutations rather than genetic exchange. Resistance develops slowly, because nearly all bacteria possess multiple copies of the 23S rRNA gene (*S. aureus* strains have 5 or 6 operons encoding 23S rRNA) and it is not transmissible between species.

Subsequently, a new mechanism of linezolid resistance was reported in veterinary staphylococcal isolates. The mechanism is nonmutational and involves acquisition of a natural resistance gene, *cf*r (chloramphenicol-florfenicol resistance). The *cf*r gene was initially described in a bovine *Staphylococcus sciuri* isolate. It has been found primarily in plasmids and appears to be capable of horizontal transfer between staphylococci. The *cf*r gene, encodes methyltransferase, which induces posttranscriptional methylation of 23S rRNA at position A2503, thus affecting the binding of at least four antimicrobial classes of drugs (phenicols, lincosamides, pleuromutilins, and streptogramin A), conferring multidrug-resistant phenotype. In human isolates, the gene was located in the chromosome, unlike the animal isolates, but it was probably part of an integrated plasmid that was potentially capable of excision and mobilization. Therefore, the gene could be transmitted to other pathogenic strains and spread quickly.

Mutations in ribosomal proteins L3 and L4 have also been associated with resistance or reduced susceptibility to oxazolidinones.

From April through June 2008, we identified 12 patients in the intensive care unit and 3 patients on other wards infected with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* that was also resistant to linezolid. One of the main objectives of this study was to characterize the mechanism of resistance to linezolid of all *S. aureus* strains isolated in our hospital. We investigated the mechanism of resistance point mutations in domain V of 23S ribosomal RNA (rRNA) or presence of the *cfi* gene. The presence of the *cfi* gene was confirmed in all the isolates. Furthermore, sequencing of domain V of 23S rRNA showed that the most common mechanism of linezolid resistance reported to date, mutation G2576T, was not detected in any of the strains analyzed. We report the presence of the *cfi* gene underlying the resistance mechanism involved in a clinical outbreak of linezolid-resistant *S. aureus*.

Infection by coagulase-negative *Staphylococcus* is generating increasing interest in intensive care units (ICU), owing to a breach of the biological barriers caused by invasive treatments such as intubation and catheterization. The ability of this microorganism to adhere to devices and its resistance to multiple drugs have led to increased use of linezolid throughout the hospital, especially in the ICU. In recent years, this increase has been paralleled by the emergence of linezolid-resistant *Staphylococcus* species, both in isolated cases and in nosocomial outbreaks.

Since 2008, we have regularly identified linezolid-resistant strains of *S. epidermidis* (LRSE) with different patterns of resistance in clinical samples. The aim of the present study was to analyze the evolution of LRSE, studying the clinical characteristics in ICU patients on which LRSE was isolated, both as colonization or in infection. Lastly, we characterized resistance mechanism of linezolid. . We found a high prevalence of the *cfi* gene in our clinical *S. epidermidis* isolates. The potential transmissibility of this agent, even without prior exposure to linezolid, can have serious epidemiological repercussions.

The prevalence of the *cfi* gene in our strains reached 50% alone or in combination with other mechanisms. The mutation G2576T in domain V was found in 22% of strains, and both the *cfi* gene and G2576T in 44%. We also found an association between the *cfi*

gene and mutations in the ribosomal protein L3. All 3 mechanisms co-occurred in 1 strain. MICs in combinations rose to ≥ 256 $\mu\text{g/mL}$.

INTRODUCCIÓN -

III. Introducción

1. Género *Staphylococcus* sp.

1.1 Antecedentes históricos

El término *Staphylococcus* viene de la palabra griega *Staphyle* que significa racimo de uvas y *coccus* que significa granos. Esta denominación se debe a la disposición que adquieren estas bacterias cuando se observan en una tinción de gram formando un patrón que recuerda a un racimo de uvas (Figura 1). Reconocidos por primera vez por Koch en 1878, fue Alexander Ogston en 1880 quien les otorgó esta denominación y el que demostró su presencia en numerosas infecciones piogénicas. Rosenbach en 1884, fue probablemente la primera persona que creció el estafilococo en cultivo puro y que estudio sus características en el laboratorio [1].

El Género *Staphylococcus* pertenece al Phylum Firmicutes del Dominio Bacteria; Clase Bacilli; Orden Bacillales; y Familia Staphylococcaceae.

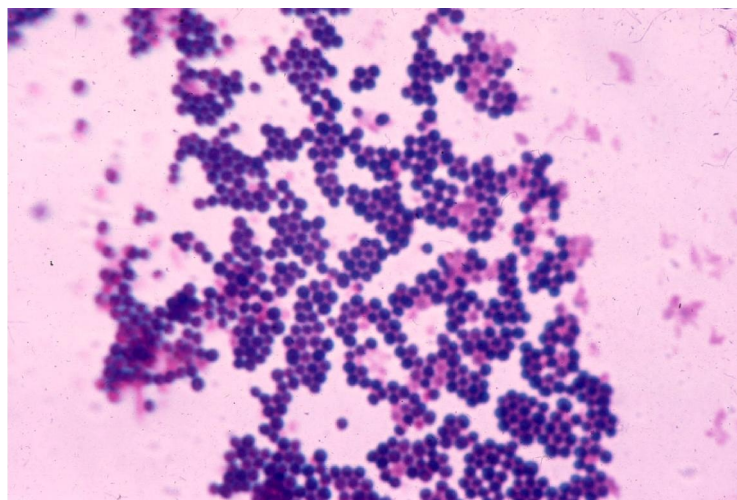


Figura 1. Imagen de *Staphylococcus aureus* en tinción de Gram

1.2 Características microbiológicas

El género *Staphylococcus* está constituido por cocos gram positivos. El nombre del género hace referencia a que estos cocos se agrupan en racimos o tétradas, sin embargo en muestra clínicas aparecen como células aisladas en pares o cadenas cortas. La mayor parte de los *Staphylococcus* tienen un diámetro de entre 0,5 y 1 μm (Figura 2) y son aerobios y anaerobios facultativos, inmóviles, son microorganismos con pocos requerimientos nutricionales, resisten la desecación, toleran concentraciones elevadas de sal y crecen en medios de cultivo convencionales. Dan positiva la reacción de la catalasa. En la actualidad el género comprende 40 especies y 24 subespecies, son colonizadores ubicuos de la piel y mucosas de casi todos los animales, incluyendo mamíferos y aves. Los estafilococos conforman un importante grupo de patógenos en el hombre y originan un amplio espectro de enfermedades sistémicas, infecciones de la piel, tejidos blandos, huesos y el aparato genitourinario e infecciones oportunistas. *Staphylococcus aureus* tiene la capacidad de coagular el plasma, es la principal característica que le diferencia del resto de las especies que se conocen comúnmente como estafilococos coagulasa negativos y por ello esta característica se utiliza como prueba diagnóstica en los laboratorios de microbiología clínica. *S. aureus* coloniza las narinas anteriores, es el más importante en patología infecciosa humana, es el miembro más virulento y más conocido del género. En medios con sangre las colonias de *S. aureus* presentan una consistencia cremosa, se pigmentan de amarillo o dorado y se rodean de un halo de β -hemólisis o hemólisis completa (Figura 3).

Los estafilococos coagulasa negativos (SNC) son una parte importante de la flora normal de la piel humana, *S. capitis* crece en regiones con glándulas sebáceas como la frente, *S. hominis* y *S. haemolyticus* se hallan en zonas con glándulas apocrinas (axilas). *S. epidermidis*, es un colonizador común de las axilas, la cabeza y las fosas nasales. La colonización con *S. epidermidis* puede jugar un papel importante para el mantenimiento de una flora habitual de la piel, por la competencia con microorganismos potencialmente patógenos, como *S. aureus*. Actualmente, *S. epidermidis* está siendo reconocido como un importante patógeno oportunista que puede causar infecciones graves.

Dentro de los SCN las especies que se asocian con mayor frecuencia a enfermedad en el ser humano son *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus lugdunensis* y *Staphylococcus saprophyticus* [2,3].

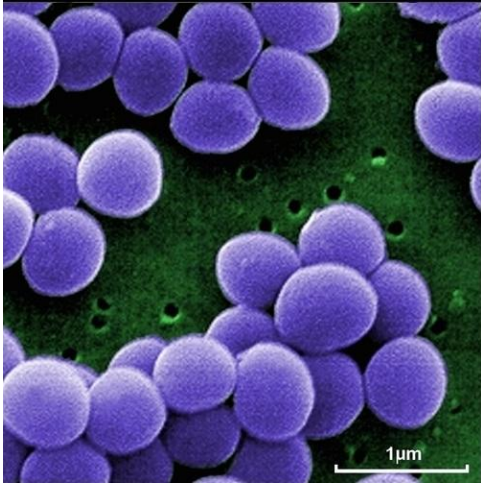


Figura 2. Tamaño de *S. aureus* en microscopía electrónica



Figura 3. Cultivo de *S. aureus* en agar sangre

2. *Staphylococcus aureus*

2.1 Fisiología y estructura

S. aureus es el patógeno más importante del género *Staphylococcus sp.* Desde el punto de vista estructural, *S. aureus* comparte las características de los microorganismos gram positivos, agregando características distintivas de su especie.

2.1.1 Pared celular

La pared celular de los estafilococos tiene la estructura general de un coco gram positivo, formada principalmente por el peptidoglicano y los ácidos teicoicos (Figura 4).

2.1.2 Cápsula y capa de polisacárido

La capa más externa de la pared celular de los estafilococos se puede recubrir de una cápsula de polisacárido. Más del 90% de los aislados de *S.aureus* producen cápsulas polisacáridas. Se han identificado hasta 11 serotipos capsulares de *S.aureus*. Los serotipos 5 y 7 son responsables de la mayor parte de las infecciones humanas, esta cápsula protege a las bacterias ya que inhibe la fagocitosis por los leucocitos polimorfonucleares (PMN).

La mayor parte de los estafilococos producen una biopelícula hidrosoluble laxa formada por monosacáridos, proteínas y pequeños péptidos en una cantidad que depende de factores genéticos y de las condiciones de crecimiento. Esta sustancia extracelular une las bacterias a tejidos y cuerpos extraños, como catéteres, injertos, prótesis valvulares y articulares y derivaciones. Esta propiedad es muy importante para la supervivencia de los SCN que son relativamente avirulentos [4].

2.1.3 Peptidoglucano y enzimas asociadas

El peptidoglucano representa la mitad de la pared celular en peso, característica que comparten todas las bacterias grampositivas. El peptidoglucano está formado por capas de cadenas de glucanos (10-12 subunidades alternantes de N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina). Las cadenas laterales de oligopéptidos están unidas a las subunidades de ácido N-acetilmurámico y se entrecruzan por medio de puentes peptídicos. Esta capa de peptidoglucano se compone de numerosas capas entrecruzadas que le confiere una mayor rigidez a la pared celular. Las enzimas que catalizan la construcción de la capa de peptidoglucano se llaman proteínas ligadoras de penicilina ya que son las dianas para las penicilinas y otros antibióticos β -lactámicos.

El peptidoglucano posee una actividad de tipo endotoxina, ya que estimula la producción de pirógenos endógenos, la activación del complemento, la formación de interleucina-1 por parte de los monocitos y la agregación de los leucocitos PMN (un proceso que origina la formación de abscesos) [3,4]

2.1.4 Ácidos teicoicos

Los ácidos teicoicos constituyen otro destacado componente de la pared celular, en la que representan entre un 30% y un 50% de su peso seco. Los ácidos teicoicos son polímeros fosfatados específicos de especie que se unen de manera covalente a residuos de ácido N-acetilmurámico de la capa de peptidoglucano o a través de una unión lipofílica a la membrana citoplasmática (ácidos lipoteicoicos). Aunque los ácidos teicoicos son poco inmunogénicos, estimulan una respuesta humoral específica cuando se encuentran unidos al peptidoglucano [4].

2.1.5 Proteína A

La superficie de la mayoría de las cepas de *S. aureus* (pero no la de los SCN) está recubierta de la proteína A. Esta proteína se une a la capa de peptidoglucano o a la membrana citoplasmática y tiene afinidad de unión especial el receptor Fc de las inmunoglobulinas IgG₁, IgG₂ e IgG₄.

2.1.6 Coagulasa

En los estafilococos se han identificado numerosas proteínas de superficie. La superficie externa de la mayoría de las cepas de *S. aureus* contiene un factor de agregación (coagulasa ligada). Esta proteína constituye un destacado factor de virulencia en *S. aureus*. Se une al fibrinógeno y lo convierte en fibrina insoluble, lo que hace que los estafilococos se agreguen o formen grupos. La detección de esta proteína constituye la prueba de identificación principal de *S. aureus*.

2.1.7 Membrana citoplasmática

La membrana citoplasmática se compone de un complejo de proteínas, lípidos y una pequeña cantidad de carbohidratos. Actúa de barrera osmótica para la célula y proporciona una sujeción para la biosíntesis celular y las enzimas respiratorias.

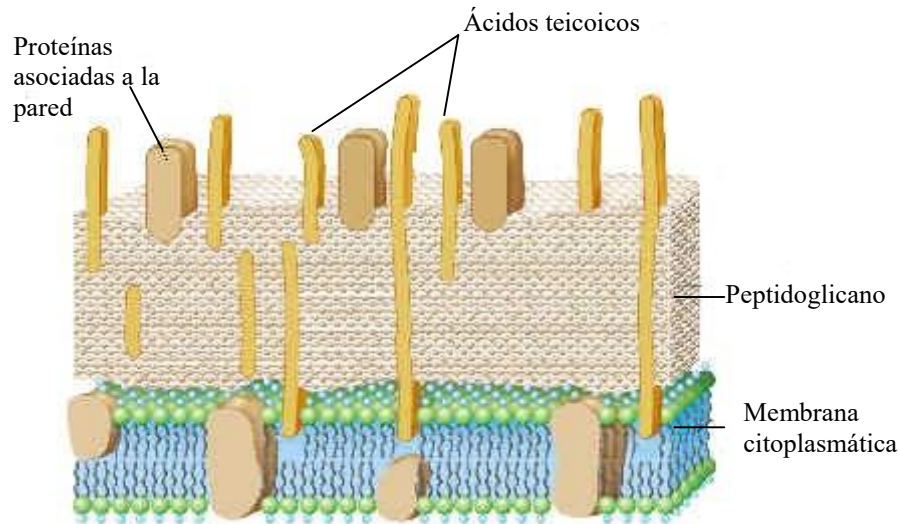


Figura 4. Estructura de la pared celular de *Staphylococcus sp.*

2.2 Mecanismos de patogenicidad

En su patogenia intervienen, además de su capacidad para diseminarse y multiplicarse en los tejidos del hospedador, algunos elementos de su pared celular y su capacidad de sintetizar numerosas enzimas y toxinas (Figura 5).

2.2.1 Defensas contra la inmunidad innata

Los estafilococos encapsulados se ligan a las opsoninas (IgG, factor C3 del complemento) en el suero no inmune normal, pero la cápsula cubre estas opsoninas y protege a las bacterias al inhibir la fagocitosis de los gérmenes por parte de los leucocitos polimorfonucleares (PMN). En presencia de anticuerpos específicos frente a los estafilococos, el exceso de C3 se liga a las bacterias, lo que permite su fagocitosis. La capa de polisacáridos extracelulares también interfiere con la fagocitosis de las bacterias. La capacidad de la proteína A de ligarse a las inmunoglobulinas evita de forma eficaz la eliminación inmunitaria mediada por anticuerpos de *S. aureus*. La proteína A extracelular puede también unirse a los anticuerpos, formando inmunocomplejos con el consiguiente consumo del complemento [4].

2.2.2 Proteínas de adhesión

El ácido teicoico y las proteínas de superficie resultan importantes para la adherencia a las proteínas de la matriz del huésped ligadas a sus tejidos por ejemplo, fibronectina, fibrinógeno, elastina y colágeno). Estas proteínas de adhesión a la superficie se unen de forma covalente con los peptidoglucanos de la pared celular en los estafilococos y se han llamado proteínas MSCRAMM (moléculas de la matriz adhesivas que reconocen a los componentes de la superficie microbiana) [4].

2.2.3 Enzimas

- Catalasa: hidroliza el peróxido de hidrógeno, tóxico para el microorganismo, en agua y oxígeno.
- Coagulasa: las cepas de *S. aureus* poseen dos tipos de coagulasa, la coagulasa ligada o factor de agregación y la coagulasa libre o extracelular, ambas tienen el mismo efecto: convertir el fibrinógeno en fibrina.
- Hialuronidasa: hidroliza el ácido hialurónico, es un factor de diseminación.
- Penicilinasas: producidas en la actualidad por casi todas las cepas de *S. aureus*, inactiva la penicilina mediante hidrólisis de su anillo β -lactámico.
- Lipasa: hidroliza los lípidos y garantizan la supervivencia de los estafilococos en las regiones sebáceas del organismo. Lo producen todas las cepas de *S. aureus* y más del 30% de todas las cepas de SCN.
- Nucleasa termoestable: puede hidrolizar el ADN viscoso.
- Fibrinolisisina o estafilocinasas: puede disolver los coágulos de fibrina [2,5].

2.2.4 Toxinas

S. aureus produce un gran número de toxinas, entre las que figuran cinco toxinas citolíticas que dañan la membrana (alfa, beta, delta, gamma y leucocidina de Pantone-Valentine [PVL]), dos toxinas exfoliativas (A y B), ocho enterotoxinas (A a E y G a I) y la toxina-1 del síndrome del shock tóxico (TSST-1). Las toxinas citolíticas se han descrito también como hemolisinas, pero no es una denominación correcta puesto que

las actividades de las cuatro primeras no se restringen únicamente a los eritrocitos y la PVL es incapaz de lisar estas células.

Citotoxinas

- Toxina α , puede estar codificada en el cromosoma bacteriano o en un plásmido. La toxina α altera el músculo liso de los vasos sanguíneos y es tóxica para muchas células, como eritrocitos, leucocitos, hepatocitos y plaquetas. Se cree que es un mediador importante del daño tisular en la enfermedad estafilocócica.
- Toxina β , conocida también como esfingomielinasa C. Presenta especificidad para la esfingomielina y la lisofosfatidilcolina, y es tóxica para diversas células, entre las que se encuentran eritrocitos, fibroblastos, leucocitos y los macrófagos.
- Toxina δ , tiene un amplio espectro de actividad citolítica, afecta a los eritrocitos, muchas otras células de los mamíferos y las estructuras de las membranas intracelulares. La toxina actúa como un surfactante que altera las membranas celulares mediante una acción de tipo detergente [4].
- Toxina γ , puede lisar neutrófilos y macrófagos [4].
- Leucocidina de Panton-Valentine (PVL). Sintetizada solo por el 2-3% de las cepas de *S. aureus* resistente a meticilina (SAMR) asociadas a las infecciones comunitarias. Es leucotóxica, pero carece de actividad hemolítica. Las cepas productoras de PVL parecen estar relacionadas con un pequeño grupo de infecciones cutáneas relacionadas con SAMR adquiridos en la comunidad sobre todo en adultos jóvenes y niños. Está codificada por un fago móvil que puede transferir la toxina a otras cepas. La lisis provocada por estas toxinas está mediada por la formación de poros con aumento de la permeabilidad a los cationes y la inestabilidad osmótica [6].

Toxinas exfoliativas

El síndrome de la piel escaldada por estafilococos (SPEE), un espectro de enfermedades que se caracteriza por dermatitis exfoliativa, esta mediado por toxinas exfoliativas. La prevalencia de producción de la toxina en cepas de *S. aureus* varía en función de la distribución geográfica, pero generalmente se

encuentra entre menos de un 5% y un 10%. Se han identificado dos formas distintas de toxina exfoliativa ETA y ETB. ETA es termoestable y está codificada por un gen cromosómico, mientras que ETB es termolábil y mediada por un plásmido. Las toxinas son proteasas de serina que rompen la desmogleína 1, un miembro de la familia de las estructuras de la adhesión celular (desmosomas) responsables de formar los puentes intracelulares en el estrato granuloso de la epidermis. Las toxinas no se asocian a procesos de citólisis ni inflamación, por lo que en la capa de la epidermis afectada no hay ni estafilococos ni leucocitos. El desarrollo de anticuerpos neuralizantes protectores lleva a la resolución del proceso tóxico. El SPEE se observa fundamentalmente en niños pequeños, y rara vez se describe en niños mayores o adultos [4,7].

Enterotoxinas

La enterotoxina A es la que con más frecuencia se asocia a las intoxicaciones alimentarias. Las enterotoxinas C y D se encuentran en los productos lácteos contaminados, y la enterotoxina B produce colitis pseudomembranosa estafilocócica. Las enterotoxinas tienen un diseño perfecto para provocar las enfermedades de origen alimentario, ya que son estables a 100°C durante 30 minutos y resisten la hidrólisis por enzimas gástricas. Se reducen en un 30-50% de las cepas de *S. aureus*, son superantígenos capaces de inducir la activación inespecífica de los linfocitos T y la liberación de citocinas [4,8].

Toxina-1 del síndrome del shock tóxico

La TSST-1 es una exotoxina termoestable y resistente a la proteólisis codificada por un gen cromosómico. Es un superantígeno que estimula la liberación de citocinas y provoca extravasación de células endoteliales, mientras que a altas concentraciones tiene efecto citotóxico en las células. La capacidad de TSST-1 para atravesar las barreras mucosas, incluso cuando la infección está localizada en la vagina o la herida, provoca los efectos sistémicos del STT (síndrome del shock tóxico). La muerte de las pacientes con STT se produce como consecuencia de un shock hipovolémico que origina insuficiencia multiórganica. Aproximadamente el 90% de

las cepas de *S. aureus* causantes del síndrome del shock tóxico asociado a la menstruación producen TSST [4,7].

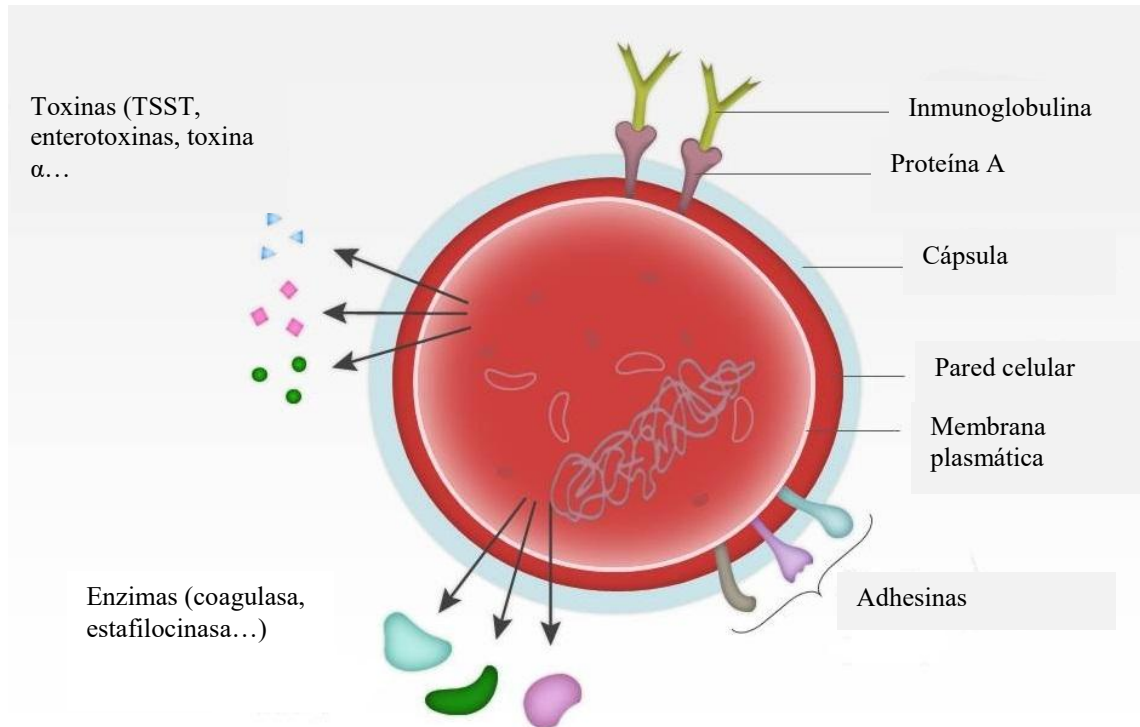


Figura 5. Factores de patogenicidad de *S. aureus*

2.3 Epidemiología

Los estafilococos son ubicuos, todas las personas portan SCN en la piel, y es frecuente la colonización transitoria de los pliegues cutáneos húmedos con *S. aureus*. En neonatos es frecuente la colonización del ombligo, piel y región perianal con *S. aureus*. Aproximadamente el 30% de los adultos sanos es portador de *S. aureus* en nasofaringe, aunque existe una incidencia más elevada en pacientes hospitalizados, personal sanitario, y sujetos aquejados de enfermedades eccematosas de la piel. La diseminación de bacterias es frecuente y la responsable de muchas infecciones adquiridas en el hospital como consecuencia de la presencia de los estafilococos en la piel y en la nasofaringe. Pueden sobrevivir en superficies secas durante periodos de tiempo prolongados y se pueden transferir a una persona vulnerable por contacto directo o a

través de fómites. Desde los años 80 las cepas de SAMR se han extendido con rapidez entre los pacientes hospitalizados susceptibles. Estas cepas eran infrecuentes a nivel comunitario, sin embargo en 2003 se describió la aparición de unas nuevas cepas de SAMR responsables de brotes de infecciones cutáneas adquiridas en la comunidad y neumonías graves. Es interesante destacar que estas cepas no se relacionaban con las cepas que circulaban en los hospitales y que las cepas aisladas en cada país eran únicas a nivel genético, aunque comparten algunos rasgos comunes como el cassette *SCCmec* de tipo IV, la toxina de PVL y una sensibilidad mayor al resto de los antibióticos con excepción de los β -lactámicos [4].

2.4 Enfermedades causadas por *Staphylococcus aureus*

Desde su descubrimiento en 1880, el *S. aureus* ha emergido como un patógeno potencial capaz de causar distintas enfermedades.

La mayoría de las enfermedades producidas por *S. aureus* son endógenas, ya que las fosas nasales son el principal reservorio del microorganismo, desde el que fácilmente alcanza la piel. La prevalencia de colonización en el adulto sano es del 20-40%, puede serlo de manera prolongada o intermitente.

El *S.aureus* puede causar infecciones leves como la foliculitis, o furúnculos e infecciones graves que pueden poner en peligro la vida del paciente [9].

2.4.1 Infecciones cutáneas

Impétigo

El impétigo es una infección superficial que afecta sobre todo a niños pequeños, se produce fundamentalmente en la cara y las extremidades. Inicialmente se observa una pequeña mancha roja aplanada, y luego se desarrolla una pústula (vesícula llena de pus) sobre una base eritematosa. Es frecuente la existencia de múltiples vesículas. Los estreptococos del grupo A también pueden ser agentes causales del impétigo de manera independiente o en combinación con *S. aureus* [3,4].

Foliculitis

La foliculitis es una infección piógena que afecta a los folículos pilosos. La base del folículo está elevada y enrojecida, con una pequeña acumulación de pus bajo la superficie de la epidermis. Los forúnculos son una extensión de la foliculitis, son nódulos elevados, dolorosos y grandes por debajo de los cuales se acumula el tejido necrótico. El carbunco aparece cuando los forúnculos coalescen y se extienden al tejido subcutáneo. Se produce una extensión sistémica a otros tejidos a través de una bacteriemia estafilocócica [3,4].

Infecciones de herida

Las infecciones de herida por *S. aureus* pueden tener lugar con posterioridad a una intervención quirúrgica o a un traumatismo como consecuencia de la introducción en la herida de estos microorganismos. Se caracterizan por la presencia de edema, eritema, dolor y acumulación de material purulento [3,4].

2.4.2 Bacteriemia y endocarditis

S. aureus es una causa frecuente de bacteriemia. En las bacteriemias producidas por la mayor parte de los microorganismos encontramos su origen en un foco identificable (infección pulmonar, del aparato genitourinario, del aparato digestivo, etc) sin embargo en *S. aureus* no se conocen los focos de infección en aproximadamente un tercio de los pacientes. La hipótesis más aceptada es que la infección se extienda a sangre a partir de una infección cutánea de aspecto inocuo. Más del 50% de los casos de bacteriemia por *S. aureus* se adquieren en el hospital después de una intervención quirúrgica, o como consecuencia del uso continuado de un catéter intravascular contaminado. Las bacteriemias por *S. aureus*, y en especial los episodios prolongados, se asocian a la diseminación a otras partes del organismo como el corazón.

La endocarditis aguda producida por *S.aureus* constituye una enfermedad grave con una tasa de mortalidad de aproximadamente el 50%. El pronóstico del paciente es desfavorable a no ser que se instaure un tratamiento médico y quirúrgico adecuado de forma inmediata [3,4,9].

2.4.3 Neumonía y empiema

La enfermedad respiratoria por *S. aureus* se puede producir después de la aspiración de secreciones bucales o la diseminación hematógena del microorganismo desde un foco alejado. La neumonía por aspiración se observa fundamentalmente en sujetos muy jóvenes, los ancianos y los pacientes con fibrosis quística, gripe, enfermedad pulmonar obstructiva crónica o bronquiectasias. En el examen radiológico se observan infiltrados parcheados con consolidación o abscesos, los cuales se deben a la capacidad de secreción de toxinas y enzimas citotóxicas y de formar abscesos localizados por parte del microorganismo. La neumonía de diseminación hematógena es frecuente en pacientes con bacteriemia o endocarditis [3,4,9].

El empiema afecta al 10% de los pacientes con neumonía, y *S. aureus* es el agente etiológico en un tercio de los casos. En algunos casos resulta difícil llevar a cabo el drenaje del material purulento debido a que los microorganismos se pueden consolidar en áreas loculadas aisladas.

2.4.4 Osteomielitis y artritis séptica

La osteomielitis por *S. aureus* puede derivar de la diseminación hematógena en el hueso, o puede constituir una infección secundaria como consecuencia de un traumatismo o bien la extensión de una infección desde una zona adyacente.

S. aureus es la principal causa de artritis séptica en niños pequeños y adultos que reciben inyecciones intraarticulares o portadores de articulaciones con anomalías mecánicas. La artritis estafilocócica se caracteriza por una articulación dolorosa y eritematosa de la que se obtiene material purulento por aspiración. La infección aparece en las grandes articulaciones como hombro, rodilla, cadera o codo [4].

2.5 Sensibilidad antibiótica y tratamiento

Una de las características más importantes del *S.aureus* es su capacidad para desarrollar resistencia a antibióticos (Figura 6).

