

# UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE  
INGENIERÍA AGRONÓMICA  
Y DEL MEDIO NATURAL



*Caracterización fenotípica y genotípica  
de Staphylococcus coagulasa negativos  
resistentes a linezolid emergentes en un  
hospital de distrito durante los años  
2012 - 2013*

**TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA**

ALUMNA: CRISTINA MARTINEZ VALIENTE

TUTOR: ANTONIO OLMOS CASTELLÓ

TUTOR DE LA EMPRESA: JUAN J. CAMARENA MIÑANA

*Curso Académico: 2013-2014*

VALENCIA, 30/06/2014

## **Caracterización fenotípica y genotípica de *Staphylococcus coagulasa* negativos resistentes a linezolid emergentes en un hospital de distrito durante los años 2012 - 2013.**

Los *Staphylococcus coagulasa* negativos (SCN) se asocian a infecciones oportunistas nosocomiales, implicándose en ocasiones en casos graves de bacteremia. Habitualmente el tratamiento frente a estos microorganismos se basa, debido al elevado porcentaje de resistencia a meticilina, en la administración de glucopéptidos, como vancomicina o teicoplanina. No obstante, la aparición de cepas con sensibilidad disminuida a estos antimicrobianos ha llevado a la necesidad del empleo de nuevas alternativas, entre ellas el linezolid, una oxazolidinona activa frente a grampositivos resistentes, convirtiéndose en uno de los fármacos de uso habitual en este tipo de infecciones. Sin embargo, se localizan cada vez más frecuentemente cepas resistentes a este antibiótico. Esta resistencia puede estar mediada por 3 mecanismos diferentes: mutaciones en el gen *rrn* que codifica el dominio V del ARNr 23S, adquisición del gen plasmídico *cfr* y/o mutaciones en los genes que codifican las riboproteínas L3 y L4.

En este trabajo se llevó a cabo la caracterización fenotípica y genotípica de 67 cepas de SCN linezolid-resistentes aisladas de muestras de pacientes ingresados en el Servicio de Reanimación del Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia durante los años 2012 - 2013. La caracterización fenotípica se realizó empleando diversos métodos de identificación bioquímica que incluían sistemas automatizados Vitek 2 (BioMérieux) y Microscan Walkaway (Siemens), los cuales proporcionan datos de identificación de especie y sensibilidad a diversos antimicrobianos y el método de dilución en placa Etest (BioMérieux), para la confirmación de las CMI's a linezolid, oxacilina, vancomicina, teicoplanina, tigeciclina y daptomicina. La meticilin-resistencia se confirmó además utilizando una prueba inmunocromatográfica de detección de PBP2a (Alére). Asimismo, se analizaron diferentes factores de riesgo para determinar una posible relación con el pronóstico del paciente. La caracterización genotípica consistió en el estudio del mecanismo de resistencia a linezolid, centrándonos en la detección del gen *cfr* y la mutación G2576T. Además, se confirmó la presencia del gen *mecA* que codifica resistencia a oxacilina. Paralelamente, se realizó la caracterización molecular de las cepas SCN mediante AP-PCR (Arbitrarily Primed PCR) utilizando como *primer* OPA-11, pudiendo así determinar la presencia de posibles clones.

De los 67 aislados se identificaron 30 *S. epidermidis*, 23 *S. haemolyticus*, 9 *S. hominis* y 5 *S. capitis*. Todos mostraron resistencia a meticilina y linezolid, y sensibilidad a daptomicina y tigeciclina (alternativas utilizadas en casos de SCN linezolid-resistentes). Las CMI's de los glucopéptidos fueron elevadas frente a vancomicina, y con casos resistentes a teicoplanina. De los factores de riesgo analizados únicamente se encontró relación estadísticamente significativa entre la significación clínica que el médico dio a la presencia del SCN linezolid-resistente y el pronóstico del paciente. La meticilin-resistencia del total de aislados se confirmó mediante la detección de PBP2a y del gen *mecA*. El mecanismo de resistencia a linezolid hallado con mayor frecuencia entre los aislados fue la mutación G2576T del gen *rrn* (77%), mientras que el gen *cfr* únicamente se detectó en el 25% de los casos. La AP-PCR dio como resultado la agrupación de los aislados en 5 posibles clones, detectándose dos clones *cfr+* mantenidos a lo largo del estudio.

### *Palabras clave:*

*Staphylococcus coagulasa* negativos resistentes a linezolid, *cfr*, *rrn*, *mecA*, AP-PCR.

## Phenotypical and genotypical characterization of emerging linezolid-resistant coagulase-negative *Staphylococcus* at a district hospital during the years 2012 - 2013.

Coagulase-Negative *Staphylococcus* (CNS) are associated to opportunist nosocomial infections, getting sometimes involved in acute cases of bacteremia. Usually the treatment against these microorganisms is based, due to the high percentage of methicillin-resistance, on the administration of glycopeptides as vancomycin or teicoplanin. Nevertheless, the appearance of strains with decreased sensibility towards these antimicrobials has managed to the need to use new alternatives, among them linezolid, an oxazolidinone active against resistant-grampositives, becoming a drug often used in these kind of infections. In spite of this, more and more linezolid-resistant strains are being located. This resistance can be mediated in three different ways: *rrn* gene mutations which encodes domain V of RNAr 23S, acquisition of gene *cfr* in one plasmid and mutations in the genes that encode L3 and L4 riboproteins.

Throughout this work, a phenotypical and genotypical characterization of 67 isolated linezolid-resistant strains was done, strains that came from the Reanimation Service of the 'Hospital Universitario Doctor Peset', in Valencia, from 2012 to 2013. The phenotypical characterization was performed using several biochemical identification methods including the Vitek 2 (BioMérieux) and Microscan Walkaway (Siemens) automatized methods, which provide data about species identification and sensibility to different antimicrobials and the Ethest (BioMérieux) plate dilution method, used to confirm the linezolid, oxacillin, vancomycin, teicoplanin, tigecycline and daptomycin CMI. Methicillin-resistance was also confirmed using the PBP2a (Alére) immunocromatographic detection test. Likewise several risk factors were analyzed in order to determinate a possible relation with the patient's prognostic. The genotypical characterization consisted on the study of the linezolid-resistant mechanism, focusing on the detection of the *cfr* gene and the G2567T mutation. Besides, the presence of *mecA* gene which encodes oxicillin resistance was confirmed. At the same time, the molecular characterization of the SCN strains was done through AP-PCR using OPA-11 as *primer*, therefore being able to determinate the presence of possible clones.

Out of 67 isolates, 30 were identified as *S. epidermidis*, 23 as *S. haemolyticus*, 9 as *S. hominis* and 5 as *S. capitis*. All of them showed resistance to methicillin and linezolid, and sensibility to daptomycin and tigecycline (alternatives used in linezolid-resistant CNS cases). Glycopeptides' CMI against vancomycin and teicoplanin were risen and some cases of teicoplanin-resistant were detected. Out of the risk factors analyzed only one of them showed statistical significance; the clinical signification of the linezolid-resistant CNS presence considered by the doctor and the prognostic of the patient. Methicillin-resistance of all the isolates was confirmed by the detection of PBP2a and the *mecA* gene. The most frequently linezolid-resistant mechanism found among the isolates was the G2567T mutation of the *rrn* gene (77%), whereas the *cfr* gene only was detected at 25% of cases. AP-PCR gave as result the aggrupation of isolates within 5 possible clones, while two possible *cfr+* clones were detected along the study.

### Key words:

Linezolid-resistant coagulase-negative *Staphylococcus* (CNS), *cfr*, *rrn*, *mecA*, AP-PCR.

Autor: Cristina Martinez Valiente  
Valencia, 30 Junio 2014

Tutor: Antonio Olmos Castelló  
Tutor de la empresa: Juanjo Camarena Miñana

## **AGRADECIMIENTOS**

Me gustaría expresar en estas líneas mi agradecimiento a todas las personas que han hecho posible la realización de este trabajo.

En primer lugar, a todo el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia por brindarme la oportunidad de poder realizarlo, en especial a mi tutor el Dr. Juanjo Camarena por poner todos los medios que tenía a su alcance para poder llevarlo a cabo.

Al equipo del Servicio de Microbiología del Hospital General Universitario de Valencia por la ayuda prestada para la elaboración de este trabajo.

A mi familia, por haberme apoyado siempre en todas las decisiones que he tomado, por animarme a mejorar y superarme día a día y por haberme demostrado que con esfuerzo todo se consigue.

Por último, me gustaría agradecerle a Héctor todo su apoyo, paciencia y comprensión. Por estar ahí en todo momento para ayudarme, evitando que cayera e impulsándome siempre hacia arriba, porque sin su ayuda nada de esto habría sido posible.

Gracias a todos.

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN.</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS.</b>	<b>4</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS.</b>	<b>5</b>
<b>3.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y VARIABLES ANALIZADAS.</b>	<b>5</b>
<b>3.2. IDENTIFICACIÓN DE CEPAS Y SU CONSERVACIÓN.</b>	<b>6</b>
<b>3.3. CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DE LOS AISLADOS.</b>	<b>7</b>
<b>3.3.1. Confirmación de identificación de especie y estudio de sensibilidad.</b>	<b>8</b>
<b>3.3.1.1. Sistemas automatizados para identificación y sensibilidad.</b>	<b>8</b>
<b>3.3.1.2. Estudio de sensibilidad mediante difusión en épsilon (Etest).</b>	<b>9</b>
<b>3.3.1.3. Detección de PBP alterada.</b>	<b>9</b>
<b>3.3.1.4. Biotipo y Antibiotipo de aislados.</b>	<b>10</b>
<b>3.4. ESTUDIOS GENOTÍPICOS SOBRE LOS AISLADOS.</b>	<b>10</b>
<b>3.4.1. Confirmación de la presencia del gen <i>mecA</i>.</b>	<b>11</b>
<b>3.4.1.1. Amplificación y detección del gen <i>mecA</i>.</b>	<b>11</b>
<b>3.4.2. Detección del gen <i>cfr</i> en cepas linezolid-resistentes.</b>	<b>11</b>
<b>3.4.2.1. Extracción de ADN plasmídico.</b>	<b>12</b>
<b>3.4.2.2. Amplificación y detección del gen.</b>	<b>12</b>
<b>3.4.3. Detección de la mutación G2576T del gen <i>rrn</i>.</b>	<b>12</b>
<b>3.4.3.1. Extracción de ADN y amplificación del gen <i>rrn</i>.</b>	<b>13</b>
<b>3.4.3.2. Restricción por <i>NheI</i> y detección de la mutación.</b>	<b>13</b>
<b>3.4.4. Caracterización molecular de aislados mediante AP-PCR con OPA-11.</b>	<b>14</b>
<b>3.4.4.1. Reactivos utilizados.</b>	<b>14</b>
<b>3.4.4.2. Extracción ADN cromosómico.</b>	<b>15</b>
<b>3.4.4.3. Amplificación con OPA-11 del ADN extraído.</b>	<b>16</b>

<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.</b>	<b>16</b>
<b>4.1. VARIABLES DEMOGRÁFICAS Y FACTORES DE RIESGO SOBRE         LOS CASOS-PACIENTE.</b>	<b>17</b>
<b>4.2. ESTUDIO DE IDENTIFICACIÓN, SENSIBILIDAD Y PATRONES         FENOTÍPICOS.</b>	<b>18</b>
<b>4.3. CONFIRMACIÓN DE LA OXACILIN-RESISTENCIA.</b>	<b>20</b>
<b>4.4. DETECCIÓN DEL MECANISMO DE LINEZOLID-RESISTENCIA.</b>	<b>22</b>
<b>4.5. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS AISLADOS,         PATRONES GENOTÍPICOS.</b>	<b>24</b>
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>28</b>
<b>6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>29</b>
<b>6.1. BIBLIOGRAFÍA CITADA</b>	<b>29</b>
<b>6.2. BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA</b>	<b>32</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> <i>Proceso de aislamiento de Staphylococcus coagulasa negativo (SCN).</i>	<b>7</b>
<b>Figura 2.</b> <i>Incremento de CMI frente a glucopéptidos en cepas Staphylococcus coagulasa negativos linezolid-resistentes.</i>	<b>18</b>
<b>Figura 3.</b> <i>Estudio de sensibilidad de Staphylococcus coagulasa negativo (SCN) frente a oxacilina mediante método de difusión en disco-placa (disco de oxacilina de 1µg) y/o difusión sobre tira Etest de oxacilina con siembra directa en agar Müller-Hinton hipersalino.</i>	<b>18</b>
<b>Figura 4.</b> <i>Ejemplos de cepas con prueba inmunocromatográfica positiva en la detección de PBP2a.</i>	<b>21</b>

<b>Figura 5.</b> <i>Electroforesis en gel de agarosa al 1% para detección del gen mecA por PCR, usando los primers RSM2647 y RSM2648.</i>	21
<b>Figura 6.</b> <i>Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para detección del gen cfr por PCR.</i>	22
<b>Figura 7.</b> <i>Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para detección de la mutación G2576T por amplificación del gen rrn.</i>	23
<b>Figura 8.</b> <i>Perfiles electroforéticos en gel de agarosa al 1% de los genotipos más importantes (E1, E2, E3, C3 y HH1) tras la aplicación de AP-PCR con OPA-11 sobre aislados de Staphylococcus coagulasa negativos linezolid y meticilin-resistentes.</i>	24
<b>Figura 9.</b> <i>Distribución temporal de los clones detectados por AP-PCR de Staphylococcus coagulasa negativos en el Servicio de Reanimación del Hospital Universitario Doctor Peset en los años 2012-2013.</i>	27

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> <i>Puntos de corte para el estudio y la interpretación de la CMI (mg/L) por Etest de los antimicrobianos seleccionados en el estudio de SCN.</i>	9
<b>Tabla 2.</b> <i>Resumen de variables demográficas, factores analizados y aislados SCN estudiados.</i>	Anexo I
<b>Tabla 3.</b> <i>Factores de riesgo analizados en relación con la evolución de casos de infección por SCN en REA durante el periodo 2012-2013.</i>	17
<b>Tabla 4.</b> <i>Resultados de estudio de sensibilidad por Etest de cepas Staphylococcus coagulasa negativos resistentes a linezolid y meticilina frente a antimicrobianos alternativos.</i>	19
<b>Tabla 5.</b> <i>Relación entre fenotipo, antibiograma y biotipo de los SCN aislados.</i>	19
<b>Tabla 6.</b> <i>Genotipos obtenidos de las cepas de Staphylococcus coagulasa negativos resistentes a linezolid y meticilina tras la aplicación de la AP-PCR con OPA-11.</i>	26

## ABREVIATURAS EMPLEADAS

<i>Staphylococcus</i> coagulasa negativos	SCN
Servicio de Reanimación	REA
<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina	SARM
Concentración Mínima Inhibitoria	CMI

## 1. INTRODUCCIÓN.

Entre los microorganismos grampositivos, es el género *Staphylococcus* tanto *S. aureus* como *Staphylococcus coagulasa* negativo (SCN) los habitualmente asociados a infección nosocomial. En el caso de *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM), debido a las características de los pacientes ingresados es, por su potencial implicación epidemiológica, el más estudiado, seguido de *Enterococcus faecalis* y *E. faecium* por su asociación a posibles resistencias en pacientes hospitalizados con factores de riesgo. Sin embargo, cuando se analizan las bacterias asociadas a infecciones por microorganismos oportunistas en hospitales en todo el mundo es el SCN, con sus diferentes especies, el que ocupa siempre el primer lugar en todos los estudios, incluidos los que se realizan en nuestro país. Su forma de presentación abarca un amplio espectro clínico, siendo capaces de causar infecciones de todo tipo en pacientes ingresados en prácticamente cualquier planta de hospitalización, en especial en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) y el servicio de Reanimación (REA) (Sánchez and De La Torre, 2013).