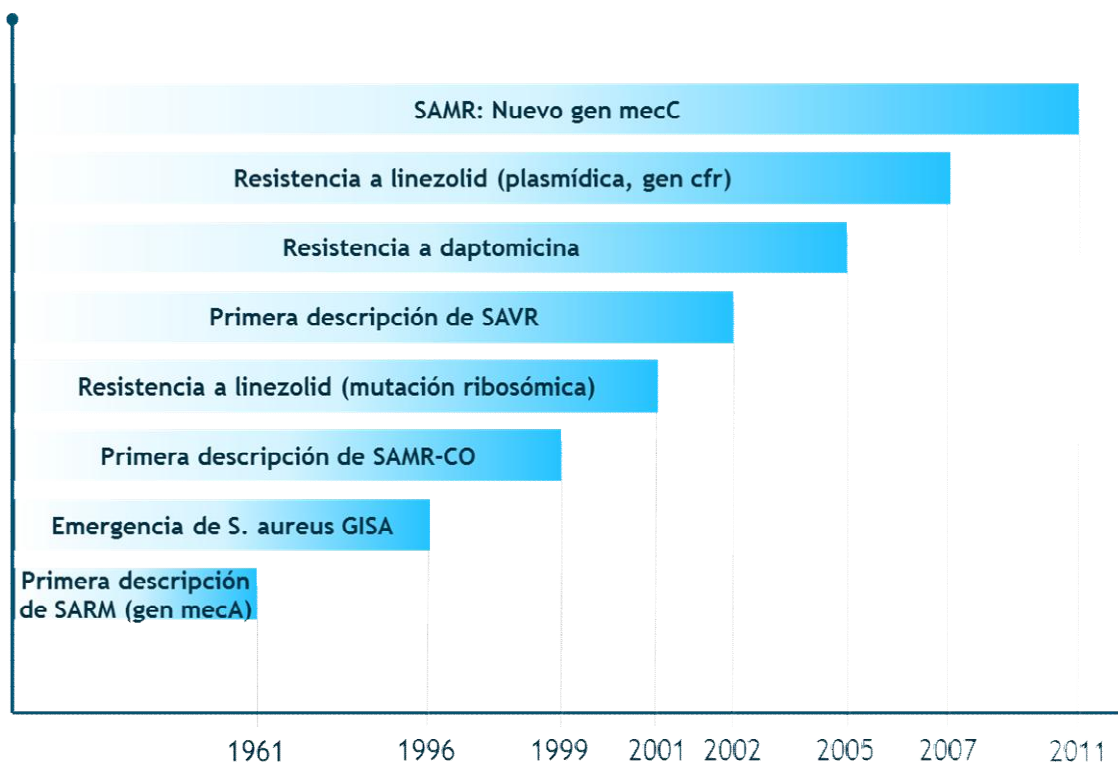


Figura 6. Aparición de la resistencia antibiótica en *S. aureus*

2.5.1 Resistencia a β -lactámicos

Antes de la aparición de la penicilina la tasa de mortalidad de pacientes infectados era del 80 %. A partir del año 1940 comenzaron a tratarse las infecciones de *S. aureus* con este antibiótico pero en solo dos años comenzaron a aparecer cepas resistentes a la penicilina. En la actualidad, más del 90% de las cepas de *S. aureus* son resistentes a penicilina. El mecanismo de resistencia consiste en la adquisición de un plásmido que codifica una penicilinasasa. En 1959 se introdujeron en la práctica clínica la meticilina y otras penicilinas semisintéticas (cloxacilina, oxacilina o nafcilina) resistentes a la acción de las β -lactamasas estafilocócicas. De nuevo en solo dos años se describe la primera cepa resistente a este antibiótico, en este caso por adquisición del elemento genético

móvil *SCCmec* (Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*) que contiene el gen *mecA* responsable de la resistencia a meticilina. Este gen codifica la proteína de unión a penicilina PBP2a. Los antibióticos se unen a las PBPs de la pared celular interrumpiendo la síntesis de peptidoglicano y causando la muerte de la bacteria. Pero los β -lactámicos no pueden unirse a la PBP2a por lo que la síntesis de la pared bacteriana puede continuar. Por lo tanto, los estafilococos portadores del gen *mecA* y de su proteína PBP2a deben considerarse resistentes a todos los antibióticos β -lactámicos sin excepción [10]. Los elementos genéticos *SCCmec* son muy diversos en su organización estructural y contenido genético, y se han clasificado en tipos y subtipos de tipo I a tipo XI. Los tipos I, IV y V portan exclusivamente resistencia a beta-lactámicos mientras que los tipos II y III determinan multirresistencia ya que contienen genes adicionales de resistencia a drogas en plásmidos y transposones integrados en el cassette [11].

S. aureus resistente a meticilina (SAMR) es uno de los principales patógenos implicados en la infección nosocomial, responsable de una amplia variedad de síndromes potencialmente mortales, como bacteriemia, endocarditis, infecciones de la herida quirúrgica y neumonía. Los primeros brotes de infección por esta bacteria resistente en hospitales españoles se describieron a finales de los años 80 y en muchos de los grandes hospitales se ha convertido en endémica. El porcentaje de SAMR entre el total de los *S. aureus* aislados de muestras clínicas de pacientes hospitalizados pasó del 1,5% en 1986 hasta el 17,9% en 1996 [12]. Además, un alto porcentaje de los SAMR presenta también resistencia asociada a otros grupos de antibióticos como macrólidos, quinolonas, aminoglucósidos, rifampicina o tetraciclinas [13]. Durante muchos años, las infecciones por SARM eran adquiridas en hospitales y otros centros sanitarios; sin embargo, recientemente han aparecido nuevas cepas de SAMR de origen comunitario, causando infecciones en pacientes sin contacto previo con el medio hospitalario. Además, el SARM también se ha aislado en los animales, en particular en el ganado. Las cepas de SAMR asociadas principalmente al ganado (LA-SAMR, livestock-associated) pertenecen al ST398 (ST representa el tipo de secuencia), un clon asociado al cerdo que también se ha encontrado en terneros, aves de corral y en humanos. En general, las cepas de SAMR, relacionadas con la asistencia sanitaria, contienen *SCCmec* del I-IV, el tipo IV también aparece en SAMR adquirido en la comunidad, así como el tipo VII. El tipo V se encuentra también en LA-SAMR ST398. Recientemente ha sido

descrito en cepas de SAMR, aislados en ganado y en el hombre el nuevo SCC*mec* XI, que contiene una nueva variante del gen *mecA*, el *mecA* LGA251, al cual se le ha asignado el nombre de *mecC* [Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome (SCC) Elements]. El LA-SAMR que lleva el nuevo gen *mecC* fue descrito por primera vez en Reino Unido y Dinamarca, aislado en ganado y en muy pocas ocasiones como causa de infecciones en el hombre. En España se describió en 2013 la presencia de aislados de SAMR aislados en humanos y que contienen el gen *mecC* [14]. Además del elemento SCC*mec* *S. aureus* puede llevar genes de resistencia integrados en otros sitios de su cromosoma y en plásmidos.

2.5.2 Resistencia a glicopéptidos

Los glicopéptidos son antibióticos frecuentemente utilizados para el tratamiento de infecciones por *S. aureus* concretamente por SAMR. Hasta hace algunos años, los aislados de *S. aureus* eran uniformemente sensibles a la vancomicina y la teicoplanina sin embargo, en 1997 se publicó en Japón un caso de fracaso terapéutico con vancomicina en un paciente infectado con un SAMR con una CIM de 8 mg/l [15], posteriormente se comunicaron otros casos similares en diferentes países. Todos los pacientes tenían en común haber recibido un tratamiento prolongado con vancomicina que no fue efectivo en el curso del cual se aislaron cepas SAMR con sensibilidad disminuida a gluco péptidos, expresada de forma heterogénea, con un incremento de la CMI de vancomicina de hasta 4-8 mg/l. Se han descrito dos tipos de expresión de la resistencia a los gluco péptidos: la expresión homogénea (CMI de vancomicina 8-16mg/L) y la expresión heterogénea (CMI de 1-4mg/L). Las cepas con expresión heterogénea son más frecuentes, se conocen con el nombre de *S. aureus* con resistencia intermedia a vancomicina (VISA) o a gluco péptidos (GISA). Esta resistencia es debida a una serie de factores; el engrosamiento pared celular que previene la difusión de vancomicina, hiperexpresión de de PBP2 y PBP2a, aumento de la producción de muropéptidos anormales, reducción de la expresión de PBP4, aumento en los niveles de D-Ala-D-Ala, reducción del entrecruzamiento del péptidoglicano, reducción de la actividad autolítica, lento crecimiento. En estas cepas no se han detectado los genes de resistencia *vanA*, *vanB* o *vanC*, responsables de la resistencia a gluco péptidos de alto nivel observada en los enterococos. La detección de estas cepas con sensibilidad

disminuida a los glucopéptidos es difícil con los métodos tradicionales de difusión en agar, por lo que se requiere tanto la utilización de métodos cuantitativos como la elaboración de estudios poblacionales para detectar las subpoblaciones de colonias SAMR con esta característica [16,17,18]. Posteriormente se publicó en EEUU dos casos de infección por cepas SAMR con auténtica resistencia a la vancomicina (VRSA). Ambas cepas eran portadoras del gen *vanA*. En uno de los casos pudo demostrarse que el gen *vanA* provenía de una cepa de enterococo resistente a la vancomicina que coinfectaba al paciente [19]. Las cepas VISA se generan a partir de VSSA por múltiples mutaciones espontáneas, por adquisición secuencial de mutaciones en sistemas regulatorios, mutaciones en reguladores que alteran la expresión de más de 100 genes involucrados en la síntesis de pared celular, procesos celulares y metabolismo [20].

Se han descrito casos de resistencia a daptomicina dado que el mecanismo de acción de la daptomicina es único, en principio no existe resistencia cruzada entre éste y otros antimicrobianos [21]. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que cepas de *S. aureus* con sensibilidad reducida a la vancomicina (CMI de 4-16 mg/L) también presentan sensibilidad reducida a la daptomicina. No obstante, la resistencia a vancomicina mediada por *vanA* no afecta a la sensibilidad de la daptomicina [22].

2.5.3 Resistencia a linezolid

Mutaciones ribosómicas

En el año 2000 se aprobó linezolid, un antibiótico de la familia de las oxazolidinonas completamente sintético y bacteriostático. Linezolid se une al sitio A (aminoacil) de la subunidad 50S del ribosoma, próximo al centro catalítico. Inhibe la iniciación de la síntesis de proteínas de la bacteria mediante unión al dominio V del ARN ribosomal (ARNr) 23S (posiblemente implica competición con otros sustratos que intentan entrar en el sitio A) (Figura 7 y Figura 8).

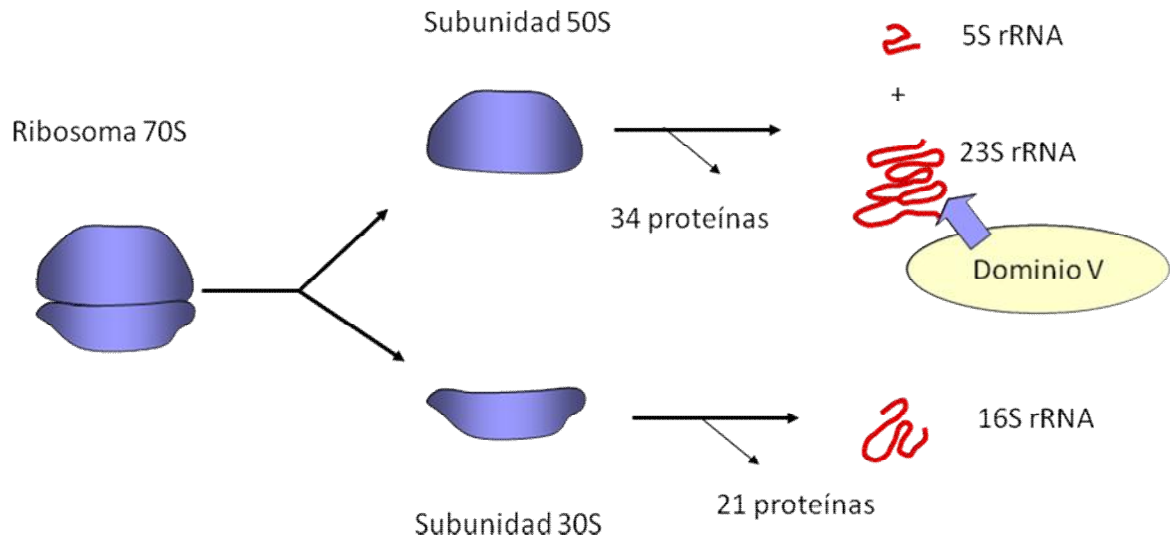


Figura 7. Lugar de acción de linezolid

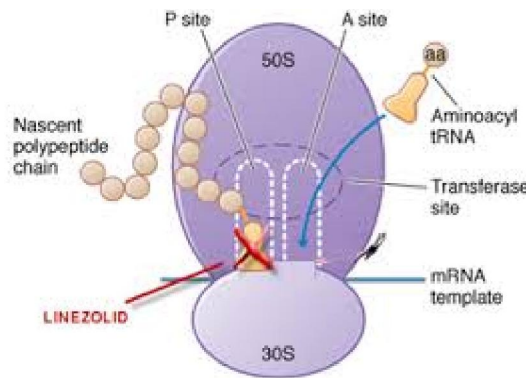


Figura 8. Mecanismo de acción de linezolid

Los primeros aislados de microorganismos gram positivos resistentes a linezolid aparecieron durante los ensayos preclínicos. En el año 2001 se describió la primera resistencia a linezolid [23].

El mecanismo de resistencia a linezolid más común tiene lugar por una mutación en un nucleótido en el sitio de unión del antibiótico (dominio V del ARNr 23S) [24,25,26], siendo la mutación G2576T la más frecuente aunque se han descrito otras como T2500A [27]. Además in vitro se han descrito una gran variedad de mutaciones en el dominio V del ARNr 23S en *S. aureus*, como C2192T, G2447T, A2503G, T2504C, G2505A and G2766T [28]. Estas mutaciones requieren una generación de novo, por lo

que la frecuencia de resistencia es baja además en estafilococos existe una redundancia de los genes de ARNr (5-6 copias en *S. aureus*) y no existe transferencia genética horizontal (Figura 9).

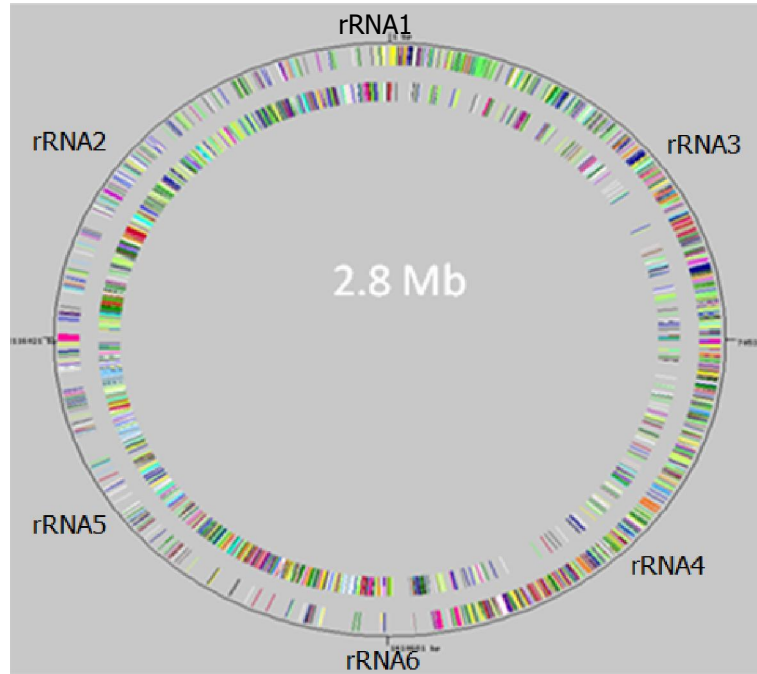


Figura 9. Genes ARNr en *Staphylococcus aureus*

Resistencia a linezolid mediada por el gen *cfr*

Posteriormente fue descrita la resistencia a linezolid por la presencia del gen *cfr*. Fue descrito en el año 2000 en estafilococos aislados en animales *S. sciuri* (cepa bovina), *S. simulans* (cepa bovina), *S. aureus* (cepa porcina) [29]. El gen *cfr* codifica una metiltransferasa que metila un nucleótido específico, A2503, en la diana de unión del linezolid (dominio V del 23S rRNA). Confiere resistencia a fenicoles (cloranfenicol), lincosamidas, oxazolidinonas, pleuromutilinas (retapamulina) y estreptogramina A. Está asociado a elementos genéticos móviles por lo que existe transferencia horizontal. Da lugar a un fenotipo de multirresistencia [30,31]. En 2010 nuestro grupo publicó el primer brote de *S. aureus* resistentes a linezolid por presencia del gen *cfr*, en la Unidad de Críticos del Hospital Clínico San Carlos [32]. El mismo año, se publicó la aparición de aislados de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Enterococcus faecium*, y *Enterococcus faecalis* resistentes a linezolid, algunas de las cuales presentaban resistencia a linezolid por la

presencia única del gen *cfr*, por mutaciones del 23S ARNr o por mutaciones en 23S ARNr en combinación con el gen *cfr* [33].

Mutaciones en las proteínas ribosomales

Además de los dos mecanismos descritos, existe también una mutación en las proteínas ribosomales L3 y L4 las cuales también están relacionadas con una disminución de la sensibilidad de *Staphylococcus sp.* a las oxazolidinonas. Ambas son proteínas estructurales (Figura 10). La combinación de dos o más mecanismos en una cepa de *Staphylococcus sp* produce una elevación notable de la CMI a linezolid. Se ha observado una elevación de la CMI a de linezolid en especies de *S. epidermidis* portadoras del gen *cfr* como consecuencia de la asociación con mutaciones en la proteína ribosomal L3 [34]. Posteriormente se describió el mismo fenómeno en cepas de SALR, procedentes del brote que tuvo lugar en nuestro hospital, encontrando la asociación del gen *cfr* con una mutación en L3 Δ Ser145/His146Tyr en varias cepas con CMI de 32 μ g/ml y encontrando además una cepa con *cfr* y la delección en L3 Δ Met169-Gly174 que le confería al aislado una CMI de 64 μ g/m [35].

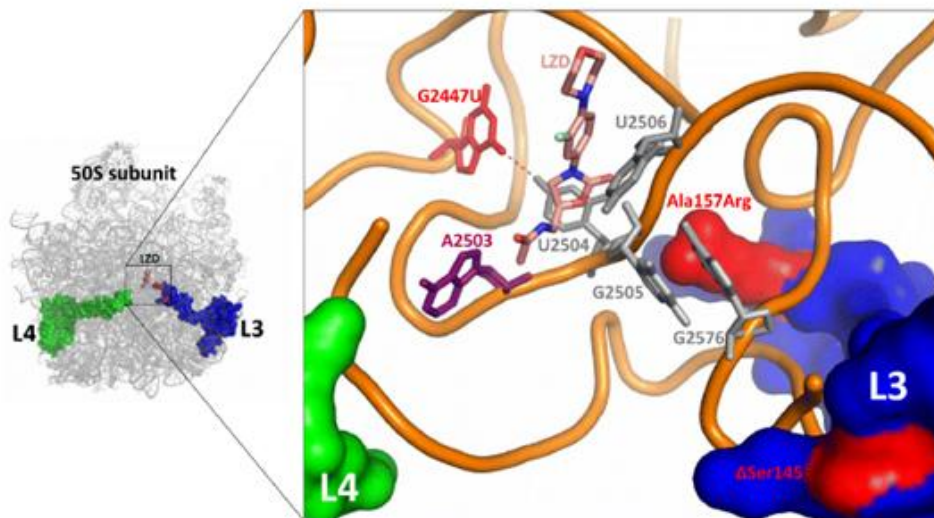


Figura 10. Proteínas ribosomales L3 y L4

3. *Staphylococcus epidermidis*

3.1 Importancia clínica

S. epidermidis es el miembro más importante y más estudiado de los estafilococos coagulasa-negativos y del que más conocimientos se tienen en la actualidad en cuanto a mecanismos moleculares de virulencia. Es uno de los colonizadores más abundantes de la piel humana, durante mucho tiempo fue considerado como inocuo, pero en la actualidad se reconoce como un patógeno oportunista importante ya que se ha identificado como la causa más frecuente de las infecciones relacionadas con dispositivos como catéteres, prótesis, etc, cada vez más empleados en el ámbito hospitalario y en especial en pacientes de unidades de críticos. La definición de factores de virulencia es amplia, ya que comprende los genes y proteínas que facilitan la infección y la persistencia en el cuerpo humano, pero la mayoría de estos factores también tienen un papel importante en la vida comensal de *S. epidermidis* como un microorganismo inofensivo de la piel humana y no pueden por tanto ser considerados como "factores de virulencia" en sentido estricto [36].

3.2 Mecanismos de patogenicidad de *S. epidermidis*

3.2.1 Biopelícula

Implicada en la colonización y persistencia del microorganismo en catéteres y biomateriales. Se cree que la colonización se realiza en dos pasos, comenzando con la adherencia inespecífica de cada célula a los materiales y continuando con el crecimiento y la formación de la biopelícula (Figura 11). *S. epidermidis*, al igual que muchos otros SNC, es un excelente formador de biopelículas, y la mayoría de las infecciones por *S. epidermidis* están relacionadas con la formación de las mismas. Las biopelículas son aglomeraciones de bacterias que están incrustados en una matriz extracelular y proporcionar protección frente a los antibióticos y los mecanismos de defensa del

huésped. Para la mayoría de los antibióticos, los valores de CMI frente a las bacterias en biofilms son más altos [36,37].

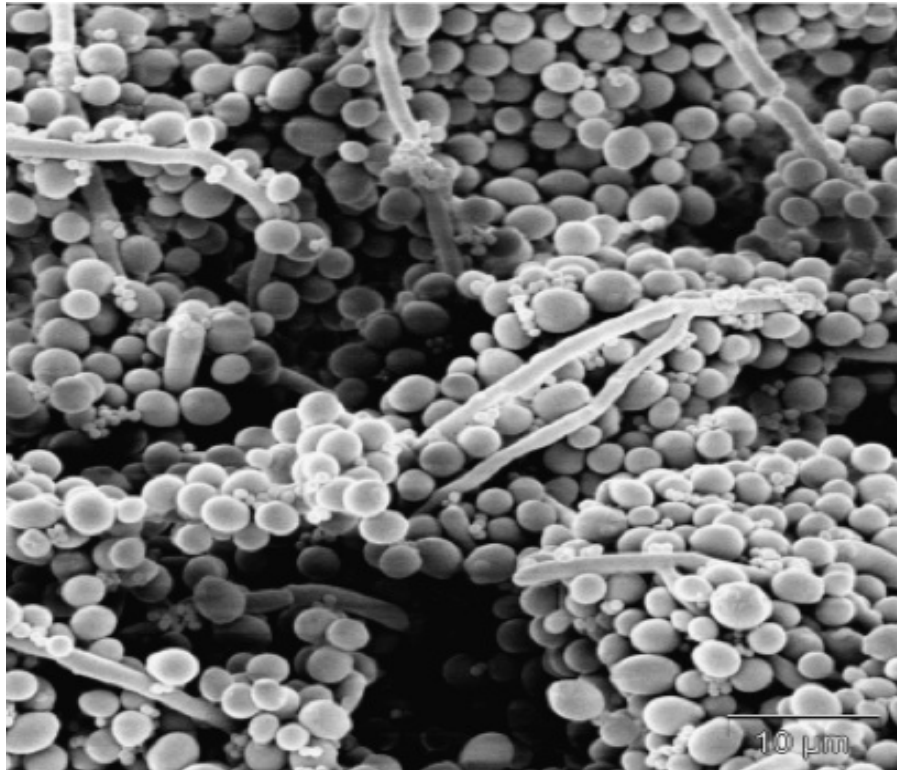


Figura 11. Biopelícula observada por microscopía electrónica

3.2.2 Exopolisacárido PIA

S. epidermidis produce también una serie de moléculas que proporcionan protección frente a las defensas del huésped como las proteínas y exopolímeros, tales como el exopolisacárido PIA, contribuyen a la formación de biopelículas e inhiben la fagocitosis [36].

3.2.3 Modulinas solubles en fenol

Investigaciones recientes han identificado una familia de péptidos pro-inflamatorios presentes en *S. epidermidis*, conocidas como modulinas solubles en fenol (phenol soluble modulins PSMs), que tienen además actividad lítica frente a leucocitos y

eritrocitos y están implicadas en la formación del biofilm. Sin embargo, en *S.epidermidis* la producción de PSMs más agresivos se mantienen a un bajo nivel debido al equilibrio que mantiene con el huésped. Curiosamente, a diferencia de *S. aureus*, que produce gran cantidad de toxinas dirigidas a producir infección en el hombre, la mayoría, si no todos los "factores de virulencia de *S. epidermidis*" parecen tener funciones originales en el estilo de vida comensal de esta bacteria [36,38].

3.2.4 Ácidos teicoicos

Los ácidos teicoicos ya descritos con anterioridad, tienen múltiples funciones en la fisiología del estafilococo y en su patogénesis, contribuyendo a la adhesión, la colonización de la bacteria. Además estudios recientes, muestran su implicación en la formación de la biopelícula [36].

3.2.5 Poli- γ -glutámico (PGA)

El poli- γ -glutámico (PGA) es un homopolímero lineal de residuos de ácido glutámico que ligados a través del grupo γ -carboxi de ácido glutámico. Por lo tanto, el PGA se encuentra en muchos microorganismos, en particular en las bacterias halófilas, donde se supone que juega un papel osmoprotector . Hasta su descubrimiento en *S. epidermidis* en 2005, el *Bacillus anthracis* era el único organismo patógeno en el que se atribuyó al PGA un papel en la evasión del sistema inmune, es decir, en la protección de la fagocitosis.

El PGA de *S. epidermidis* se muestra para protegerlo de la AMP (péptidos antimicrobianos), mientras que el PIA y los ácidos teicoicos presentan al menos una parte de su papel en la protección de las defensas del huésped a través de su contribución a la formación de biopelículas, la PGA no tenía un papel perceptible en la formación de biopelículas [36,37].

3.2.6 Toxinas

S. epidermidis es una especie bacteriana que se describe comúnmente como relativamente inocua, esto es debido en parte a la idea de que es una bacteria no productora de toxinas, en marcado contraste con *S. aureus*, cuya virulencia se basa en la amplia variedad de toxinas que produce. Se ha descrito la presencia esporádica de la toxina del síndrome de shock tóxico (TSST) y enterotoxinas en SNC, incluido *S. epidermidis*. Recientemente la idea de que *S. epidermidis* y otras especies de SCN son bacterias libres de toxinas se ha puesto en debate tras la caracterización de las PSMs, una familia de péptidos codificados en el genoma de carácter citolítico. El término de modulinas solubles en fenol fue acuñado por el grupo de S. Klebanoff en 1999, describieron un complejo peptídico con una gran actividad proinflamatoria, obtenidas a partir de una extracción con fenol caliente, de filtrados de cultivos de *S. epidermidis*. El complejo PSMs está formado por tres componentes principales, la δ -toxina, PSM α y PSM β . Los miembros de la familia de los PSMs muestran distintas características físico-químicas. Se caracterizan porque todos contienen una α -hélice anfipática que confiere propiedades tensioactivas. Es de destacar que todos los PSM están bajo una estricta regulación por *agr*. Recientemente ha sido descrito la PSM-*mec*, fue descubierto en los SCC*mec* de tipo II, III y VIII. Como muchos aislados clínicos de *S. epidermidis* son SEMR y pertenecen a uno de esos tipos SCC*mec*, la producción de PSM-*mec* es frecuente entre las cepas de *S. epidermidis* aisladas de infección. PSM-*mec* contribuye significativamente a la virulencia en cepas de *S. aureus* que muestran una elevada producción de dicho péptido. El papel de PSM-*mec* en la virulencia de *S. epidermidis* aún no ha sido investigado directamente. La capacidad de los PSM de *S. epidermidis* para lisar los neutrófilos y eritrocitos se han analizado recientemente. Al igual que los PSM β de *S. aureus*, los PSM β de *S. epidermidis* no presentan actividad citolítica, lo que indica que la ausencia de esta capacidad pueda ser una característica de las PSM de tipo β . La mayoría de las PSM de tipo α de *S. epidermidis* tienen una baja a moderada actividad citolítica con la notable excepción de PSM δ , que alcanza una capacidad citolítica comparable a la PSM α 3 de *S. aureus* (de gran capacidad citolítica). El descubrimiento de que la PSM δ tiene una gran actividad citolítica de neutrófilos y eritrocitos humanos, es de especial importancia, ya que representa una toxina muy potente, descubierta por primera vez en *S. epidermidis* y se conserva en todos los

miembros conocidos de la especie. Sin embargo, hasta ahora, la producción de PSMδ en *S. epidermidis* se produce a niveles relativamente bajos, hecho que está directamente relacionado con la capacidad de *S. epidermidis* de comportarse como un colonizador y patógeno oportunista. Posiblemente, la baja producción de PSMs citolíticos en *S. epidermidis* está ligada a una menor resistencia a la actividad de los neutrófilos en comparación con *S. aureus* [36,38].

3.2.7 Exoenzimas

S. epidermidis produce enzimas relacionadas con factores de virulencia. *S. epidermidis* producen una serie de proteasas, las cuales pueden contribuir a la virulencia de la bacteria a través de la destrucción del tejido y proteínas del huésped. Estos mecanismos específicos pueden ser atribuidos al gen *SepA*, las cuales degradan los AMPs humanos, y *Esp* que degradan el fibrinógeno y el factor C5 del complemento [36].

3.3 Formación del biofilm y sustancias implicadas

Los mecanismos que subyacen a las funciones de protección de los biofilms son múltiples y pueden ser diferentes para un determinado antibiótico o un mecanismo de defensa concreto del huésped. En primer lugar, la matriz representa una barrera mecánica difícilmente penetrable por las células del sistema inmune. Sin embargo, se ha demostrado, que por ejemplo, los neutrófilos son capaces de penetrar profundamente en las biopelículas bacterianas, probablemente a través de canales libres de matriz que son componentes característicos de la estructura tridimensional del biofilm. Sin embargo, la actividad de los fagocitos es obstaculizada por la formación de biopelículas. Por otra parte, la difusión limitada a través de la matriz extracelular del biofilm contribuye a la tolerancia frente algunos antibióticos. Este es el caso por ejemplo de ciprofloxacino y biopelículas que produce *Pseudomonas aeruginosa*. Sin embargo, algunos antibióticos han demostrado su capacidad de difusión en la matriz del biofilm, como es el caso de la rifampicina, vancomicina o daptomicina. En segundo lugar, en los biofilms las bacterias se encuentran en un estado de latencia, estado en el cual se encuentra disminuida la actividad de muchos procesos celulares, tales como la división celular, la síntesis de

proteínas o la replicación del ADN. Esto dificulta la acción de los antibióticos, como los que actúan inhibiendo la síntesis protéica o la inhibición de la formación de la pared celular. En tercer lugar, las biopelículas pueden comprender un aumento en el número de las llamadas células "persisten", que muestran una mayor tolerancia a los antibióticos. Recientemente, se ha demostrado que biocapas de *S. epidermidis* contienen un número elevado de células "persisten" cuando está expuesta a antibióticos. Por último, los biofilms pueden mostrar un exceso de producción de proteínas o de otros biopolímeros que contribuyen a la resistencia o tolerancia antibiótica [39].