Los SCN son microorganismos ubicuos ambientales y/o presentes en superficies de piel y mucosas de personas y animales que, aunque habitualmente se consideran contaminantes de muestras biológicas de pacientes, en especial en muestras de exudados cutáneos o mucosas, ocasionan en determinadas situaciones infecciones oportunistas que pueden afectar a cualquier órgano. Pueden estar implicados en casos graves de bacteremias, asociadas a catéteres periféricos y/o centrales, causando endocarditis o incluso infecciones en prótesis u otros dispositivos, siempre en el contexto de una infección nosocomial asociada en numerosas ocasiones a brotes de origen hospitalario (Ruiz *et al.*, 2011).

Entre las especies de SCN de mayor interés clínico destaca principalmente *Staphylococcus epidermidis*, al ser el más frecuente y el de mayor relevancia por su elevada capacidad de producir *biofilm*, facilitando su propagación en catéteres intravenosos y otros dispositivos, produciendo bacteremias secundarias. Además, especies como *S. haemolyticus*, *S. warneri* y *S. hominis*, entre otras, se han asociado a cuadros similares, pudiendo aislarse de cualquier muestra del paciente del que se debe descartar siempre su posible implicación etiopatogénica (Lozano *et al.*, 2013).

La implicación de estos SCN como oportunistas en procesos infecciosos nosocomiales supone un problema añadido de dificultad en los planteamientos terapéuticos de estos casos, ya que éstos son de manera intrínseca más resistentes que *S. aureus*, presentando porcentajes de meticilina resistencia por encima del 70-80%, que al igual que en el caso de los SARM supone la no indicación de ningún  $\beta$ -lactámico, y por tanto, de meticilina, oxacilina y cloxacilina, en su tratamiento. Entre los diferentes mecanismos de resistencia descritos cabe destacar la producción de  $\beta$ -lactamasas y el desarrollo de proteínas de unión a penicilina (PBP) modificadas. El mecanismo de resistencia a meticilina es similar al descrito en *S. aureus*, asociado en general a la síntesis de una PBP modificada (PBP2a), codificada por el gen *mecA*, que forma parte del complejo *SSCmec*, presentando así baja afinidad por todos los betalactámicos (Stapleton and Taylor, 2002).

Debido a la resistencia asociada que presentan estos SCN a otros grupos de antimicrobianos, se recomienda el uso de glucopéptidos, vancomicina o teicoplanina, como tratamiento empírico frente a estos SCN meticilin-resistentes. Sin embargo, la aparición cada vez más frecuente de cepas con sensibilidad disminuida a estos glucopéptidos, así como los parámetros farmacocinéticos subóptimos para vancomicina y su toxicidad asociada, limitan su utilidad en determinados grupos de pacientes o en cepas SCN con incremento de CMI a vancomicina ( $CMI \geq 2 \text{ mg/L}$ ) (Ruiz *et al.*, 2011). Para completar este escenario de dificultades en el tratamiento empírico de estos microorganismos, en los últimos años se ha producido una gran reducción en el ritmo de aprobación de nuevos antimicrobianos, quedando los recursos limitados en la clínica diaria hospitalaria a tres alternativas: linezolid, daptomicina y tigeciclina. Por tanto, disminuyen las opciones disponibles para el tratamiento de estos cocos grampositivos multirresistentes, asociándose en general a un aumento significativo de la mortalidad en este tipo de infecciones (Sánchez and De La Torre, 2013).

Uno de los antimicrobianos considerado desde el inicio de su comercialización en el año 2001 como alternativa válida para el tratamiento de SCN meticilin-resistentes, con amplia utilización en unidades de riesgo, es el linezolid, perteneciente a la familia de las oxazolidinonas. Éste es activo frente a la mayoría de bacterias grampositivas, incluyendo *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina, *Staphylococcus* resistentes con sensibilidad disminuida a glucopéptidos, *Enterococcus faecalis* y/o *E. faecium* resistentes a vancomicina y una gran variedad de *Streptococcus* (López-Fabal *et al.*, 2013). El mecanismo de acción de este antibiótico consiste en su unión a la subunidad 50S del ribosoma de la célula procariota, en el centro peptidiltransferasa dentro del 23S ARNr (Dominio V). Esto produce la distorsión del punto de unión del formilmetionil-ARNt, evitando por tanto la formación del complejo de iniciación (Calvo and Martínez-Martínez, 2009).

El modo de acción del linezolid difiere de otros inhibidores de la síntesis proteica, como es el caso del cloramfenicol, macrólidos, lincosamidas y tetraciclinas. Son todos ellos antibióticos bacteriostáticos al actuar sobre la síntesis proteica. Estos permiten la formación del complejo de iniciación aunque inhiben la elongación del péptido. Esta diferencia es significativa y relevante, ya que, a pesar de que prevenir la iniciación de la síntesis proteica es tan efectivo contra el microorganismo como prevenir la elongación del péptido, el particular modo de acción del linezolid a nivel de iniciación le proporciona mayor efectividad en la prevención de la síntesis de factores de virulencia de *Staphylococcus* y *Streptococcus*, como son entre ellos la coagulasa, las hemolisinas y la proteína A (Livermore, 2003). El linezolid, a diferencia de otros agentes de este grupo es sólo activo frente a grampositivos, al presentar los gramnegativos resistencia a las oxazolidinonas, ya que aparentemente, son reconocidas y excretadas por bombas de flujo endógenas. Sin embargo, presenta una mayor actividad intrínseca frente a grampositivos multirresistentes por su particular mecanismo de acción, siendo así una alternativa altamente eficaz en estos casos, siempre que no experimenta resistencia.

Al tratarse de una molécula sintética, originalmente no deberían existir reservorios naturales que explicaran las resistencias a linezolid. Por ello las resistencias descritas a este fármaco deberían asociarse con mutaciones puntuales de baja frecuencia. Sin embargo, desde su mayor utilización en la práctica clínica cada vez se van describiendo mayor cantidad de cepas resistentes a este antimicrobiano (López-Fabal *et al.*, 2013). Los estudios llevados a cabo

para dilucidar los posibles mecanismos de resistencia de los microorganismos grampositivos a este antimicrobiano, detectan tres posibles tipos de resistencias: *a)* mutaciones nucleotídicas en el gen *rrn*, el cual codifica el dominio V del ARN 23S. Estas mutaciones pueden darse en una o en varias copias del gen codificante, destacando fundamentalmente G2447T, T2500A y G2576T, siendo esta última la más frecuente. Este mecanismo de resistencia es el más habitual, aumentando los niveles de resistencia en función del número de copias mutadas, que suelen ser 5 o 6 en el caso de *Staphylococcus*; *b)* la adquisición del gen *cfr* plasmídico, que codifica una metiltransferasa ribosómica que modifica la adenosina situada en la posición 2503 del 23S RNA; y *c)* mutaciones que afectan a los genes *rcpC* y *rplD* que codifican las proteínas L3 y L4, respectivamente, de la subunidad ribosómica 50S (Cui *et al.*, 2013).

Estos mecanismos comentados se pueden relacionar con los tres tipos diferentes de fenotipos de resistencia detectados en el laboratorio: *a)* resistencia cruzada a linezolid y a pleuromutilinas; *b)* resistencia cruzada al linezolid, fenicoles, pleuromutilinas, lincosamidas y estreptogamina A (también conocido como fenotipo PhLOPS<sub>A</sub>); y *c)* resistencia cruzada a linezolid, macrólidos y cloramfenicol. Sin embargo, al ser frecuente que las cepas presenten más de un mecanismo de resistencia diferente, resulta difícil generalmente poder asociar el fenotipo observado con el mecanismo real de resistencia a linezolid, asociado a este caso (Ardanuy *et al.*, 2011).

El relativamente reciente problema detectado en clínica de resistencia a linezolid de microorganismos grampositivos se ha asociado fundamentalmente en SCN de muestras de pacientes bien diferenciados en determinados grupos de riesgo. Éstos incluyen tanto pacientes con infección recurrente por SARM, que reciben tratamiento muy prolongado con linezolid por vía oral, como aquellos pacientes hospitalizados de larga estancia por complicaciones con enfermedades crónicas y/o inmunodepresión, que ha conllevado ingreso en unidades de riesgo hospitalarias como las unidades de cuidados intensivos (UCI) o de reanimación (REA). Estos pacientes reciben, por sus complicaciones infecciosas, habitualmente un número variable de ciclos de tratamiento antimicrobiano múltiple que suele incluir linezolid. Esto ha sido observado en nuestro entorno al detectar en el Hospital Universitario Doctor Peset (Camarena *et al.*, 2012) el incremento progresivo de linezolid-resistencia, desde cifras del 3,5% en 2010 hasta 20% en enero de 2012. La caracterización de aislados de este grupo demostró además incrementos de CMI frente a vancomicina y teicoplanina, debiendo establecerse unas pautas adecuadas para la detección y control adecuado de estos aislados en estas unidades.

Existen diversos ejemplos de situaciones en las que una elevada presión antibiótica por uso prolongado favorece la selección de microorganismos resistentes; este es el caso de linezolid. Existen datos tanto *in vitro* como *in vivo* de que la aparición de la mutación G2576T del gen *rrn* está directamente relacionada con la presencia y el consumo de linezolid, y esto se confirma porque en ausencia del antibiótico las cepas recuperan la sensibilidad. Por ello, la reducción del uso de linezolid ante la detección de cepas resistentes es una medida obligatoria, debiendo cambiar entonces a tratamiento dirigido con tigeciclina o bien daptomicina, teniendo presente que la daptomicina se inhibe por el surfactante pulmonar. Sin embargo, cuando la mutación se debe a la presencia del gen *cfr*, esta relación causa-efecto resulta menos evidente, ya que su aparición no parece “inducirse” directamente por la administración de linezolid. Se ha especulado en estos casos con la transmisión horizontal del gen *cfr* entre cepas. En este caso la

aparición de cepas resistentes no dependería sólo del uso del antibiótico sino también de la selección por la “casualidad” de la presencia de SCN portadores del gen (Sánchez and De La Torre, 2013). Esta última posibilidad añade por tanto mayor gravedad a los pacientes con la detección de estas cepas resistentes, pues la diseminación del correspondiente plásmido favorece la aparición de brotes nosocomiales. Esta propagación no sólo se ha descrito entre pacientes del mismo hospital, sino además entre pacientes de distintos centros, incluso de distintos países, llegando a la transmisión entre diferentes microorganismos, como se ha descrito tanto entre distintas especies de *Staphylococcus* o incluso entre *S. aureus* y *Klebsiella pneumoniae* (Sánchez *et al.*, 2013).

Así, para poder controlar el impacto que puede llegar a ocasionar la presencia de cepas linezolid-resistentes en población de riesgo, en especial aquella susceptible de infecciones oportunistas nosocomiales, resulta esencial el pautar un eficaz mecanismo de detección y control de este tipo de infecciones por SCN resistentes a linezolid en cada hospital. La mayor edad de la población atendida en UCI/REA, y en consecuencia el incremento del número de pacientes potenciales de riesgo de padecer estas infecciones, nos deben alertar de la necesidad de aplicar una adecuada política de antibióticos que incluya un adecuado control de las resistencias.

## 2. OBJETIVOS.

En el presente trabajo se planteó como objetivo principal el estudio de los mecanismos de resistencia a linezolid en aislados de *Staphylococcus* coagulasa negativos con posible resistencia a meticilina, detectados a partir de las muestras de pacientes ingresados en el Servicio de Anestesia y Reanimación (REA) del Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia durante los años 2012-2013.

Para cumplir satisfactoriamente este objetivo general, se plantearon además los siguientes objetivos específicos:

1. Identificar las diversas especies de *Staphylococcus* detectados a partir de muestras de pacientes de REA, empleando métodos automatizados como son los sistemas Vitek 2 y Microscan Walk-away, y la pauta utilizada en la rutina habitual del laboratorio del Servicio de Microbiología del hospital,
2. Estudiar la sensibilidad de los SCN aislados a diferentes grupos de antimicrobianos indicados, utilizando para ello tanto métodos automatizados, sistema Vitek 2, como manuales, método de difusión en épsilon (Etest) para determinación de CMIs frente a cada antibiótico y detección de los casos de SCN linezolid-resistentes.
3. Detectar el mecanismo de resistencia a linezolid que han desarrollado los diversos SCN aislados, centrándonos en la mutación G2576T del gen *rrn*, el cual codifica el dominio V del ARNr 23S y la posible adquisición del gen plasmídico *cfr*.

4. Estudiar la meticilin resistencia de los aislados tanto por métodos de confirmación genotípicos mediante detección de la presencia del gen *mecA*, como por métodos fenotípicos basados en el método de difusión en agar o detección de PBP2a por inmunocromatografía.
5. Determinar la presencia de posibles clones y su distribución temporal, utilizando tanto métodos de caracterización fenotípica, biotipado obtenido por el Vitek-2 y antibiotipado derivado de la sensibilidad a diversos antimicrobianos, como métodos de agrupación genotípica como la AP-PCR utilizando el *primer* OPA-11.
6. Analizar los posibles factores de riesgo intrínsecos y /o extrínsecos y factores de pronóstico de los pacientes infectados por cepas linezolid-resistentes, a partir de datos obtenidos de la Historia Clínica informatizada que se dispone de cada paciente.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS.

#### 3.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y VARIABLES ANALIZADAS.

Se realizó un estudio retrospectivo con intervención sobre variables que incluyó aquellos casos de pacientes con aislamiento de posibles *Staphylococcus coagulasa* negativos (SCN) con resistencia a linezolid confirmada mediante determinación de CMI  $\geq 8$ mg/L (punto de corte recomendado por el *Clinical and Laboratory Standards Institute*, CLSI), de muestras procedentes de pacientes ingresados en el Servicio de Reanimación (REA) del Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia y remitidas al Servicio de Microbiología para su diagnóstico, durante los años 2012-2013.

Las muestras analizadas correspondieron a aquellos pacientes con sospecha clínica de infección bacteriana tras su ingreso en REA, que se procesan habitualmente en hemocultivos (en series de al menos dos frascos de cultivos roller para estudio de microorganismos aerobios y anaerobios), así como, en función de la sintomatología que presente, aquellos catéteres centrales y/o periféricos, líquidos estériles como líquido peritoneal, exudados de abscesos postquirúrgicos, etc. Incluyendo por tanto en cada caso cualquier posible foco del cuadro clínico.

Entre los microorganismos aislados de estas muestras se procedió a la identificación a nivel de especie de todos aquellos *Staphylococcus* spp., tanto *S. aureus* como SCN, desde los habituales *S. epidermidis* y *S. haemolyticus*, hasta menos frecuentemente asociados a diagnósticos clínicos como *S. hominis*, *S. warneri*, *S. capitis* o cualquier otra especie de este género. En todos los casos, se procedió a identificar aquellos otros microorganismos (bacterias y hongos) asociados o causantes de infecciones polimicrobianas, al ser este un grupo de pacientes con elevado riesgo de este tipo de infecciones.

En cada uno de los casos-paciente detectados con esta característica de linezolid resistente se procedió a la revisión del análisis de variables a estudiar, tomadas a partir de la Historia Clínica informatizada en el hospital. Así, en primer lugar, se analizaron las variables demográficas (edad, sexo) así como la presencia de factores intrínsecos y/o extrínsecos de

riesgo: presencia de fiebre, taquicardia, taquipnea, reactantes de fase aguda (PCR, procalcitonina, etc...), leucocitosis y otros factores para determinar presencia de sepsis, sepsis grave y shock séptico con posible fallo multiorgánico. Además se estudió la posible presencia de un foco pulmonar, conexión a ventilación mecánica, neoplasias con tratamiento con quimioterapia, insuficiencia renal y/o diabetes mellitus. Todos estos factores finalmente se relacionaron con los días de ingreso en REA, tratamiento antibiótico empírico y/o dirigido y pronóstico de los pacientes.

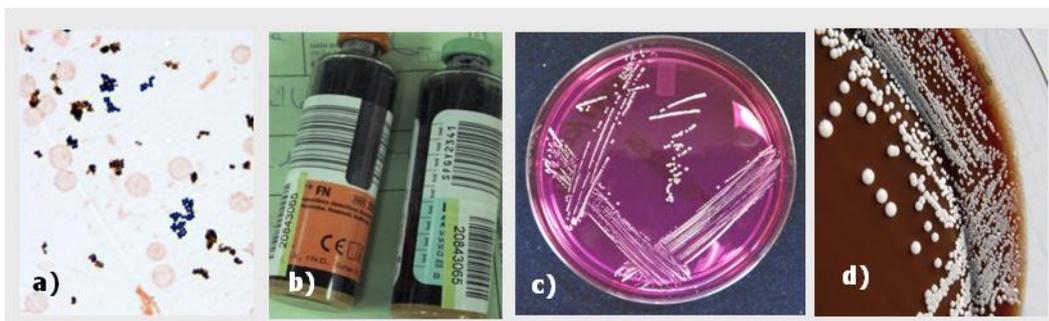
Para establecer la significación clínica del aislado de SCN en muestra del paciente se definió este concepto como la importancia que el médico peticionario había dado a la presencia de SCN resistente a linezolid en las muestras, viendo si estaba con tratamiento antiestafilocócico y si cambió el tratamiento pautado inicialmente con linezolid a tratamiento dirigido con tigeciclina o daptomicina. Se definió además, la significación microbiológica de estos aislados, entendiéndola como la aparición simultánea de la cepa resistente en diversas muestras o en diferentes fechas de extracción. Finalmente, se evidenció el posible tratamiento con linezolid durante el episodio, para considerar si podía estar relacionado con el desarrollo de resistencia a este antimicrobiano.

Por último, se realizó un análisis estadístico calculando el *p value*, para encontrar la posible relación entre las infecciones polimicrobianas, tratamiento empírico adecuado, administración de linezolid previo, circulación intrahospitalaria y shock séptico con el pronóstico del paciente (alta hospitalaria o *exitus*).

### 3.2. IDENTIFICACIÓN DE CEPAS Y SU CONSERVACIÓN.

El protocolo de trabajo para determinación de presencia de *Staphylococcus spp.* resistentes a linezolid en las muestras de estos pacientes de REA, y la conservación de las cepas para posterior realización de estudios epidemiológicos o de caracterización fenotípica, fue el de rutina del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia.

Se utilizó el sistema automatizado de lectura continua, BacT/ALERT 3D (BioMérieux), para la detección de hemocultivos positivos. El aislamiento de SCN se realizó a partir de hemocultivos donde la tinción de Gram mostró la presencia de cocos grampositivos agrupados en tétradas y/o racimos. En estos casos se realizó un subcultivo en las mismas placas utilizadas para siembra desde catéter, sondas, abscesos o cualquier otro tipo de muestras: *a)* agar chocolate PoliViteX; *b)* medio de agar sangre con ácido nalidíxico (CNA) para obtención de colonias blancas catalasa positivas; y *c)* medio MSA (*Mannitol Salt Agar de Chapman*), el cual tiene un 7,5% de cloruro sódico que dificulta el crecimiento de otros géneros diferentes a estafilococos, y además la presencia de manitol en el medio facilita la diferenciación entre aquellas especies capaces de fermentarlo, produciendo un cambio de color en el medio de rosado a amarillo (*S. aureus* y *S. capitis*) y las que no fermentan manitol (*S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, etc.). Estos cultivos se incubaron a 37°C durante 24h para obtención de masa bacteriana sobre la que poder realizar las pruebas pertinentes de identificación (*Figura 1*).



**Figura 1.** Proceso de aislamiento de *Staphylococcus coagulasa negativo* (SCN) a) Tinción de Gram con cocos grampositivos a partir de muestra. b) Frascos roller de hemocultivos del sistema BacTAlert 3D. c) Aislamiento de cepa de SCN manitol negativo en placa de Chapman-MSA. d) Aislamiento de SCN agar chocolate PoliVitex.

Una vez llevada a cabo una identificación previa como *S. aureus* o SCN, la confirmación de especie de estas cepas se realizó mediante el estudio de características bioquímicas en el sistema automatizado Vitek 2 (BioMérieux) empleando las tarjetas GP y AST-P626. Este sistema identificó la gran mayoría de SCN, siendo necesario en los casos de no diferenciación de especie la utilización de un API para *Staphylococcus* (API Staph, BioMérieux), o incluso de otros sistemas automatizados como Microscan Walk-away (Siemens) tal como se describe posteriormente.

Las cepas, una vez identificadas, se conservaron mediante congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$  suspendidas en criotubos a partir de colonias con crecimiento no superior a 48 h para posteriores estudios de sensibilidad y caracterización epidemiológica. La composición del medio de conservación (1 mL en cada criotubo) fue: 3 g de liofilizado triptona-soja caldo (TSB), 85 mL de agua destilada y 15 mL de glicerina 87%.

Las cepas control utilizadas para la validación de las distintas técnicas aplicadas en nuestro estudio fueron: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (sensible a meticilina,  $\beta$ -lactamasa positiva) y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (sensible a meticilina,  $\beta$ -lactamasa negativa) en la técnica de AP-PCR; *Staphylococcus aureus* ATCC 38591 (oxacilin-resistente) como control en la técnica de detección del gen *mecA* y de métodos fenotípicos de detección de meticilín-resistencia, *Staphylococcus epidermidis* (linezolid resistente, *cfr* confirmado) para la técnica de detección del gen plasmídico *cfr* y *Staphylococcus aureus* (linezolid resistente, mutación G2576T positiva) para la técnica de detección de la mutación G2576T, ambas cepas cedidas por el Servicio de Microbiología del Hospital General Universitario de Valencia.

### 3.3 CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DE LOS AISLADOS.

La caracterización fenotípica que se llevó a cabo en el estudio consistió en la identificación de las diferentes cepas aisladas y conservadas así como en la determinación de sensibilidad o resistencia a diferentes antimicrobianos, incluyendo linezolid.

Para la diferenciación entre *S. aureus* y otras especies de *Staphylococcus* (SCN), utilizó la prueba de la coagulasa, ya que *S. aureus* es la única especie de estafilococo capaz de producir este enzima que provoca la transformación de fibrinógeno en fibrina. Se realizó en primer

lugar una prueba rápida de detección de coagulasa ligada a la pared bacteriana (Pastorex Staph Plus, Bio-Rad), añadiendo una gota de reactivo en un portaobjetos frotando sobre su superficie una colonia de la especie a identificar, donde en menos de 40 segundos se observó si se producía o no aglutinación. La confirmación de la positividad se efectuó detectando la coagulasa libre, para lo que se emulsionó una colonia sobre plasma de conejo en tubos de ensayo incubándose a 37°C durante 4 a 24 h, siendo positivo cuando se coagulaba el plasma.

La identificación de especies se realizó mediante técnicas automatizadas, como el sistema Vitek 2 (BioMérieux) y Microscan Walk-away (Siemens). Para el estudio de sensibilidad se utilizaron los datos proporcionados por la tarjeta AST-P626 del Vitek 2 y técnicas manuales como el método Etest (BioMérieux) o test rápido para detección de PBP2a (Alere®) en caso de meticilin resistencia.

### **3.3.1. Confirmación de identificación de especie y estudio de sensibilidad.**

Para llevar a cabo este estudio se procedió a confirmar la especie y resistencia a partir de las cepas congeladas a -80°C desde su detección. Para ello, se frotaron los diferentes criotubos con asas de siembra y se cultivaron las diferentes cepas en agar chocolate, CNA y MSA en las condiciones anteriormente citadas.

Las colonias recuperadas se analizaron visualmente de manera muy rigurosa antes de los estudios para detectar posibles contaminaciones, pasando entonces a realizar los distintos métodos empleados para la identificación de las cepas y la detección de la sensibilidad a antimicrobianos.

#### **3.3.1.1. Sistemas automatizados para identificación y sensibilidad.**

Tanto la confirmación de género y la identificación de especie de las cepas, como la sensibilidad de éstas a diversos antimicrobianos se realizó empleando los sistemas automatizados disponibles comercialmente, Vitek 2 (BioMérieux) y Microscan Walk-away (Siemens). El primero está basado en la utilización de tarjetas que contienen diversas pruebas bioquímicas para la identificación bacteriana, cuyo análisis tarda aproximadamente entre 4 y 6 h en proporcionar los resultados. El segundo sistema, sustituye las tarjetas de identificación por paneles, aunque el principio básico es el mismo. Sin embargo, el tiempo de análisis es mayor oscilando entre las 24 y las 36 h, siendo utilizado en este sistema para confirmar la identificación proporcionada por el sistema Vitek 2 en casos discrepantes, incluyéndose además un sistema de API para *Staphylococcus* (API Staph, BioMérieux).

En el caso del sistema Vitek 2 se realizó una dilución directa de las colonias en suero fisiológico hasta alcanzar un equivalente al estándar de 0.75 de Mc Farland. Se emplearon en este caso las tarjetas GP y AST - P626 las cuales nos proporcionan la identificación de especie y la sensibilidad a los siguientes antimicrobianos: bencilpenicilina, oxacilina, gentamicina, tobramicina, levofloxacino, eritromicina, clindamicina, linezolid, daptomicina, teicoplanina, vancomicina, tigeciclina, fosfomicina, ácido fusídico, mupirocina, rifampicina y sulfametoxazol.

En el sistema Microscan Walk-away se emplearon los paneles de identificación PosCombo-32, que se emplean para la identificación de los diferentes géneros y especies de bacterias grampositivas, confirmando especies y sensibilidad a tetraciclina (antibiótico no incluido en la tarjeta AST P626 del Vitek 2).

### 3.3.1.2. Estudio de sensibilidad mediante difusión en épsilon (Etest).

La sensibilidad de las cepas a vancomicina, teicoplanina, tigeciclina, daptomicina, oxacilina y linezolid, mediante determinación de CMI, se realizó con el método Etest (BioMérieux). Éste consiste en extender una dilución de los microorganismos sobre el agar Mueller Hinton II, colocando sobre el mismo tras la siembra unas tiras de plástico que contienen un gradiente predefinido de concentraciones de cada antibiótico, pudiendo así conocer la concentración mínima inhibitoria (CMI) en mg/L, coincidiendo el punto de corte de la épsilon de inhibición con el gradiente del antibiótico.

Para el Etest de especies de estafilococos se siguieron las instrucciones de utilización del fabricante. Se realizó una suspensión directa de las colonias equivalente al estándar de 0.5 de Mc Farland, colocando a continuación la tira Etest correspondiente sobre su superficie sembrada, produciéndose una difusión en épsilon del antibiótico desde el soporte hasta el agar, creándose un gradiente exponencial y continuo de las concentraciones de antimicrobiano. La incubación se realizó a 35°C durante 24 h, excepto en el caso de la oxacilina que se sembró en MHII hipersalino (2%) y se incubó a 30-32°C para facilitar la expresión de resistencia. Los puntos de corte para la interpretación de sensibilidad o resistencia de cada uno de estos antibióticos realizados por Etest se reflejan en la *tabla 1*.

**Tabla 1:** Puntos de corte para el estudio y la interpretación de la CMI (mg/L) por Etest de los antimicrobianos seleccionados en el estudio de SCN (CLSI, 2013)

Antibiótico	Rango	S	I	R
Oxacilina	0.016-256	≤ 0.5	-	≥ 1
Linezolid	0.016-256	≤ 4	-	≥ 8
Vancomicina	0.016-256	≤ 2	4 - 8	≥ 16
Teicoplanina	0.016-256	≤ 8	16	≥ 32
Tigeciclina*	-	≤ 0.5	-	> 0.5
Daptomicina**	-	≤ 1	-	-

\*: puntos de corte para Tigeciclina aprobados por el European Comité on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, 2006) basados en índices farmacodinámicos.

\*\* : La ausencia o rara aparición de cepas resistentes a daptomicina hace que no se consideren categorías diferentes a la "sensible", y los aislamientos con resultados sugestivos de cepa "no sensible" deberían confirmarse en laboratorios de referencia en los que se utilice el método de dilución de referencia del CLSI.

### 3.3.1.3. Detección de PBP alterada.

La presencia de PBP2a se realizó mediante una prueba rápida de inmunocromatografía (PBP, Alere) que permite detectar meticilin-resistencia por la puesta en evidencia del producto

de expresión del gen *mecA*. Esta prueba detecta la presencia de la proteína alterada de unión a penicilina (PBP2a) en la pared celular bacteriana, la cual es codificada por el gen *mecA*.

Para la realización de la prueba se añadieron dos gotas del reactivo 1 en un tubo de ensayo proporcionado por la casa comercial. Posteriormente con ayuda del asa de siembra se incorporaron en su interior 3 colonias de la cepa a estudiar y dos gotas del reactivo 2, agitándolo a continuación para su adecuada emulsión. Por último, se añadió la tira inmunocromatográfica y se esperaron 5 minutos, tras lo cual se procedió a su lectura, basada en la aparición de una banda en el control de reacción y la presencia o no de banda correspondiente a la PBP2a.

#### **3.3.1.4. Biotipo y Antibiotipo de aislados.**

Una vez obtenidos los resultados de la identificación y la sensibilidad a los diferentes antimicrobianos empleando los diversos métodos descritos anteriormente, se procedió a establecer el biotipo y el antibiotipo de cada cepa del estudio, para poder concluir posteriormente si las cepas eran fenotípicamente iguales.

La determinación del biotipo se realizó a partir del sistema Vitek 2, el cual lo asigna a las muestras que analiza en función del resultado obtenido en las diferentes pruebas bioquímicas de identificación. El nivel de similitud del fenotipo en cada cepa - especie aislada dependerá de la numeración obtenida asignando un valor a cada prueba. En el caso del antibiotipo es el número que se asignó para el estudio actual, obtenido de establecer una relación numérica entre una serie de antimicrobianos (analizados por los sistemas comentados en el apartado anterior) y la sensibilidad o resistencia que poseen las cepas a ellos; de modo que, si la cepa era sensible a ese antimicrobiano se asignó un 1, y si era resistente o intermedia un 0. El orden de los antibióticos seleccionados para la determinación del antibiotipo fue: penicilina, oxacilina, eritomicina, clindamicina, gentamicina, levofloxacino, fosfomicina, tetraciclina, cotrimoxazol, rifampicina, vancomicina, teicoplanina, tigeciclina, daptomicina, ácido fusídico y mupirocina.