Muchos de los mecanismos de protección de las biopelículas frente a las defensas del huésped, se han analizado en *S. epidermidis*. Los mecanismos de defensa innata del huésped permiten que éste pueda responder rápidamente frente a una infección. La respuesta inmune tiene lugar por el reconocimiento de estructuras fijas en la superficie bacteriana, como peptidoglicano, lipopéptidos, ácidos lipoteicoicos, o incluso algunas moléculas específicas de cada especie, tales como los PSM. La respuesta inmune innata del huésped comprende principalmente la actividad de los fagocitos, péptidos antimicrobianos (AMP), y el sistema del complemento [36,40]

A partir de la década de 1980 se publicaron numerosos trabajos en los que se demostraba que la función del biofilm no era otra sino prevenir la fagocitosis bacteriana. Recientemente se ha observado que estas biopelículas sirven para proteger a la bacteria de los neutrófilos por la inactivación del complemento. Por otra parte, la matriz extracelular disminuye la actividad de los péptidos antimicrobianos (AMP), probablemente para impedir que lleguen a su objetivo principal, la membrana citoplasmática. Con respecto a la asociación de *S. epidermidis* con las superficies plásticas, los estudios de microscopía electrónica sugieren un proceso en tres fases: una etapa inicial de adhesión, la agregación y acumulación intracelular, y la fase de desprendimiento del biofilm (Figura 12). La fase de adhesión inicial puede ocurrir en las superficies de sustancias no biológicas, como la superficie de plástico de catéteres, o en superficies de sustancias biológicas como tejidos humanos. Las células se adhieren a la superficie y forman múltiples capas y se engastan en una matriz exopolisacárida creando una biopelícula. La agregación intracelular tiene lugar mediante una serie de proteínas de la matriz y sustancias poliméricas. En esta fase interviene el polisacárido PIA, también puede estar implicada una proteína extracelular. La biosíntesis de PIA está

codificada por un grupo de genes llamados *ica*. La producción de PIA también capacita a *S. epidermidis* para aglutinar eritrocitos. En investigaciones recientes, se ha destacado la importancia de los tensioactivos en el desprendimiento de la biopelícula. Al igual que en *S. aureus*, *S. epidermidis* produce las llamadas MSCRAMMS (adhesinas de superficie), estas adhesinas juegan un papel importante en la inmovilización celular de *S. epidermidis* al tejido y superficies proteicas, o a los dispositivos plásticos. Esto puede o no, conducir finalmente a la formación de biopelículas, pero en cualquier caso es un paso crucial para la persistencia de *S. epidermidis* en el cuerpo humano durante la colonización y la infección [36,40].

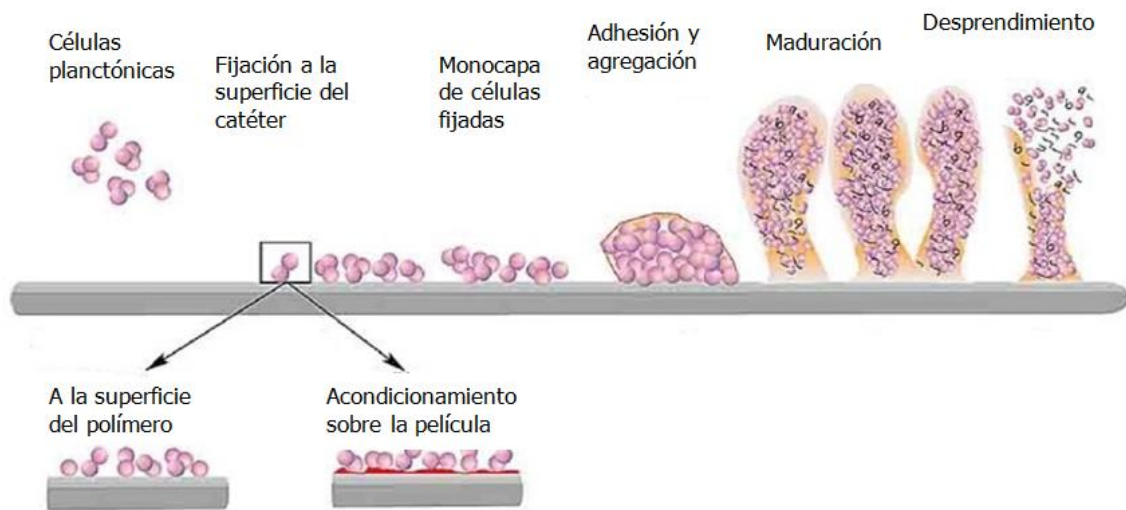


Figura 12. Formación del biofilm

4. Epidemiología de estafilococos coagulasa negativos

A excepción de la endocarditis de válvulas naturales y algunas infecciones de catéteres de diálisis peritoneal, prácticamente todas las infecciones por SCN con excepción de *S. saprophyticus* (infección de las vías urinarias) se adquieren en el hospital. Las cepas hospitalarias de *S. epidermidis* presentan resistencia a múltiples antibióticos, la colonización de pacientes y del personal sanitario por estas cepas precede a la infección por estos microorganismos. Probablemente, los microorganismos acceden a los cuerpos extraños por inoculación directa durante la inserción y la subsiguiente manipulación del

dispositivo, así como por la contaminación de las conexiones y vías de acceso de los catéteres [36].

5. Enfermedades causadas por *S. epidermidis* y otros estafilococos coagulasa-negativos

La mayoría de las enfermedades causadas por *S. epidermidis* y SCN están relacionadas con dispositivos (como el catéter intravascular o infecciones de prótesis articulares) y sus complicaciones [36].

5.1 Infecciones de catéteres y anastomosis

Más del 50 % de las infecciones de catéteres y derivaciones se debe a la infección por SCN. Estas infecciones se han convertido en un problema médico de gran relevancia, ya que los catéteres de larga duración y las anastomosis o derivaciones se utilizan generalmente para controlar a pacientes graves. Los SCN están especialmente adaptados para producir estas infecciones. En los pacientes con infecciones de las anastomosis y los catéteres se observa generalmente una bacteriemia persistente, puesto que los microorganismos pueden acceder de forma continua a la sangre. Las bacteriemias producidas por SCN son en la mayoría de los casos bacteriemias relacionadas con el catéter y alcanzan los 250.000 casos por año en EE.UU., con una tasa de mortalidad de 25.1%. Estas infecciones suponen un gasto muy significativo para el sistema público de salud, con un coste aproximado de 25.000 dólares por episodio y una estancia hospitalaria superior a 7 días. Las manifestaciones más graves, como la endocarditis de válvula protésica (EVP), son poco frecuentes en comparación con las infecciones relacionadas con el catéter. Sin embargo, los SNC se encuentran entre los agentes infecciosos más frecuentes en EVP (15-40%) [36,41].

5.2 Infecciones de las prótesis articulares

Las infecciones de las prótesis articulares, en especial de la cadera, pueden deberse a infección por SCN. Por lo general, los pacientes presentan únicamente dolor localizado y un fallo mecánico de la articulación. Los signos sistémicos, como la fiebre y la leucocitosis, no son llamativos y los hemocultivos suelen arrojar resultados negativos. El tratamiento consiste en la sustitución de la prótesis y la instauración de un tratamiento antimicrobiano. El riesgo de reinfección de la nueva prótesis articular es considerablemente mayor en estos pacientes [36].

5.3 Otras infecciones

Otras infecciones causadas por SCN son las infecciones de la derivación del líquido cefalorraquídeo, las peritonitis secundarias a catéteres de diálisis peritoneal, osteomielitis, infección de injertos vasculares, infecciones oculares. *S. lugdunensis* representa una excepción entre los SNC, ya que a menudo está implicado en infecciones graves que se asemejan a las causadas por *S. aureus*. Es importante destacar que los recién nacidos representan un grupo de alto riesgo en infecciones por SCN, con un 31% de las infecciones neonatales y el 73% de las bacteriemias neonatales atribuibles a SCN [41].

6. Resistencia antibiótica y tratamiento

Los SCN aislados en infecciones de origen nosocomial, en especial *S. epidermidis* y *S. haemolyticus*, son habitualmente resistentes a múltiples antibióticos, con más de un 80% de cepas resistentes a la meticilina. *S. epidermidis* resistente a meticilina (SEMR), se encuentra entre un 75 y un 90% a nivel mundial. Más del 50% de las cepas de *S. epidermidis* y *S. haemolyticus* de origen nosocomial son resistentes a aminoglucósidos y macrólidos, y en menor medida, tetraciclina, cloranfenicol, clindamicina. Al igual que en *S. aureus*, prácticamente todas las cepas de *S. epidermidis* producen β -lactamasa. Los antibióticos más utilizados para el tratamiento de las infecciones por SCN de origen nosocomial son los glicopéptidos, tigeciclina y linezolid. Las cepas con resistencia

intermedia a vancomicina (VISE), van en aumento, sin embargo, no se ha descrito la diseminación de cepas con resistencia de alto nivel a vancomicina. *S. haemolyticus* fue el primer SCN en mostrar resistencia a la vancomicina, aunque actualmente *S. epidermidis* ha evidenciado una sensibilidad disminuida a glicopéptidos [3]. La resistencia de SCN a daptomicina y tigeciclina es rara o poco frecuente. Linezolid es tratamiento de elección en muchos casos de infección causadas por SCN. Hace una década, la resistencia a linezolid era rara o poco frecuente, sin embargo, en la actualidad cada vez es más común la presencia de microorganismos gram positivos (SCN y en particular *S. epidermidis*) resistentes a linezolid. La presencia de estas cepas es habitual en las unidades de críticos de los hospitales, en muchos casos simplemente como colonizadores pero también como verdaderos agentes causales de infección. La aparición de resistencia puede darse en casos aislados por tratamientos prolongados con linezolid, o en muchos casos, en forma de brotes debido la presencia del gen *cfr* como principal mecanismo de resistencia a linezolid, que tiene capacidad de transferencia horizontal. Las tasas de resistencia varían ligeramente en cada país, pero se mantienen por debajo del 1% en estafilococos y enterococos [42].

7. Nuevas alternativas de tratamiento.

El tratamiento de los microorganismos Gram-positivos multirresistentes continúa siendo un desafío con la aparición de nuevos mecanismos de resistencia.

Tigeciclina

La tigeciclina, es una tetraciclina (glicilciclina) derivado de la minociclina. Se utiliza como tratamiento de las infecciones de piel y partes blandas e infecciones intraabdominales complicadas. Su potencia, su perfil farmacológico y su actividad frente a bacterias multirresistentes, le confieren potencial en el tratamiento de patologías como neumonía nosocomial, de las infecciones asociadas a dispositivos, y el tratamiento de otras infecciones graves. Es bacteriostático, y su mecanismo de acción es inhibición de la síntesis proteica por unión a la subunidad ribosómica 30S. La resistencia a tigeciclina en *Staphylococcus* es escasa. En el caso de *S. aureus* se debe a la presencia del gen *tet(K)* (resistencia por eflujo) y *tet(M)* (protección ribosomal) [43].

Daptomicina

Daptomicina es un lipopéptido cíclico, se une a las membranas bacterianas (en presencia de iones Ca^{++}) de las células (fase de crecimiento y estacionaria) causando una despolarización y conduciendo a una rápida inhibición de la síntesis de proteínas. No presenta resistencia cruzada con otros antibióticos, tiene un bajo índice de resistencias. Está indicado en infecciones de piel y partes blandas y bacteriemia por *S. aureus*, no está indicada para el tratamiento de neumonía porque se inactiva en presencia del surfactante pulmonar [44].

Ceftarolina

Actualmente, ceftarolina se presenta entre las nuevas alternativas de tratamiento frente a microorganismos gram positivos multirresistentes. Ceftarolina es un antibiótico del grupo de los β -lactámicos, es una cefalosporina de quinta generación con actividad frente a microorganismos gram negativos y gram positivos, incluyendo los resistentes a meticilina. Proporciona un nivel de seguridad adecuado en el paciente crítico. Por sus características farmacocinéticas y farmacodinámicas presenta una mejor difusión a pulmón que daptomicina o vancomicina y sus concentraciones plasmáticas son más elevadas que las alcanzadas por linezolid, por lo que su actividad bactericida es más rápida [45].

Tedizolid

Tedizolid o tedizolid fosfato (antes Torezolid TR-700) es una oxazolidinona de nueva generación con actividad frente a SAMR y *Enterococcus* resistentes a Vancomicina entre otros. Tedizolid presenta una serie de ventajas respecto a su predecesor. Ha demostrado actividad frente a microorganismos gram positivos con sensibilidad disminuida a linezolid, además tedizolid parece no verse afectado por la presencia del gen *cfr*, implicado en numerosos brotes de bacterias gram positivas resistentes a linezolid. Se piensa que es debido que el grupo hidroximetil C5 de la cadena lateral es más pequeño y más flexible que el grupo acetamidometilo de la cadena lateral de linezolid (Figura 13) [46,47].

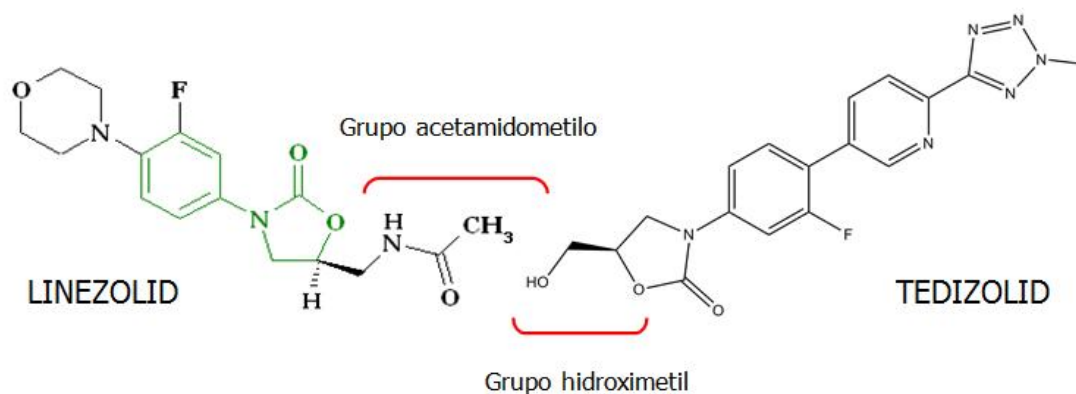


Figura 13. Moléculas de linezolid y tedizolid

8. Principales infecciones en las unidades de críticos

Las infecciones nosocomiales tiene todavía una alta incidencia en las unidades de cuidados intensivos (UCI), convirtiéndose en uno de los problemas más importantes en el ámbito sanitario. Asimismo se asocian con una alta mortalidad y morbilidad en los pacientes críticos y están asociadas a un aumento en la estancia media de los pacientes y del coste hospitalario. Tomando como base el Estudio Nacional de Vigilancia de Infección Nosocomial en Unidades de Cuidados Intensivos [48,49], se describe la etiología de las principales infecciones nosocomiales, como son la neumonía asociada a ventilación mecánica, la infección urinaria asociada a sondaje uretral y la bacteriemia primaria y relacionada con el catéter. Según este estudio en el año 2014, se ha experimentado un incremento en la tasa de bacteriemias primarias (bacteriemias relacionadas con el catéter más bacteriemias de origen desconocido) [48].

Por todo lo expuesto hasta ahora resulta de crucial importancia para el sistema sanitario la prevención de la diseminación y el control de la aparición de brotes de *S.aureus* y de SCN especialmente en las unidades de críticos de los hospitales. Ello requiere un conocimiento profundo de la epidemiología de la bacteria y su modo de propagación.

OBJETIVOS -

IV. Objetivos

El estudio y control de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SAMR), resulta de gran importancia por su elevado potencial patógeno y su implicación en un gran número de infecciones nosocomiales. La presencia de estafilococos coagulasa negativos multirresistentes, es habitual en el ámbito hospitalario, su potencial patógeno no es tan elevado como el de *S. aureus*, pero pueden constituir un reservorio importante de multirresistencia.

Desde Abril a Junio de 2008, se aislaron en nuestro hospital 15 cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina y resistentes además a linezolid. La escasa frecuencia de microorganismos con este fenotipo de resistencia en nuestro hospital, nos hizo plantearnos los siguientes objetivos:

1. -Caracterizar e identificar los mecanismos de resistencia a linezolid de todas las cepas de *S. aureus* aisladas en el Hospital Clínico San Carlos de Abril a Junio de 2008.
2. -Establecer las relaciones clonales de *S. aureus* resistentes a meticilina y resistentes a linezolid, aislados en este periodo y compararlos con los clones circulantes en el Hospital Clínico San Carlos.
3. -Determinar la sensibilidad a los principales antimicrobianos empleados en el tratamiento de *S. aureus* multirresistente.
4. -Realizar un estudio y seguimiento de la resistencia a linezolid en *S. epidermidis* aislados de pacientes ingresados en la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital Clínico San Carlos durante un periodo de cuatro años.
5. -Caracterizar e identificar los mecanismos de resistencia a linezolid de todas las cepas de *S. epidermidis* incluidas en el estudio.
6. -Estudiar la sensibilidad a los principales antimicrobianos empleados en el tratamiento de estafilococos multirresistentes, incluyendo ceftarolina, una nueva

cefalosporina con actividad frente a microorganismos gram positivos multirresistentes.

7. - Analizar los datos clínicos de los pacientes y establecer la posible asociación entre la duración del tratamiento con linezolid y la aparición de los diferentes mecanismos de resistencia.

MATERIAL Y MÉTODOS -

V. Material y Métodos

1. Aislados clínicos

En el estudio se incluyeron un total de 15 aislados clínicos de *S. aureus* resistentes a linezolid (SALR) obtenidos en el Hospital Clínico San Carlos, de Abril a Junio del 2008. De las cepas seleccionadas, 12 se obtuvieron de pacientes ingresados en la UCI del hospital, las 3 cepas restantes se aislaron de pacientes ingresados en otros servicios del centro. Se obtuvo también una cepa de SALR obtenida de una muestra ambiental recogida en la UCI que también se incluyó en el estudio.

Se recogieron además, un total de 100 cepas de *S. epidermidis* resistentes a linezolid (SELR) en un periodo de 4 años (2008-2011) procedentes de diferentes muestras clínicas obtenidas en pacientes ingresados en la UCI del Hospital Clínico San Carlos.

Todos los aislados fueron identificados en el servicio de microbiología clínica mediante las técnicas convencionales basados en galerías de pruebas bioquímicas: sistemas de identificación WIDER (Francisco Soria Melguizo, Madrid, España), y sistemas de identificación VITEK 2 (BioMerieux, Marcy L'Etoile, Francia).

1.1 Cepas de referencia

En todas las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos y en la tipificación por Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE) se incluyeron cepas control de la colección ATCC (American Type Culture Collection) y de NCTC (National Collection of Type Cultures)

Los microorganismos utilizados son los siguientes:

- *Staphylococcus aureus* ATCC 29213: Control en la determinación de CMIs.
- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212: Control en la determinación de CMIs.

- *Staphylococcus aureus* NCTC 8325: Perfil de restricción por PFGE.

2. Técnicas de identificación

La identificación inicial de los microorganismos se realizó de forma rutinaria mediante técnicas de identificación semiautomatizadas. Estos métodos, también permiten conocer la sensibilidad a antimicrobianos. Estas técnicas se detallan a continuación.

2.1 Sistema de identificación WIDER

La identificación de microorganismos mediante esta técnica se realiza por medio de paneles comerciales de pruebas bioquímicas. En el caso de *Staphylococcus sp.* Se utilizan los paneles “MIC/ID Gram positivos C094-31/W/Rev.1. (Figura 14.) El procedimiento se realiza según las instrucciones del fabricante (Francisco Soria Melguizo, España). Para ello se inocula una suspensión de cada microorganismo equivalente a 0.5 McFarland en cada uno de los pocillos del panel. Posteriormente se incubó a 37°C durante al menos 16 horas. En este tiempo, diferentes reacciones bioquímicas tienen lugar en cada ensayo lo que produce alteraciones en el pH. Esto genera un perfil específico para cada microorganismo que se identifica a continuación mediante lectura automática.

2.2 Sistema de identificación Vitek 2

La identificación de microorganismos por el sistema Vitek 2 (BioMerieux, Marcy L’Etoile, Francia) se basa en la realización de diferentes pruebas bioquímicas. El procedimiento se lleva a cabo a partir de una suspensión bacteriana equivalente a 0.5 McFarland en solución salina, como indica el fabricante (BioMerieux, Marcy L’Etoile, Francia). Para la identificación del género *Staphylococcus sp.* se emplearon las tarjetas de identificación de Gram positivos (GP) (Figura 15).

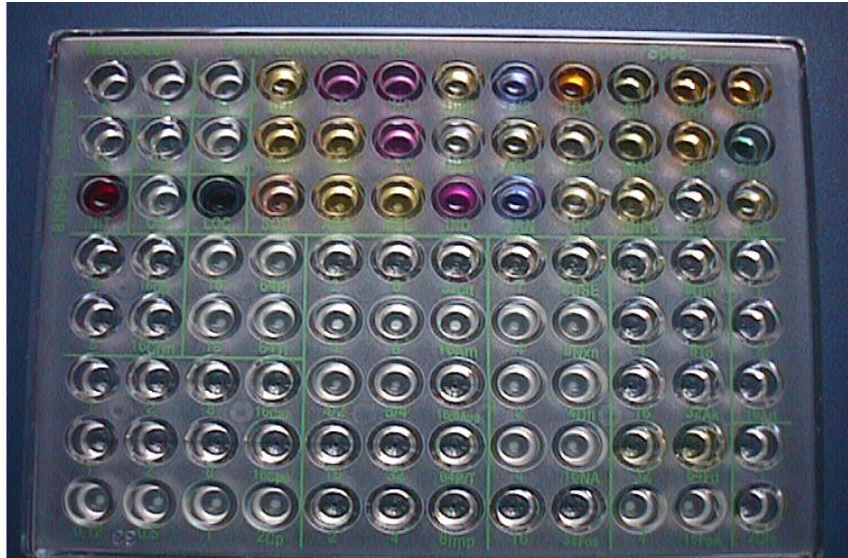


Figura 14. Panel de identificación y sensibilidad WIDER

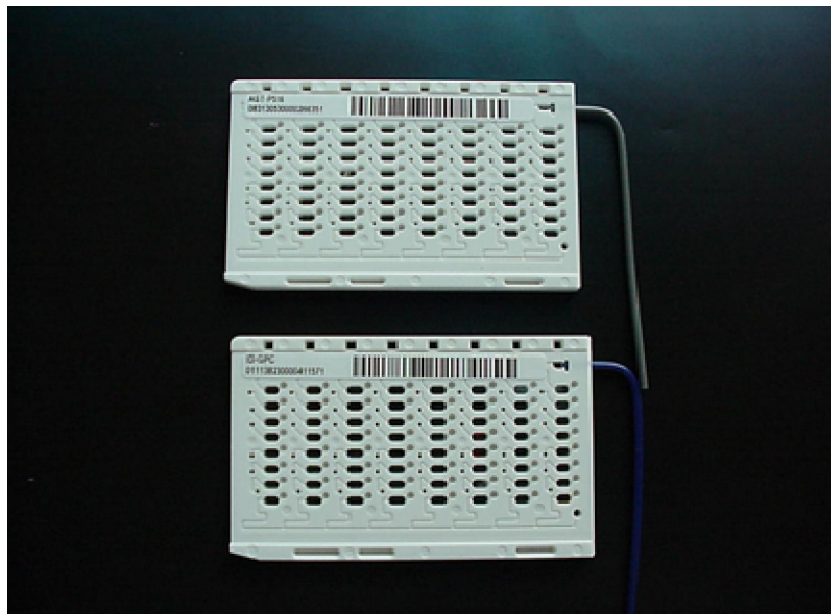


Figura 15. Tarjetas de identificación y sensibilidad de *Staphylococcus sp.* VITEK

3. Estudio de sensibilidad a antimicrobianos

En todos los aislados, de *S. aureus* y *S. epidermidis* resistentes a linezolid se determinó la sensibilidad a los antibióticos estudiados. Los métodos utilizados se describen a continuación.

3.1 Método de dilución en agar

La técnica de dilución en agar fue uno de los métodos utilizados para determinar las concentraciones mínimas inhibitorias (CMIs). Se realizó siguiendo las recomendaciones del CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute) [50], el medio de cultivo empleado fue Mueller-Hinton agar (Difco, Francisco Soria Melguizo, S.A. Madrid).

Antimicrobianos estudiados

Se estudió la sensibilidad de un total de seis antibióticos. Todos fueron facilitados en forma de sustancia valorada en polvo y sus potencias fueron proporcionadas por los respectivos laboratorios farmacéuticos (Tabla 1).

Preparación de las placas

Las diluciones fueron preparadas el día de uso, utilizando los solventes y diluyentes especificados por el CLSI [50].

De cada solución madre se realizaron diluciones dobles seriadas en sus correspondientes diluyentes hasta alcanzar el intervalo de concentración deseado. Las placas se prepararon mezclando 2 mL de cada una de las concentraciones con 18 mL de agar y se dejaron solidificar a temperatura ambiente.

Preparación del inóculo

A partir de cultivos de 24 horas en agar sangre de los aislados de *S. aureus* y *S. epidermidis* resistentes a linezolid se tomaron varias colonias y se resuspendieron en solución salina estéril (NaCl 0.9%) hasta conseguir una suspensión con una turbidez de 0.5 de la escala de McFarland (1×10^8 UFC/ml) y se inocularon las placas con un replicador de Steers. El replicador deposita gotas de 1-2 μ l sobre la superficie del agar, siendo el inóculo final en cada gota de aproximadamente 10^5 UFC/ml.

Se incluyeron en cada serie dos placas de agar sin antibiótico, inoculando una al principio y otra al final de la serie, como control de crecimiento y de pureza del inóculo. Las placas se incubaron a 37°C.

Lectura de placas

La lectura se realizó a las 24 horas para todos los antimicrobianos.

Se definió la CMI como la menor concentración del antimicrobiano que inhibió el crecimiento visible para cada cepa y antibiótico, no considerándose crecimiento la aparición de colonias aisladas ni de un velo débil.

Tabla 1. Rango de diluciones empleado para cada antibiótico

Antimicrobiano	Casa comercial	Rango de diluciones ($\mu\text{g/mL}$)
Clindamicina	Pharmacia&Uphjon	0.12-512
Cloranfenicol	Pfizer	0.12-256
Vancomicina	SIGMA	0.12-128
Teicoplanina	Aventis	0.12-128
Linezolid	Pfizer	0.12-256
Tigeciclina	Wyeth-Lederle	0.12-64

3.2 Método de Epsilon test[®]

Las tiras de E-test (AB Biodisk, Sweden), son un método cuantitativo de difusión en agar. Consisten en unas tiras de plástico que incorporan un gradiente de concentración de antimicrobiano. Cuando se depositan sobre las placas de agar, el antibiótico difunde en el medio. Este método, se utilizó para determinar las CMIs a daptomicina y ceftarolina.

También se realizó el estudio de CMI por este método en todos los aislados caracterizados como resistentes a linezolid por los métodos semiautomatizados.

Puntos de corte utilizados

Los puntos de corte utilizados para la interpretación de los resultados fueron los establecidos por el CLSI y EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) en el caso de la tigeciclina y ceftarolina, y se detallan en la tabla 2 [50,51].

Tabla 2. Puntos de corte de sensibilidad establecidos por el CLSI y EUCAST para *Staphylococcus sp.*

	Sensible	Intermedio	Resistente
Clindamicina	≤ 0.5	1-2	≥ 4
Cloranfenicol	≤ 8	16	≥ 32
Vancomicina*	$\leq 4 / \leq 2$	8-16/4-8	$\geq 32 / \geq 16$
Teicoplanina	≤ 8	16	≥ 32
Linezolid	≤ 4	-	≥ 8
Daptomicina	≤ 1	-	
Ceftarolina**	≤ 1	-	> 1
Tigeciclina**	$\leq 0,5$	-	$> 0,5$

*Puntos de corte para *Staphylococcus coagulasa negativo/ Staphylococcus aureus*

**Los puntos de corte para tigeciclina y ceftarolina son los establecidos por el EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)

4. Estudios de clonalidad

Se realizaron estudios de clonalidad en todos los aislados de SALR seleccionados para este estudio.

4.1 Electroforesis en campo pulsado

Determinación del patrón electroforético por electroforesis en gel en campo pulsado (PFGE). La técnica de PFGE permite resolver fragmentos de ADN de gran tamaño, incluso cromosomas. Las variaciones que ocurren naturalmente en la secuencia de ADN entre individuos de la misma especie da como resultado variaciones en los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción de manera que mientras en unos individuos existe un determinado sitio de reconocimiento, en otros está ausente. La combinación de digestión con enzimas de restricción y PFGE permite diferenciar unos individuos de otros ya que su perfil electroforético es distinto y se observa directamente. Para la realización de esta técnica se siguieron los pasos que se muestran a continuación.

4.1.1 Preparación del ADN

Para cada aislado se realiza un cultivo en medio líquido de cerebro y corazón (BHI) y se incuba en un baño a 37°C durante 24 horas. Posteriormente se mide la absorbancia de cada cultivo a una λ de 600 nm obteniendo la densidad óptica. Se calcula la cantidad de células/ml de cada muestra. A continuación se calcula el volumen necesario de cada cultivo para obtener 2×10^8 células. Se centrifugan todas las muestras 3 minutos a 8000 rpm resuspendiendo el precipitado en 200 μ l de tampón SE (NaCl 75 mM, EDTA 25 mM pH 8.0), se añade a cada uno 200 μ l de agarosa de bajo punto de fusión al 2% en SE manteniéndolos a 56°C. Por último se dispensa la mezcla en un molde para formar los bloques de agarosa (dos bloques por aislado) dejando solidificar a 4°C durante 15 minutos.

4.1.2 Lisis celular

Se requiere preparar la solución EC (Tris 6 mM, NaCl 2 M, EDTA 0,1 M, Na-desoxicolato 0,2%, Na-laurilsarcosina 0,5% pH 8.0) y posteriormente se prepara la solución de lisis (EC, Rnasa A 10 mg/ml, Lisozima 20 mg/ml, Lisostafina 10 mg/ml).

A continuación se coloca cada bloque de agarosa en un tubo eppendorff y se le añade la solución de lisis dejándolo a 37°C durante 5 horas. Transcurrido este tiempo se decanta la solución de lisis y se añade a cada bloque 1ml de la solución ESP (1 mg/mL de proteinasa K en solución ES: EDTA 0,05 M, sarcosil 1% pH 9.0). Se incuban 17 horas a 56°C.

Por último, se decanta la solución ESP y los bloques se lavan con solución TE (Tris. ClH 10 mM pH 7.5, EDTA 1 mM pH 8.0) durante 30 minutos en agitación, repitiendo este procedimiento 5 veces. De esta manera se elimina la proteinasa K que de otro modo podría interferir con la digestión enzimática que se realiza a continuación.

4.1.3 Digestión enzimática

Se equilibran los bloques con tampón *Sma* I (Tris-acético 33 mM, acetato magnésico 4H₂O 10 mM, acetato potásico 66 mM, 0,5 DTT) a temperatura ambiente durante 30-60 minutos. Se añaden 100 µl del tampón *Sma*I conteniendo 10 U de enzima de restricción *Sma*I y se incuban a 25°C durante toda la noche.

4.1.4 Preparación del gel y electroforesis

Se prepara un gel al 1% de agarosa en TBE 0,5 x (Tris 44,5 mM, ácido bórico 44,5 mM, EDTA 1 mM pH 8,4). Se posiciona el gel en el centro del CHEF (contour-clamped homogeneous electric field, Bio-rad, Hercules, Calif.) (Figura 16) y se cubre con 2,2l de TBE 0,5 x. Las condiciones de electroforesis son: T^a, pulso inicial 5 s, pulso final 40 s, 6 V/cm y un tiempo total de electroforesis de 20 h, 14°C. El gel se tiñe con bromuro de etidio (1 µg/mL) durante 30-45 minutos y se destiñe durante 45 minutos en agua destilada.

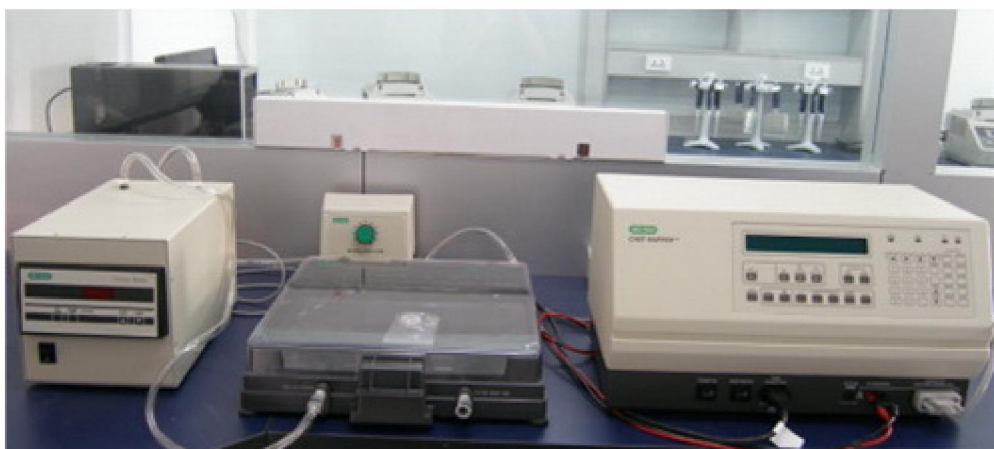


Figura 16. CHEF (contour-clamped homogeneous electric field, Bio-rad, Hercules)

4.1.5 Análisis comparativo de los patrones de electroforesis

Una vez obtenido el perfil electroforético se realiza el análisis mediante un programa informático (FPQuest 4.5, Bio-Rad) lo que permite tipificarlos y compararlos para agruparlos en grupos electroforéticos o clones (individuos que difieren en 6 bandas electroforéticas o menos). De esta manera pueden trazarse el origen de los clones y sus

relaciones evolutivas. Para el análisis de grupos se utilizó el coeficiente Dice (para calcular la matriz de similitud), el UPGMA (método de medias aritméticas) para determinar los grupos y una tolerancia del 3% en la variación de tamaño de banda [52].

4.2 MLST (Multilocus Sequence Typing)

El MLST es una técnica basada en la amplificación y secuenciación de genes constitutivos (housekeeping) que codifican enzimas metabólicas, no sometidos a presión selectiva y que permite detectar variaciones neutras que definen líneas clonales relativamente estables.

Los genes analizados y la secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación y secuenciación en *S. aureus* son los descritos por Enright [53] y se presentan en la tabla 3.

Los productos de amplificación se purifican para su posterior secuenciación. Se compara la secuencia de cada uno de los loci con las ya existentes en una base de datos centralizada. Si la secuencia ya existe, el programa le asigna el número del alelo identificado. Si la secuencia no coincide con las existentes, aunque sea únicamente en un nucleótido, el programa le asignará un nuevo número de alelo. Una vez asignado un número a cada alelo, tendremos el perfil alélico de nuestra cepa que consistirá en una secuencia de 7 números. Cada perfil alélico definirá lo que se conoce como tipo de secuencia o “sequence type” (ST). Esta secuencia tipo se obtiene mediante la comparación con la base de datos MLST específica para *S.aureus* (<http://saureus.mlst.net/>).

Tabla 3. Oligonucleótidos empleados para realizar el MLST

Gen	Oligonucleótido	Secuencia del iniciador (5' 3')
<i>arcC</i>	Forward	TTGATTCACCAGCGCGTATTGTC
	Reverse	AGGTATCTGCTTCAATCAGCG
<i>aroE</i>	Forward	ATCGGAAATCCTATTTACATTC
	Reverse	GGTGTTGTATTAATAACGATATC
<i>glpF</i>	Forward	CTAGGAACTGCAATCTTAATCC
	Reverse	TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC
<i>gmK</i>	Forward	ATCGTTTTATCGGGACCATC
	Reverse	TCATTA ACTACAACGTAATCGTA
<i>pta</i>	Forward	GTTAAAATCGTATTACCTGAAGG
	Reverse	GACCCTTTTGTTGAAAAGCTTAA
<i>tpi</i>	Forward	TCGTTCAATTCTGAACGTCGTGAA
	Reverse	TTTGCACCTTCTAACAATTGTAC
<i>yqiL</i>	Forward	CAGCATA CAGGACACCTATTGGC
	Reverse	CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC

5. Extracción de ácidos nucleicos

5.1 Extracción de ácidos nucleicos en *S. aureus*

La extracción de los ácidos nucleicos se realizó en el extractor automático NucliSENS® easyMAG® (BioMerieux) (Figura17). Este sistema está basado en la tecnología de extracción con sílice magnética (también denominada tecnología BOOM®). En un primer paso se incuban las muestras con un tampón de lisis, y los ácidos nucleicos son capturados por las partículas de sílice magnética. El sistema tiene un dispositivo magnético que atrae a la sílice, permitiendo la purificación de los ácidos nucleicos tras varios lavados. A continuación un paso con calor libera el ácido nucleico de la sílice

para que finalmente eluya y las partículas de sílice magnética queden retenidas de nuevo por el dispositivo magnético.

La extracción de los ácidos nucleicos de las cepas de *S. aureus*, se llevó a cabo a partir de 1mL de una suspensión celular en suero salino, ajustada a un 1-2 en la escala de Mcfarland. En todas las cepas el volumen de elución se ajustó a 110 μ L.

La concentración y pureza del ácido nucleico total extraído se determinó en un Nanodrop (Nanodrop Technologies, Wilmington, Delaware, USA).

5.2 Extracción de los ácidos nucleicos en *S. epidermidis*

La extracción de los ácidos nucleicos en las cepas de *S.epidermidis* se realizó en columnas de extracción de ácidos nucleicos QIAamp® DNA Mini and Blood (QIAGEN®) (Figura 18). El proceso de extracción en columna consiste en una primera etapa de lisis celular mediante un proceso de desnaturalización con las enzimas correspondientes y alta temperatura, una vez realizada la lisis, se añade el producto a una columna. A medida que el lisado atraviesa la columna, por efecto del vacío y la fuerza centrífuga, al ADN queda adsorbido sobre una membrana de gel de sílice.

Para la extracción de las cepas de *S. epidermidis*, se realizó a partir de un cultivo de 24h en placa de agar sangre, una suspensión de colonias en 1mL de solución salina. Posteriormente se centrifugan para la obtención del pellet. La lisis se realiza resuspendiendo el pellet en una solución enzimática que contiene 200 μ g/mL de lisostafina (SIGMA), se incuba a 37°C 30 minutos y posteriormente se le añade proteinasa K y se incuban las muestras a 56°C 30 minutos y a 95°C 15 minutos. Posteriormente el lisado se transfiere a la columna de extracción, se realiza la fijación a la membrana mediante la adición de EtOH y la centrifugación. Por último, tras varios lavados con el Buffer correspondiente, obtendremos un volumen de elución de 100 μ L.



Figura 17. Sistema NucliSENS® easyMAG®



Figura 18. QIAamp® DNA Mini and Blood

6. Determinación del mecanismo de resistencia a Linezolid

Determinamos el mecanismo de resistencia a linezolid en todos los aislados estudiados. Se realizó la determinación de las mutaciones ribosómicas en el dominio V del ARNr 23S, la detección de la presencia del gen *cfr* y la detección de mutaciones en las proteínas ribosomales L3 y L4.

6.1 Detección de mutaciones en el dominio V del ARNr ribosomal 23S

Para la detección de mutaciones en el dominio V, es necesario obtener la amplificación de cada copia del ARNr de la cepa en estudio, para posteriormente detectar la presencia de mutaciones en el dominio V, en cada una de las copias.

6.1.1 Amplificación del ADN para cada alelo individual de ARNr

La amplificación de cada alelo individual ARNr de la subunidad ribosómica 23S se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Utilizamos 5 pares de

oligonucleótidos uno para cada copia del ARN ribosomal de *S. aureus* y *S. epidermidis*. Los oligonucleótidos utilizados se muestran en la tabla 4.

Los productos de la amplificación tienen un tamaño en rango de 5.5 a 6.5 kb, por lo que la enzima utilizada para la PCR fue la Expand Long Template PCR System (Roche Diagnostics GmbH) apta para amplificar grandes regiones.

Para cada reacción de amplificación las concentraciones finales de la mezcla fueron las siguientes: 3.5 mM MgCl₂, 0.5 μM de cada uno de los iniciadores, 200μM de dNTPs y 3.7 U de Expand Long Template. En todas añadimos 5 μL del extraído de ADN obtenido de cada cepa. El volumen hasta 50μL se completó con agua destilada estéril. Las condiciones de amplificación se muestran en la tabla 5.

Tabla 4. Oligonucleótidos específicos para cada copia de ARNr ribosómico

Gen	Oligonucleótidos	Secuencia del iniciador (5' 3')
<i>rrn1</i>	Forward	GCGGTGTTTTGAGAGATTATTA
	Reverse	GCTTCATGATATACGCTTCCTTT
<i>rrn2</i>	Forward	GCAGACGCACAGGACTTA
	Reverse	GATACCGTCTTACTGCTCTTCTC
<i>rrn3</i>	Forward	AGGCCGGCAATATGTAAG
	Reverse	GTCGTCAAACGGCACTAATA
<i>rrn4</i>	Forward	GTGGACGGTGCATCTGTAG
	Reverse	ATCACCCGCTCCATAGATAAT
<i>rrn5</i>	Forward	GCCGATAGCTCTACCACTG
	Reverse	AGGTGCGATGGCAAACA

Tabla 5. Condiciones de PCR para la amplificación del ARNr

94°C	2 minutos		Desnaturalización inicial	
94°C	10 segundos		Desnaturalización	} 30 ciclos
53°C	30 segundos		Hibridación	
68°C	4 minutos	Incremento de 20s/ciclo del ciclo 11 al 30	Extensión	
68°C	7 minutos		Extensión final	

6.1.2 Amplificación del Dominio V

Una vez amplificado cada alelo individual de ARNr, se realiza una amplificación del Dominio V (que contiene la región de 2576 de la secuencia de *Escherichia coli*). Para amplificar esta región realizamos una PCR anidada, utilizando los productos de amplificación obtenidos anteriormente.

Realizamos una dilución 1/1000 del producto de PCR en el caso de los *S.aureus* y una dilución de 1/100 para *S. epidermidis*. En ambos casos se emplearon 5µL de ADN diluido para la realización de la PCR anidada. Las concentraciones finales de la mezcla fueron: 1X de buffer 10X (100mM Tris-HCl pH 8,3, 500mM de KCl), 1.5 mM de MgCl₂, 0.5 µM de cada oligonucleótido, 200µM de dNTPs, 2.5U de la Taq polimerasa.

Los oligonucleótidos empleados y las condiciones de la PCR se muestran en la tabla 6 y 7 respectivamente.

Tabla 6. Oligonucleótidos empleados en la amplificación del Dominio V

Región	Oligonucleótidos	Secuencia del iniciador (5' 3')
Dominio V	Forward	GCGGTCGCCTCCTAAAAG
	Reverse	ATCCCGGTCCTCTCGTACTA

Tabla 7. Condiciones de PCR para la amplificación del Dominio V

94°C	2 minutos	Desnaturalización inicial	} 30 ciclos
94°C	10 segundos	Desnaturalización	
55°C	30 segundos	Hibridación	
72°C	30 segundos	Extensión	
72°C	7 minutos	Extensión final	

6.2 Detección del gen *cfr*

Se realizó la detección del gen *cfr*, en todos los aislados del estudio.

6.2.1 Preparación del ADN

La extracción del ADN de los aislados *S.aureus* y de *S. epidermidis* empleado para la detección del gen *cfr* se realizó mediante el método de lisis con el buffer Tritón (100mM NaCl, 10 mM Tris HCl pH 8,3, 1 mM EDTA pH 8, 1% Tritón X-100). Se recoge con un asa de punta redonda una pequeña parte de una colonia de los estafilococos procedentes de un cultivo puro de 24 horas y se resuspende en 300µL del buffer Tritón. Se hierva la suspensión bacteriana durante 10 minutos y seguidamente se enfría en hielo. A partir de aquí los resuspendidos deben mantenerse a -20°C hasta su uso. A continuación se centrifugan los tubos durante 1 minuto y en el sobrenadante se encontrarán los ácidos nucleicos.

6.2.2 Amplificación del gen *cfr*

La amplificación del gen *cfr* se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los cebadores utilizados se muestran en la tabla 8. Las concentraciones finales de la mezcla de PCR fueron: 1X de buffer 10X (100mM Tris-HCl pH 8,3, 500mM de KCl), 1.5 mM de MgCl₂, 0.5 µM de cada oligonucleótido, 200µM de dNTPs, 2.5U de la Taq polimerasa. Las condiciones de la PCR se muestran en la tabla 9.

Tabla 8. Oligonucleótidos empleados para la amplificación del gen *cfr*

Gen	Oligonucleótidos	Secuencia del iniciador (5' 3')
<i>Cfr</i>	Forward	TGAAGTATAAAGCAGGTTGGGAGTCA
	Reverse	ACCATATAATTGACCACAAGCAGC

Tabla 9. Condiciones de PCR para la amplificación del gen *cfi*

94°C	2 minutos	Desnaturalización inicial	
94°C	10 segundos	Desnaturalización	30 ciclos
55°C	30 segundos	hibridación	
72°C	30 segundos	extensión	
72°C	7 minutos	Extensión final	

7. Detección de mutaciones en las proteínas ribosomales L3 y L4

La amplificación de los genes que codifican las proteínas ribosomales L3, L4 y L22 se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Cada gen se amplificó como un único amplicon (3,3kb) empleando para amplificar la región la pareja de oligonucleótidos *rplCF/rplVR*. Posteriormente se secuencian los productos de amplificación con el oligonucleótido específico de cada gen. Los oligonucleótidos empleados para la amplificación de la región en la que se encuentran las proteínas ribosómicas, así como los cebadores que codifican cada una de las proteínas, se muestran en la tabla 10. Las concentraciones finales de la mezcla de PCR fueron: 1X de buffer 10X (100mM Tris-HCl pH 8,3, 500mM de KCl), 1.5 mM de MgCl₂, 0.5 μM de cada oligonucleótido, 200μM de dNTPs, 2.5U de la Taq polimerasa. Las condiciones de la PCR se muestran en la tabla 11.

Tabla 10. Oligonucleótidos empleados para la amplificación y secuenciación de las proteínas ribosomales

Gen	Proteína	Oligonucleótidos	Secuencia del iniciador (5' 3')
<i>rplCF</i>	L3	Forward	ATGGGCTTAAACTTACCATC
<i>rplDF</i>	L4	Forward	AAAAGGTTTAGTAGAAATCAG
<i>rplVF</i>	L22	Forward	GTACATTCAAAGGACACGTTG
<i>rplVR</i>	L22	Reverse	AATCACGGATAATACCAACACG

Tabla 11. Condiciones de PCR para la amplificación de los genes *rplC*, *rplD* y *rplV*

94°C	2 minutos	Desnaturalización inicial	
94°C	45 segundos	Desnaturalización	} 35 ciclos
54°C	45 segundos	hibridación	
72°C	30 segundos	extensión	
72°C	7 minutos	Extensión final	

8. Detección de los amplificados

Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5% en Buffer TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA) 1X con Bromuro de Etidio. La visualización de los productos amplificados, se realizó en un transiluminador de luz ultravioleta. En cada reacción de PCR se incluyeron un control positivo de amplificación y un control negativo. Como marcador de peso molecular se utilizó 100-2000pb (Dominion, MBL) y un marcador de amplio espectro de 500pb-10Kb (Molbiolab) para la amplificación del ARNr.

9. Secuenciación

Para realizar la secuenciación del ADN se requiere la purificación de los productos de PCR. Se realizó mediante el kit de purificación de productos de PCR QIAquick[®] (QIAGEN[®]). Se basa en la presencia de una membrana de silica en la que queda ensamblado el ADN, mediante la presencia de un tampón con elevada concentración de sales, y su posterior elución con un tampón de bajo contenido en sal o con agua. En el proceso de purificación, se eliminan los cebadores, nucleótidos, enzimas, aceites minerales, sales, agarosa, bromuro de etidio, y otras impurezas de las muestras de ADN.

Realizamos la secuenciación del ADN para la detección de mutaciones en el Dominio V y en las proteínas L3, L4 y L22.

El método de secuenciación empleado es el método de Sanger o secuenciación de terminación de la cadena. La reacción de secuencia consiste en la copia de la secuencia patrón (no es una amplificación de la secuencia como en el caso de la PCR). Se necesita

la hebra molde, uno de los cebadores, una enzima Taq polimerasa, el cofactor de la enzima MgCl, una solución tampón, los cuatro desoxinucleotidos (dNTPs) y cuatro didesoxinucleotidos marcados (ddNTPs).

En nuestro estudio utilizamos un kit comercializado Big Dye Terminator dRhodamina v1.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems). Las concentraciones finales de la mezcla son: 2µL de Premix (mezcla comercializada de tampón, dNTPs, enzima y ddNTPs), 1µL del oligonucleótido correspondiente a una concentración de 3.2mM, 2µL de agua destilada estéril y 5µL del producto purificado de ADN, para alcanzar un volumen total de 10µL. Las condiciones de la reacción de secuenciación se muestran en la tabla 12.

Tabla 12. Condiciones de la reacción de secuencia

96°C	1 minuto	desnaturalización inicial	
96°C	10 segundos	desnaturalización	} 25 ciclos
50°C	5 segundos	hibridación	
60°C	4 minutos	extensión	

Para la lectura de la secuencia se utilizó el secuenciador ABI Prism ® 3100 Applied Biosystem (Centre Drive, Foster City, California). Las secuencias obtenidas se analizaron con el programa informático Sequence Scanner y se identificaron mediante comparación con las secuencias incluidas en la base de datos de PubMed empleando la herramienta de alineamiento de secuencias BLAST.

(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

10. Obtención de datos clínicos

Se recopiló toda la información clínica relevante de los pacientes ingresados en la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital Clínico San Carlos en los que se aisló *S. aureus* y *S. epidermidis* resistente a linezolid.

Los datos clínicos analizados se enumeran en la tabla 13.

Tabla 13. Datos clínicos de los pacientes recogidos para el estudio

Unidad de ingreso	Cuadro clínico	Tratamiento	Muestra
-UCI Cardiovascular -UCI Médico-quirúrgica -UCI Neuro-politrauma	- Patología de base - Motivo de ingreso en UCI - Tipo de infección	- Previo a aislamiento de SALR o SELR - Posterior al aislamiento de SALR o SELR	Tipo de muestra: Hemocultivo Cateter Orina Exudado Broncoaspirado Líquido corporal

11. Análisis estadístico

El procesamiento de datos clínicos de los pacientes se realizó mediante el programa estadístico SPSS versión 15.0 (SPSS Inc, Chicago, Illinois).

RESULTADOS -

VI. Resultados

1. Aislados clínicos

Se seleccionaron un total de 15 cepas de SAMR resistentes a linezolid, aisladas en el Hospital Clínico San Carlos desde Abril a Junio del 2008. De las 15 cepas, 12 se aislaron en la Unidad de Cuidados Intensivos del centro.

Los aislados de *S. aureus* resistentes a linezolid (SALR), se obtuvieron de diferentes muestras clínicas. La mayoría de ellas, fueron hemocultivos, broncoaspirados y catéteres. En algunos de los pacientes, se aisló SALR en diferentes muestras clínicas, durante el tiempo de estancia en el hospital. Estos datos, así como la fecha de aislamiento, el servicio donde estuvieron ingresados los pacientes y el tipo de infección causada por SALR, se muestran en la tabla 14.

Tabla 14. Pacientes en los que se obtuvieron aislamientos de SALR. Se muestra la fecha del aislamiento, el servicio donde se encontraba ingresado el paciente, el tipo de muestra y la infección causada

Paciente	Fecha	Servicio	Muestra primaria	Otras muestras	Infección
1	13/04/2008	UCI S	Hemocultivo	-	Bacteriemia
2	03/05/2008	UCI S	Hemocultivo	-	Bacteriemia
3	13/05/2008	UCI S	Hemocultivo	-	Bacteriemia
4	14/05/2008	UCI N	Hemocultivo	Exudado herida, hemocultivo	Neumonía
5	14/05/2008	UCI N	Broncoaspirado	Catéter	Neumonía
6	14/05/2008	UCI N	Broncoaspirado	-	Neumonía
7	29/05/2008	UCI N	Hemocultivo	Catéter	Colonización
8	13/06/2008	UCI N	Catéter	-	Colonización
9	17/06/2008	UCI S	Broncoaspirado	-	Neumonía
10	24/06/2008	UCI N	Catéter	Broncoaspirado	Neumonía
11	27/06/2008	UCI S	Broncoaspirado	-	Neumonía
12	26/05/2008	UCI S	Exudado faríngeo	-	Portador
13	12/06/2008	COT*	Exudado de herida	-	Infección de herida quirúrgica
14	09/06/2008	CIG**	Broncoaspirado	-	Colonización
15	26/06/2008	NEU***	Broncoaspirado	LCR	Neumonía

*Servicio de traumatología, ** Servicio de cirugía general, ***Servicio de neurocirugía.

Como podemos observar en la tabla 14, tres de los pacientes presentaron bacteriemia primaria y seis de ellos, neumonía asociada a ventilación mecánica. En uno de los pacientes la cepa de SALR se aisló en un hemocultivo extraído a través de la luz del catéter únicamente, los hemocultivos de sangre periférica así como la punta del catéter

fueron negativos. En este caso, SALR no fue causa de infección, aislándose únicamente como un colonizador, puesto que no se obtuvo ninguna muestra más de este paciente con aislamientos de SALR.

En otro de los pacientes, el aislamiento se obtuvo en el cultivo de la punta del catéter, comportándose en este caso también como un colonizador. Por último, hubo un aislado de SALR, que se obtuvo de una muestra de exudado faríngeo obtenida del estudio de portadores realizado por medicina preventiva. En la parte final de la tabla, se muestran las tres únicas cepas de SALR que se aislaron fuera de la unidad de cuidados intensivos.

Uno de los pacientes se encontraba ingresado en el servicio de traumatología, y presentó una infección de la herida quirúrgica por un aislado de SALR.

Otro de los pacientes se encontraba ingresado en el servicio de cirugía general, no presentó infección por SALR, aislándose únicamente en una muestra de broncoaspirado.

El tercer paciente, se encontraba ingresado en el servicio de neurocirugía, presentó neumonía asociada a ventilación mecánica causada por el microorganismo multirresistente. Además, en este paciente SALR se aisló en una muestra de líquido cefalorraquídeo obtenida de la derivación ventricular.

2. Estudio de sensibilidad antibiótica

Realizamos el estudio de sensibilidad a todas las cepas utilizando técnicas de dilución en agar según las recomendaciones del CLSI [50] obteniendo el valor de CMI para cada uno de los antibióticos. En el caso de la daptomicina, la obtención de las CMIs se realizó por el método de E-test. Las cepas estudiadas eran todas resistentes a meticilina y linezolid. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 15.

Tabla 15. Resultados del estudio de sensibilidad de las cepas de SALR a los antibióticos analizados

Antibiótico	CMI ₅₀ µg/mL	CMI ₉₀ µg/mL	Rango CMI µg/mL	% resistentes
Linezolid	32	32	16-32	100
Cloranfenicol	128	128	128-256	100
Vancomicina	2	2	1-2	0
Teicoplanina	1	1	0.5-1	0
Clindamicina	>512	>512	512->512	100
Daptomicina	0.5	0.5	0.125-0.5	0
Tigeciclina	0.125	0.125	0.125	0

Todas las cepas mostraron una elevada resistencia a cloranfenicol, clindamicina y linezolid, y el 100% de las cepas fueron sensibles a vancomicina, teicoplanina, daptomicina y tigeciclina. Las CMIs de vancomicina fueron de 2 µg/mL en todos los casos, excepto en un aislado, en el que la CMI a vancomicina fue de 1 µg/mL. Esta cepa, además, presentó una CMI a linezolid de 16 µg/mL y fue la más sensible comparativamente a todos los antibióticos estudiados. Tigeciclina y daptomicina presentaron las CMIs más bajas para todos los aislados alcanzando valores de 0.125 µg/mL. El estudio de sensibilidad de estas cepas a cloranfenicol se realizó por la descripción de un fenotipo de multirresistencia descrito en estafilococos que confiere resistencia a fenicoles (cloranfenicol) lincosamidas, oxazolidinonas, pleuromutilinas (retapamulina) y estreptogramina A. Observamos el patrón de resistencia a clindamicina, cloranfenicol y linezolid en el 100% de nuestros aislados.

Los principales antibióticos empleados para el tratamiento de las infecciones producidas por SALR fueron vancomicina y tigeciclina, tanto para los pacientes ingresados en la UCI, como para los tres pacientes ingresados en diferentes servicios del hospital. Las principales infecciones causadas por SALR fueron la neumonía asociada a ventilación mecánica y la bacteriemia. Estos datos se muestran en la tabla 16.

Tabla 16. Infección y tratamiento de los pacientes

Paciente	Infección	Tratamiento	Evolución
1	Bacteriemia	Vancomicina	No exitus
2	Bacteriemia	Vancomicina	No exitus
3	Bacteriemia	Vancomicina	No exitus
4	Neumonía	Tigeciclina	No exitus
5	Neumonía	Tigeciclina	Exitus
6	Neumonía	Tigeciclina	No exitus
7	Colonización	-	Exitus
8	Colonización	Vancomicina, Tigeciclina	Exitus
9	Neumonía	Tigeciclina	Exitus
10	Neumonía	Vancomicina	No exitus
11	Colonización	-	Exitus
12	Neumonía	Tigeciclina	No exitus
13	Colonización	-	No exitus
14	Infección de herida	Tigeciclina	No exitus
15	Neumonía	Vancomicina	No exitus

Siete de los pacientes sobrevivieron al episodio, tres de los pacientes que fallecieron estaban colonizados por SALR por lo que su fallecimiento no estaba relacionado con el aislamiento del microorganismo multirresistente. Solo en un caso, en el que el paciente presentó neumonía asociada a ventilación mecánica, el fallecimiento se atribuyó a la infección causada por SALR.

3. Estudio genotípico

3.1 Obtención de perfiles electroforéticos

Se realizó un estudio de clonalidad de todas las cepas de SALR aisladas, mediante PFGE. Se muestran los perfiles obtenidos para las cepas en estudio tras realizar la electroforesis de campo pulsado en la figura 19.

C 1 2 3 4 5 6 C 8 9 10 11 12 13 C

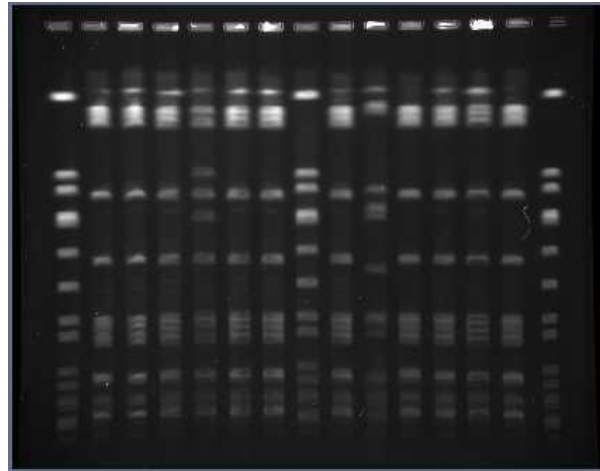


Figura 19. Gel de campo pulsado. Se muestran los perfiles electroforéticos obtenidos correspondientes a la cepa de referencia NCTC 8325 (C)

La inspección visual de los perfiles de electroforesis nos permitió establecer la similitud entre las diferentes cepas de acuerdo a los criterios de Tenover [54]. El análisis mediante el sistema FPQuest nos permitió la obtención del dendrograma (Figura 20).

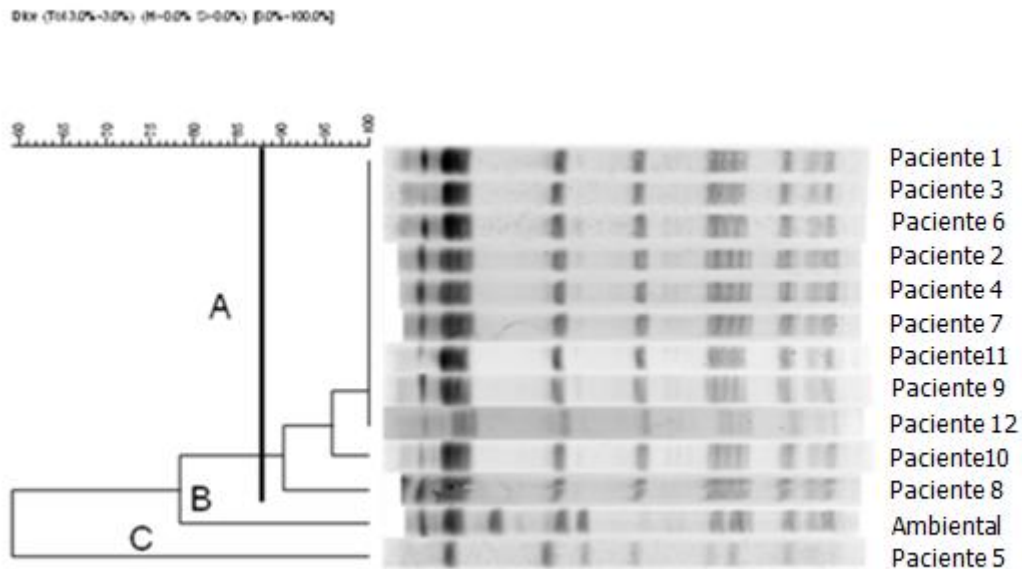


Figura 20. Dendrograma de las cepas implicadas en el brote. Se realizó por análisis de grupos utilizando similitudes basadas en el coeficiente Dice de los patrones de macrorrestricción obtenidos con la enzima *Sma I*. Se diferencian tres clones, el A que es el mayoritario, el B y el C.

En la figura 20 podemos observar que existe un clon mayoritario A en el que se agrupan once de las trece cepas de SALR estudiadas. Se incluyó también en el análisis clonal una cepa de SALR obtenida de una muestra ambiental tomada en la UCI del hospital, esta cepa corresponde al clon B, y que como podemos observar en la figura 20, se asemeja al clon A. Por último, observamos un tercer clon, el clon C, que corresponde solo a una cepa de SALR. Esta cepa fue la que presentó menor resistencia a linezolid, con una CMI de 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En el resto de aislados, las CMIs a linezolid fueron de 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La CMI de vancomicina también fue la menor presentando una CMI de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, obteniéndose en los demás aislados una CMI de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para dicho antibiótico. En el antibiograma obtenido en el laboratorio de microbiología mediante las tarjetas de sensibilidad VITEK 2, la cepa correspondiente al clon C presentó sensibilidad a la eritromicina mientras que el resto de las cepas estudiadas fueron resistentes a este antibiótico. Todos estos datos demuestran la diferenciación fenotípica de esta cepa de SALR además de su clara diferenciación genotípica obtenida mediante PFGE. No se observan diferencias significativas entre los distintos clones, en el resto de antibióticos estudiados.

Los clones obtenidos para los aislados de SALR, se compararon con los clones de SAMR circulantes en nuestro hospital, obtenidos de un estudio epidemiológico previo en el que se incluían 48 cepas de SAMR, aisladas en el hospital clínico durante los años 2007 y 2008. El dendrograma obtenido por el sistema FPQuest se muestra en la figura 21.