### **3.4. ESTUDIOS GENOTÍPICOS SOBRE LOS AISLADOS.**

La confirmación mediante PCR para detección del gen *mecA*, gen *cfr*, mutación G2576T localizada en el gen *rrn* el cual codifica el dominio V del ARNr 23S y el análisis genotípico para agrupaciones de posibles clones mediante AP-PCR se realizó sobre cepas seleccionadas a partir de sus características fenotípicas y/o implicación clínica del caso.

Así, sobre el total de cepas linezolid-resistentes detectadas a lo largo de los dos años del estudio, se procedió a realizar la caracterización y los estudios genotípicos sobre aquellas cepas que se pudieron conservar y recuperar tras su congelación, atendiendo a casos de pacientes con posible implicación clínico-microbiológica de una o más especies de SCN distintas caracterizadas inicialmente mediante los estudios fenotípicos (biotipo y/o antibiotipo), en especial aquellas que tras sospecha de posible agrupación fenotípica hubo que confirmarla mediante aplicación de métodos genotípicos.

### 3.4.1. Confirmación de la presencia del gen *mecA*.

La presencia del gen *mecA* confiere resistencia al grupo de antibacterianos antiestafilocócicos, meticilina y oxacilina entre otros, y por su mecanismo resistencia global a todos los  $\beta$ -lactámicos en general. Sin embargo, la expresión de la resistencia es heterogénea en algunas cepas, lo que implica que la mayoría de la población es susceptible a una concentración relativamente baja de  $\beta$ -lactámicos, lo que dificulta la detección por métodos tradicionales como son la difusión disco-placa en agar y las diluciones del antibiótico en agar (Olmos, 1997). Por ello, independientemente de meticilin-resistencia por Etest o métodos de detección de PBP2a por inmunocromatografía, se confirmó la resistencia en todos los casos con métodos moleculares. La PCR aplicada a la detección de un fragmento de 533 pb del gen *mecA*, el cual codifica para la proteína alterada PBP2a, confirma este mecanismo de resistencia a  $\beta$ -lactámicos (Murakami *et al.*, 1991). Usando dos *primers* complementarios a una porción del gen *mecA*, el primer homólogo a la hebra 5'  $\rightarrow$  3' ó RSM 2647 (1182 – 1303 pb), y el correspondiente a la hebra antisentido 3'  $\rightarrow$  5' ó RSM 2648 (1814 – 1793 pb) previamente descritos por Murakami *et al.* (1991), se podrá detectar por PCR un fragmento amplificado de 533pb, que codifica la meticilin-resistencia y siendo válido para la detección y control de brotes (Jayaratne y Rutherford, 1999).

La cepa control empleada para la validación de esta técnica fue *Staphylococcus aureus* ATCC 38591 (oxacilin-resistente).

#### 3.4.1.1. Amplificación y detección del gen *mecA*.

La amplificación de la secuencia se realizó sin necesidad de extraer previamente el ADN (Olmos, 1997), diluyendo directamente una colonia de la cepa problema en el cóctel de amplificación, el cual estaba constituido además por 7.5  $\mu$ L de tampón IV (10x), 2.5  $\mu$ L de  $MgCl_2$ , 0.2  $\mu$ L de cada primer, 0.5  $\mu$ L de Red Hot polimerasa y 0.5  $\mu$ L de dNTPs, llevándolo hasta un volumen final de 25  $\mu$ L con agua destilada estéril.

Las condiciones de amplificación aplicadas fueron las siguientes (Olmos, 1997): una fase inicial de desnaturalización a 94°C durante 4 min, 40 ciclos constituidos por una desnaturalización a 94°C durante 30 s, una hibridación a 55°C durante 30 s, y una extensión a 72°C durante 1 min, finalizando con una última fase de extensión a 72°C durante 5 min.

El análisis de los fragmentos obtenidos fue realizado en un en gel de agarosa al 1%, con tampón TBE a 100V. El marcador de peso molecular empleado fue el VI de Boehringer Mannheim. Una vez finalizada la electroforesis, se procedió a la detección de los productos de amplificación en un transiluminador UV a 300 nm para observación de posible presencia de amplificado de 533 pb (*mecA*) que codifica para PBP2a, presente en cepas resistentes a meticilina/oxacilina pero ausente en las sensibles.

### 3.4.2. Detección del gen *cfr* en cepas linezolid-resistentes.

El gen *cfr* codifica una metiltransferasa la cual modifica la adenina en posición 2503 del 23S ARNr alterando el sitio de unión del linezolid y por tanto inhibiendo su acción, confiriendo

resistencia tanto a este antimicrobiano como a otros que actúan a este nivel como es el caso de macrólidos-lincosamidas (clindamicina).

La detección de la presencia del gen plasmídico *cfr* se realizó sobre todos los SCN aislados en REA incluidos en el estudio según el procedimiento descrito por Morales *et al.* (2010), donde se detalla un protocolo de trabajo similar al descrito por Kehrenberg y Schwarz (2006) pero bajo unas condiciones de amplificación con algunas modificaciones, y que se describe a continuación.

Se empleó como control una cepa de *Staphylococcus epidermidis* con presencia confirmada del gen *cfr* cedida por el Servicio de Microbiología del Hospital General Universitario de Valencia.

#### **3.4.2.1. Extracción de ADN plasmídico.**

Para la extracción de ADN plasmídico en este caso se empleó el método modificado de *boiling* (Queipo-Ortuño *et al.*, 2008), mediante el cual se obtiene ADN amplificable requiriendo un menor coste y tiempo de trabajo (Alegre *et al.*, 2013).

Para ello, se diluyeron aproximadamente 3 colonias bacterianas perfectamente aisladas en 700  $\mu$ l de agua estéril. A continuación se calentaron las muestras a 95°C en un termobloque durante 15 min. Seguidamente se centrifugaron las muestras y se recuperó el sobrenadante, el cual contiene el ADN plasmídico en cada caso.

#### **3.4.2.2. Amplificación y detección del gen.**

Para llevar a cabo la amplificación se añadió (para un volumen final de 25  $\mu$ L), 12.5  $\mu$ L de master mix (AmpliTaq gold PCR master mix, ABI), 5  $\mu$ L de ADN, 0.2  $\mu$ L del primer directo (*Cfr-fw* TGA AGT ATA AAG CAG GTT GGG AGT CA), 0.2  $\mu$ L del primer reverso (*Cfr-rv* ACC ATA TAA TTG ACC ACA AGC AGC) completando hasta el volumen final con agua destilada.

Las condiciones de amplificación aplicadas fueron las siguientes (Morales *et al.*, 2010): una fase inicial de desnaturalización a 94°C durante 2 min, 30 ciclos constituidos por una desnaturalización a 94°C durante 10 s, una hibridación a 55°C durante 30 s, y una extensión a 72°C durante 30 s, finalizando con una última fase de extensión a 72°C durante 7 min.

Para detectar la presencia de ADN amplificado se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, con tampón TBE a 100V. El marcador de peso molecular empleado fue 100 pb DNA ladder (Invitrogen). Una vez finalizada la electroforesis, se procedió a la detección de los productos de amplificación en un transiluminador UV a 300 nm, confirmando la presencia de banda de amplificación de 746 pb.

#### **3.4.3. Detección de la mutación G2576T del gen *rrn*.**

El mecanismo de resistencia más comúnmente encontrado en los organismos resistentes a linezolid detectados en infecciones nosocomiales, consiste en mutaciones en la región del gen *rrn* el cual codifica el dominio V del ARNr 23S, el cual es el lugar de acción del linezolid, por

tanto las mutaciones en esta región producen un cambio conformacional en éste que impide la unión del antimicrobiano (Mendes *et al.*, 2010).

Para el estudio de la mutación más frecuente producida en el gen *rrn*, G2576T, se procedió a estudiar un fragmento de éste que consta de 420 pb, en las cuales se puede encontrar la región que contiene dicha mutación. Para ello, se realizó una digestión con el enzima de restricción *NheI*, ya que el cambio de base de timina por guanina en la posición 2576 introduce un punto de restricción para este enzima dando lugar a dos fragmentos, uno mayor de 322 pb y otro menor de 98 pb (Hong *et al.*, 2007).

Se debe tener presente en el análisis de datos del estudio que debido a que las cepas de estafilococos poseen entre 5 y 6 copias de ARNr 23S, nunca se podrá encontrar una digestión completa de todo el ADN amplificado, incluso prolongando la incubación con el enzima, ya que siempre habrá copias del gen sin la mutación (Hong *et al.*, 2007).

Para la validación de esta técnica se empleó una cepa de *Staphylococcus aureus* con la mutación G2576T confirmada por secuenciación, cedida por el Servicio de Microbiología del Hospital General Universitario de Valencia.

#### **3.4.3.1. Extracción de ADN y amplificación del gen *rrn*.**

La extracción de ADN se llevó a cabo nuevamente por el método modificado de *boiling* (Queipo-Ortuño *et al.*, 2008), de la misma manera que se efectuó para la obtención del ADN necesario para la amplificación del gen *cfr*.

La amplificación de la región del gen *rrn* que incluye la mutación G2576T se realizó siguiendo la pauta descrita por Hong *et al.* (2007). En este caso se utilizó como cóctel previo de amplificación (para un volumen final de 25 µL) el siguiente: 12.5 µL de master mix (AmpliTaq gold PCR master mix, ABI), 5 µL de ADN, 0.2 µL del primer directo (GCG GTC GCC TCC TAA AAG), 0.2 µL del primer reverso (ATC CCG GTC CTC TCG TAC TA) completando hasta el volumen final con agua destilada.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: una primera fase de desnaturalización a 94°C durante 5 min, 32 ciclos constituidos por una etapa de desnaturalización a 94°C durante 30 s, hibridación a 55°C durante 30 s y una etapa de extensión a 72°C durante 60 s que cierra el ciclo, seguida de una última fase de extensión durante 10 min a 72°C.

#### **3.4.3.2. Restricción por *NheI* y detección de la mutación.**

Antes de realizar la digestión con el enzima *NheI* se comprobó que se había amplificado correctamente el fragmento del gen *rrn*. Para ello se dejó correr parte del amplificado en un gel de agarosa al 1.5% y se observó que la banda de ADN encontrada coincidía con la banda de 420 pb esperada.

Una vez confirmada su presencia, el amplificado se digirió con el enzima de restricción *NheI* bajo las condiciones recomendadas por el fabricante (Invitrogen) para este enzima.

Una vez concluida la digestión, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, con tampón TBE a 100V, para observar la presencia de las bandas de 420, 322 y 98 pb. El marcador de peso molecular empleado fue 100 pb DNA ladder (Invitrogen). Una vez finalizada la electroforesis, se procedió a la detección de los productos de amplificación en un transiluminador UV a 300 nm.

#### **3.4.4. Caracterización molecular de aislados mediante AP-PCR con OPA-11.**

La caracterización genotípica de las cepas linezolid resistente realizadas para agrupación de posibles clones se llevó a cabo mediante una AP-PCR (Arbitrarily Primed PCR), técnica validada para caracterización de especies de *Staphylococcus* (Olmos *et al.*, 1998) como alternativa rápida y eficaz a otras como PFGE (*Pulsed field gel electrophoresis*), que además conlleva una mayor complejidad, mayor coste de equipamiento y tiempo de realización (Bou *et al.*, 2000).

Esta PCR con *primers* arbitrarios aplicada sobre ADN cromosómico bacteriano como método de caracterización molecular se ha utilizado con sus diversas variantes en función del microorganismo estudiado. En este caso, la técnica seleccionada fue la de AP-PCR siguiendo el protocolo descrito por Olmos *et al.* (1998), al haberse mostrado su utilidad en la caracterización genotípica de *Staphylococcus* spp. en las condiciones optimizadas en este artículo.

La AP-PCR se basa en la síntesis enzimática *in vitro* de secuencias de un ADN molde utilizando uno o más *primers* cortos (10 pb) no específicos de un gen, los cuales hibridarán en múltiples secuencias complementarias, comunes y propias del ADN problema, a una temperatura de *annealing* baja. La amplificación de estas regiones dará lugar a la obtención de determinadas bandas comunes de género y especie, y bandas propias del clon (Williams *et al.*, 1990), resultando así de utilidad en la detección rápida de posibles clones.

En este caso, la obtención de ADN bacteriano se realizó a partir del método de extracción rápido G.E.S. (Pitcher *et al.*, 1989).

Las cepas control empleadas para la validación de esta técnica fueron: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (sensible a meticilina,  $\beta$ -lactamasa positiva) y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (sensible a meticilina,  $\beta$ -lactamasa negativa).

##### **3.4.4.1. Reactivos utilizados.**

La preparación y conservación de los reactivos para AP-PCR se realizó en cada caso del siguiente modo:

- *Solución amortiguadora TE pH 8.3*. Composición: Tris base 0.001 M y ácido etilendiamino tetracético (EDTA) 0.001 M. Ajustar el pH con HCl y esterilizar en autoclave a 121°C 20 minutos.
- *Solución de lisozima*. Disolver 50 mg/mL en tampón TE pH 8.3. Calentar a 37°C unos minutos antes de usar.

- *Reactivo G.E.S.* Composición: tiocianato de guanidino 5 M, EDTA 0.1 M y aproximadamente 5 mL de agua destilada estéril. Calentar en baño de agua a 65°C con agitación hasta su disolución y dejar enfriar. Añadir 0.43 mL de sarcosil 30%. Enrasar a 25 mL y mezclar bien. Filtrar empleando un filtro de 0.22 µm y conservar en botella opaca a temperatura ambiente (si precipita, calentar en baño de agua a 60 – 70 °C antes de usar).
- *Acetato de amonio 7.5 M.* Conservar a 4°C.
- *Isopropanol.* Conservar a 4°C.
- *Cloroformo/2-pentanol (24:1).* Conservar a 4°C.
- *Etanol 70%.* Conservar a -80°C.
- *Solución de carga.* Composición: glicerol al 30% y azul de bromofenol al 0.25% (en TBE pH 8.3).
- *Primer OPA-11:* CAA-TCG-TCC-GT

#### **3.4.4.2. Extracción de ADN cromosómico.**

Para realizar el aislamiento rápido y la purificación de ADN genómico bacteriano de los SCN se aplicó el método G.E.S (Pitcher *et al.*, 1989). Empleando este procedimiento se consigue eliminar la actividad endógena endonucleasa, evitando el uso de fenol y tratamientos con ARNasas y proteasas, obteniéndose ADN bacteriano de doble hebra, de gran pureza y tamaño.

Se siguió la siguiente pauta de trabajo:

a) Los cultivos celulares de SCN se sembraron en placas con medio agar chocolate y se recogieron los aislados después de 24 h de incubación en estufa a 37°C sin suministro adicional de CO<sub>2</sub>. Las masas celulares se introdujeron en tubos *ependorf* estériles, y se resuspendieron en 100 µL de la solución de lisozima. La suspensión celular permaneció en baño a 37°C durante una hora y media.

b) La lisis celular se llevó a cabo añadiendo 500 µL de reactivo G.E.S, manteniendo las suspensiones celulares durante 30 min en el agitador. Durante este tiempo permaneció la solución de acetato de amonio en el congelador a -20°C. Una vez transcurrido el tiempo, se añadieron 250 µL de acetato de amonio frío 7.5 M, mezclando bien y dejando los tubos en hielo durante 10 min. Posteriormente, se añadieron 500 µL de mezcla cloroformo/2-pentanol (24:1), mezclando bien para formar una emulsión, que a continuación se rompió centrifugando a 13.000 r.p.m. durante 10 min.

c) Se transfirió la capa superior a un nuevo *ependorf* y se añadieron 540 µL por mL de sobrenadante obtenido, en nuestro caso aproximadamente 400 µL. Se mezclaron cuidadosamente y se dejaron a temperatura ambiente durante 30 min, seguidos de una centrifugación a 13.000 r.p.m. durante 7 min.

d) El ADN obtenido (pellet) se lavó con 1 mL de etanol 70% frío, depositando los tubos en el agitador durante 5 min en cada lavado. Por último, se secó el ADN a temperatura ambiente durante toda la noche. Al día siguiente, se redisolvió el pellet con 55  $\mu$ L de agua destilada estéril, y se dejó rehidratándose toda la noche. Se midió la pureza y la concentración de ADN con un espectrofotómetro, y se conservó a 4°C hasta su utilización.

#### 3.4.4.3. Amplificación con OPA-11 del ADN extraído.

Una vez realizada la extracción de ADN se procedió a su amplificación, siguiendo el protocolo descrito por Olmos *et al.* (1998). La pauta de trabajo fue la siguiente:

a) Preparación previa del cóctel de amplificación para un volumen final de 25 $\mu$ L: 0.5 $\mu$ L *Taq polimerasa* Red Hot (ABgene), 2.5  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub>, 7.5  $\mu$ L de tampón IV (10x), 0.5  $\mu$ L de dNTPS, 0.4  $\mu$ L de primer OPA-11 (CAA TCG TCC GT), 50 ng de la muestra de ADN y se completó hasta el volumen final con agua destilada.

b) Amplificación de los fragmentos de ADN: consistió en una primera fase de desnaturalización a 94°C durante 5 min, seguida de una segunda fase de 44 ciclos constituidos por una desnaturalización a 94°C durante 1 min, con rampa de 3 min y 52 segundos hasta 36°C (temperatura de *annealing*) durante 1 min y rampa de 2 min y 24 s, hasta alcanzar 72°C (temperatura de elongación) durante 1 min y rampa 1 min y 18 s, cerrando así el ciclo. El proceso concluyó con una tercera fase de polimerización a 72°C, durante 10 min.

c) La electroforesis del ADN amplificado se realizó a 40V en gel de agarosa al 1%, con tampón TBE (1x). Como marcador de peso molecular se empleó el VI de Boehringer Mannheim. Una vez finalizada la electroforesis, se procedió a la detección de los productos de amplificación en un transiluminador UV a 300 nm y análisis de bandas en programa LaneManager 2.2 de TDI.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

La resistencia a linezolid entre los aislados clínicos de *Staphylococcus* spp. ha aumentado progresivamente desde el inicio de su comercialización en el año 2001 (Ruiz *et al.*, 2011). En el caso del Hospital Universitario Doctor Peset, en estudios previos (Camarena *et al.*, 2012) se pone de manifiesto un crecimiento significativo de casos clínicos con cepas linezolid resistente en el área de REA desde el 2010 al 2012, incrementándose de un 2.2% a un 50%. Esto conllevó la implantación de pautas en el hospital para poder detectar y llevar un control a los pacientes con bacteremias causadas por estafilococos resistentes a este antibiótico, realizando una correcta identificación de la cepa y confirmando las CMI's tanto a linezolid como a oxacilina, glucopéptidos, tigeciclina y daptomicina para poder modificar el tratamiento dirigido de los pacientes a uno de estos antibióticos a los que el estafilococo pueda presentar sensibilidad.

#### 4.1. VARIABLES DEMOGRÁFICAS Y FACTORES DE RIESGO SOBRE LOS CASOS-PACIENTE.

En el estudio se incorporaron un total de 25 pacientes (67 aislamientos) que padecieron infección bacteriana por SCN resistentes a linezolid y oxacilina durante su estancia en REA en los años 2012 y 2013. La edad media de los pacientes fue de 61 años con un rango de 23 a 80 años. La relación hombre:mujer fue de aproximadamente 2:1 (16 hombres y 9 mujeres) (Ver *tabla 2* en anexo I).

Los resultados de las variables analizadas mostraron como 20 de los 25 casos (80%) había recibido tratamiento previo con linezolid a lo largo del episodio. De los 67 aislados el grado de significación aplicando criterios microbiológicos de la cepa aislada en el proceso patológico del paciente fue del 70.8%, disminuyendo la significación desde el punto de vista clínico al 52% (13 de los 25 casos). El 80% de los episodios fueron de etiología polimicrobiana, estando implicado además del SCN linezolid-resistente en general bacterias gramnegativas y en algunos casos hongos levaduriformes.

En más del 50% de los casos se pudo objetivar tratamiento empírico adecuado (TEA). El tratamiento dirigido (TD), adaptando la antibioterapia al resultado microbiológico (linezolid-resistencia), se estableció en 2 de las 5 infecciones monomicrobianas y en 7 de las 20 polimicrobianas, modificando a tratamiento con daptomicina, tigeciclina o en caso de glucopéptido, a vancomicina con sensibilidad a dosis adecuadas.

La estancia media en REA de estos pacientes fue de 30.2 días (rango entre 2 y 68 días). En 11 de los casos se detectó circulación intrahospitalaria previa, aumentando la estancia hospitalaria media a 55.2 días (rango 3 a 125 días).

Del total de los pacientes el 64% presentaron durante el episodio un cuadro de sepsis, que evolucionó a shock séptico en el 56% de los casos. El pronóstico del paciente finalizó con *exitus* en 7 de los 25 casos (28%), siendo el resto dados de alta.

Como se puede observar en la *tabla 3* de todas las variables analizadas, sólo se demostró significación estadística ( $P < 0,05$ ) en el factor "grado de significación clínica" que el petionario le dio al hecho de la detección en laboratorio de una infección por SCN linezolid resistente.

**Tabla 3.** Factores de riesgo analizados en relación con la evolución de casos de infección por SCN en REA durante el período 2012- 2013.

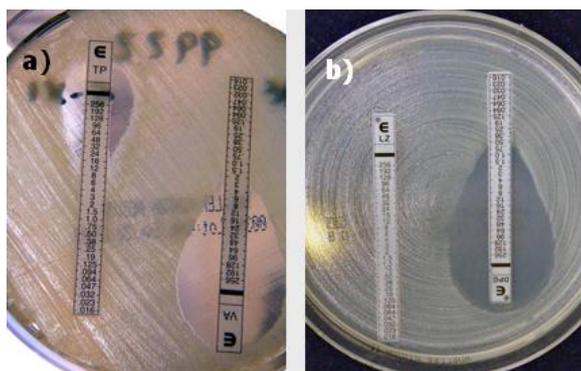
Factores de riesgo	Totales (n=25)	Exitus (n=7)	p
Infección Polimicrobiana	20 (80%)	5 (71.4%)	NS
Tratamiento empírico adecuado	14 (56%)	4 (42.9%)	NS
Linezolid previo	20 (80%)	5 (71.4%)	NS
Circulación hospitalaria	11 (44%)	2 (28.6%)	NS
Significación Clínica	13 (52%)	1 (14.3%)	0,01
Shock séptico	14 (56%)	4 (57.1%)	NS

NS: No significativo ( $p > 0,05$ )

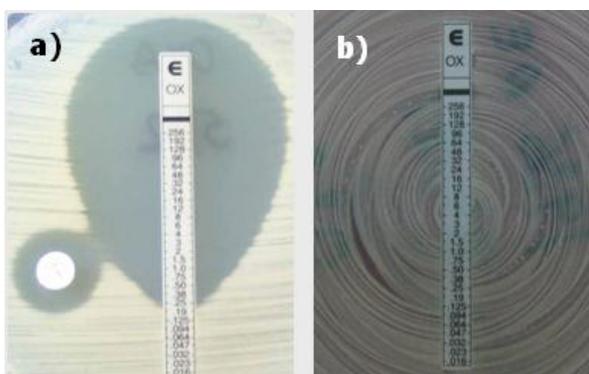
#### 4.2. ESTUDIO DE IDENTIFICACIÓN, SENSIBILIDAD Y PATRONES FENOTÍPICOS.

De los 67 aislados, 30 fueron identificados por los sistemas Vitek 2 y MicroscanWalk-away como *S. epidermidis*, 23 como *S. haemolyticus*, 9 como *S. hominis* y 5 como *S. capitis*. Esto contrasta con los datos obtenidos en un estudio previo de los dos años anteriores en el hospital, donde la mayor parte de los aislados eran *S. haemolyticus* (Camarena *et al.*, 2012). La gran mayoría de cepas (85%) se obtuvieron de hemocultivos, aunque también se hallaron estas cepas en muestras procedentes de posibles focos como catéteres, sondas, líquidos peritoneales, y exudados de abscesos (Ver *tabla 2* en anexo I). No se detectó ninguna cepa de *S. aureus* resistente a linezolid en el hospital, siendo sólo cepas SCN las implicadas.

Empleando el método Etest (*Figuras 2 y 3*) se confirmó en todos los aislados la resistencia a linezolid y oxacilina (CMI  $\geq 8$  mg/L, CMI  $\geq 1$  mg/L, respectivamente). Además, todos ellos fueron susceptibles a tigeciclina y daptomicina (CMI  $\leq 0.5$  mg/L y CMI  $\leq 1$  mg/L, respectivamente), alternativas para el tratamiento de cepas SCN linezolid-resistentes. Los glucopéptidos (vancomicina y teicoplanina) considerados como primera alternativa en el tratamiento de cepas SARM, mostraron CMIs elevadas, detectándose 8 aislados con CMI = 8 mg/L para vancomicina (sensibilidad intermedia) y 14 cepas resistentes a teicoplanina (CMI  $\geq 32$  mg/L).



**Figura 2.** Incremento de CMI frente a glucopéptidos en cepas *Staphylococcus coagulans* negativas Linezolid-resistentes. a) CMI para teicoplanina 6 mg/L; CMI para vancomicina 2 mg/L. b) CMI para daptomicina 0.5 mg/L; CMI para linezolid  $\geq 256$ mg/L



**Figura 3.** Estudio de sensibilidad de *Staphylococcus coagulans* negativa (SCN) frente a oxacilina mediante método de difusión disco-placa (disco de oxacilina de 1  $\mu$ g) y/o difusión sobre tira Etest de oxacilina con siembra directa en agar Müller-Hinton hipersalino. a) Cepa SCN sensible a meticilina (halo oxacilina 15 mm; CMI 0.25 mg/L. b) Cepa SCN resistente a meticilina (halo oxacilina 0 mm; CMI  $\geq 256$  mg/L)

Debido a la disminución de susceptibilidad (*Tabla 4*) a vancomicina y teicoplanina que presentan estas cepas de SCN resistentes a oxacilina y linezolid, el tratamiento alternativo de estos pacientes se debe plantear con tigeciclina o daptomicina, ya que, la resistencia a estos antimicrobianos es prácticamente inexistente en la actualidad (Montero *et al.*, 2008), al igual que lo descrito en este estudio.

**Tabla 4:** Resultados de estudio de sensibilidad por Etest de cepas *Staphylococcus coagulasa negativo* resistentes a linezolid y meticilina frente a antimicrobianos alternativos (Datos de CMI en mg/L)

Antibiótico	Rango	CMI 50	CMI 90	Resistencias
Vancomicina	1 - 8	2	4	*20%
Teicoplanina	0.5 - 64	2	16	**21%
Linezolid	8 - ≥ 256	≥ 256	≥ 256	100%
Tigeciclina	0.125 - 0.5	0.25	0.5	0%
Daptomicina	0.125- 1	0.25	0.5	0%

\*8 cepas con CMI de 8 mg/L (Resistencia Intermedia)

\*\*13 cepas CMI 32 mg/L y 1 cepa CMI 64mg/L

Empleando los sistemas Vitek 2 y Walk-away se determinó la resistencia/sensibilidad del resto de antimicrobianos estudiados, de manera que los antimicrobianos penicilina, eritromicina, clindamicina, y mupirocina (utilizada esta última en el tratamiento de portadores de SARM) se mostraron resistentes o intermedios en todas las cepas. En el caso de gentamicina sólo 3 de los aislados fueron sensibles. Sólo 2 cepas de *S. capitis* mostraron sensibilidad al cotrimoxazol. En el caso de la tetraciclina, se encontraron sólo 3 aislados resistentes.

Sin embargo, el estudio de sensibilidad frente a fosfomicina, rifampicina y ácido fusídico mostró resistencias en el 46.3%, 62.7% y 65.7% respectivamente. De esta manera, estos tres antibióticos fueron aquellos que variaron más frecuentemente entre las distintas cepas y por tanto fueron los empleados para asignar los diferentes antibiotipos, obteniéndose finalmente 11 antibiotipos diferentes (Mostrados en la *tabla 5*).

Atendiendo tanto al patrón de resistencia o sensibilidad a los diferentes antimicrobianos estudiados (Antibiotipo) y al bionúmero proporcionado por el sistema Vitek 2 (Biotipo) se agruparon las cepas según su fenotipo, de modo que se obtuvieron un total de 28 fenotipos diferentes (*Tabla 5*).