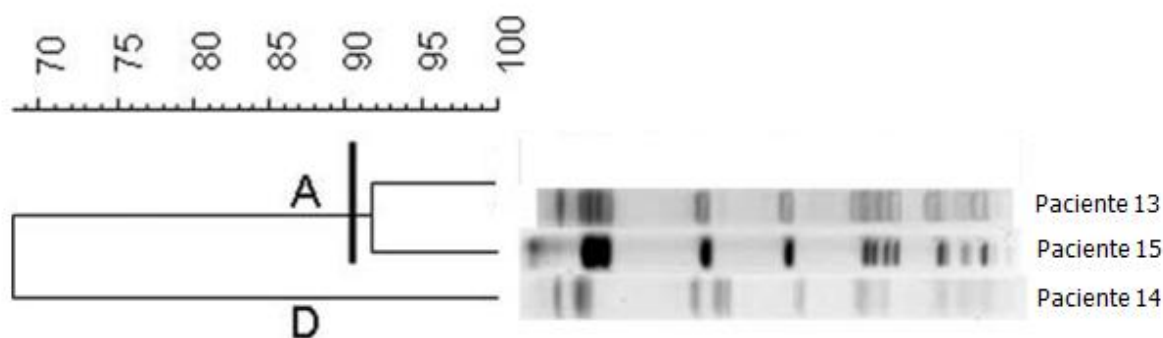


Figura 22. Dendrograma obtenido de las cepas de SALR aisladas de los pacientes no ingresados en la UCI -

Podemos observar en la figura 22, que dos de las tres cepas de SALR aisladas en pacientes no ingresados en UCI en el momento pertenecen al clon A. Ambos pacientes habían estado previamente ingresados en la UCI, hecho que relaciona la aparición de estos aislados, en otros servicios del hospital. Sin embargo, la cepa de SALR aislada del paciente 14, correspondía a un clon totalmente diferente al resto, el clon D. Esta cepa no presenta diferencias significativas en el patrón de sensibilidad antibiótica, respecto al resto de aislados pertenecientes al clon A. El paciente en el que se aisló la cepa de SALR perteneciente al clon D, nunca estuvo ingresado en la UCI de nuestro hospital.

3.1.1 MLST

El análisis molecular mediante MLST se realizó en cuatro cepas, una de cada clon obtenido por PFGE.

Los resultados obtenidos fueron el ST228 para las cepas del clon A y el clon B, y el ST125 para las cepas correspondientes al clon C y al clon D.

3.1.2 Identificación del mecanismo de resistencia de SALR

Detección del gen *cfr*

Para la identificación del mecanismo de resistencia a linezolid, se realizó en todos los aislados de SALR una PCR para amplificación del gen *cfr*. Todas las cepas mostraron la amplificación de una banda de un tamaño de 746 pares de bases, fragmento compatible con el gen *cfr*. La observación del gen *cfr* en los aislados de SALR, amplificados en gel de electroforesis se muestran en la figura 23.



Figura 23. Amplificación del gen *cfr* de las cepas de SALR en gel de electroforesis al 1%

El gen *cfr* confiere resistencia a fenicoles (cloranfenicol), lincosamidas (clindamicina), oxazolidinonas (linezolid), pleuromutilinas (retapamulina) y estreptogramina A. Todas las cepas de SALR aisladas presentaron además resistencia a cloranfenicol y clindamicina, este patrón se corresponde con la presencia del gen *cfr* en los aislados.

Detección de mutaciones nucleotídicas en el dominio V del ARNr 23S

Además del gen *cfr*, se realizó en todas las cepas la determinación de mutaciones en el dominio V de la subunidad 23S del ribosoma. Se amplificaron cada una de las cinco copias del ARNr (Figura 24) y se realizó una PCR anidada de cada una de ellas para la amplificación del dominio V (Figura 25).

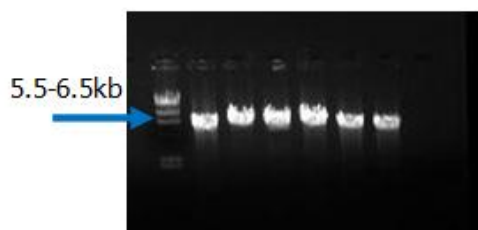


Figura 24. Amplificación del ARNr-1 en aislados de SALR

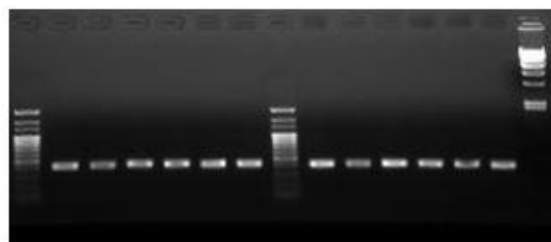


Figura 25. Amplificación del dominio V de aislados de SALR, tras la realización de la PCR anidada

Posteriormente se secuenciaron los productos de amplificación y se comprobó la ausencia de mutaciones en el ribosoma en todas las cepas.

El mecanismo de resistencia a linezolid de todos los aislados de SALR estudiados estaba mediado por la presencia del gen *cfr*.

4. Caracterización y seguimiento de cepas de SELR aisladas en la UCI

4.1 Datos epidemiológicos

Durante los cuatro años (2008-2011), realizamos un seguimiento de todos los *Staphylococcus coagulasa negativo* (SCN) resistentes a linezolid aislados en la Unidad de Cuidados Intensivos del HCSC. El estudio se centra principalmente en *S. epidermidis* por ser el microorganismo más abundante con diferencia del resto de SCN. Se seleccionaron un total de 100 cepas de *S. epidermidis* resistentes a linezolid (SELR) durante el periodo estudiado. Además, analizamos los datos globales de los aislamientos de SCNLR obtenidos en todos los servicios del hospital, y los comparamos con los datos obtenidos en UCI en el mismo periodo.

En la tabla 17, se muestran los datos globales de todos los aislamientos de SCNLR obtenidos en el hospital durante los cuatro años estudiados.

Tabla 17. Datos globales de los aislamientos de SCNLR en el Hospital Clínico San Carlos durante 4 años

	2008	2009	2010	2011
SCN	2166	2268	2377	1874
SCN LR	50	111	120	78
%	2.3%	4,89 %	5%	4,16%
<i>S.epidermidis</i>	1442	1619	1750	1248
<i>S.epidermidis</i> LR	33 (2.29 %)	94 (5.8%)	103 (5.88%)	67 (5,36%)
<i>S.hominis</i>	228	293	252	244
<i>S.hominis</i> LR	5 (2.20 %)	9 (3.07%)	11 (4.36%)	9 (3.68%)
<i>S.warneri</i>	47	52	34	81
<i>S.warneri</i> LR	5 (10.64 %)	6 (11.5%)	1 (2.9%)	1 (1.23%)
<i>Staph. sp.</i>	449	304	343	301
<i>Staph. sp</i> LR	7 (1.55%)	2 (0.66%)	5 (1.45%)	1 (0.33%)

S. epidermidis es el SCN más abundante en nuestro medio, representando más del 50% de los SCN aislados. En la tabla 17, podemos observar, que el porcentaje de SELR se eleva desde un 2.29% en 2008 a un 5.8% en 2009, porcentaje que triplica a los aislados obtenidos en el año 2008. A partir de ese año, el porcentaje se mantiene estable. En el resto de SCN, el número de cepas resistentes a linezolid es poco frecuente, siendo *S. warnerii* la especie con mayor número de aislados resistentes. En la tabla 18, se representan los aislamientos de SCNLR en la UCI de nuestro hospital durante el mismo periodo. Podemos observar el aumento progresivo de SELR desde el 2008 al 2010, aumentando el porcentaje de cepas resistentes en un 18,5 %. En el año 2010, se registra el número más alto de SCNLR tanto en la UCI, como en todo el hospital. Sin embargo, a partir de este año, se produce una disminución del porcentaje de cepas resistentes, de todas las especies de SCN, en todo el ámbito hospitalario. En el caso de SELR, en el año 2011 el porcentaje de resistencia es un 4% menor que en 2010.

Tabla 18. Datos de SCNLR aislados en la UCI del Hospital Clínico San Carlos durante 4 años

	2008	2009	2010	2011
<i>S. epidermidis</i>	214	442	291	294
<i>S. epidermidis</i> LR	14 (6.5%)	71 (16%)	73 (25%)	62 (21%)
<i>S. hominis</i>	420	68	35	40
<i>S. hominis</i> LR	3 (7.1%)	5 (7.3%)	9 (25.7%)	3 (7.5%)
<i>S. warnerii</i>	3	8	0	6
<i>S. warnerii</i> LR	1 (33.3%)	6 (75%)	0	1 (16.6%)

Comparamos los datos obtenidos en la UCI de nuestro hospital, respecto al porcentaje de cepas de SELR aisladas del 2008 al 2011, con el resto de hospitales españoles (estudio ENVIN-HELICS) (Figura 26).

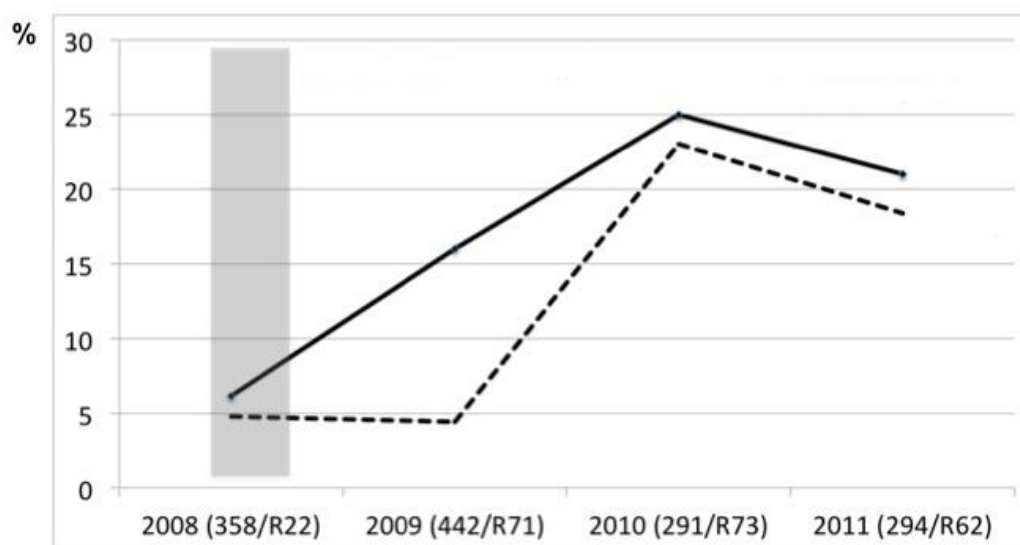


Figura 26. Porcentaje de SELR aislados en la UCI del Hospital Clínico San Carlos. La línea continua muestra el porcentaje obtenido en nuestro hospital, la línea discontinua muestra el porcentaje obtenido en los servicios de UCI de los hospitales españoles. (ENVIN-HELICS)

Como podemos observar en la figura 26, la disminución observada a partir del año 2010, respecto al porcentaje de aislados de SELR en nuestro hospital, se correlaciona con lo ocurrido en el resto de hospitales españoles. Hay un aumento notable desde el 2008 al 2010, y un descenso claro a partir del año 2011.

4.2 Datos clínicos

De las 100 cepas SELR recogidas para el estudio, se seleccionaron un total de 15 aislados en el año 2008, 27 en el año 2009, 39 en el año 2010 y 10 en el año 2011.

Los datos clínicos recogidos incluyen, el tipo de unidad en la que estuvieron ingresados los pacientes (UCI cardiovascular, UCI médico-quirúrgica, UCI Neuro-politrauma), la muestra en la que se aisló el SELR, el tipo de infección, el tratamiento antibiótico empleado, los días de tratamiento con linezolid y el antibiótico empleado para el tratamiento del episodio de infección por SELR. Todos estos datos fueron analizados mediante el programa estadístico SPSS. Los datos se muestran en la tabla 19.

Tabla 19. Datos clínicos obtenidos de los 100 pacientes incluidos en el estudio

SELR (n=100)	Infección (n=52)	Colonización (48)
Unidad		
UCI Cardiovascular	26 (50%)	18 (37.5%)
UCI Médico-Quirúrgica	23 (44.2%)	26 (54.1%)
UCI Neuro-politrauma	3 (5.7%)	4 (8.3%)
Estancia media en UCI		
	38	17
Muestra		
Hemocultivo	33 (63.4%)	3 (6.2%) obtenidos a través del catéter
Catéter	6 (11.5%)	18 (37.5%)
BAS/BAL	0	22 (45.8%)
Líquido corporal	8 (15.3%)	1 (2%) obtenido de un drenaje
Exudados	4 (7.6%)	4 (8.3%)
Orina	1 (1.9%)	0
Múltiples aislados por paciente		
	28 (53.8%)	4 (8.3%)
Intubación orotraqueal		
	48 (92.3%)	48 (100%)

Tabla 19. (Continuación) Datos clínicos obtenidos de los 100 pacientes incluidos en el estudio

SELR (n=100)	Infección (n=52)	Colonización (n=48)
2 o más catéteres centrales (arterial o venoso)	47 (90%)	42 (87.5%)
Infección por SELR		
Bacteriemia/Bacteriemia relacionada con el catéter	32 (61.5%)	0
Infección de herida quirúrgica	11 (21.1%)	0
Endocarditis	1 (1.9%)	0
Infección intraabdominal	3 (5.7%)	0
Infección del tracto urinario	1 (1.9%)	0
Meningitis	1 (1.9%)	0
Shock séptico	3 (5.7%)	0
Ninguna	0	48 (100%)
Terapia antibiótica previa		
Penicilinas con o sin penicilinasas	5 (9.6%)	3 (6.2%)
Cefalosporinas	3 (5.7%)	4 (8.3%)
Carbapenémicos	14 (27%)	11 (23%)
B-lactámicos + quinolonas ó aminoglicósidos	24 (46.1%)	26 (54.1%)
Otros	1 (1.9%)	1 (2%)
Linezolid	47 (90%)	28 (58.3%)
Duración del tratamiento con linezolid		
< 10 días	5 (10.6%)	6 (21.4%)
10-20 días	26 (55.3%)	12 (42.8%)
> 20 días	16 (34%)	10 (35.7%)
SELR (n=100)	Infección (n=52)	Colonización (n=48)
Tratamiento del episodio de infección por SELR		
Vancomicina	38 (73%)	
Tigeciclina	5 (9.6%)	
Daptomicina	9 (17.3%)	
Exitus	17 (32.6%)	10 (20.8%)

De los 100 aislamientos seleccionados, un 52% de los aislados pertenecen a pacientes que desarrollaron infección por este patógeno y un 48% en los que el aislado obedeció a una colonización, estando el paciente ingresado por otro proceso clínico, a veces infeccioso, pero por otro agente causal.

Distribución de pacientes

La UCI de nuestro hospital, se encuentra dividida en tres unidades especializadas: UCI cardiovascular, UCI médico-quirúrgica y UCI neuro-politrauma. La mayoría de los pacientes incluidos en el estudio, se encontraban en el momento de la infección o colonización por SELR en la UCI médico-quirúrgica, representado por el 49%, y en la UCI cardiovascular en la que se encontraban el 44% de los pacientes. Tan solo un 7% de los pacientes con aislados de SELR, estaban ingresados en la UCI neuro-politrauma (Figura 27).

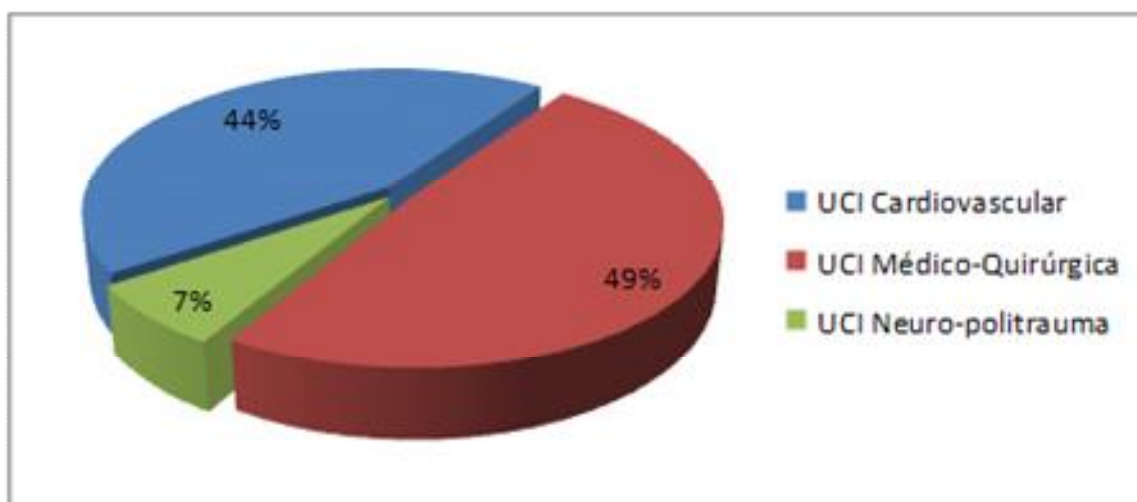


Figura 27. Distribución de los pacientes con aislados de SELR en las diferentes unidades de UCI del Hospital Clínico San Carlos -

Aislamiento múltiple

Para la realización de este estudio, se seleccionó un único aislado de SELR por sujeto, ya que en muchos casos se aisló más de una cepa por paciente, obtenida de diferentes muestras clínicas. En la figura 28, se muestran los pacientes en los que se aisló SELR en más de una muestra.

En total, en 31 pacientes de los 100 escogidos para el estudio, SELR fue aislado en más de una muestra clínica. Este fenómeno de aislamiento múltiple se produjo con mayor frecuencia en los pacientes que con posterioridad desarrollaron infección ($p=0,001$). Los perfiles clínicos al ingreso fueron similares en ambos grupos.

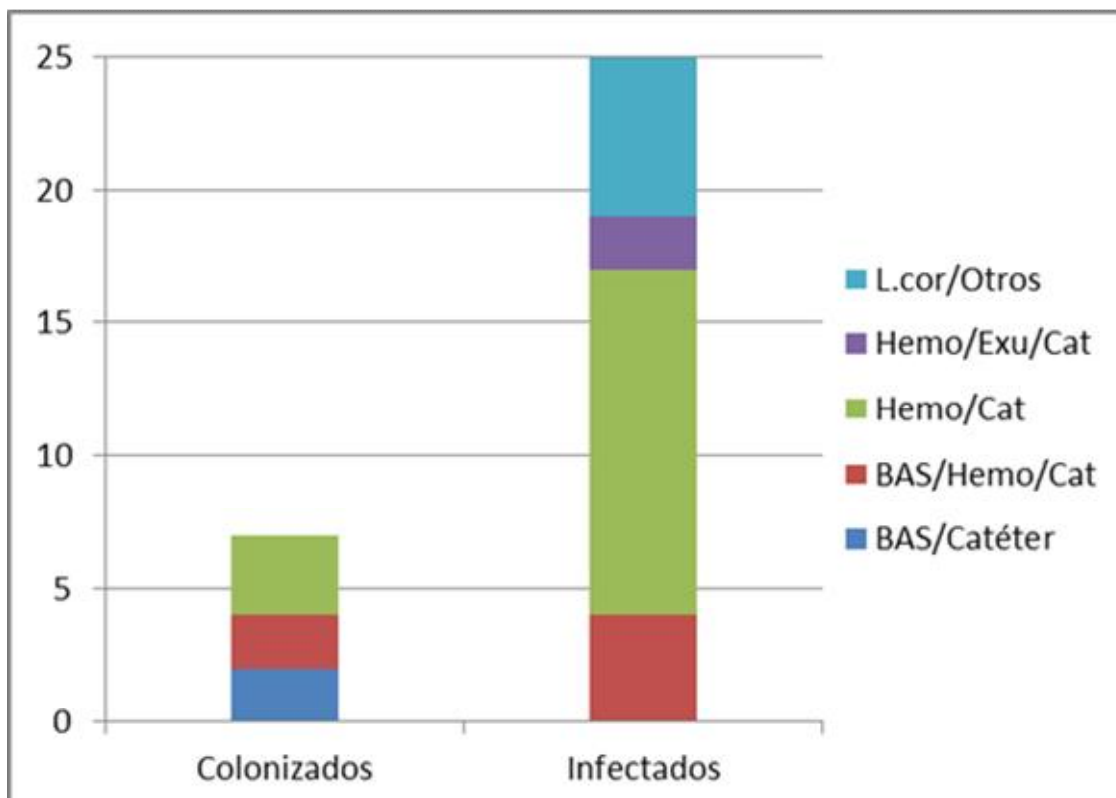


Figura 28. Relación de los 31 pacientes con más de un aislado de SELR. En la gráfica, se diferencian los pacientes que sólo estuvieron colonizados, y los que tuvieron infección causada por SELR

En los pacientes colonizados, los aislados se obtuvieron solo en muestras respiratorias, puntas de catéter o en un hemocultivo extraído a través de la vía colonizada por SELR.

Distribución de las muestras clínicas

Las principales muestras de las que se obtuvieron los aislados fueron hemocultivos, catéteres y broncoaspirados (BAS). En la figura 29, se muestra la distribución de las muestras en las que se aislaron SELR.

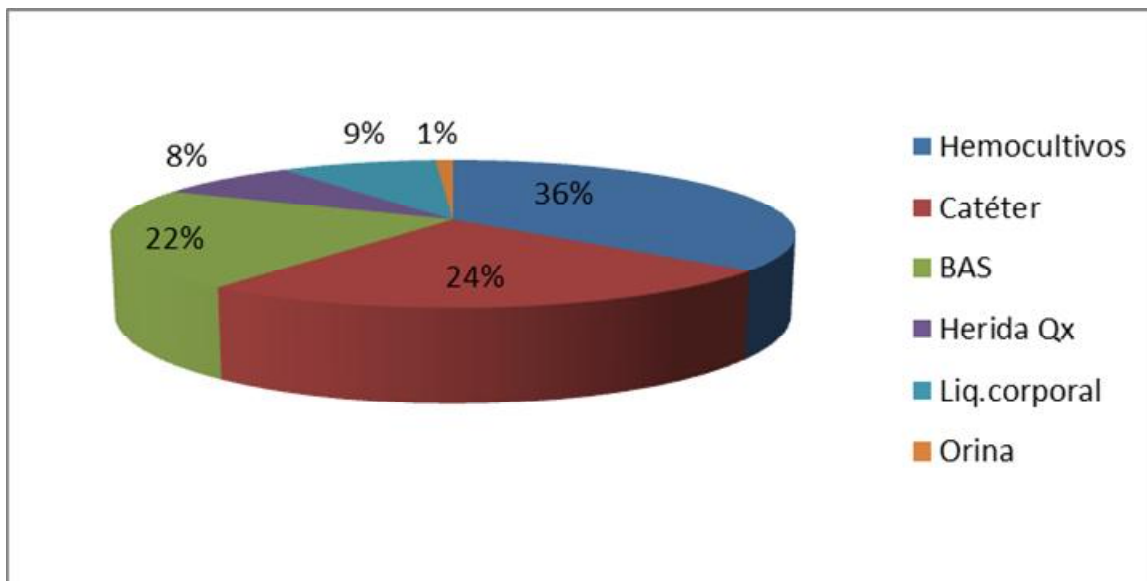


Figura 29. Distribución de las muestras clínicas de las que se aislaron las cepas de SALR

El 36% de las cepas de SALR aisladas en los 4 años se obtuvieron de hemocultivos, el 22% de los aislados se obtuvieron de BAS, un 22 % catéteres, un 9% de líquidos corporales, un 8% de exudados de herida quirúrgica, y un 1% se aisló en una muestra de orina. En la figura 30, observamos la distribución de las muestras en los 4 años del estudio.

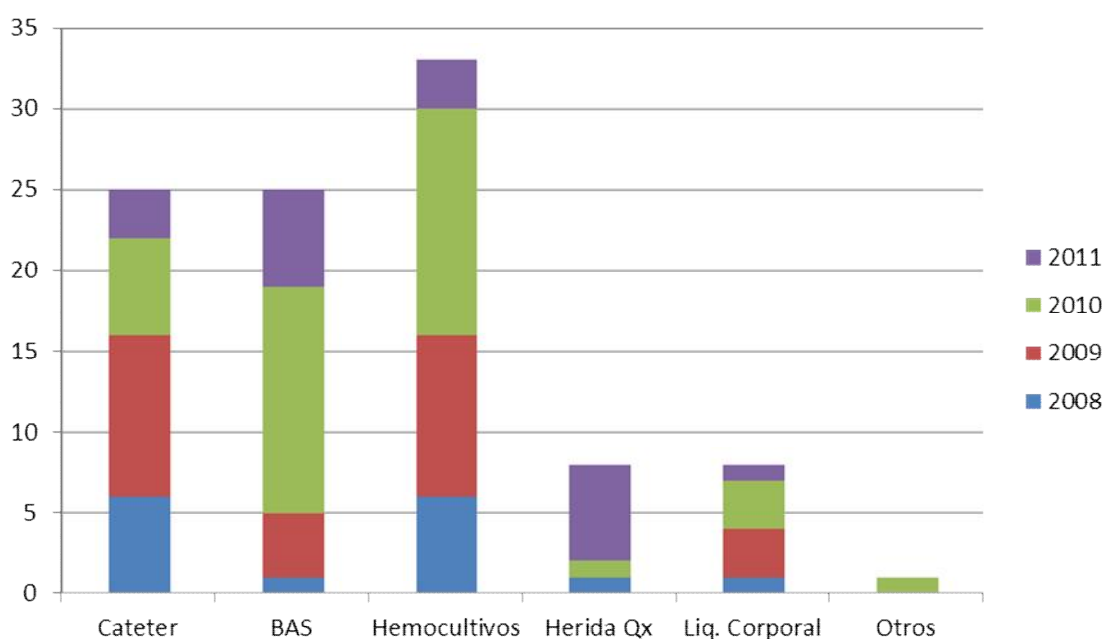


Figura 30. Distribución de los aislados estudiados en cada uno de los años, por tipo de muestra.

Distribución de los pacientes según el tipo de infección

Casi la totalidad de los pacientes estudiados estaban sometidos a intubación orotraqueal y tenían al menos 2 catéteres centrales en el momento del aislamiento.

La distribución de los pacientes según el tipo de infección se muestra en la figura 31. El cuadro clínico al que más se asoció el aislamiento de SELR fue la bacteriemia (65,1%), mayoritariamente relacionada con el catéter, llegando a desarrollar uno de los pacientes una endocarditis sobre válvula protésica. Hubo 3 aislamientos de SELR en muestras procedentes de hemocultivo sin cumplir criterios de bacteriemia (solo en un hemocultivo y extraído del catéter venoso central). El segundo grupo en frecuencia de aislamientos, con un 21,1% fue la infección de herida quirúrgica. En 6 de estos 11 pacientes con infección de herida quirúrgica, SELR fue el agente etiológico responsable de mediastinitis tras cirugía cardiotorácica. Los factores de riesgo de bacteriemia primaria o bacteriemia relacionada con el catéter, analizados en nuestra serie (más de un catéter central, empleo de antimicrobianos de amplio espectro durante el ingreso, estar sometido a ventilación mecánica y cirugía reciente) se repitieron tanto en el grupo de los colonizados como en el de los que presentaron infección.

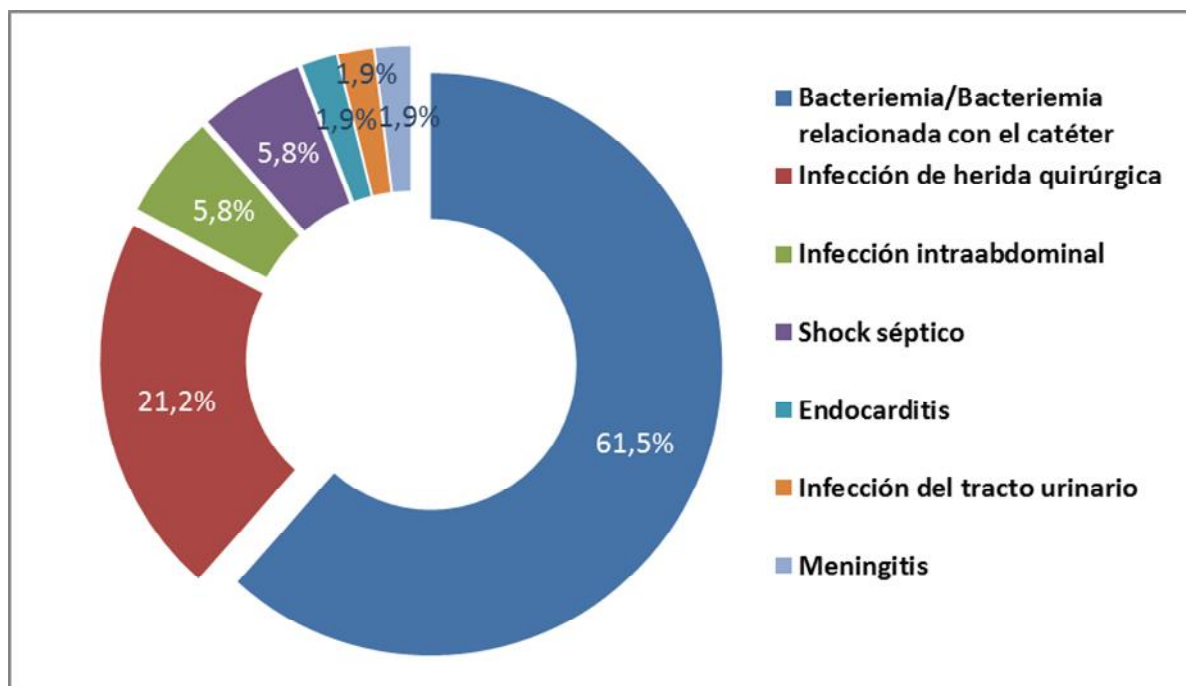


Figura 31. Distribución de los tipos de infección causadas por SELR

Tratamiento antibiótico

El 92% de los pacientes habían recibido tratamiento con antimicrobianos durante el ingreso y previo al aislamiento del SELR, en su mayoría combinaciones de un β -lactámico con una quinolona o un aminoglucosido o bien monoterapia con carbapenémicos.

El 58,3% de los pacientes colonizados y el 90% de los que presentaron infección por SELR habían recibido previamente al aislamiento tratamiento con linezolid ($p < 0,05$), no pudiéndose establecer una correlación entre el número de días previos de exposición al fármaco y el aislamiento del patógeno.

Un total de 25 pacientes, no recibieron tratamiento con linezolid. De estos 25 pacientes, 20 pertenecen al grupo de los colonizados por SELR. El tipo de infección causada por SELR en los 5 pacientes restantes que no recibieron tratamiento con linezolid, fue la bacteriemia en 4 de los casos, e infección del tracto urinario en el último de ellos.

El resto de pacientes del estudio, fueron tratados con linezolid. Agrupamos los pacientes, según los días de tratamiento con dicho antibiótico. Los tres periodos se establecen en menos de 10 días de tratamiento, de 10-20 días de tratamiento y más de 20 días de tratamiento. Todos los pacientes que recibieron tratamiento con linezolid en el periodo de estancia en UCI, tanto del grupo de los colonizados como de los que presentaban infección, se muestran en la figura 32.

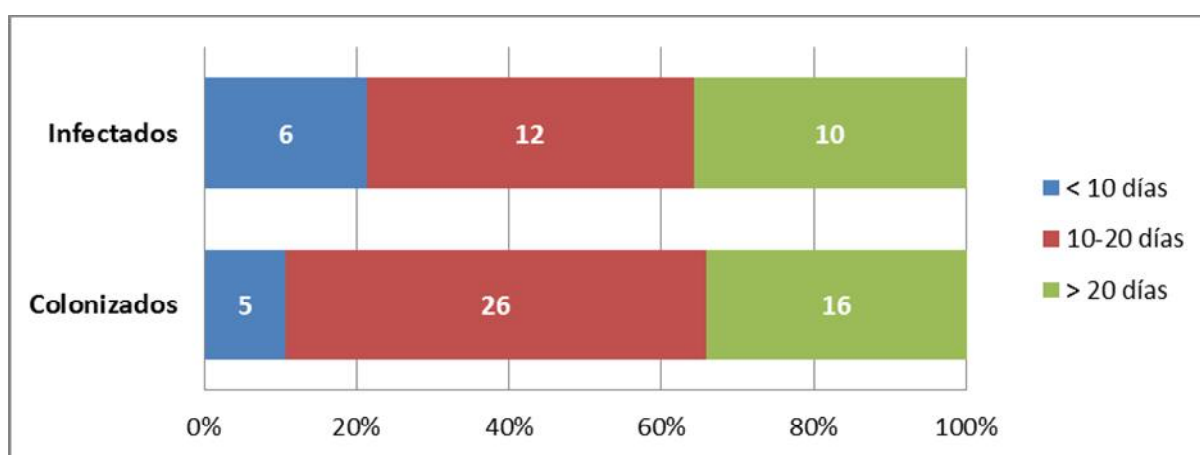


Figura 32. Distribución de los pacientes en estudio, agrupados en función de los días de tratamiento con linezolid

Vancomicina fue el antibiótico más utilizado como tratamiento en todos los modelos de infección por SELR (73%), seguido de daptomicina (17,3%) y tigeciclina (9,6%). Vancomicina fue el antibiótico empleado en un 81% de los casos con bacteriemia y en un 72% de los casos en los que la infección estaba relacionada con la herida quirúrgica. El único caso de endocarditis fue tratado con daptomicina. Tigeciclina fue el antibiótico menos empleado, utilizado en todos los casos de infección intraabdominal, y sólo en un caso de infección de herida quirúrgica y de shock séptico. Estos datos se muestran en la figura 33.

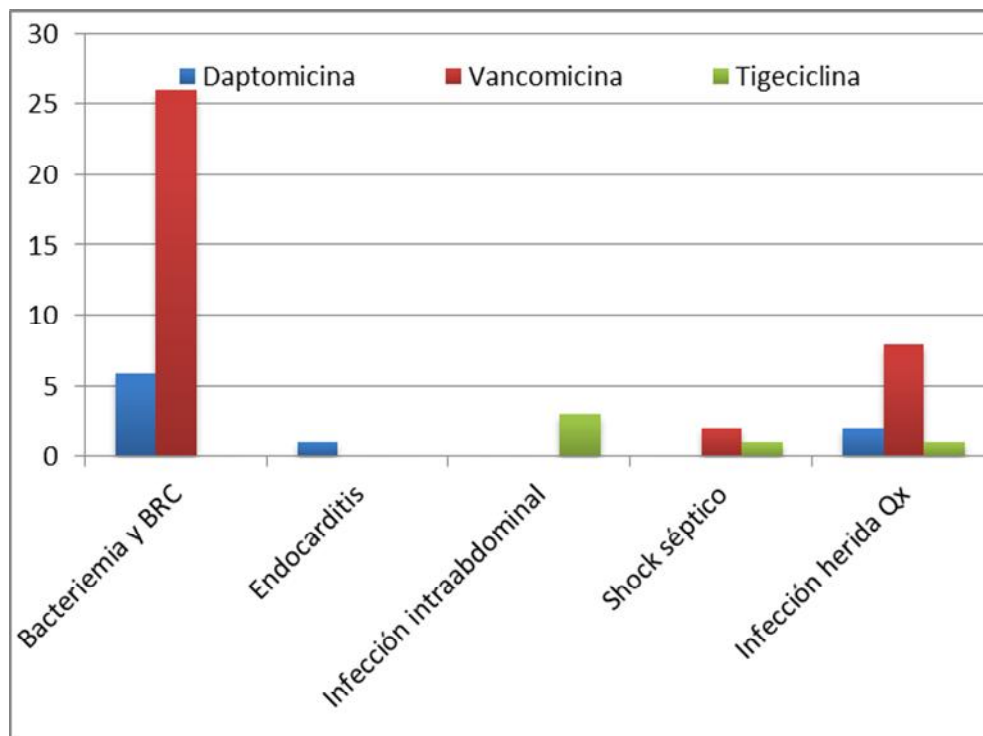


Figura 33. Tratamiento empleado en las diferentes infecciones causadas por SELR

Por último, destacar, que no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la mortalidad entre los dos grupos de pacientes, obteniéndose un 32.6 % en el grupo de los pacientes infectados por SELR y un 20.8%, en los pacientes colonizados.

Comparación de E-test y método de dilución en agar para la determinación de la resistencia a linezolid

Se seleccionaron todos los SELR mediante los métodos rutinarios empleados en el servicio de microbiología, de identificación y sensibilidad (WIDER y VITEK 2). Teniendo en cuenta que los resultados de CMI obtenidos por E-test son generalmente más bajos (principalmente cuando la resistencia está mediada por el gen *cfI*) y las CMIs pueden ser tan bajas como 1 o 2 µg/mL (sensibles), se compararon las CMIs obtenidas por el método de dilución en agar, con las CMIs obtenidas por el método de E-test. Los resultados de las cepas que presentaron discordancia entre los dos métodos de sensibilidad se muestran en la tabla 20.

Tabla 20. Comparación de la CMI a linezolid obtenida por E-test y por técnicas de dilución en agar en las cepas aisladas en los años 2008, 2009, 2010 y 2011

Año	Cepa	CMI E test µg/mL	CMI dilución agar µg/mL
2008	8	8	16
	11	8	32
2009	20	32	64
	24	≥256	128
	31	16	32
2010	38	16	32
	45	32	64
	49	32	64
	50	16	64
	54	32	64
	65	2	8
	67	32	64
	68	8	16
	69	8	16
	70	16	32
2011	72	32	16
	74	8	32
	75	2	8
	76	32	64
	77	2	8
	78	4	8
	79	≥256	128
	83	8	16
	91	4	8
	92	8	16
99	2	8	
100	16	64	

En total, 27 cepas presentaron discordancia de resultado entre ambos métodos. El resto de variaciones respecto a la CMI determinada por los dos métodos, no fueron significativas. Se obtuvieron un total de 16 cepas, con una variación de ± 1 dilución, por

lo que ambos métodos fueron concordantes. En 3 cepas se obtuvieron variaciones en un rango de ± 2 diluciones.

En el año 2010, se producen diferencias significativas. Tres de las cepas de SELR estudiadas, presentaron una CMI a linezolid de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, valor dentro del rango de sensibilidad para este antibiótico (sensible $\leq 4 \mu\text{g}/\text{mL}$), sin embargo, por el método de dilución en agar, se obtuvo una CMI a linezolid de 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en los tres casos. En un aislado, se obtuvo una CMI por E-test de 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y de 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por el método de dilución en agar. Aunque la variación es solo de una dilución, este aislado sería caracterizado como sensible por el método de E-test.

En el año 2011, se detectaron dos cepas sensibles a linezolid por el método de E-test, con CMIs de 2 y 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente, y con una CMI a linezolid de 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por el método de dilución en agar.

En la mayoría de los casos (con excepción de dos aislados, en los cuatro años), la CMIs obtenidas por E-test fueron menores.

Estudio de sensibilidad antibiótica

El estudio de sensibilidad a diferentes antimicrobianos se realizó también mediante técnicas de dilución en agar, con excepción de daptomicina y ceftarolina, cuyas CMIs se obtuvieron mediante el método de E-test.

Los resultados de las pruebas de sensibilidad frente a los distintos antimicrobianos se detallan en la tabla 21.

Tabla 21. Valores de CMI₅₀ y CMI₉₀ obtenidos para los 100 aislados de SELR incluidos en el estudio a los distintos antimicrobianos

Antibiótico	CMI ₅₀ µg/mL	CMI ₉₀ µg/mL	Rango CMI µg/mL	% resistentes
Linezolid	128	≥256	8-≥256	100%
Cloranfenicol	128	≥256	4-≥256	98%
Vancomicina	2	2	1-4	0
Teicoplanina	1	1	0.5-1	0
Clindamicina	≥256	≥256	0.5-≥256	98%
Tigeciclina	0.125	0.5	0.06-0.5	0
Daptomicina*	0.25	0.5	0.12-1	0
Ceftarolina**	1	1	0.5-1	0

*CMI determinada por el método de E-test **CMI determinada por el método de E-test en 68 aislados de SELR

Los puntos de corte utilizados para el estudio corresponden a los aconsejados por el CLSI [50] para todos los antimicrobianos, a excepción de tigeciclina. Al no especificarse en el CLSI los valores para este antimicrobiano, se adoptaron los aconsejados por el EUCAST [51].

Como se muestra en la tabla 21, el resultado de la CMI₉₀ a linezolid fue de ≥256 µg/mL. Estos valores, muestran una elevada resistencia a dicho antibiótico en nuestros aislados. En el caso de clindamicina y cloranfenicol, el porcentaje de resistentes fue del 98% en los dos casos, esta resistencia está relacionada en gran parte, con la presencia del gen *cfr* en nuestros aislados, pero en muchos casos, también están implicados otros mecanismos de resistencia.

Todas las cepas fueron sensibles a vancomicina, teicoplanina, daptomicina y tigeciclina. En 14 aislados se obtuvo una CMI de 4 µg/mL a vancomicina.

Los antimicrobianos que presentaron los valores de CMI más bajos en nuestros aislados fueron tigeciclina y daptomicina, obteniéndose valores de CMI de 0.06 µg/mL en el caso de tigeciclina y de 0.12 µg/mL para daptomicina.

Se realizó además, la sensibilidad a ceftarolina en 68 aislados de SELR seleccionados de las 100 cepas de SELR. El método empleado fue mediante tiras de E-test. De las cepas seleccionadas, 29 se aislaron de muestras de hemocultivos, 24 de catéteres, 9 de líquidos corporales y 6 de exudados de herida quirúrgica. Todas las cepas fueron sensibles a ceftarolina con valores de CMI que oscilaron entre 0.5-1 µg/mL.

4.3 Detección de mecanismos de resistencia a linezolid

Determinamos el mecanismo de resistencia a linezolid en todos los aislados estudiados. Se han descrito tres mecanismos de resistencia a linezolid: mutaciones nucleotídicas en el dominio V del ARNr 23S (gen *rrn*), la adquisición del gen *cfr*, mutaciones en los genes codifican las proteínas L3 y L4.

4.3.1 Detección del gen *cfr*

El gen *cfr* codifica la producción de una metiltransferasa ribosómica y que confiere resistencia a 5 clases de antimicrobianos (fenicoles, lincosamidas, oxazolidinonas, pleuromutilinas y estreptogramina A).

La amplificación de este gen, se realizó en todos los aislados, se detectó en un 57% de los aislados la presencia de este gen. El tamaño de la banda es de 746pb, en la figura 34 se muestran los resultados de la PCR para la detección del gen *cfr*, en un gel de electroforesis.

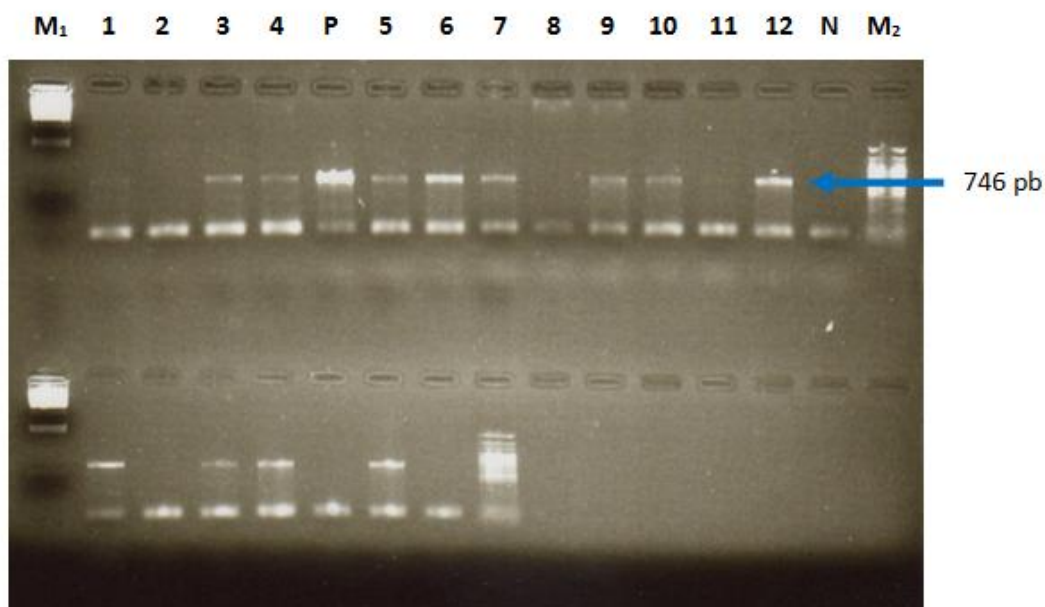


Figura 34. Productos de amplificación del gen *cfr* en gel de agarosa al 1% en aislados de SELR. M₁ y M₂ son marcadores de peso molecular, P hace referencia al control positivo que correspondía a una cepa de SAMRLR *cfr* positivo y N hace referencia al control negativo que correspondía al *S. aureus* ATCC 29213

El número de aislados de SELR portadores del gen *cfr* en el año 2008 fue de 9 cepas, lo que corresponde a un 60% de los aislados estudiados en este año. Los datos obtenidos en el año 2009, muestran un total de 12 cepas portadoras del gen *cfr*, lo que corresponde a un 44,4% de los aislados, fue el año en el que se obtuvo el porcentaje más bajo de aislados de SELR portadores del gen *cfr*. En el año 2010 el total de cepas portadoras del gen *cfr* fue de un 51 % y en el año 2011 se detectó la presencia de dicho gen en un 90% de las cepas estudiadas. Los resultados se muestran en la figura 35.

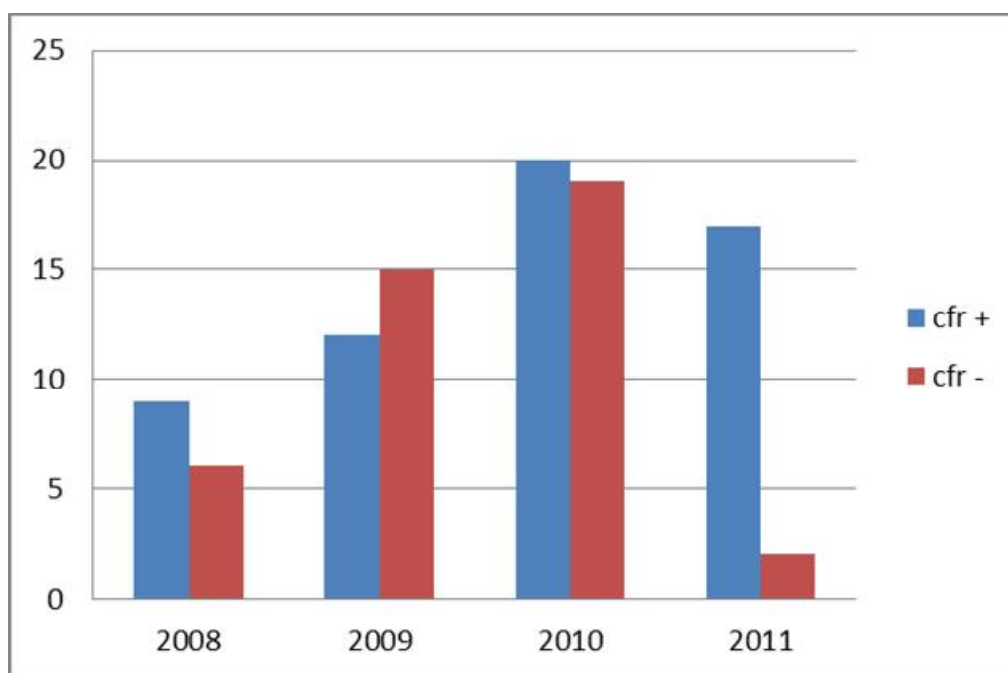


Figura 35. Distribución de los aislados de SELR portadores del gen *cfr* en los cuatro años del estudio

4.3.2 Detección de mutaciones nucleotídicas en el dominio V del ARNr 23S

Las mutaciones en el ARNr es el mecanismo de resistencia más frecuente a linezolid. Los *Staphylococcus sp.* suelen tener un número de copias del gen ARNr que oscila entre 5 y 6 copias, los niveles de resistencia aumentan en función del número de copias del gen ARNr 23S afectadas.

Amplificación de las copias de ARNr

Realizamos la amplificación de las 5 copias del ARNr en cada uno de los 100 aislados de SELR incluidos en el estudio. La región amplificada tiene un tamaño de 5.5 a 6.5 kb. Una vez obtenida la amplificación de las 5 copias del ARNr, amplificamos mediante la realización de una PCR anidada, el dominio V del ARNr 23S, en cada una de ellas. En esta región, se producen las mutaciones relacionadas con la resistencia a linezolid. Los resultados obtenidos, se muestran en las figuras 36 y 37 respectivamente.

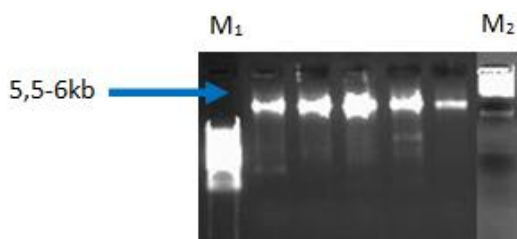


Figura 36. Amplificación del ARNr-5 en aislados de SELR

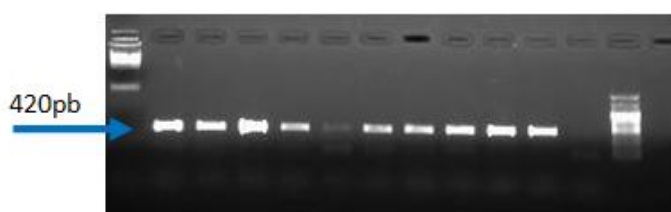


Figura 37. Amplificación del dominio V en aislados de SELR, tras la realización de la PCR anidada

En la figura 36, se observan bandas de gran tamaño que corresponden a las copias del ARNr, concretamente en esta imagen, a las correspondientes al ARNr-5, obtenidas en 5 aislados de SELR. El tamaño de las bandas oscila entre 5,5 kb y 6kb en nuestro caso. Los marcadores de peso molecular empleados se muestran en la figura 36 como M₁ y M₂.

En la figura 37, se muestra la amplificación del dominio V. El tamaño de la región amplificada es de 420 pares de bases, posteriormente, tras la amplificación de esta región, se realiza la secuenciación del dominio V para detectar mutaciones.

De las 100 cepas estudiadas, 72 presentaron mutaciones en el dominio V de la subunidad 23S del ribosoma. La única mutación encontrada en todos los aislados fue la G2576T. En un total de 22 cepas, de los 72 aislados que presentaron la mutación - G2576T, este fue el único mecanismo de resistencia a linezolid encontrado. En 44 aislados, la mutación G2576T, se combinó con la presencia del gen *cfr*.

En función del número de copias de ARNr mutadas la resistencia a linezolid es variable. Generalmente, a partir de la primera mutación, las mutaciones sucesivas en otros alelos se adquieren rápidamente mediante intervención de la recombinación homóloga.

En la figura 38, se muestra la relación entre el número de copias de ARNr mutadas por cada cepa, y la CMI a linezolid obtenida en cada una de ellas.

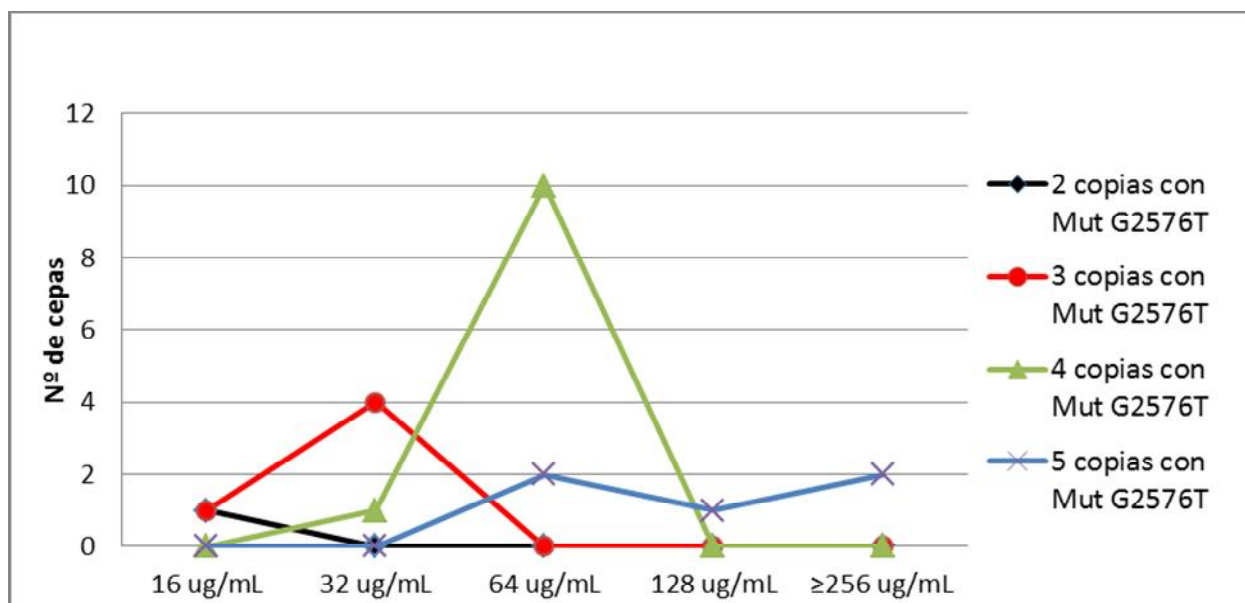


Figura 38. Relación del número de copias de ARNr con mutación G2576T y las CMI a linezolid

Podemos observar en la figura 38, que las CMI a linezolid más elevadas, se correspondieron con el mayor número de copias de ARNr mutadas. Todas las cepas con CMI a partir de 64 $\mu\text{g/mL}$ presentaron de 4-5 copias de ARNr con la mutación G2576T.

Se encontró solo un aislado con una CMI a linezolid de 16 $\mu\text{g/mL}$ y que portaba únicamente 2 copias del ARNr mutadas.

Con estos datos, podemos afirmar que existe una relación entre los valores de CMI obtenidos para linezolid, y la cantidad de copias de ARNr mutadas en cada una de las cepas.

4.3.3 Detección de mutaciones en proteínas ribosomales

Las mutaciones en los genes que codifican las proteínas L3 y L4 de la subunidad ribosómica 50S, están codificadas por los genes *rplC* y *rplD* respectivamente. La presencia de estas mutaciones suele ser poco frecuente y proporcionan una resistencia de bajo nivel a linezolid.

Mutaciones en L3

Los resultados obtenidos fueron, que un total de 15 aislados, presentaron la mutación Gly152Asp en la proteína ribosomal L3, como único mecanismo de resistencia a linezolid. Los resultados obtenidos, muestran una asociación de la mutación Gly152Asp con la presencia del gen *cfr* en 4 cepas y la asociación con la mutación G2576T en 5 cepas.

Todos los aislados, presentaron además la mutación L101V en la proteína L3, dicha mutación, no afecta a la resistencia de este antibiótico.

Mutaciones en L4

Sólo se observó la mutación en la proteína ribosomal L4 Asn158Ser, esta mutación, solo se encontró en tres aislados. Los tres, presentaban además la mutación en L3 Gly152Asp.

Se secuenció además, el gen *rlpV*, que corresponde a la proteína ribosomal L22. No se encontraron mutaciones en ninguno de los aislados.

Mecanismos de resistencia en los pacientes colonizados e infectados

En la figura 39, se muestra la distribución de los tres mecanismos de resistencia entre los dos grupos de pacientes. Un 46% de los aislados, presentaron resistencia a linezolid causada por un único mecanismo de resistencia.

Un 54% de los aislados, presentaron resistencia a linezolid por combinación de dos mecanismos de resistencia. Tan solo en una cepa, se detectaron los tres mecanismos. La asociación más frecuente, fue la mutación en el dominio V G25756T con el gen *cfr*,

confiriéndole a los aislados valores elevados de CMI a linezolid, siendo estas en la mayor parte de los casos de $\geq 256 \mu\text{g/mL}$. En la figura 40, se muestra la asociación de los mecanismos de resistencia en los aislados obtenidos de pacientes infectados y colonizados.

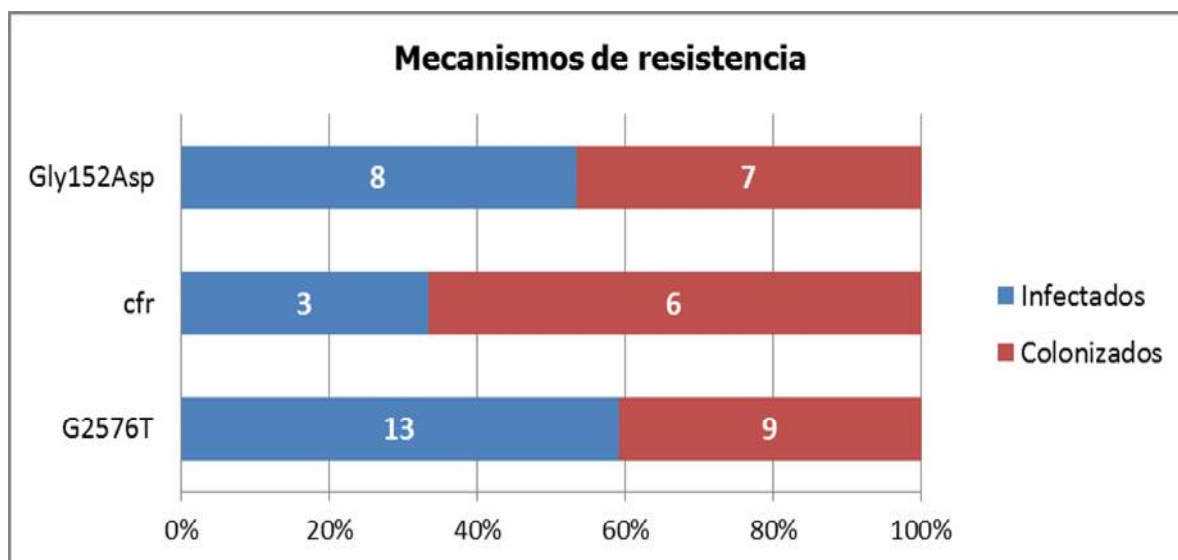


Figura 39. Distribución de los mecanismos de resistencia en los pacientes infectados y colonizados por SELR -

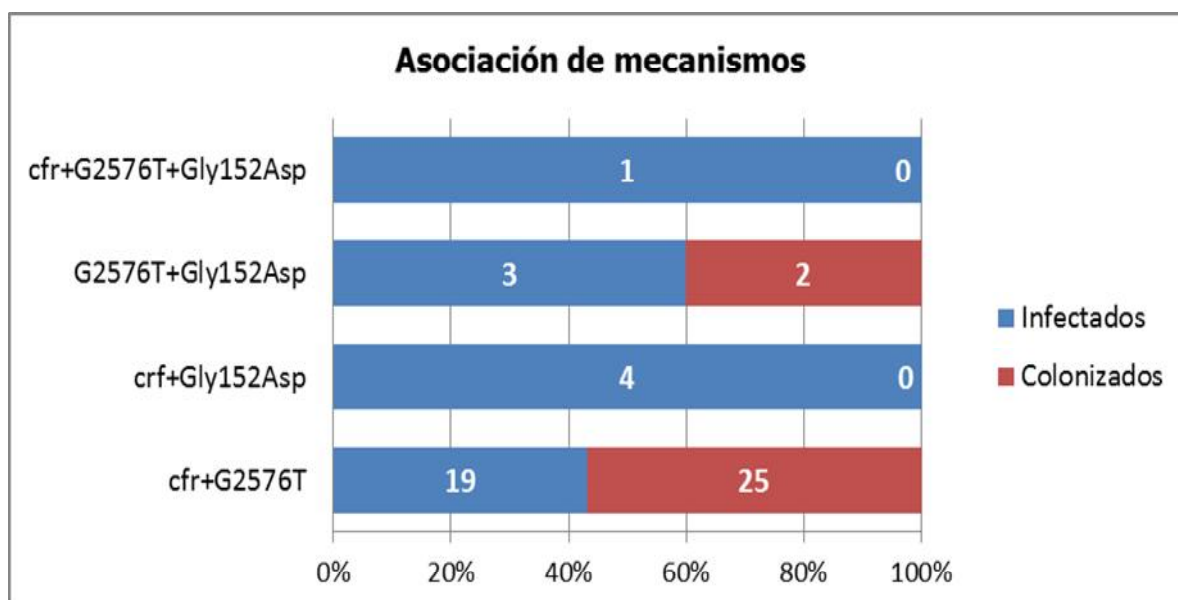


Figura 40. Asociación de los mecanismos de resistencia a linezolid en los pacientes infectados y colonizados por SELR

Podemos observar en la figura 40, que la asociación de mecanismos de resistencia causada por la presencia del gen *cfrr* y la mutación G2576T, es prácticamente similar en los dos grupos de pacientes, siendo superior en 6 de los casos obtenidos en el grupo de pacientes colonizados. El resto de las diferentes asociaciones de mecanismos de resistencia a linezolid, son más predominantes en los pacientes que padecieron infección por SELR, que en los pacientes colonizados.

Relación entre mecanismos de resistencia y días de tratamiento con linezolid

Con los resultados obtenidos, se estableció una relación entre los días de tratamiento con linezolid, y los diferentes mecanismos de resistencia que presentaron los aislados de SELR en los distintos pacientes.

La aparición de determinados mecanismos de resistencia, está relacionada con el tiempo de tratamiento con linezolid. La mutación ribosómica G2576T, aparece frecuentemente en aislados de pacientes que han recibido tratamientos prolongados con linezolid. La presencia del gen *cfrr*, también está influida por los tratamientos prolongados con este antibiótico, pero la característica más importante de este mecanismo de resistencia, es su capacidad de transmisión horizontal, debido a que puede ir en transposones o plásmidos. Por lo que es posible, la presencia de este gen en aislados de pacientes que no hayan recibido tratamiento con linezolid.

Los datos que relacionan los días de tratamiento con linezolid y los diferentes mecanismos de resistencia detectados en los aislados de SELR, se muestran en la figura 41 y 42.

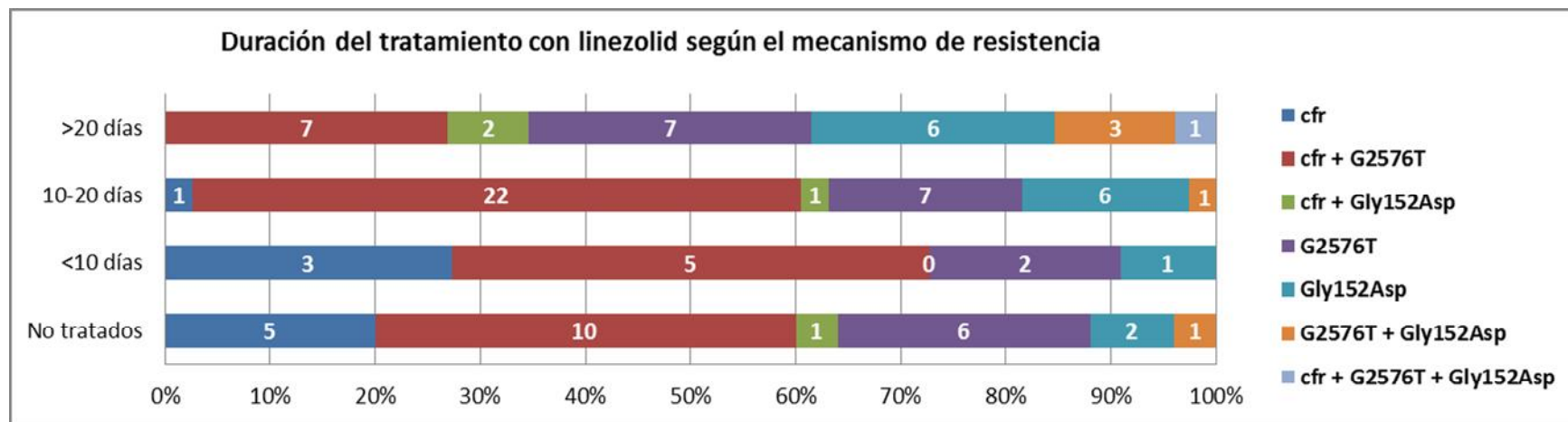


Figura 41 y 42. Distribución de los pacientes en función de los días que fueron tratados con linezolid y los mecanismos de resistencia encontrados en los aislados de SELR -



En ambas figuras podemos observar que de los 100 pacientes estudiados, un total de 75, recibieron tratamiento con linezolid, 11 pacientes recibieron tratamiento de menos de diez días, 38 recibieron tratamiento durante 10-20 días y 26 recibieron tratamiento por un periodo de más de 20 días. Nos encontramos con todos los tipos de mecanismos de resistencia estudiados y las diferentes asociaciones, en los tres grupos de tratamiento, así como en los 25 pacientes restantes, que no recibieron terapia antibiótica con linezolid.