**Tabla 5.** Relación entre fenotipo, antibiotipo y biotipo de los SCN aislados.

Fenotipo	SCN	BT	ATB	ATB2	BiotipoVITEK	ANTIBIOTIPO
1	Se	E1b	1	RFu / FT	010-000-036-020-211	00-00-001-100-11-11-00
2	Se	E1c	1	RFu / FT	010-000-076-620-211	00-00-001-100-11-11-00
3	Se	E1d	1	RFu / FT	030-000-076-620-211	00-00-001-100-11-11-00
4	Se	E1e	1	RFu / FT	010-000-016-020-211	00-00-001-100-11-11-00
5	Se	E1i	1	RFu / FT	010-400-076-621-211	00-00-001-100-11-11-00
6	Se	E2	1	RFu / FT	030-400-076-620-211	00-00-001-100-11-11-00
7	Se	E1c	2	Fu / FRT	010-000-076-620-211	00-00-001-101-11-11-00

Fenotipo	SCN	BT	ATB	ATB2	BiotipoVITEK	ANTIBIOTIPO
8	Se	E1c	2	Fu / FRT	010-000-076-620-211	00-00-001-101-11-11-00
9	Se	E1e	2	Fu / FRT	010-000-026-620-211	00-00-001-101-11-11-00
10	Se	E1f	2	Fu / FRT	010-000-066-620-211	00-00-001-101-11-11-00
11	Se	E1g	2	Fu / FRT	010-000-066-621-211	00-00-001-101-11-11-00
12	Se	E3a	2	Fu / FRT	050-002-047-720-271	00-00-001-101-11-11-00
13	Se	E4	2	Fu / FRT	070-400-056-630-251	00-00-001-101-11-11-00
14	Se	E1d	3	RTFu / F	030-000-076-620-211	00-00-001-100-10-11-00
15	Shh	HH5	3	RTFu / F	050-046-412-720-231	00-00-001-100-10-11-00
16	Shae	HA1c	4	FRT / Fu	010-006-003-620-231	00-00-000-100-10-11-10
17	Shae	HA1r	4	FRT / Fu	010-002-040-760-231	00-00-000-100-10-11-10
18	Shae	HA2	4	FRT / Fu	010-046-003-620-231	00-00-000-100-10-11-10
19	Shae	HA1a	4b	FRTFu	010-006-002-320-231	00-00-000-100-10-11-00
20	Shae	HA4	4c	RT / FFu	010-046-002-220-231	00-00-001-100-10-11-10
21	Sc	C1	5	F / RTFu	000-000-002-060-201	00-00-000-101-11-11-10
22	Se	E1e	5	F / RTFu	010-000-056-020-211	00-00-000-101-11-11-10
23	Shh	HH4	5	F / RTFu	040-000-410-760-031	00-00-000-101-11-11-10
24	Shh	HH2	5b	FFu / RT	040-000-410-220-031	00-00-000-101-11-11-00
25	Shae	HA1p	6a	FTFu / GRT	010-000-032-730-231	00-00-100-101-10-11-00
26	Shh	HH3	6a	FTFu / GRT	100-000-010-720-331	00-00-100-101-10-11-00
27	Shh	HH1	6b	FTFu / R	000-000-010-220-031	00-00-000-101-10-11-00
28	Sc	C3	7b	F / SRTFu	000-000-002-061-201	00-00-000-111-11-11-10

SCN: *Staphylococcus coagulasa* negativo, BT: Biotipo, ATB: antibiotipo, ATB2: descripción antibiotipo, Se: *S. epidermidis*, Shh: *S. hominis*, Shae: *S. haemolyticus*, Sc: *S. capitis*, R: Rifampicina, Fu: ácido fusídico, F: fosfomicina, T: teicoplanina, G: gentamicina, S: cotrimoxazol. En el antibiotipo 1, se encuentran los aislados resistentes a R y Fu y sensibles a F y T. En el antibiotipo 2, los resistentes a Fu y sensibles a F, R y T. En el antibiotipo 3, los resistentes a R, T y Fu y sensibles a F. En el antibiotipo 4, aquellos resistentes a F, R, T y sensibles a Fu. En el antibiotipo 4b aquellos resistentes a F, R, T y Fu. En el antibiotipo 5, se encuentran los resistentes a F y sensibles a R, T y Fu. En el antibiotipo 5b, resistentes a F y Fu y sensibles a R y T. En el antibiotipo 6a se encuentran las cepas resistentes a F, T y Fu, y sensibles a G, R, T. En el 6b los resistentes a F, T, Fu y sensibles a R. En el antibiotipo 7b aquellos resistentes a F y sensibles a S, R, T y Fu.

#### 4.3. CONFIRMACIÓN DE LA OXACILIN-RESISTENCIA

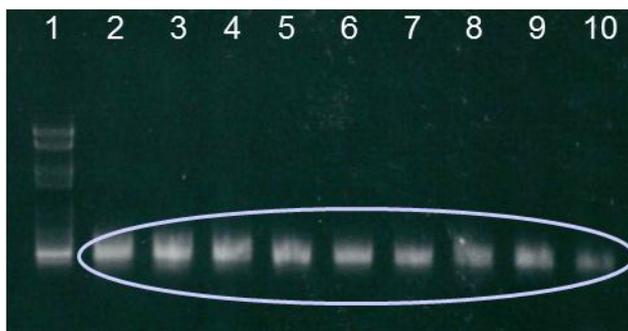
Como ocurre en general con los SCN el porcentaje de meticilin resistencia fue tan elevado que en este caso alcanzó el 100%. Todos los aislados presentaron, por tanto, en las pruebas de sensibilidad resistencia a oxacilina con CMI  $\geq 4$  mg/L. Esta resistencia además se pudo comprobar de forma rápida en la detección fenotípica mediante inmunocromatografía de presencia de PBP2a (Alere) y confirmar en el estudio genotípico de detección del gen *mecA*.

La prueba inmunocromatográfica de detección de PBP alterada (PBP2a) directa de colonias sólo presentó una cepa con resultado negativo, que tras una repetición del ensayo se confirmó como positivo. Cuando la prueba es positiva se puede observar en la tira inmunocromatográfica dos líneas, una control (línea superior) y una inferior, resultado de la interacción entre el anticuerpo específico y la proteína PBP2a de la superficie de los *Staphylococcus* resistentes a meticilina (Figura 4).



**Figura 4.** Ejemplos de cepas con prueba inmunocromatográfica positiva en la detección de PBP2a. Línea superior control de la prueba cromatográfica, línea inferior resultado de la interacción entre el anticuerpo específico y la proteína PBP2a (pruebas positivas).

Sin embargo, en todos los aislados se detectó la presencia del gen *mecA*. Como se puede observar en la *figura 5*. La positividad en esta prueba se determinó por la presencia en el gel de una banda de 533pb correspondiendo al fragmento de *mecA* esperado de la amplificación.



**Figura 5.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% para detección del gen *mecA* por PCR, usando los primers RSM2647 y RSM2648. Carrera 1, patrón de *Pm Boehringer-Manheim VI*; carreras 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10, cepas *Staphylococcus coagulasa* negativas meticilin-resistentes (*mecA* positivas).

Estos resultados reflejan que la prueba inmunocromatográfica para detección de PBP2a mostró una sensibilidad del 96%. Estos resultados son comparables a los obtenidos por otros grupos de trabajo (Nonhoff *et al.*, 2012), donde se observó un 96.6% de sensibilidad empleando esta técnica de detección inmunocromatográfica de PBP2a.

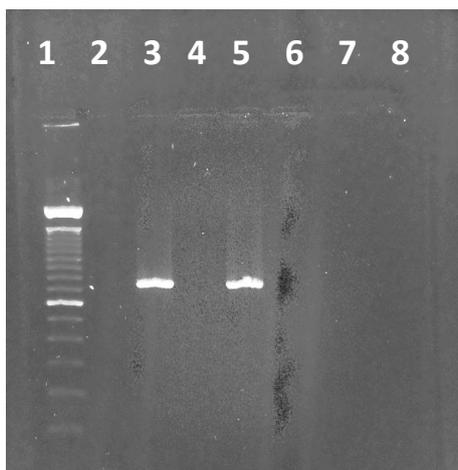
A pesar de la necesidad de confirmar por repetición las cepas testadas en este método se describe en general como altamente recomendable para su utilización rutinaria en diagnóstico clínico, ya que una vez se ha producido el crecimiento de las colonias en el medio adecuado, únicamente se necesitan cinco minutos para la obtención de resultados. Sin embargo, se debe tener presente que debido a que la expresión de la resistencia suele ser heterogénea, es importante emplear una cantidad de colonias significativas y distintas para su detección. De lo contrario podría darse un resultado negativo por no haber analizado ninguna colonia resistente entre la población. Por ello las pruebas de detección rápidas para detección de

resistencias, como es el caso de la inmunocromatografía de detección de PBP2a, se deben complementar siempre con la prueba Etest también sobre emulsión realizada con varias colonias (Olmos, 1997).

El problema de la heterogeneidad de la resistencia a meticilina en la población bacteriana de *Staphylococcus* spp. se puede mitigar empleando métodos de detección genotípicos, ya que la masa bacteriana analizada es mucho mayor. Otro problema de los métodos fenotípicos es que se ven fuertemente afectados por las condiciones de los medios de cultivo, de modo que tanto la temperatura de incubación (se expresa más a 30°C que a 37°C), como el pH y la concentración de NaCl pueden afectar a la detección de meticilin resistencia por estos métodos. Por ello la confirmación genotípica sería deseable ante la mínima duda. (Khan *et al.*, 2012).

#### 4.4. DETECCIÓN DEL MECANISMO DE LINEZOLID-RESISTENCIA.

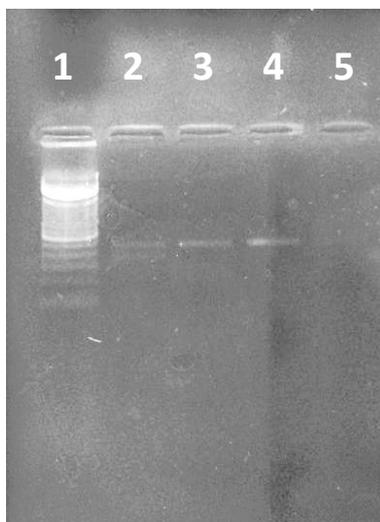
La presencia del gen *cfr* se confirmó observando en el gel una banda de 746 pb que corresponde a un fragmento amplificado de esta región (Figura 6). En nuestro estudio el 25% de los aislados analizados presentaron esta banda, cifra habitual ya que el *cfr* (+) se ha descrito más frecuentemente en brotes por *S. aureus*.



**Figura 6.** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para detección del gen *cfr* por PCR. Carrera 1, patrón de Pm DNA ladder de Invitrogen; carreras 3 y 5 *Staphylococcus coagulasa* negativas (SCN) resistentes a linezolid *cfr* positivas; carreras 2, 4, 6, 7 y 8 SCN resistentes a linezolid *cfr* negativas.

Estudios recientes demuestran la posibilidad de que el gen *cfr* se integre en el genoma del microorganismo en aquellos aislados procedentes de humanos. Sin embargo, todos los aislados procedentes de animales poseen el gen *cfr* en un plásmido (Morales *et al.*, 2010). No obstante, la posibilidad de que exista transmisión horizontal del gen entre cepas es una gran amenaza, convirtiendo cepas habitualmente no patogénicas, como *S. epidermidis* en reservorios de genes resistencia. Por este motivo, es necesario tener en cuenta esta posibilidad para evitar la transmisión entre pacientes, tomando las medidas necesarias para ello.

Por otra parte, la mutación G2576T del gen *rrn* se encontró presente en el 77% de los aislados. Como se puede observar en la *figura 7* la presencia de esta mutación da lugar a dos fragmentos en el gel de electroforesis, una mayor de 420 pb y otra menor de 322 pb. La banda menor se debe a la digestión del fragmento del gen *rrn*, mientras que la banda mayor es el fragmento sin digerir. La banda de 98 pb resultado de la digestión que se obtenía en otros estudios (Hong *et al.*, 2007) no se pudo observar en el gel.



**Figura 7.** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para detección de la mutación G2576T por amplificación del gen *rrn* el cual codifica el dominio V del ARN 23S y posterior digestión con el enzima *NheI*. Carrera 1, patrón de *Pm* DNA ladder de Invitrogen; carreras 2 *Staphylococcus coagulasa* negativas (SCN) resistentes a linezolid mutación G2576T positiva; carreras 3 y 4 SCN resistentes a linezolid mutación G2576T negativas; carrera 5 control negativo de amplificación del dominio.

La banda de 420 pb aparece en todos los casos (excepto en el control negativo de la amplificación) incluso prolongándose durante toda la noche la incubación de la restricción con el enzima *NheI* (Hong *et al.*, 2007). Esto es así porque las diferentes especies de SCN poseen entre 5 y 6 copias del gen 23S ARNr, y por tanto, es posible encontrar copias que no poseen la mutación, y por tanto no son fragmentadas por el enzima. No se halló la mutación G2576T en ninguno de los *Staphylococcus capitis* estudiados. Esto se debe a que esta especie habitualmente suele presentar otras mutaciones en esta región del gen *rrn*, como es la C2190T (Huang *et al.*, 2014).

La elevada presencia de la mutación G2576T en comparación con otras mutaciones, sugiere que ésta se ve favorecida en los aislados clínicos, ya que *in vitro* las otras mutaciones ocurren con la misma frecuencia (Pillai *et al.*, 2002).

Entre los resultados positivos, cabe destacar que el 25.5% de cepas en las que se encuentra presente el gen *cfr* había recibido tratamiento previo con linezolid, mientras que en el caso de la mutación G2576T del gen *rrn* este porcentaje aumentó hasta el 77.5%.

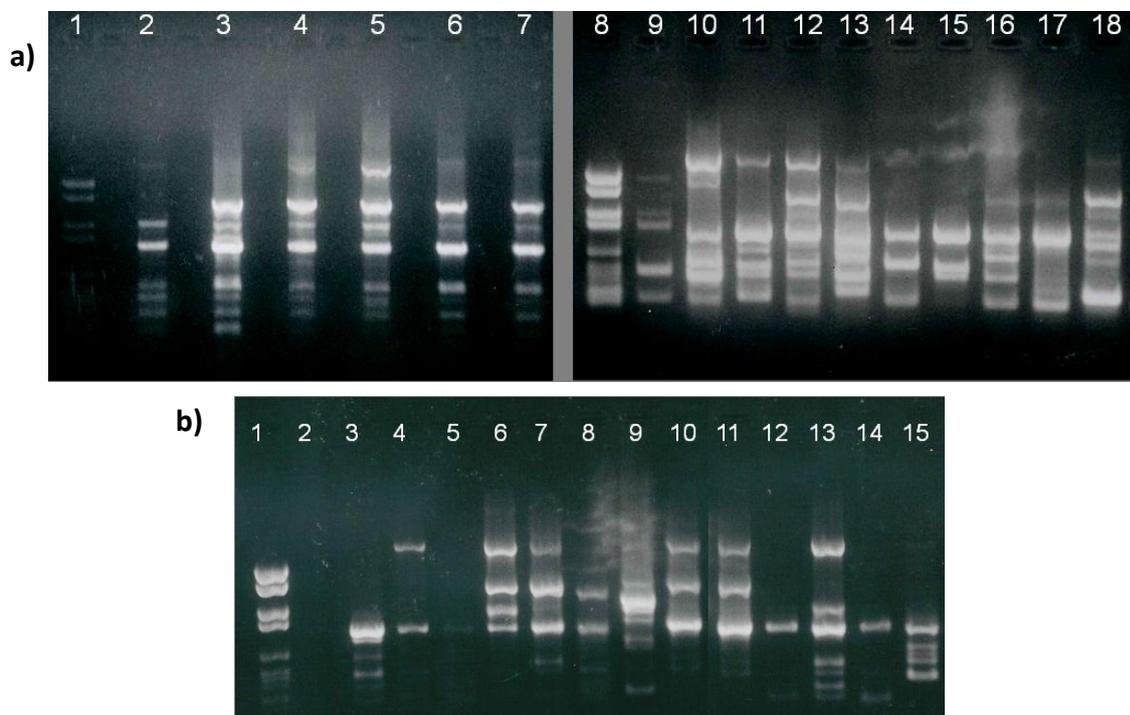
Los resultados de distintos estudios sobre resistencia (Wright *et al.*, 2010) llevan a la conclusión esperada de que la presión antibiótica posee una influencia importante sobre la

selección de organismos resistentes. En el caso de la resistencia a linezolid mediada por los dos mecanismos estudiados en este trabajo, se demostró en otras investigaciones (Sánchez and De La Torre., 2013) que era habitual encontrar microorganismos resistentes a linezolid con la mutación G2576T en el gen *rrn* en aquellos aislados provenientes de muestras de pacientes con prolongados tratamientos a este antibiótico, mientras que la aparición de la resistencia debida a la adquisición del gen *cfr*, al tratarse de un gen plasmídico no se pudo relacionar con el consumo del antibiótico, sino que otros factores podían estar relacionados con la adquisición de este gen, entre los que destaca la presencia de contacto entre cepas portadoras y no portadoras del gen, produciéndose transmisión horizontal del plásmido.

Al igual que lo descrito en estos trabajos previos, en nuestro caso se comprobó esta asociación con consumo previo de linezolid, si bien, no llegó a ser estadísticamente significativa ( $p$  mayor de 0,05), lo que parece explicarse al analizar un grupo de población no lo suficientemente grande.