El mecanismo de resistencia más frecuente en nuestros aislados, es la mutación G2576T en combinación con el gen *cfrr*, y como podemos observar en ambas figuras (41 y 42), 22 cepas de SELR, aisladas de los pacientes que recibieron tratamiento con linezolid de 10-20 días, 7 cepas aisladas de los pacientes tratados más de 20 días, y 5 de los tratados menos de 10 días presentaron este modelo de resistencia. La asociación de estos dos mecanismos, también se presentó, en 10 de los aislados de SELR obtenidos de los pacientes no tratados.

La mutación ribosómica G2576T como único mecanismo de resistencia o en combinación con la mutación Gly152Asp en L3, se encontró en 10 aislados de pacientes tratados más de 20 días con linezolid, en 8 aislados de pacientes tratados de 10-20 días y en 7 de los pacientes que no habían recibido tratamiento con linezolid.

El gen *cfrr*, se encontró como único mecanismo de resistencia, únicamente en un aislado de un paciente que recibió de 10 a 20 días de tratamiento, en 3 aislados de SELR de pacientes tratados menos de 10 días y en 5 aislados de pacientes no tratados. No se encontró ninguna cepa de SELR, con el gen *cfrr* como único mecanismo de resistencia en el grupo de pacientes tratados más de 20 días con linezolid.

Los pacientes que recibieron tratamiento con linezolid, durante más días, presentan con más frecuencia, aislados de SELR con mutaciones ribosómicas, como único mecanismo de resistencia o en combinación con el gen *cfrr*.

La presencia del gen *cfrr*, es de gran importancia en nuestras cepas de SELR estudiadas, puesto que un 58% de las 100 cepas estudiadas, eran portadoras del gen. Es único mecanismo de resistencia a linezolid transmisible, y los aislados con dicho mecanismo son importantes causantes de brotes, especialmente, en las unidades de cuidados intensivos.

En la tabla 22, se resumen, los resultados principales del estudio, en los que se incluyen el mecanismo de resistencia encontrado en cada aislado, los días de tratamiento que recibió el paciente en el que se aisló la cepa de SELR, y las CMIs obtenidas a cada antibiótico, con especial interés, en los antibióticos empleados en los tratamientos de las infecciones causadas por SELR.

Resultados

Tabla 22. Resultados principales del estudio en los que se describen las CMIs a los distintos antibióticos, los mecanismos de resistencia y los días de tratamiento

Mecanismo de resistencia	Aislados de SELR 2008-2011	No tratados (25)	Días de tratamiento con linezolid			Rango CMI (µg/mL)					
			<10 (11)	10-20 (n=38)	>20 (n=26)	Linezolid	Clindamicina	Cloranfenicol	Vancomicina	Tigeciclina	Daptomicina
Gen <i>cfr</i>	9	5 (20%)	3 (27.2%)	1 (2.6%)	0	2-8	>256	128->256	1-4	0.06-0.5	0.12-0.5
<i>cfr</i> + mutación en dominio V (G2576T)	44	10 (40%)	5 (45.4%)	22 (57.9%)	7 (26.9%)	>256	>256	128->256	1-4	0.06-0.5	0.12-1
Gen <i>cfr</i> + mutación en L3 (Gly152Asp)	4	1 (4%)	0	1 (2.6%)	2 (7.7%)	8-16	>256	>256	2	0.12-0.25	0.25-0.5
Mutación en dominio V G2576T	22	6 (24%)	2 (18.1%)	7 (18.4%)	7(26.9%)	16-64	0,5->256	8->256	1-4	0.06-0.5	0.12-1
Mutación en protein L3 (Gly152Asp)	15	2 (8%)	1 (9%)	6 (15.7%)	6 (23%)	8	2->256	4->256	1-4	0.06-0.25	0.12-1
Mutación en dominioV (G2576T) + mutación L3 (Gly152Asp)	5	1 (4%)	0	1 (2.6%)	3(11.5%)	64->256	>256	128->256	1-2	0.12-0.5	0.25-1
Gen <i>cfr</i> + mutación en L3 + mutación dominio V (G2576T)	1	0	0	0	1 (3.8%)	>256	>256	>256	2	0.5	0.5

DISCUSIÓN -

VII. Discusión

Staphylococcus aureus meticilin resistente (SAMR) es uno de los principales patógenos implicados en infecciones hospitalarias. Tiene una gran capacidad para desarrollar resistencias, por eso, siempre debemos controlar la presencia de este microorganismo, especialmente, en las Unidades de Cuidados Intensivos. En España, la resistencia a la meticilina en SCN y *S. aureus* en cepas identificadas en unidades de cuidados intensivos (UCI) es de alrededor del 80 y del 30%, respectivamente [48,49]. La caracterización de los clones circulantes así como el conocimiento de la epidemiología local resultan de gran importancia para el correcto manejo de los pacientes infectados.

De acuerdo con esto, y previamente a la aparición del brote de SAMR linezolid resistente en nuestro centro, realizamos un estudio para identificar los principales grupos clonales circulantes en nuestro hospital, identificando un clon de SAMR predominante en la UCI. Todas las cepas incluidas en este clon mayoritario, resultaron susceptibles a todos los antibióticos de amplio espectro frente a microorganismos gram positivos.

Los antibióticos de amplio espectro, más empleados en la actualidad, para las infecciones causadas por este patógeno, incluyen linezolid, tigeciclina y daptomicina, y más recientemente ceftarolina. El linezolid, fue el antibiótico anti grampositivos multirresistentes más utilizado en las 167 UCIs participantes en el programa de vigilancia ENVIN-HELICS en 2011 [48]. El elevado consumo de linezolid, no solamente en los servicios de UCI en España, se debe principalmente a su actividad frente a microorganismos resistentes a la vancomicina, muy prevalente en *E. faecium* en Estados Unidos [55], y en algunos países europeos [56], y frente a *S. aureus* y SCN resistentes a meticilina, presente en porcentajes elevados en muchos países [56]. El otro aspecto que contribuye al frecuente empleo del linezolid es seguramente su buen perfil de seguridad en ciclos inferiores a 2 semanas comparado con el de la vancomicina. Estas circunstancias lo han convertido en la principal opción terapéutica frente a estas

bacterias y, en consecuencia, predeciblemente, han aumentado el riesgo de aparición de cepas resistentes [57].

En la actualidad, los datos obtenidos en EEUU y en los estudios de vigilancia a nivel mundial, nos muestran, que existe una resistencia a linezolid de un 1% en *S.aureus*, y de un 2% en SCN [42]. Presentamos en nuestro centro el primer brote causado por SAMR resistente a linezolid. Se aisló SAMR linezolid resistente en 15 pacientes (12 pertenecientes a la UCI). El análisis mediante PFGE de todos los aislados clínicos, además de una cepa de SAMR linezolid resistente obtenida de una muestra ambiental, nos mostró que la mayoría de las cepas estaban relacionadas genéticamente. Se diferencian 4 clones principales, el clon A, en el que se incluyen los aislados obtenidos de 11 pacientes ingresados en la UCI, el clon B que se obtuvo de una muestra ambiental de UCI, el clon C que se obtuvo de un paciente ingresado en UCI y también implicado en el brote, y por último el clon D, que se aisló de un paciente ingresado en otro servicio del hospital y que no pertenecía al brote [31,58]. Realizamos además, un análisis clonal mediante MLST, de 4 aislados de SAMR resistentes a linezolid, uno de cada clon obtenido por PFGE. La cepas pertenecientes al clon A y clon B, se incluyeron en el ST125-SARM, y las cepas pertenecientes al clon C y D respectivamente, se incluyeron en el ST228-SAMR.

En los años sesenta, el genotipo ancestral ST-250-SAMR, originario en Dinamarca, era el más frecuente y surgió como consecuencia de la adquisición del gen *mec* por un aislado sensible a meticilina (ST-250-SAMS), que a su vez surgió del ST8-SAMS. Posteriormente, este clon casi desapareció y fue sustituido por el clon Ibérico ST247-SAMR-I, que evolucionó a partir del ST250-SAMR por una mutación puntual, y fue una importante causa de infección nosocomial en muchos países de Europa y algunos hospitales de Estados Unidos. En España, antes de 1996, el clon Ibérico era el predominante, pero disminuyó de 1996 a 1998 al tiempo que se observó un aumento de otro clon distinto el ST228-SAMR-I con una frecuencia del 23,3%. El clon Ibérico, fue reemplazado en años posteriores también por la aparición de otros clones como el ST36-SAMR-II, muy frecuente en el Reino Unido, pero sobre todo, fue reemplazado por el clon ST125-SAMR-IV, que actualmente es el responsable de aproximadamente el 50% de los casos de infección por SAMR en nuestros hospitales, y el más frecuente en nuestro entorno [11,12].

Por lo tanto, nuestros datos, se corresponden con los datos descritos en la actualidad, ya que los clones obtenidos, son frecuentemente aislados en los hospitales de nuestro país.

Los resultados obtenidos del genotipado, muestran que la aparición de la resistencia en los diferentes aislados, se produce por dos vías distintas. Por un lado, la transmisión de una cepa resistente (grupo clonal A) entre pacientes que habían recibido antimicrobianos de amplio espectro, y la transmisión horizontal entre cepas de SAMR, ya que la resistencia a linezolid se detectó en diferentes clones. Estos datos, nos llevan a pensar además en la existencia de un mecanismo de resistencia mediado por plásmidos, como el ya descrito gen *cfr* [29,30]. Todos los aislados de SELR de nuestro estudio eran portadores del gen *cfr*. La presencia del gen *cfr* en un plásmido, se describió por primera vez en una cepa bovina de *Staphylococcus sciuri* [29]. Posteriormente, se describió la presencia del gen *cfr* en un plásmido en *S. aureus* de origen animal. En 2007, Toh et al [59] informó de la primer aislado clínico de SAMR resistente a linezolid, cuya resistencia estaba mediada por la presencia del *cfr*. En el año 2008, se describieron en EEUU dos nuevos casos de resistencia a linezolid mediada por el gen *cfr*, en aislamientos clínicos de *S. epidermidis* y *S. aureus* [60]. En aislados humanos, a diferencia de los aislados de origen animal, el gen *cfr* se había encontrado únicamente integrado en el genoma, pero probablemente fue parte de un plásmido integrado que era potencialmente capaz de la escisión y la movilización. Por lo tanto, es posible la transmisión horizontal, además, las especies de SCN se pueden convertir en un reservorio para esta resistencia. Este modo de transmisión, es más difícil de prevenir que la propagación de origen nosocomial, que se controla con las medidas estándar, como el aislamiento, las precauciones de barrera y la restricción de antibióticos.

La primera aparición de resistencia, se detectó mediante estudios in vitro, esta resistencia era producida por mutaciones ribosómicas en el dominio V de la subunidad 23S. En aislados clínicos la mutación más frecuente es la G2576T, aunque en la actualidad, se han descrito algunas otras como la T2500 en *S. aureus* [27] o T2504A en *S. epidermidis* [61]. Además in vitro se han descrito una gran variedad de mutaciones en el dominio V del ARNr 23S en *S. aureus*, como C2192T, G2447T, A2503G, T2504C, G2505A and G2766T [28].

En nuestro estudio, todas las cepas de SAMR resistentes a linezolid aisladas en el periodo estudiado (incluyendo las tres no implicadas en el brote), presentaron como

único mecanismo de resistencia la presencia del gen *cfrr*, no encontrándose en ningún caso mutaciones ribosómicas en el dominio V. Posteriormente, en un estudio se determinó, que además de la presencia del gen *cfrr* existían mutaciones en la proteína ribosomal L3 en nuestros aislados [35]. Concretamente, se estudio una cepa correspondiente al clon A detectándose la mutación Δ Ser145/His146Tyr, y una cepa correspondiente al clon D donde se encontró la mutación Δ Met169-Gly174. En la cepa estudiada correspondiente al clon C, no se detectaron mutaciones en la proteína L3. Posterior a este estudio, se han publicado múltiples trabajos, en los que aparecen mutaciones en las proteínas L3 y L4, tanto en *S. aureus* como en SCN resistentes a linezolid [62,63,64].

Por todo lo descrito hasta ahora, una vez concluido el brote transcurrido en la UCI de nuestro hospital, nos planteamos como objetivo el seguimiento y caracterización de los aislados de SCN resistentes a linezolid, obtenidos de pacientes ingresados en este servicio. Nuestro estudio, se centra principalmente en aislados de *S. epidermidis*, puesto que es la especie más frecuentemente aislada dentro de grupo de los SCN.

Los datos obtenidos, en los cuatro años de estudio, muestran un porcentaje global de SCN resistentes a linezolid en el Hospital Clínico San Carlos, en torno al 4 %. En el año 2008, los datos fueron de un 2,3 % y partir de ese año, sufrieron un incremento progresivo hasta el año 2011, donde las cifras comienzan a disminuir de nuevo. El programa de vigilancia LEADER de los hospitales norteamericanos recoge un incremento de resistencia a linezolid en SCN del 0,2% en 2004 al 1,63% en 2008 [65] con pequeñas variaciones interestatales. En el estudio presentado por Koskova et al. Se muestra un incremento de SCN resistentes a linezolid en su centro que va de un 0,9 a un 3% de 2006 a 2007 [66]. En otro estudio, presentado por Mulanovich, se muestra un incremento de un 0,6 al 5,5 % de 2007 a 2009 en Texas [67].

S. epidermidis, constituye en la actualidad, un patógeno oportunista importante ya que se ha identificado como la causa más frecuente de las infecciones relacionadas con dispositivos (catéteres, prótesis, etc), cada vez más empleados en el ámbito hospitalario y en especial en pacientes ingresados en las unidades de críticos.

El porcentaje de resistencia a meticilina en *S. epidermidis* oscila globalmente en torno al 80% [36]. En España, y según datos del seguimiento en unidades de críticos ENVIN-

HELICS 2011 *S epidermidis* se aisló en un 5,8% de todas las muestras significativas de infección en las UCIs Españolas, elevándose a más del 6,3 % en estancias superiores a 7 día [48]. Esto ha abocado al mayor empleo de vancomicina y de linezolid. La frecuencia en los aislamientos de SELR en nuestra UCI aumentó progresivamente entre los años 2008 y 2010 del 6% al 25%, descendiendo en el año 2011 al 20%. En España, el citado estudio ENVIN-HELICS muestra un incremento de resistencia a linezolid del 4,8% en 2008 al 24% en 2010, para descender al 18,3% en 2011, datos similares a los encontrados en nuestra serie, obteniendo en nuestro estudio un porcentaje de 6,5% en 2008, que se eleva en 2010 al 25% y sufre una disminución a partir del año 2011 al 21%.

La mayoría de los casos de nuestra serie en los que el aislamiento de SELR fue causa de infección sucedieron en el contexto de bacteriemia, seguidos de infección de herida quirúrgica. El 95 % de las bacteriemias primarias o relacionadas con el catéter, en los que *S. epidermidis* representa con mucho el primer agente etiológico, aparecen a partir del cuarto día de estancia en UCI, incrementando la probabilidad de aparición a medida que aumenta la estancia media [48,68] y nuestros pacientes presentaron una mediana de estancia más prolongada. Los factores de riesgo de bacteriemia primaria o bacteriemia relacionada con el catéter, analizados en nuestra serie (más de un catéter central, empleo de antimicrobianos de amplio espectro durante el ingreso, estar sometido a ventilación mecánica y cirugía reciente) se repitieron tanto en el grupo de los colonizados como en el de los que presentaron infección. Aunque todos los aislados de hemocultivos cumplieron los criterios del CDC de bacteriemia significativa [69] recientemente en un estudio realizado por Rahkonen, se muestra la dificultad para distinguir incluso en estos casos la colonización de la infección, ya que no encuentran diferencias clínicas ni bioquímicas entre los pacientes con hemocultivos positivos considerados como colonizados y aquellos considerados portadores de infección [70]. La tendencia es a tratar a los pacientes de la bacteriemia, y así se hizo en nuestros pacientes, para evitar el riesgo de embolismo séptico, como le sucedió a uno de nuestros pacientes que desarrolló una endocarditis.

Los antimicrobianos utilizados principalmente para las infecciones causadas por microorganismos gram positivos multirresistentes son vancomicina, teicoplanina, linezolid, tigeciclina y daptomicina. Los glucopéptidos, esencialmente vancomicina, han

sido considerados tradicionalmente tratamiento de elección. Los estafilococos en general mantienen una elevada sensibilidad a los glucopéptidos de manera que lo más frecuente es que sean sensibles a la vancomicina y a la teicoplanina. Sin embargo, existen cepas con sensibilidad disminuida a ambos antimicrobianos, tanto entre *S. aureus* como entre las diferentes especies de SCN. Por este motivo, en los últimos años, se ha abierto un gran debate al comprobar cifras elevadas de fracasos terapéuticos en situaciones en las que los aislados de SARM presentaban valores de CMI $\geq 1,5$ $\mu\text{g/mL}$, sobre todo cuando se comparan con los que se producen con aislados con valores de CMI de vancomicina ≤ 1 $\mu\text{g/mL}$ [71,72].

En el primer caso, aun ajustando el tratamiento con vancomicina a valores valle de 15 a 20 $\mu\text{g/mL}$, se produce un porcentaje elevado de fracasos tras el tratamiento con vancomicina. Estos datos, han provocado, en muchos casos, el aumento en el uso de antimicrobianos de amplio espectro como linezolid, tigeciclina o daptomicina para el tratamiento de estas infecciones [73,74].

En los aislados de SELR incluidos en nuestro trabajo, realizamos un estudio de sensibilidad a vancomicina, linezolid, tigeciclina y daptomicina.

Todos nuestros aislados, fueron sensibles a vancomicina, tigeciclina y daptomicina En la actualidad, la resistencia a tigeciclina y daptomicina por microorganismos gram positivos es rara o poco frecuente. En el estudio realizado por Sader et al sobre sensibilidad a daptomicina en bacterias gram positivas, muestran unos valores de sensibilidad del 99,9% para *S. aureus*, del 100.0% para *Enterococcus faecalis*, y del 99,5% de *Enterococcus faecium* [75]. Los resultados de sensibilidad a daptomicina en los aislados de SELR estudiados, mostraron una CMI₉₀ para este antibiótico de 0.5 $\mu\text{g/mL}$, estos resultados se corresponden con los datos publicados en la actualidad [76].

Cuando la infección por *Staphylococcus* resistentes a meticilina, requiere tratamiento con antibióticos de amplio espectro, se recomienda, el uso de linezolid en caso de neumonía por SAMR, endooftalmitis o infección del sistema nervioso central. Daptomicina es el antimicrobiano de elección en caso de bacteriemia primaria o relacionada con el catéter y en casos de endocarditis infecciosa, también está recomendado su uso para el tratamiento de infecciones de piel y partes blandas. Tigeciclina puede emplearse para el tratamiento de piel y partes blandas polimicrobianas [77,78].

Los resultados de CMI₉₀ para tigeciclina obtenidos en nuestros aislados fueron de 0.5 µg/mL. Las CMIs obtenidas para este antibiótico, fueron las más bajas en todos los casos, por lo que tigeciclina podría ser una buena alternativa en el tratamiento de infecciones por SCN multirresistentes [79].

En nuestros pacientes, los antibióticos empleados para el tratamiento de las bacteriemias y bacteriemias relacionadas con el catéter fueron vancomicina y daptomicina. Daptomicina, fue empleada también como tratamiento del único caso de endocarditis infecciosa descrito en nuestros pacientes en estudio. Tigeciclina, se empleó para el tratamiento de la infección intraabdominal, y en un caso de infección de herida quirúrgica. Como podemos observar, los tratamientos empleados para las infecciones causadas por SELR en los pacientes en estudio, se corresponden directamente con las recomendaciones recogidas en los documentos de consenso [77].

Realizamos además a 68 aislados de SELR, un estudio de sensibilidad a ceftarolina. La ceftarolina, es una nueva cefalosporina de quinta generación, con actividad frente a grampositivos resistentes, que, por ser un betalactámico, podría proporcionar un perfil de seguridad adecuado en el paciente crítico [80,81]. Todos los aislados de SELR estudiados fueron sensibles a ceftarolina, con CMIs obtenidas en un rango de 0.5-1%. Actualmente, los puntos de corte de ceftarolina son según EUCAST resistentes para concentraciones de >1 mg/L [51], mientras que el CLSI considera concentraciones de 2 mg/L como sensibilidad intermedia y resistente para concentraciones de >2 mg/L [50]. Debido a sus perfiles y farmacodinámicos farmacocinéticos características, esta nuevo antimicrobiano nos ofrece una buena opción terapéutica para estas infecciones. Los estudios experimentales han demostrado una buena eficacia clínica para el tratamiento de endocarditis por *S. aureus*, independientemente de su sensibilidad a la meticilina o vancomicina. [82,83,84]. La experiencia clínica es limitada, aunque los ensayos clínicos y series de casos demuestran una respuesta clínica favorable en pacientes con bacteriemia asociada con infecciones de piel y tejidos blandos, neumonía o la endocarditis infecciosa. Los estudios futuros deben definir con mayor precisión el papel de este nuevo antibiótico en el tratamiento de estas infecciones [85].

El estudio de Mulanovich [67], sugiere que una tasa de utilización de linezolid de ≥ 13 DDD/100 pacientes-día pueden ser el umbral requerido para generar un brote por *Staphylococcus* resistentes a linezolid. Posiblemente la presión antibiótica en la Unidad de Cuidados Intensivos, y el consumo elevado de linezolid, favorecieron la formación del brote. Estos datos se corresponden con los obtenidos en otros estudios [86].

En los últimos años ha aumentado el número de publicaciones de SELR en el contexto de brotes [87,88] o de diseminaciones clonales con carácter de endemidad en unidades clínicas o en centros enteros [89,90,91].

El mecanismo de resistencia más frecuente en nuestros aislados fue la mutación G2576T en el dominio V del ARNr 23S presente en 72 de ellos, como único mecanismo de resistencia (22 aislados) o en asociación con otros mecanismos (50 aislados). Estos datos, se corresponden con los trabajos publicados en la actualidad, puesto que la mutación ribosómica G2576T en el dominio V de la subunidad 23S, sigue siendo en la actualidad, el mecanismo de resistencia a linezolid más frecuente tanto en *S. aureus* como en *S. epidermidis* [92,93]. Parece que la aparición de este mecanismo de resistencia, está relacionado con tratamientos prolongados con linezolid [94]. El desarrollo de la resistencia tiene lugar por una mutación puntual inicial en una de las copias del gen 23S del ARN ribosomal, produciéndose posteriormente una recombinación homóloga de las restantes copias [95]. Los estafilococos tienen de 5 a 6 copias del ARN ribosomal, por lo que la resistencia a linezolid mediante este mecanismo, puede ofrecer diferentes valores de CMI. Se observa en nuestros aislados, CMIs más elevadas, en función del número de copias de ARNr que contenían la mutación G2576T en el dominio V de la subunidad 23S, casos similares han sido descritos en la literatura [62]. La resistencia a linezolid mediante este mecanismo, tiene un coste biológico (fitness cost) bajo, cuando se trata sólo de una mutación [96]. Cuando tiene lugar una acumulación de mutaciones, se produce una pérdida de fitness. Los tratamientos prolongados con linezolid, producen un aumento en el número de mutaciones, recientemente, se ha visto que esta resistencia puede ser reversible [97]. Los recientes estudios, han demostrado, que en muchas ocasiones la resistencia a linezolid no está producida por un único mecanismo de resistencia [33] sino por una combinación de mecanismos. De todos los aislados incluidos en nuestro estudio el 50

% presentaban CMI's a linezolid $>256\mu\text{g/mL}$, la mayoría de estos aislados, presentaban la asociación de la mutación ribosómica G2576T con otro mecanismo de resistencia.

El segundo mecanismo de resistencia más frecuente en nuestros aislados fue la presencia del gen *cfr*. Este gen fue descrito por primera vez en un SAMR LR aislado clínicamente en 2007 [59]. El gen *cfr*, tiene un bajo coste biológico para el microorganismo, cuando dicho gen, se asocia al gen *erm* que confiere resistencia a macrólidos, aumenta el coste biológico [98].

En los aislados de este estudio, el gen *cfr* se obtuvo en un total de 58 cepas, los valores obtenidos en nuestro hospital son elevados en comparación con otros trabajos. En el estudio realizado por Mendes et al, analizan el mecanismo de resistencia en 13 cepas de *S. epidermidis* aislados en pacientes de hospitales de EEUU, tan sólo cuatro aislados presentaron gen *cfr* [99]. Sin embargo, otros estudios, como el realizado por Bonilla et al, en el que describen un brote causado por *S. epidermidis* resistente a linezolid, encuentran una alta prevalencia del gen *cfr* en sus aislados, obteniendo 7 cepas de *S. epidermidis cfr* positivo de los 16 estudiados en un hospital (A), y 13 aislados de *S. epidermidis cfr* positivo de los 21 aislados obtenidos en otro hospital (B) [88]. Estos resultados, se asemejan a los obtenidos en nuestro estudio.

Desde el punto de vista epidemiológico, estos datos son importantes, ya que el gen *cfr* puede estar localizado en un plásmido y es el único mecanismo de resistencia a linezolid capaz de transmitirse de forma horizontal [100,101,102].

Podemos afirmar con los resultados obtenidos en los 4 años de estudio, que el porcentaje de aislados de *S. epidermidis* resistentes a linezolid portadores del gen *cfr* se mantiene en un rango variable entre el 50-60%. Se plantea en la actualidad, si los SCN, colonizadores habituales del hombre, constituyen un reservorio de este mecanismo de resistencia en el ámbito hospitalario.

La resistencia a linezolid, cuando aparece la presencia del gen *cfr*, como único mecanismo de resistencia, es de bajo nivel. Algunas cepas pueden presentar CMI's en el rango de sensibilidad ($\leq 4\text{mg/L}$), por ello siempre que se sospecha resistencia al linezolid (CMI's en el rango alto de sensibilidad) es necesario analizar conjuntamente los resultados de sensibilidad al resto de los antimicrobianos afectados por este mecanismo [103]. El método más adecuado para detectar la resistencia al linezolid es el de microdilución. Los resultados de CMI obtenidos por el método de E-test son

generalmente más bajos, principalmente cuando la resistencia está mediada por el gen *cfrr* y las CMI's pueden ser tan bajas como 1 o 2 $\mu\text{g/mL}$, dentro del rango de sensibilidad [104]. Por este motivo, comparamos todos los resultados de CMI's a linezolid obtenidos por el método de dilución en agar con los resultados de CMI obtenidos por E-test, pudiendo constatar este efecto en 4 aislados. Las CMI's obtenidas por el método de E-test en estas cepas fue de 2 $\mu\text{g/mL}$, por lo tanto sensibles a linezolid. Sin embargo, realizando el método de dilución en agar, se obtuvieron CMI's de 8 $\mu\text{g/mL}$ en todos los casos.

De las 100 cepas de SELR estudiadas, solo 9 presentaron el gen *cfrr* como único mecanismo de resistencia. Todos estos aislados, mostraron CMI's a linezolid por método de dilución en agar de 8 $\mu\text{g/mL}$.

Cuando la CMI a linezolid, se eleva en aislados portadores del gen *cfrr*, debemos pensar en que existen más mecanismos implicados en esta resistencia. Esta situación la pudimos constatar en los aislados de nuestro estudio, encontrando como asociación más frecuente la presencia del gen *cfrr* y la mutación ribosómica G2576T. En todas las cepas con esta combinación de mecanismos, las CMI's arrojaron valores ≥ 256 $\mu\text{g/mL}$. El porcentaje obtenido de aislados de SELR con ambos mecanismos, fue de un 44%. Estos datos se corresponden con lo descrito por otros autores [105].

Encontramos además, la combinación del gen *cfrr*, con mutaciones en las proteínas ribosomales L3 y L4. Este mecanismo de resistencia, producido por mutaciones en las proteínas ribosomales, fue estudiado en todos nuestros aislados. Se ha demostrado, que las mutaciones en L3 y L4, deparan una disminución en la sensibilidad a oxazolidinonas [35]. Cuando la resistencia a linezolid está mediada por alteraciones en estas proteínas, se produce resistencia cruzada al cloranfenicol y a los macrólidos, debido a la relativa frecuencia de cepas que presentan otros mecanismos de resistencia conjuntos que pueden afectar a la actividad del cloranfenicol o de los macrólidos, es difícil sospechar la presencia de este mecanismo.

Existen en la actualidad, múltiples estudios que demuestran la presencia de mutaciones en las proteínas ribosomales relacionadas con la resistencia a linezolid. En nuestros aislados, encontramos la mutación Gly152Asp en la proteína L3 en un total de 25 cepas. Esta mutación, fue descrita previamente, relacionada con la resistencia a las pleuromultilinas [106]. Posteriormente, en el estudio de Endimiani et al, describen esta

mutación en un aislado de SALR, esta cepa mostró CMI a linezolid de bajo nivel, siendo esta de 8 µg/mL [94]. Probablemente, la mutación Gly152Asp, reduce la afinidad de las oxazolidinonas por una alteración indirecta de las bases 2505 y 2506, análogos de la mutación G2576T [28].

En las cepas de SELR incluidas en el estudio, la mutación Gly152Asp, apareció como único mecanismo de resistencia en 15 de los aislados. En todos los casos, las CMIs obtenidas para linezolid fueron de 8 µg/mL al igual que demuestra el estudio de Edimiani et al. Todos los aislados del estudio, presentaron además la mutación en L3 Leu101Val, esta mutación en la proteína L3, es frecuente y no parece estar relacionada con la disminución de la sensibilidad a linezolid, puesto que está presente en aislados sensibles al antibiótico [66]. La mutación Gly155Arg y la ΔHis146, en L3, fueron descritas por Locke y colaboradores, estas mutaciones fueron detectadas en cepas de *S.aureus* mutados en el laboratorio, con CMIs a linezolid de 4-8 µg/mL. Posteriormente, Mendes y colaboradores, describen en un estudio, la aparición de las mutaciones Phe147Leu y Ala157Arg, en aislados de *S.epidermidis*, estas mutaciones, se encuentran muy próximas al sitio de unión del antibiótico, por lo que es probable su relación con la disminución de la sensibilidad a linezolid [34].

Las mutaciones en la proteína ribosomal L4, están relacionadas con resistencia cruzada a macrólidos, linezolid o cloranfenicol en *S. pneumoniae*, *S.aureus* y *Clostridium perfringens* [107]. En nuestro estudio, sólo detectamos la presencia de mutaciones en la proteína ribosomal L4 en tres aislados de los 100 estudiados. En todos los casos, la mutación en la L4, apareció acompañada de mutaciones en la proteína ribosomal L3 como único mecanismo de resistencia a linezolid

La mutación encontrada en nuestros aislados fue la Asn158Ser. Según los resultados obtenidos en otros estudios, esta mutación parece no estar relacionada con la disminución de la sensibilidad a linezolid, apareciendo también, en aislados de *S. epidermidis* sensibles a linezolid describiéndose como un marcador clonal [34]. Sin embargo, existen múltiples publicaciones que describen mutaciones en la proteína L4, relacionadas con la resistencia a linezolid, como la inserción de una glicina en la posición 71 (Ins70G) [66]. La mutación Lys68Arg, también parece estar implicada en la resistencia a linezolid, sin embargo hay estudios, en los que se detecta la aparición de esta mutación, sin producir efecto en la elevación de la CMI a linezolid [34].

Sin embargo, con los datos obtenidos en los aislados de este estudio, podemos afirmar que las mutaciones en las proteínas ribosomales, no son frecuentes en nuestro medio.

En el resto de aislados, en los que se detectaron mutaciones en la proteína L3, este mecanismo de resistencia apareció en combinación con la presencia del gen *cfr*, o con mutaciones ribosómicas en el dominio V de la subunidad 23S, por lo que las CMI a linezolid, fueron más elevadas.

Al igual que descrito en otros estudios, cuatro cepas de SELR, presentaron como mecanismo de resistencia a linezolid, la combinación del gen *cfr*, con la mutación Gly152Asp en L3. Tres de ellas, presentaron una elevación de la CMI de una dilución (de 8 a 16 $\mu\text{g/mL}$), respecto a las cepas que presentaron el gen *cfr*, o la mutación Gly152Asp como único mecanismo [28].

Cuando la resistencia se produjo por la combinación de la mutación Gly152Asp, con la mutación ribosómica G2576T, la elevación de la CMI tres veces más, respecto a los aislados que presentaron como único mecanismo de resistencia la mutación en la proteína L3, obteniéndose valores de $64\text{-}\geq 256$ $\mu\text{g/mL}$. Estos datos, coinciden con lo publicado en otros estudios [28,86].

Únicamente, un aislado del estudio, presentó la combinación de los tres mecanismos de resistencia, la CMI a linezolid fue ≥ 256 $\mu\text{g/mL}$.

Como podemos observar con los resultados obtenidos, en la mayoría de los casos la resistencia a linezolid esta mediada por una combinación de mecanismos de resistencia. La aparición de la resistencia, está relacionada con la presión antibiótica, por tanto, con tratamientos prolongados con este antibiótico. Es frecuente la aparición de resistencia a linezolid en pacientes hospitalizados de larga estancia, que han sufrido múltiples complicaciones médicas o quirúrgicas, que tiene enfermedades crónicas, o inmunodepresión y que han necesitado ingreso en unidades de cuidados intensivos, con un número variable de ciclos de tratamiento antimicrobiano de amplio espectro. Es el caso de los pacientes incluidos en nuestro estudio, en el que el 92% de los pacientes, recibieron tratamiento previo al aislamiento del SELR. De los pacientes que presentaron infección por SELR, un total de 47 habían recibido tratamiento con linezolid. Son múltiples los estudios que asocian la aparición de la mutación G2576T con el consumo de linezolid, esto se corresponde con nuestros datos, los cuales muestran, que un total de 48 aislados de SELR obtenidos de pacientes que habían recibido linezolid durante

más de 10 días, presentaban la mutación ribosómica G2676T, y solo 24 pacientes de los tratados menos de 20 días o no tratados con linezolid presentaron aislados con este mecanismo de resistencia. Estos resultados, nos hacen tener en cuenta, la existencia de propagación nosocomial de los aislados de SELR [86].

La presencia de mutaciones en las proteínas ribosomales, también parecen estar relacionadas con los tratamientos prolongados con linezolid sin embargo, la aparición de cepas resistentes a linezolid mediado por la presencia del gen *cftr*, no solamente estaría relacionada con el tratamiento prolongado con linezolid, sino también por la presencia de microorganismos portadores de este gen [104]. En nuestros datos, de las 9 cepas que presentaron el gen *cftr* como único mecanismo de resistencia, 5 se aislaron en pacientes no tratados con linezolid, 3 en pacientes tratados menos de 10 días y solamente uno, se encontró en una cepa perteneciente a un paciente tratado de 10 a 20 días, por lo que estos datos, reflejan que la aparición de este mecanismo puede no estar relacionada con el tratamiento con linezolid. El resto de cepas que presentaron el gen *cftr*, lo presentaron en combinación con mutaciones en el dominio V o con mutaciones en la proteína L3. En total fueron 33 cepas de SELR, obtenidas de pacientes tratados más de 10 días con linezolid.

Desde el punto de vista microbiológico no se encontró una correlación temporal entre los pacientes tratados menos de 10 días, entre 10 y 20 días o más de 20 días con linezolid con la probabilidad de asociación entre mecanismos de resistencia, sin embargo existe una tendencia de asociación entre estos mecanismos a partir de los 10 días de tratamiento con linezolid [67].

En nuestro estudio obtuvimos numerosos aislados de SELR obtenidos en muestras respiratorias, en todos estos casos, la presencia de SELR fue considerada como colonización. Muchos de los pacientes, sin embargo, habían iniciado ya esquemas antimicrobianos de amplio espectro frente a gram positivos resistentes por sospecha de infección del tracto respiratorio inferior asociada a ventilación mecánica. Es frecuente la aparición de SCN como colonizadores en pacientes ingresados durante largos periodos de tiempo, y en especial, en pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos [48].

Datos recientemente comunicados refieren el inicio de terapia empírica frente a grampositivos resistentes en las UCIs españolas hasta en un 78%, empleando linezolid

casi en la misma proporción que vancomicina, con una duración media de tratamiento de 8 ± 6 días [108].

En nuestro hospital la presencia del gen *cfr* en cepas de *Staphylococcus* es muy significativa, situación preocupante ya que las mutaciones en el dominio V y las mutaciones en las proteínas ribosómicas, no son transferibles y están asociados con la previa exposición a linezolid, sin embargo la diseminación del gen *cfr* entre microorganismos, es de gran preocupación, ya que se ha demostrado su transmisibilidad in vitro e in vivo. A pesar de estos datos, y de que la cantidad de publicaciones que comunican la aparición de aislados de *Staphylococcus* resistentes a linezolid ha aumentado en los últimos años, la resistencia a linezolid, no parece seguir un ritmo de diseminación similar al de otras resistencias bacterianas y se mantiene establemente baja en estudios multicéntricos internacionales recientes[109,110]. Los datos recientes de prevalencia de SCN resistentes a linezolid, en unidades de cuidados intensivos en nuestro país, muestran una disminución en el porcentaje de aislados de estos microorganismos, obteniéndose en el estudio ENVIN 2012, un porcentaje de SELR del 17, 31% y en 2013 del 11%. Estos datos se confirman con los obtenidos en nuestro hospital, en el que en el año 2012, el porcentaje de aislados de SELR en la unidad de cuidados intensivos había disminuido a un 10.5%. No se ha descrito ningún aislamiento de *S. aureus* resistente a linezolid en la UCI, desde la aparición del brote de 2008.

Estos datos, parecen estar relacionados con las adecuadas medidas de control y aislamientos de estos pacientes, así como las iniciativas que contribuyen a conservar las escasas alternativas disponibles para el tratamiento de *Staphylococcus* multirresistentes.

Linezolid, sigue siendo en la actualidad, antibiótico de elección, para la infección respiratoria grave causada por SAMR. En nuestro hospital, los aislamientos de cepas de SAMR LR desde el brote ocurrido en 2008, han sido esporádicos.

Actualmente existe una nueva oxazolidinona, tedizolid fosfato, según los estudios, tedizolid mostró una excelente actividad frente a bacterias Gram-positivas y era por lo menos 4 veces más potente que el linezolid frente a cepas resistentes a linezolid con mutaciones ribosómicas en el dominio V y mutaciones en las proteínas L3 y L4 [46,47]. Además, tedizolid, produce una selección menor que linezolid, en la aparición de cepas con mutaciones ribosómicas. Tedizolid tiene además, una ventaja significativa sobre las cepas resistentes a linezolid que llevan el gen *cfr*. La metilación de A2503 de la

subunidad 23S del ARN ribosomal por el *cfr* confiere resistencia a linezolid pero no a tedizolid debido a las diferencias estructurales (el grupo hidroximetil C5 de la cadena lateral de tedizolid es más pequeño y más flexible que el grupo acetamidometilo de la cadena lateral de linezolid). Por estos todos estos motivos, tedizolid puede convertirse en una opción terapéutica valiosa en el tratamiento de infecciones causadas por patógenos Gram-positivos.

CONCLUSIONES -

VIII. Conclusiones

1. - Desde Abril a Junio del 2008, se describe en la UCI del Hospital Clínico San Carlos el primer brote causado por cepas de *S. aureus* resistentes a linezolid, mediado por la presencia del gen *cfr*.
2. - Los aislados de *S. aureus* resistentes a linezolid, se identifican con un clon mayoritario (clon A). No es, sin embargo, el único clon que aparece ya que algunas cepas, muestran distintos perfiles de PFGE.
3. - En el 100 % de los aislados de *S. aureus* resistentes a linezolid se observa un fenotipo de multirresistencia que incluye oxacilina, linezolid, clindamicina y cloranfenicol.
4. - Las medidas de aislamiento, y las medidas higiénico sanitarias que se establecieron, fueron efectivas para el control del brote. Desde entonces hasta la actualidad, no se ha descrito ningún brote causado por cepas de SALR resistente en nuestro centro y los aislamientos de este microorganismo en el mismo son esporádicos.
5. - La resistencia a linezolid de las cepas de *S. epidermidis* aislados en la UCI del Hospital Clínico San Carlos en los 4 años estudiados, osciló entre un 6.5% y un 21%, obteniéndose un pico máximo del 25% en el año 2010.
6. - La bacteriemia o bacteriemia relacionada con el catéter, así como la infección de herida quirúrgica, fueron las principales patologías en las que se encontró implicado *S. epidermidis* resistente a linezolid.
7. - El 100% de los aislados de *S. epidermidis* resistentes a linezolid, fueron sensibles a vancomicina, tigeciclina y daptomicina.
8. - El mecanismo de resistencia más frecuente en los aislados de *S. epidermidis* resistente a linezolid fue la mutación ribosomal G2576T.

9. - Los valores de CMI a linezolid más elevados, estaban relacionados con la asociación de mecanismos de resistencia. La combinación más frecuente en nuestros aislados fue la presencia del gen *cfrr* con la mutación G2576T.
10. En los pacientes con más de 10 días de tratamiento con linezolid, el mecanismo más frecuente fue la mutación G2576T, sola o en combinación con otros mecanismos de resistencia. Esta mutación, no es transmisible y su aparición esta relacionada con los tratamientos prolongados con linezolid.
11. Vancomicina, daptomicina y tigeciclina fueron los tratamientos de elección en los casos de infección por *S. epidermidis* resistente a linezolid.
12. Todos los aislados de *S.epidermidis* resistentes a linezolid estudiados, fueron sensibles a ceftarolina, que se presenta como una nueva alternativa para el tratamiento de infecciones causadas por *Staphylococcus sp.* multirresistentes.

BIBLIOGRAFÍA -

IX. Bibliografía

1. - **Pahissa A.** Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. 1ª edición 2009. ICG Marge, SL. Barcelona (España)
2. - **Murray P. R., Baron E. J., Jorgensen, J. H., Landry, M. L. and Pfaller, M. A.** 2007 Manual of Clinical Microbiology A.S.M. Press. Washington: American Society for Clinical Microbiology.
3. - **Mandell G. L., Bennett J. E. and Dolin R.** 2006. Enfermedades infecciosas principios y práctica, Sexta ed, Vol. 2 ELSEVIER Churchill Livingstone
4. - **Murray P.R, Rosenthal K.S. and Pfaller M.A.** Microbiología Médica Sexta ed, ELSEVIER España
5. - **M. Á. Domínguez Luzón y J. Rodríguez Baño.** Infecciones por estafilococos (253-262), en: Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2006, Editorial Médica Panamericana, Madrid
6. - **Wannet WJ, Spalburg E, Heck ME, et al.** Emergence of virulent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains carrying Panton-Valentine leucocidin genes in The Netherlands. 2005 *J Clin Microbiol* 43:3341-5.
7. - **Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM.** Exotoxinas of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev* 13:16-34,2000
8. - **Gravet A, Rondeau M, Harf-Monteil C et al.** Predominant *Staphylococcus aureus* isolated from antibiotic associated diarrhea is clinically relevant and produces enterotoxigenic toxin A and the biocomponent toxin LukE-KukD. 1999, *J Clin Microbiol* 37:4012-4019
9. - **Lowy FD.** *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* 1998 399:520-532,
10. **Deurenberg, R. H., Vink, C., Kalenic, S. et al,** The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol Infect* 2007;13: 222-235

11. **Enright MC, Robinson DA, Randle G et al.** The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Nat Acad Sci USA* 2002; 99:7687-692
12. **Vindel A, Trincado P, Gómez E et al.** Prevalence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in spanish hospitals between 1996 and 2002. *J Clin Microbiol* 2006; 44:266-70
13. **Rodríguez-Baño J, Pascual, A.** Hospital infection control in Spain. *J. Hosp. Infect.* 2001; 48 (4): 258-60.
14. **García-Garrote F, Cercenado E, Marín M et al.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the *mecC* gene: emergence in Spain and report of a fatal case of bacteraemia. *J Antimicrob Chemother.* 2014; Jan; 69(1):45-50.
15. **Hiramatsu K. et al.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob. Chemother.* 1997; 40: 135-6).
16. **Howden BP, Davies JK, Johnson PD, et al.** Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. *Clin Microbiol Rev.* 2010 Jan;23(1):99-139
17. **Charles PG, Ward PB, Johnson PD, et al.** Clinical features associated with bacteremia due to heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis.* 2004 Feb 1;38(3):448-51
18. **Howe RA, Monk A, Wootton M, et al.** Vancomycin susceptibility within methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages. *Emerg Infect Dis.* 2004 May;10(5):855-7.
19. **Périchon B, Courvalin P.** VanA-type vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Nov;53(11):4580-7 Jun 8
20. **Shoji M, Cui L, Iizuka R, Komoto A, et al.** *walK* and *clpP* mutations confer reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 Aug;55(8):3870-81.

21. **Peleg AY, Miyakis S, Ward DV, et al.** Whole genome characterization of the mechanisms of daptomycin resistance in clinical and laboratory derived isolates of *Staphylococcus aureus*. *PLoS One*. 2012;7(1):e28316
22. **Patel JB, Jevitt LA, Hageman J, et al.** An Association between Reduced Susceptibility to Daptomycin and Reduced Susceptibility to Vancomycin in *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis*. 2006 Jun 1;42(11):1652-3.
23. **Tsiodras S, Gold HS, Sakoulas G, et al.** Linezolid resistance in clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *Lancet*. 2001 Jul 21;358(9277):207-8.
24. **Kloss P, Xiong L, Shinabarger DL, Mankin AS.** Resistance mutations in 23 S rRNA identify the site of action of the protein synthesis inhibitor linezolid in the ribosomal peptidyl transferase center. *J Mol Biol* 1999; 294:93–10
25. **Rahim S, Pillai SK, Gold HS, et al.** Linezolid-resistant, vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* infection in patients without prior exposure to linezolid *Clin Infect Dis*. 2003 Jun 1;36(11):E146-8
26. **Pillai SK, Sakoulas G, Wennersten C, et al.** Linezolid resistance in *Staphylococcus aureus*: characterization and stability of resistant phenotype. *J Infect Dis*. 2002 Dec 1;186(11):1603-7+
27. **Meka VG, Pillai SK, Sakoulas G, et al.** Linezolid resistance in sequential *Staphylococcus aureus* isolates associated with a T2500A mutation in the 23SrRNA gene and loss of a single copy of rRNA. *J Infect Dis* 2004;190:311–7
28. **Locke JB, Hilgers M, Shaw KJ.** Novel ribosomal mutations in *Staphylococcus aureus* strains identified through selection with the oxazolidinones linezolid and torezolid (TR 700). *Antimicrob Agents Chemother* 2009b;53:5265–74
29. **Schwarz S, Werckenthin C, Kehrenberg C.** Identification of a plasmidborne chloramphenicol-florfenicol resistance gene in *Staphylococcus sciuri*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:2530–2533.
30. **Kehrenberg C, Schwarz S.** Distribution of florfenicol resistance genes *fexA* and *cfr* among chloramphenicol-resistant *Staphylococcus* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:1156–63.

31. **Long KS, Poehlsgaard J, Kehrenberg C, et al.** The *cfr* rRNA methyltransferase confers resistance to phenicols, lincosamides, oxazolidinones, pleuromutilins and streptogramin A antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:2500–5.
32. **Morales G, Picazo JJ, Baos E, et al.** Resistance to linezolid is mediated by the *cfr* gene in the first report of an outbreak of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 2010;50:821–5.
33. **Cercenado E, Marin M, Insa R, et al.** abstr. P979. 20th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases; 2010
34. **Mendes RE, Deshpande LM, Farrell DJ, et al.** Assessment of linezolid resistance mechanisms among *Staphylococcus epidermidis* causing bacteraemia in Rome, Italy. *J Antimicrob Chemother* 2010;65:2329–35.
35. **Locke JB, Morales G, Hilgers H, et al.** Elevated linezolid resistance in clinical *cfr*-positive *Staphylococcus aureus* isolates is associated with co-occurring mutations in ribosomal protein L3. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:5352–5.
36. **Otto M.** Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections. *Semin Immunopathol.* 2012 Mar;34(2):201-14
37. **Otto M, Ph D.** *Staphylococcus epidermidis* – the “accidental” pathogen. *NatRevMicrobiol.* 2009 Aug; 7(8): 555-567
38. **Otto M.** Phenol-soluble-modulins. *Int J Med Microbiol.* 2014 Mar;304(2):164-9
39. **Conlon BP, Rowe SE, Lewis K.** Persister cells in biofilm associated infections. *Adv Exp Med Biol.* 2015;831:1-9
40. **Otto M.** Staphylococcal biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008; 322;207-28
41. **Otto, M.** Coagulase-negative staphylococci as reservoirs of genes facilitating MRSA infection: Staphylococcal commensal species such as *Staphylococcus epidermidis* are being recognized as important sources of genes promoting MRSA colonization and virulence. *Bioessays.* 2013 Jan;35(1):4-11

42. **Gu B, Kelesidis T, Tsiodras S, Hindler J, et al.** The emerging problem of linezolid-resistant *Staphylococcus J Antimicrob Chemother.* 2013 Jan;68(1):4-11
43. **Sader HS, Farrell DJ, Flamm RK, Jones RN.** Variation in potency and spectrum of tigecycline activity against bacterial strains from U.S. medical centers since its approval for clinical use (2006 to 2012). *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(4):2274-80. doi: 10.1128/AAC.02684-13.
44. **Robbel L, Marahiel MA .**Daptomycin, a bacterial lipopeptide synthesized by a nonribosomal machinery.. *J Biol Chem.* 2010 Sep 3;285(36):27501-8
45. **Shirley DA, Heil EL, Johnson JK.** Ceftaroline fosamil: a brief clinical review *Infect Dis Ther.* 2013 Dec;2(2):95-110.
46. **Jeffrey M. Rybak, Karrine Roberts.** Tedizolid Phosphate: a Next-Generation Oxazolidinone *Infect Dis Ther.* 2015 March; 4(1): 1–14.
47. **Chen KH, Huang YT, Liao CH, et al.** In Vitro Activities of Tedizolid and Linezolid against Gram-Positive Cocci Associated with Acute Bacterial Skin and Skin Structure Infections and Pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Oct;59(10):6262-5.
48. **Estudio Nacional de Vigilancia de Infección Nosocomial en UCI (ENVIN-UCI), 2001-2011.** Disponible en <http://hws.vhebron.net/envin-helics/>.
49. **-Alvarez-Lerma F, Palomar M, Olaechea P, et al.** National Study of Control of Nosocomial Infection in Intensive Care Units. Evolutive report of the years 2003-2005].Grupo de Estudio de Vigilancia de Infección Nosocomial en UCI.*Med Intensiva.* 2007 Jan-Feb;31(1):6-1
50. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 21st informational supplement (M100-S20). Wayne, PA: CLSI; 2011
51. **European Committee on Antimicrobial Breakpoint Susceptibility Testing.** Tables for interpretation of MICs and zone diameters. <http://www.eucast.org>
52. **Pérez-Roth, E, Lorenzo-Díaz, F, Batista, N, et al.** Tracking Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clones during a 5-Year Period (1998 to 2002) in a Spanish Hospital. *J. Clin. Microbiol.* 2004 42: 4649-4656.

53. **Enright MC, Day NP, Davies CE, et al** Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 2000 Mar;38(3):1008-15
54. **Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al.** Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* **1995**; 33:2233–2239.
55. **Hidron AI, Edwards JR, Patel J, et al.** NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2008;29:996–1011.
56. **Vincent JL, Rello J, Marshall J, et al.** International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA*.2009;302:2323–9
57. **Sánchez M, Torre MA.** Resistance to linezolid: A laboratory curiosity or an important clinical problem? *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2013;31(3):127–129
58. **Sánchez García M, de la Torre MA, Morales G, Pelaez B, Tolón MJ, Domingo S, et al.** Clinical outbreak of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* in an intensive care unit. *JAMA*. 2010;303:2260–4.
59. **Toh SM, Xiong L, Arias CA, et al.** Acquisition of a natural resistance gene renders a clinical strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* resistant to the synthetic antibiotic linezolid. *Mol Microbiol* 2007;64:1506–14
60. **Mendes RE, Deshpande LM, Castanheira et al.** First report of *cfr*-mediated resistance to linezolid in human staphylococcal clinical isolates recovered in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52:2244–2246
61. **Liakopoulos A, Neocleous C, Klapsa D, et al.** A T2504A mutation in the 23S rRNA gene responsible for high-level resistance to linezolid of *Staphylococcus epidermidis*. *J Antimicrob Chemother*. 2009 Jul; 64(1):206-7
62. **Lopez-Fabal F, Román F, Almagro M et al.** *Staphylococcus coagulasa* negativos resistentes a linezolid: características fenotípicas, genotípicas y

- sensibilidad a combinaciones de antibióticos. *Enfer Infecc Microbiol Clin* 2013; 31 (7): 442-447
63. **Baos E, Candel FJ, Merino P et al.** Characterization and monitoring of linezolid-resistant clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* in an intensive care unit 4 years after an outbreak of infection by cfr-mediated linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* *Diagn Microbiol and Infect Dis* 2013: 325–329
64. **Ikeda-Dantsuji Y, Hanaki H, Sakai F et al.** Linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from 2006 through 2008 at six hospitals in Japan. *J Infect Chemother.* 2011 Feb;17(1):45-51.
65. **Farrell DJ, Mendes RE, Ross JE, et al.** Linezolid surveillance program results for 2008 (LEADER Program for 2008). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009;65:392–403.
66. **Kosowska-Shick K, Julian KG, McGhee PL, et al.** Molecular and epidemiologic characteristics of linezolid-resistant coagulase-negative staphylococci at a tertiary care hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010;68:34–9.
67. **Mulanovich VE, Huband MD, McCurdy SP, et al.** Emergence of linezolid-resistant coagulase-negative *Staphylococcus* in a cancer centre linked to increased linezolid utilization. *J Antimicrob Chemother* 2010;65:2001–4.
68. **Olaechea PM, Alvarez-Lerma F, Palomar M, et al.** Grupo ENVIN-HELICS. Impact of primary and intravascular catheter-related bacteremia due to coagulase-negative staphylococci in critically ill patients. *Med Intensiva* 2011;35:217–25.
69. **Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, et al.** CDC definitions for nosocomial infections, 1988. *Am J Infect Control* 1988;16:128–40.
70. **Rahkonen M, Luttinen S, Koskela M, et al.** True bacteremia caused by coagulase negative *Staphylococcus* are difficult to distinguish from blood culture contaminants. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012;31:2639

71. **Cantón R y Ruiz-Garbajosa P.** Infecciones causadas por bacterias grampositivas multirresistentes (*Staphylococcus aureus* y *Enterococcus spp* *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013; 31(8) :543–551
72. **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.
73. **Van Hal SJ, Lodise TP, Paterson DL.** The Clinical significance of vancomycin minimum inhibitory concentration in *Staphylococcus aureus* infections: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis.* 2012;54:755-71
74. **Patel N, Pai MP, Rodvold KA, et al** Vancomycin: We can't Get there from here. *Clin Infect Dis.* 2011;52:969–74
75. **Sader HS, Jones RN.** Antimicrobial susceptibility of Gram-positive bacteria isolated from US medical centers: results of the Daptomycin Surveillance Program (2007-2008)
76. **Picazo J, Betriu C, Culebras E, et al.** *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina: sensibilidad a la daptomicina a lo largo de un periodo de 10 años (2001-2010) *Rev Esp Quimioter* 2011;24(2):107-11
77. **Mensa J, Barberan J, Llinares P et al.** Guía de tratamiento de la infección producida por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina
78. **Wodford N, Livermore DM** Infections caused by Gram-positive bacteria a review of the global challenge *J Infect.* 2009;59Suppl1:4–1
79. **Bustos C, Yuste JR, Del Pozo JL** A highly concentrated tigecycline lock solution ensures in vivo activity against staphylococcal catheter-related infections. *J Antimicrob Chemother.* 2015 Sep 22
80. **Candel FJ, Baos E, Nieto M et al.** Could ceftaroline be an alternative therapy for linezolid resistant *Staphylococcus epidermidis* infections in Intensive Care Medicine

81. **Almirante B, Pericás JM, Miró JM.** Role of ceftaroline fosamil in the treatment of bacteremia and infectious endocarditis. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2014; 32(Suppl 2):44-53.
82. **Sakoulas G, Moise PA, Casapao AM, et al.** Antimicrobial salvage therapy for persistent staphylococcal bacteremia using daptomycin plus ceftaroline. *Clin Ther* 2014; 36:1303-16.
83. **Cercenado E, Morosini MI.** Antimicrobial spectrum of ceftaroline. In vitro activity against methicillin-resistant *Staphylococci*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2014; 32 (Suppl 2): 8-14.
84. **Frampton JE.** Ceftaroline fosamil: a review of its use in the treatment of complicated skin and soft tissue infections and community-acquired pneumonia. *Drugs* 2013; 73:1067-94.
85. **Poon H, Chang MH, Fung HB.** Ceftaroline fosamil: a cephalosporin with activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Ther* 2012; 34: 743-65.
86. **Lozano C, Aspiroz, C, Gómez E, et al.** Characterization of methicillin- and linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* and *S. haemolyticus* strains in a Spanish hospital. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013;31(3):136–141
87. **Bonilla H, Huband MD, Seidel J, et al.** Multicity outbreak of linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* associated with clonal spread of a cfr-containing strain. *Clin Infect Dis* 2010;51:796–800
88. **Kelly S, Collins J, Maguire M, et al.** An outbreak of colonization with linezolid resistant *Staphylococcus epidermidis* in an intensive therapy unit. *J Antimicrob Chemother* 2008;61:901–7
89. **de Almeida LM, Lincopan N, de Araújo MR, et al.** Dissemination of the linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* clone ST2 exhibiting the G2576Tmutation in the 23S rRNA gene in a tertiary-care hospital, Brazil. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:768–9.

90. **Treviño M, Martínez-Lamas L, Romero-Jung PA, et al.** Endemic linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* in a critical care unit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009;28:527–33.
91. **Liakopoulos A, Spiliopoulou I, Damani A, et al.** Dissemination of two international linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* clones in Greek hospitals. *J Antimicrob Chemother* 2010;65:1070–107.
92. **Hong T, Li X, Wang J, Sloan C, Cicogna C et al.** Sequential linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* isolates with G2576T mutation. *J Clin Microbiol.* 2007; 45:3277-3280
93. **Zhu W, Tenover FC, Limor J.** Use of pyrosequencing to identify point mutations in domain V of 23S rRNA genes of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2007 Mar;26(3):161-5.
94. **Endimiani A, Blackford M, Dasenbrook EC, et al.** Emergence of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* after prolonged treatment of cystic fibrosis patients in Cleveland, Ohio. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:1684–92.
95. **Long KS, Vester B** Resistance to linezolid caused by modifications at its binding site on the ribosome. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Feb;56(2):603-12
96. **Besier S, Ludwig A, Zander J, et al.** Linezolid resistance in *Staphylococcus aureus*: gene dosage effect, stability, fitness costs, and cross-resistances. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52:1570-1572
97. **Saager B, Rohde H, Timmerbeil BS, et al.** Molecular characterisation of linezolid resistance in two vancomycin-resistant (*VanB*) *Enterococcus faecium* isolates using Pyrosequencing. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2008 Sep;27(9):873-8
98. **La Marre JM, Locke JB, Shawn KJ, et al.** Low fitness cost of the multidrug resistance gen *cfr*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:3714–9.

99. **Mendes RE, Deshpande LM, Costello AJ, et al.** Molecular epidemiology of *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates from U.S. hospitals. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Sep;56(9):4656-61
100. - **Mendes RE, Deshpande L, Rodriguez-Noriega E, et al.** First report of Staphylococcal clinical isolates in Mexico with linezolid resistance caused by *cfr*: evidence of in vivo *cfr* mobilization. *J Clin Microbiol* 2010;48:3041–3.
101. - **Diaz L, Kiratisin P, Mendes RE, et al.** Transferable plasmid-mediated resistance to linezolid due to *cfr* in a human clinical isolate of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Jul;56(7):3917-22
102. - **Gopegui ER, Juan C, Zamorano L, et al.** Transferable multidrug resistance plasmid carrying *cfr* associated with tet(L), ant(4')-Ia, and dfrK genes from a clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST125 strain. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:2139–42.
103. - **Cui L, Wang Y, Li Y et al.** Cfr-mediated linezolid-resistance among methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from infections of humans. *PLoS One.* 2013;8(2)
104. - **Cercenado E, Cantón R.** Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en grampositivos. *Procedimientos en Microbiología Clínica.* SEIMC
105. - **Ruiz E, Iuliana MC, Diaz P, et al.** Nosocomial spread of linezolid-resistant *Staphylococcus hominis* in two hospitals in Majorca. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011;29:339–44
106. - **Gentry DR, Rittenhouse SF, McCloskey L, et al.** Stepwise exposure of *Staphylococcus aureus* to pleuromutilins is associated with stepwise acquisition of mutations in *rplC* and minimally affects susceptibility to retapamulin. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:2048–52.
107. - **Hölzel CS, Harms KS, Schwaiger K, Bauer J.** Resistance to linezolid in a porcine *Clostridium perfringens* strain carrying a mutation in the *rplD* gene encoding the ribosomal protein L4. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Mar;54(3):1351-3.

108. - **Gudiol F, Aguado JM, Pascual A, et al.** Documento de consenso sobre el tratamiento de la bacteriemia y la endocarditis por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2009;27:105–15.
109. - **Farrell D, Mendes RE, Ross JE, Sader HS, et al.** LEADER Program Results for 2009: an activity and spectrum analysis linezolid using 6,414 clinical isolates from 56 medical centers in the United States. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011:3684–90
110. - **Wong A, Reddy SP, Smyth DS, et al** Polyphyletic emergence of linezolid-resistant staphylococci in the United States. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Feb;54(2):742-8.
111. - **Kainer MA, Devasia RA, Jones TF, et al.** Response to emerging infection leading to outbreak of linezolid-resistant enterococci. *Emerg Infect Dis.* 2007; 13:1024-30.

ANEXOS -