#### 4.5. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS AISLADOS, PATRONES GENOTÍPICOS.

La agrupación de aislados SCN linezolid-resistentes en patrones genotípicos se puede observar en la *figura 8*, donde se muestran ejemplos de electroforesis con las bandas obtenidas por la AP-PCR de distintas cepas. Con ayuda del programa LaneManager 2.2 de TDI se procedió al análisis de los patrones de las bandas obtenidas, para conseguir la similitud entre ellas y así poder agrupar los diferentes genotipos encontrados.



**Figura 8.** Perfiles electroforéticos (EF) en gel de agarosa al 1% de los genotipos más importantes (E1, E2, E3, C3 y HH1) tras aplicación de AP-PCR con OPA 11 sobre aislados de *Staphylococcus coagulasa* negativos (SCN) linezolid y meticilin-resistentes. a) Perfiles EF de diferentes aislados SCN correspondientes al genotipo E1, E3 y HH1. Carreras 1 y 8, patrón de Pm BM VI; carreras 2 a 7, cepas E1; carreras 13 y 18, cepas E3; carreras 10 y 16, cepas HH1; carreras 9, 11, 12, 14, 15 y 17, cepas con

perfil no agrupable NA. b) Perfiles EF de diferentes aislados ECN correspondientes al genotipo E1, E2 y C3. Carrera 1, patrón de Pm BM VI; carreras 3 y 15, cepas C3; carreras 6, 7 y 13, cepas E1; carreras 4, 10 y 11, cepas E2; carreras 5 y 12, cepas no tipables; carreras 8, 9 y 14, cepas con perfil no agrupable NA; carrera 2, control negativo.

Como se puede observar en la *tabla 6* se obtuvieron 6 genotipos diferentes de las cepas agrupables, de los cuales tres correspondieron a *S. epidermidis* (E1, E2 y E3), uno a *S. haemolyticus* (HA1), uno a *S. hominis* (HH1) y uno a *S. capitis* (C3).

De las 4 cepas de *Staphylococcus capitis* todas fueron agrupadas por AP-PCR bajo el mismo genotipo (C3). Si bien, tres de ellas presentaron el biotipo C1 y el antibiotipo 5, hubo una cepa con el biotipo C3 y el antibiotipo 7b, algo típico al ser estos marcadores fenotípicos que pueden variar en su expresión.

En el caso de los 23 aislados de *Staphylococcus epidermidis* estudiados, 14 se agruparon en el genotipo E1, con el mismo antibiotipo 1, pero discrepando en el número de biotipo, donde se pueden encontrar hasta 5 diferentes (E1b, E1c, E1d, E1e y E2) pero dentro del grupo E. Otras siete cepas de *S. epidermidis* se agruparon en el genotipo E2. De éstos, cinco presentaron el antibiotipo 2, y tres biotipos diferente (E1c, E1f y E1g), sin embargo, dos cepas presentaron antibiotipos y biotipos diferentes (antibiotipos 5 y 3, y biotipos E1e y E1d, respectivamente). Por último, dos *S. epidermidis* se agruparon bajo el genotipo E3, y el antibiotipo 1; sin embargo, los biotipos fueron diferentes entre sí (E1d y E1i).

Atendiendo a los *Staphylococcus haemolyticus*, se analizaron un total de 5 cepas, aunque una de ellas no fue tipificable en la AP-PCR. Las cuatro restantes se agruparon bajo el genotipo HA1 y el antibiotipo 4, sin embargo, tres de ellas obtuvieron el biotipo HA1c y una el HA1r.

En el caso de los *Staphylococcus hominis* se agruparon las 4 cepas analizadas bajo el mismo genotipo (HH1), dos de ellas con el mismo antibiotipo y biotipo (5b y HH2, respectivamente), difiriendo de las otras dos, las cuales presentaban el antibiotipo 6b y el biotipo HH1.

Se muestra en general la mayor capacidad de los métodos genotípicos (AP-PCR) para agrupar aislados genotípicamente cercanos que en su mayoría presentan un patrón de sensibilidad muy similar pero cuyo biotipo resulta variable en función de la expresión de cada característica bioquímica.

En ninguno de los aislados agrupados bajo los genotipos C3 y HH1 se detectó la presencia del gen *cfr*, sin embargo en todos los aislados del genotipo HH1 se encontró la mutación del gen *rrn*, esto se debe a que en el genotipo C3 se encuentran los aislados de *S. capitis* analizados, los cuales, como se ha citado anteriormente, poseen normalmente otra mutación de resistencia en este gen.

El 92% de las cepas *S. epidermidis* pertenecientes al genotipo E1 tenían la mutación G2576T en el gen *rrn*, y únicamente el 28% de ellos presentaba el gen *cfr*. Además, en este genotipo se encontraron las únicas 5 cepas que provenían de muestras de pacientes que no habían recibido tratamiento previo con linezolid.

Todos los *S. epidermidis* agrupados bajo el genotipo E2 presentaron la mutación G2576T y el 57% de ellos presentó además el gen *cfr*. De las 2 cepas de *S. epidermidis* del genotipo E3, se encontró en una de ellas el gen *cfr*, pero en ambas la mutación G2576T del gen *rrn*.

**Tabla 6.** Genotipos obtenidos de las cepas de *Staphylococcus coagulasa* negativos (SCN) resistentes a linezolid y meticilina tras la aplicación de la AP-PCR con OPA-11

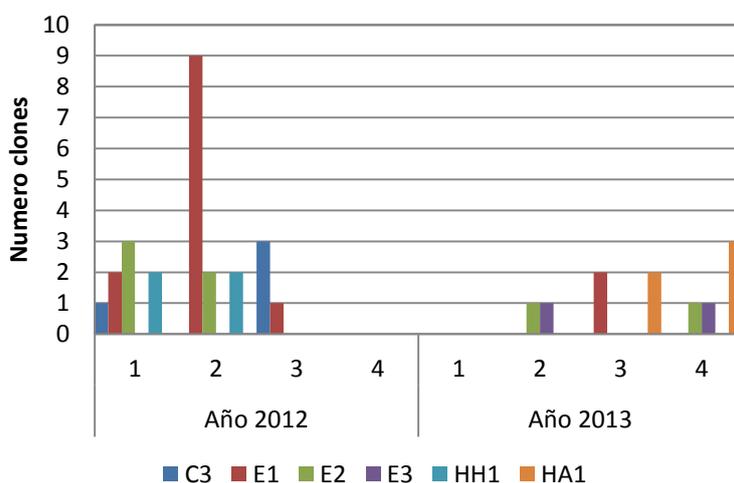
Paciente	Cepa	Mes	SCN	AP-PCR	BT	ATB	CFR	G2576T	Lzd Previo
2	C12-03	12-sep	Sc	C3	C3	7b	N	N	S
3	C12-05	12-jul	Sc	C3	C1	5	N	N	S
3	C12-18	12-feb	Sc	C3	C1	5	N	N	S
3	C12-19	12-jul	Sc	C3	C1	5	N	N	S
1	C12-01	12-feb	Se	E1	E1b	1	P	P	S
1	C12-16	12-mar	Se	E1	E1b	1	P	P	S
5	C12-06	12-may	Se	E1	E2	1	N	P	N
5	C12-21	12-may	Se	E1	E2	1	N	P	N
5	C12-22	12-may	Se	E1	E2	1	N	P	N
5	C12-23	12-jun	Se	E1	E2	1	N	P	N
8	C12-10	12-abr	Se	E1	E1c	1	N	P	S
9	C12-11	12-may	Se	E1	E1c	1	N	P	S
9	C12-27	12-may	Se	E1	E1c	1	N	P	S
9	C12-28	12-may	Se	E1	E1c	1	N	P	S
9	C12-29	12-may	Se	E1	E1c	1	N	P	S
9	C12-30	12-may	Se	E1	E1c	1	N	P	S
22	C13-10	13-sep	Se	E1	E1d	1	P	N	N
23	C13-12	13-sep	Se	E1	E1e	1	P	P	S
3	C12-04	12-jun	Se	E2	E1c	2	N	P	S
3	C12-20	12-jun	Se	E2	E1c	2	N	P	S
6	C12-08	12-mar	Se	E2	E1f	2	P	N	S
16	C13-05	13-abr	Se	E2	E1f	2	P	N	S
15	C13-04	13-nov	Se	E2	E1g	2	P	N	S
7	C12-24	12-feb	Se	E2	E1e	5	N	P	S
7	C12-09	12-feb	Se	E2	E1d	3	N	P	S
21	C13-09	13-nov	Se	E3	E1d	1	P	P	S
24	C13-13	13-may	Se	E3	E1i	1	N	P	S
19	C13-06	13-jul	Shae	HA1	HA1r	4	N	P	S
21	C13-08	13-dic	Shae	HA1	HA1c	4	P	P	S
21	C13-17	13-nov	Shae	HA1	HA1c	4	P	P	S
21	C13-18	13-nov	Shae	HA1	HA1c	4	P	P	S
9	C12-12	12-may	Shh	HH1	HH2	5b	N	P	S
9	C12-26	12-may	Shh	HH1	HH2	5b	N	P	S
10	C12-14	12-feb	Shh	HH1	HH1	6b	N	P	S
10	C12-31	12-ene	Shh	HH1	HH1	6b	N	P	S
1	C12-17	12-mar	Shae	N	HA2	4	N	P	S

BT: Biotipo, ATB: antibiotipo, Se: *S. epidermidis*, Shh: *S. hominis*, Shae: *S. haemolyticus*, Sc: *S. capitis*.

El estudio de la evolución en la aparición de cada aislado a lo largo de los años 2012 y 2013 (Figura 9), nos muestra lo siguiente:

- Tanto los *S. capitis* como los *S. hominis* se encontraron en el servicio de REA en los primeros trimestres del año 2012. No obstante, posteriormente no se hallaron más cepas de estas especies resistentes a linezolid en este servicio hospitalario.
- Los *S. haemolyticus* y los *S. epidermidis* agrupados bajo el genotipo E3 aparecieron en los tres últimos trimestres del año 2013. Actualmente el clon de *S. haemolyticus* detectado a finales del 2013 continúa presente en la unidad de REA (datos no mostrados).
- Asimismo, cabe destacar la evolución de los *S. epidermidis* agrupados bajo los genotipos E1 y E2, ya que aparecieron en el servicio de REA durante los primeros trimestres del año 2012 y posteriormente no se volvieron a hallar hasta los últimos trimestres del año 2013.

Para explicar estos resultados se debe prestar atención a la presencia del *cfr*. De modo que ninguno de los clones agrupados bajo el genotipo C3 y HH1, los cuales incluyen todos los *S. capitis* y *S. hominis* estudiados respectivamente, presentó el gen *cfr*. Sin embargo, en los genotipos restantes (E1, E2, E3, HA1) sí que aparecen cepas portadoras del gen *cfr* en diferentes fechas. Esto puede implicar que la prevalencia de las cepas a lo largo del tiempo esté relacionada con la presencia de este gen en sus genomas. Sin embargo, al encontrarse cepas con la mutación G2576T del gen *rrn* en todas las agrupaciones excepto en el genotipo C3 por tratarse de *S. capitis* (los cuales normalmente poseen una mutación diferente), no parece haber ningún tipo de relación entre las cepas que poseen la mutación y la evolución en la aparición de éstas a lo largo de los dos años.



**Figura 9:** distribución temporal de los clones detectados por AP-PCR de *Staphylococcus cogaulasa negativas* (SCN) en el Servicio de Reanimación (REA) del Hospital Universitario doctor Peset en los años 2012-13. C3, E1, E2, E3, HH1 y HA1 representan los genotipos obtenidos por la AP-PCR. La distribución temporal está dividida en trimestres. De modo que en el 4º trimestre del año 2012 y en el primero del 2013 no se encontró ningún aislado de SCN linezolid-resistente en el Servicio de Reanimación del hospital.

## 5. CONCLUSIONES

Respondiendo a los objetivos planteados inicialmente, las conclusiones obtenidas de la caracterización fenotípica y genotípica de los aislados de *Staphylococcus coagulasa* negativos resistentes a linezolid hallados en pacientes ingresados en la unidad de Reanimación del Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia durante los años 2012 y 2013, son:

1. Se identificaron un total de 25 pacientes con 67 aislados linezolid-resistentes (30 *S. epidermidis*, 23 *S. haemolyticus*, 9 *S. hominis* y 5 *S. capitis*). El aumento de *S. epidermidis* contrasta con resultados obtenidos en estudios previos en el hospital, donde la especie mayoritariamente encontrada fue *S. haemolyticus*. Estos aislados se obtuvieron mayoritariamente de hemocultivos (85%) aunque también se hallaron en otros tipos de muestras como catéteres, sondas, líquidos peritoneales y exudados de abscesos quirúrgicos.
2. En análisis de sensibilidad a antibióticos indicados para tratamiento de *Staphylococcus* spp. mostró resistencia a linezolid y oxacilina en todos los casos y sensibilidad a tigeciclina y daptomicina. Sin embargo, en el caso de vancomicina y teicoplanina (glucopéptidos habituales en el tratamiento de infecciones por *Staphylococcus* meticilin-resistentes) se observó una disminución en la susceptibilidad incluso niveles importantes de resistencia haciendo necesario el tratamiento de las cepas de SCN linezolid y meticilin-resistentes de nuestro medio con tigeciclina o daptomicina.

Todos los casos mostraron resistencia a mupirocina, fármaco utilizado en portadores de SARM, por lo que el control de infección por SCN resistentes a linezolid y meticilina no debería incluir esta medida.

3. El mecanismo hallado con mayor frecuencia entre los aislados estudiados fue la mutación G2576T del gen *rrn*, ya que el gen plasmídico *cfr* únicamente se detectó en parte de los casos. El elevado porcentaje de tratamientos previos con linezolid en estos casos es una variable a valorar para pautar un correcto control de estos casos.
4. La resistencia a meticilina se confirmó en todos los aislados tanto por métodos fenotípicos como con su confirmación genotípica del gen *mecA*. Aunque en la detección de meticilin-resistencia resultan eficaces cualquiera de las tres, cabe destacar la prueba inmunocromatográfica por su rapidez (resultando en 5 minutos), y la prueba del gen *mecA* por su robustez, ya que no está condicionada a factores ambientales.
5. Atendiendo al biotipo y al antibiotipo se obtuvieron 28 fenotipos diferentes. Sin embargo, estas cepas se agruparon en 6 genotipos diferentes mediante caracterización molecular. Analizando la progresión de los clones en el tiempo se observó que aquellos clones en los que no se había detectado la presencia del gen *cfr* (cepas de *S. capitis* y *S. hominis*), únicamente se encontraban en los primeros trimestres del año 2012, mientras que aquellos genotipos en los que sí se detectó la presencia de este gen, aparecían en los últimos trimestres del año 2013 y tanto a principio de los primeros trimestres del 2012 como en los últimos del 2013, lo cual significa que las cepas portadoras del *cfr* se propagan con

mayor éxito a lo largo del tiempo. Sin embargo, no existe relación entre la propagación de clones y la presencia de la mutación G2576T del gen *rrn* en sus genomas.

6. De los factores de riesgo analizados (infección polimicrobiana, shock séptico, circulación hospitalaria, significación clínica, administración de linezolid previo, tratamiento empírico adecuado y tratamiento dirigido adecuado) en relación al pronóstico de la enfermedad en pacientes infectados por SCN linezolid-resistentes en REA, únicamente se observó una relación estadísticamente significativa entre la significación clínica que se le dio al hecho de la presencia del aislado y el *exitus* del paciente. Parece pues adecuado valorar la presencia de estas cepas y tratar con adecuadas pautas alternativas de antibióticos como tigeciclina o daptomicina, para poder mejorar el pronóstico de estos pacientes.

## 6. BIBLIOGRAFÍA.

### 6.1. BIBLIOGRAFÍA CITADA.

1. ALEGRE, E.A.; DE BIASIO, M.B.; RAMÍREZ, N.N.; RUIZ, R.M. AND BASTIANI, C.E. (2012). Detección y diferenciación molecular de *Leptospira sp.* utilizando diferentes técnicas de extracción de ADN. *Revisión médica veterinaria.*, 24: 53-55.
2. ARDANUY, C.; CERCENADO, E.; MOROSINI, M. A. AND TORRES, C. (2011). *Procedimientos en microbiología clínica*. Editorial SEIMC.
3. BESIER, S.; LUDWIG, A.; ZANDER, J. BRADE, V. AND WICHELHAUS, T. A. (2008). Linezolid resistance in *Staphylococcus aureus*: gene dosage effect, stability, fitness costs, and cross-resistances. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 52: 1570-1572.
4. BOU, G.; CERVERÓ, G.; DOMÍNGUEZ, M.A.; QUEREDA, C AND MARTÍNEZ-BELTRÁN, J. (2000). PCR-based DNA fingerprinting (REP-PCR, AP-PCR) and pulsed-field gel electrophoresis characterization of a nosocomial outbreak caused by imipenem- and meropenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clinical microbiology infections.*, 6: 635-643.
5. CALVO, J. AND MARTÍNEZ-MARTÍNEZ L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica.*, 27(1): 44-52.
6. CAMARENA, J. J.; GONZÁLEZ, R.; ZARAGOZA, R.; MARISCAL, L.; SALVATIERRA, E.; SANCHO, S. AND NOGUEIRA, J.M. (2012). XVI congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), resistencia a linezolid en bacteriemias nosocomiales por estafilococos coagulasa negativos en un hospital de distrito. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica.*, 30: 1-8.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement*. CLSI document M100-S23. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute, 2013.

8. CUI, L.; WANG, Y.; LI, Y.; HE, T.; SCHWARZ, S.; DING, Y.; SHEN, J. AND LV, Y. (2013). Cfr-mediated linezolid-resistance among methicillin-resistant coagulase-negative Staphylococci from infections of humans. *PLOS one.*, 8:e57096
9. HONG, T.; XIANGYANG, L.; WANG, J.; SLOAN, C. AND CICOGNA, C. (2007). Sequential linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* isolates with G2576T mutation. *Journal of clinical microbiology.*, 45: 3277-3280.
10. HUANG, Y.; XU, Y.; LIU, G.; MEI, Y.; XIA, W.; XU, T.; GU, B. AND PAN, S. (2014). Emergence of linezolid resistance in a clinical *Staphylococcus capitis* isolate from Jiangsu Province of China in 2012. *Journal of thoracic disease.*, 6: 48-53.
11. KEHRENBURG, C. AND SCHWARZ, S. (2006). Distribution of florfenicol resistance genes *fexA* and *cfr* among chloramphenicol-resistant *Staphylococcus* isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy.*, 50: 1156-1163.
12. KHAN, S.; SHETTY, P.; SARAYU, L.; CHIDAMBARAM, A. AND RANGANATHAN, R. (2012). Detection of *mecA* genes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by Polymerase Chain Reaction. *International journal of health and rehabilitation sciences.*, 1: 64-68.
13. LIVERMORE, D. M. (2003). Linezolid *in vitro*: mechanism and antibacterial spectrum. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.*, 51: 9-16.
14. LÓPEZ-FABAL, F.; ROMÁN, F.; ALMAGRO, M.; SANZ, N. AND GÓMEZ-GARCÉS, J.L. (2013). *Staphylococcus* coagulasa negativos resistentes al linezolid: características fenotípicas, genotípicas y sensibilidad a combinaciones de antibióticos. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica.*, 31(7): 442-447.
15. LOZANO, C.; ASPIROZ, C.; GÓMEZ-SANZ, E.; TIRADO, G.; FORTUÑO, B.; ZARAZAGA, M. AND TORRES, C. (2013). Caracterización de cepas *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus haemolyticus* resistentes a meticilina y linezolid en un hospital español. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica.*, 31(3): 136-141.
16. MENDES, R.; DESHPANDE, L.; FARRELL, D.; SPANU, T.; FADDA, G. AND JONES, R. (2010). Assessment of linezolid resistance mechanisms among *Staphylococcus epidermidis* causing bacteraemia in Rome, Italy. *Journal of antimicrobial chemotherapy.*, 65: 2329-2335.
17. MONTENARO, C.; STOCK, F. AND MURRAY, P. (2008). Mechanisms of resistance to daptomycin in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial agents and chemotherapy.*, 52: 1167–1170
18. MORALES, G.; PICAZO, J. J.; BAOS, E.; CANDEL, F. J.; ARRIBI, A.; PELÁEZ, B.; ANDRADE, R.; DE LA TORRE, M. A.; FERERES, J. AND SÁNCHEZ-GARCÍA, M. (2010). Resistance to linezolid is mediated by the *cfr* gene in the first report of an outbreak of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical infectious disease.*, 50: 821-825.

19. MURAKAMI, K.; MINAMIDE, W.; WADA, K.; NAKAMURA, E.; TERAOKA, H. AND WATANABE, S. (1991). Identification of methicillin-resistant strains of Staphylococci by polymerase chain reaction. *Journal of clinical microbiology* ., 29: 2240-2244.
20. NONHOFF, C.; ROISIN, S.; HALLIN, M. AND DENIS, O. (2012). Evaluation of clearview exact PBP2a, a new immunochromatographic assay, for detection of low-level methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (LL-MRSA). *Journal of clinical microbiology*., 50(10): 3359-3360.
21. OLMOS, A. (1997). Aplicación del estudio de polimorfismos de DNA y características fenotípicas en el análisis de *Staphylococcus aureus* (Rosenbach, 1884) meticilín-resistentes (MRSA). Tesis doctoral. Universidad de Valencia.
22. OLMOS, A.; CAMARENA, J. J.; NOGUEIRA, J. M.; NAVARRO, J.; RISEN, J. AND SÁNCHEZ, R. (1998). Application of an optimized and highly discriminatory method based on arbitrarily primed PCR for epidemiologic analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nosocomial infections. *Journal of clinical microbiology*., 36: 1128-1134.
23. PILLAI, S. K.; SAKOULAS, G.; WENNERSTEN, C.; ELIOPOULOS, G. M.; MOELLERING, R. C.; FERRANO, M. J. AND GOLD, H. S. (2002). Linezolid resistance in *Staphylococcus aureus*: characterization and stability of resistant phenotype. *The journal of infectious diseases*., 186: 1603–1607.
24. PITCHER, D. G.; SAUNDERS N.A.; OWEN R. J. (1989) Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in Applied Microbiology*., 8: 151- 156.
25. QUEIPO-ORTUÑO, M. I.; COLMENERO, J.; MACIAS, M.; BRAVO, M. J. AND MORATA, P. (2008). Preparation of bacterial DNA template by boiling and effect of immunoglobulin G as an inhibitor in real-time PCR for serum samples from patients with brucellosis. *Clinical and vaccine immunology*., 15: 293-296.
26. RUIZ DE COPEGUI, E.; ILUSIANA, C.; DÍAS, P.; SOCÍAS, A.; GARAU, M.; AYESTARÁN, J.I.; PAREJA, A.; GALLEGOS, M.C.; PÉREZ, J.L. AND OLIVER, A. (2011). Diseminación nosocomial de *Staphylococcus hominis* resistente a linezolid en dos hospitales de Mallorca. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*., 29(5): 339-344.
27. SANCHEZ, M. AND DE LA TORRE, M.A. (2013). Resistencia al linezolid: ¿una curiosidad de laboratorio o un problema clínico relevante?. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*., 31(3): 127-129.
28. STAPLETON, P. D AND TAYLOR, P. W. (2002). Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanism and modulation. *Sci Prog*. 85: 57-72.
29. WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A. AND TINGEYL, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*., 18: 6531-6535.
30. WRIGHT, G.D. (2010). Q&A: Antibiotic resistance: where does it come from and what can we do about it?. *BMC Biology*., 8: 123-129.

## 6.2. BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA.

1. CUEVAS, O.; CERCENADO, E.; GOYANES, M. J.; VINDEL, A.; TRINCADO, P.; BOQUETE, T.; MARTÍN, M.; BOUZA, E. GRUPO ESPAÑOL PARA EL ESTUDIO DE ESTAFILOCOCOS. (2008). *Staphylococcus* spp. en España: situación actual y evolución de la resistencia a antimicrobianos (1986-2006). *Enfermedades Infecciosas en Microbiología Clínica.*, 26(5):269-77.
2. ELIECER, M.; DOMÍNGUEZ, M. A.; EZPELETA, C.; PADILLA, B.; RAMÍREZ DE ARELLANO, E. AND MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L. (2008). Cultivos de vigilancia epidemiológica de bacterias resistentes a los antimicrobianos de interés nosocomial. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica.*, 26(4): 220-229.
3. LONG, K. S. AND VESTER, B. (2012). Resistance to linezolid caused by modifications at its binding site on the ribosome. *Antimicrobial agents and chemotherapy.*, 56(2): 603-612.
4. MERINO, L.; CANTOS, A.; TORRES, M. J. AND AZNAR, J.(2006). Detección de resistencia inducible a clindamicina en aislados cutáneos de *Staphylococcus* spp. por métodos fenotípicos y genotípicos. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica.* 25(2): 77-81.
5. MOROSINI, M. I.; CERCENADO, E.; ARDANUY, C. AND TORRES, C. (2012). Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos grampositivos. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica.*, 30(6): 325-332.
6. QUILES, I.; GARCÍA, A.; DE PABLOS, M.; GÓMEZ, R. AND MINGORANCE, J. (2012). Resistance to linezolid in a methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* clinical isolate without previous exposure to oxazolidinones. *International Journal of Medical Microbiology.* 302: 145-147.
7. RIU, M.; TERRADAS, R.; SALA, M.; COMAS, M.; KNOBEL, H.; GRAU, S. AND COTS, F. (2012). Costes asociados a las bacteriemias nosocomiales en un hospital universitario. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica.*, 30(3): 137-142.
8. TORRES, C. AND CERCENADO, E. (2010). Lectura interpretada del antibiograma de cocos gram positivos. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica.*, 28(8): 541-553.

## ANEXO I

**Tabla 2:** Resumen de variables demográficas, factores analizados y aislados SCN estudiados.

Nº PACIENTE	SEXO	EDAD	Polimic	Lzd Previo	Estancia REA (días)	Evolución	nº aislados SCN	SCN	Tipo de Muestra	Fecha Muestra
1	H	77	S	S	30	ALTA	5	Se	Sangre	10/02/2012
								Shae	Sangre	21/03/2012
								Se	Sangre	14/03/2012
								Shae	Sangre	30/03/2012
								Sc	Sangre	21/03/2012
2	H	85	S	S	12	EXITUS	2	Sc	Sangre	12/09/2012
								Shae	Sangre	12/09/2012
3	H	62	N	S	50	ALTA	7	Se	Punta cateter	29/06/2012
								Sc	Sangre	17/07/2012
								Sc	Sangre	27/02/2012
								Sc	Sangre	22/07/2012
								Se	Sangre	29/06/2012
								Shae	Sonda Vesical	14/08/2012
								Shae	Sangre	03/07/2012
4	H	23	S	N	2	EXITUS	1	Se	Sangre	04/05/2012
5	M	31	N	N	68	ALTA	5	Se	Líqu. Ascítico	24/05/2012
								Shae	Sangre	14/05/2012
								Se	Sangre	25/05/2012
								Se	Sangre	24/05/2012
								Se	Sangre	20/06/2012
6	H	72	S	S	25	EXITUS	1	Se	Sangre	24/03/2012
7	M	70	S	S	33	ALTA	3	Se	Sangre	14/02/2012
								Se	Sangre	14/02/2012
								Shh	Sangre	14/02/2012
8	H	79	S	S	32	EXITUS	2	Se	Sangre	07/04/2012
								Shae	Sangre	07/04/2012
9	H	44	S	S	29	ALTA	9	Se	Sangre	22/05/2012
								Shh	Sangre	22/05/2012
								Shae	Líqu. Peritoneal	11/06/2012
								Shh	Sangre	22/05/2012
								Se	Sangre	17/05/2012
								Se	Sangre	31/05/2012
								Se	Sangre	31/05/2012
								Se	Sangre	17/05/2012
Shae	Sangre	17/05/2012								

Nº PACIENTE	SEXO	EDAD	Polimic	Lzd Previo	Estancia REA (días)	Evolución	nº aislados SCN	SCN	Tipo de Muestra	Fecha Muestra
10	M	54	S	S	35	ALTA	2	Shh	Sangre	17/02/2012
								Shh	Sangre	27/01/2012
11	M	60	S	S	29	ALTA	1	Se	Sangre	22/09/2012
12	H	78	S	S	32	EXITUS	1	Shae	Sangre	11/09/2013
13	M	45	S	S	65	ALTA	5	Se	Sangre	17/09/2013
								Se	Sangre	31/10/2013
								Se	Sangre	10/10/2013
								Shae	Sangre	20/08/2013
								Shae	Sangre	23/08/2013
14	H	32	S	S	36	ALTA	2	Shh	Sangre	22/02/2013
								Se	Sangre	20/02/2013
15	H	72	S	S	25	ALTA	1	Se	Sangre	29/11/2013
16	M	79	N	S	27	ALTA	1	Se	Sangre	25/04/2013
17	M	72	S	N	32	ALTA	1	Shae	Sangre	01/09/2013
18	H	46	S	S	30	ALTA	1	Shae	Líqu. Peritoneal	19/06/2013
19	H	65	S	S	59	EXITUS	4	Shae	Sangre	24/10/2013
								Shae	Sangre	01/11/2013
								Shh	Sangre	28/10/2013
								Shae	Exudado	24/10/2013
20	H	39	S	S	7	ALTA	1	Se	Sangre	18/07/2013
21	H	71	S	S	29	ALTA	4	Shae	Sangre	01/12/2013
								Se	Líqu. Peritoneal	13/11/2013
								Shae	Sangre	13/11/2013
								Shae	Sangre	26/11/2013
22	M	76	N	N	3	EXITUS	1	Se	Sangre	29/09/2013
23	H	61	S	S	30	ALTA	4	Shae	Sangre	05/09/2013
								Se	Abceso	14/09/2013
								Shae	Sangre	04/09/2013
								Shae	Catéter	30/08/2013
24	M	77	N	S	31	ALTA	1	Se	Sangre	15/05/2013
25	H	76	S	N	7	ALTA	2	Shh	Sangre	29/12/2013
								Shh	Sangre	29/12/2013

Polimic: Infección polimicrobiana, Lzd: linezolid, SCN: *Staphylococcus coagulasa* negativos, H: hombre, M: mujer, Se: *S. epidermidis*, Shae: *S. haemolyticus*, Shh: *S. hominis*, Sc: *S. capitis*