

Actividad y permeabilidad de linezolid y vancomicina en biocapas de *Staphylococcus epidermidis*

José M. Rodríguez-Martínez^a, Sofía Ballesta^a, Isabel García^a, M. Carmen Conejo^a y Álvaro Pascual^{a,b}

Departamento de Microbiología. ^aFacultad de Medicina. Universidad de Sevilla. ^bHospital Universitario Virgen Macarena. Sevilla. España.

INTRODUCCIÓN. Se ha evaluado la actividad y capacidad de penetración de linezolid y vancomicina en biocapas de *Staphylococcus epidermidis*.

MÉTODOS. La actividad de linezolid en comparación con vancomicina se midió frente a biocapas bacterianas de *S. epidermidis* formadas sobre segmentos de silicona. La penetración de estos antimicrobianos se midió en las biocapas formadas sobre membranas microporosas de policarbonato. Ambos ensayos se realizaron comparativamente con una cepa de *S. epidermidis* productora de *slime* y otra no productora.

RESULTADOS. La actividad de linezolid frente a biocapas de *S. epidermidis* fue significativamente mayor que la de vancomicina tanto en la cepa productora de *slime* como en la no productora. Ninguno de los antimicrobianos erradicó las biocapas de 24 h. La penetración de linezolid en biocapas de *S. epidermidis* fue mayor que la de vancomicina en todos los tiempos estudiados para ambas cepas.

CONCLUSIONES. Linezolid ha mostrado mayor actividad *in vitro* que vancomicina en biocapas de *S. epidermidis* formadas sobre catéteres de silicona y este efecto podría ser debido a su capacidad para atravesar la biocapa bacteriana.

Palabras clave: Biocapas. Linezolid. Vancomicina. Resistencia. *Staphylococcus epidermidis*.

Activity and penetration of linezolid and vancomycin against *Staphylococcus epidermidis* biofilms

INTRODUCTION. The activity and capacity for penetration of linezolid and vancomycin were comparatively evaluated against *Staphylococcus epidermidis* biofilms.

METHODS. The activity of linezolid versus vancomycin was assessed against 24-hour *S. epidermidis* biofilms developed on silicon catheters. Penetration of the two antimicrobial agents was measured in biofilms developed on polycarbonate membrane filters. Penetration and activity were comparatively tested using *S. epidermidis*, slime-producing and non-slime-producing strains.

RESULTS. The activity of linezolid against *S. epidermidis* biofilms was significantly greater than that of vancomycin for both strains. Neither antimicrobial completely eradicated bacterial survival in 24-hour biofilms.

Linezolid penetration in biofilms was greater than that of vancomycin for both *S. epidermidis* strains.

CONCLUSIONS. Linezolid showed higher *in vitro* activity than vancomycin against *S. epidermidis* biofilms on silicone catheters. This effect may be due to the capability of linezolid to cross the bacterial biofilm.

Key words: Biofilms. Linezolid. Vancomycin. Resistance. *Staphylococcus epidermidis*.

Introducción

Staphylococcus epidermidis, un microorganismo que forma parte de la flora normal de la piel, es el principal agente causal de infecciones nosocomiales asociadas con catéteres e implantes médicos debido a su especial habilidad para formar biocapas bacterianas en la superficie de estos biomateriales¹. La producción de la adhesina polisacárida intercelular *N*-acetil-glucosamina, codificada por el operón *ica*, desempeña un papel fundamental en la capacidad de adhesión de *S. epidermidis*². Las biocapas están constituidas por bacterias embebidas en una matriz polisacárida que las protege de factores adversos, incluyendo la acción de los antimicrobianos y la respuesta inmunitaria del paciente^{3,4}. Las biocapas de *S. epidermidis* son resistentes a la mayoría de los agentes antimicrobianos de uso clínico^{5,6}. Esta resistencia se debe a características intrínsecas de la estructura de la biocapa como son la impermeabilidad, la reducida tasa metabólica de las bacterias en el interior de las biocapas, la expresión de mecanismos de resistencia específicos o la presencia de subpoblaciones de bacterias persistentes⁷.

Linezolid, un inhibidor de la síntesis de proteínas que actúa uniéndose a la subunidad ribosomal 50S, es un antimicrobiano de la familia de las oxazolidinonas que puede presentar mayor actividad frente a bacterias con baja actividad metabólica, como ocurre en las biocapas, que los antimicrobianos que actúan a nivel de la pared celular⁸. Linezolid posee mayor actividad *in vitro* frente a biocapas de *S. epidermidis* que otros antimicrobianos de uso común^{9,10}, lo cual podría ser debido, parcialmente, a la capacidad de linezolid para concentrarse en las biocapas bacterianas. El objetivo de este estudio fue evaluar la posible relación entre la acumulación de linezolid y vancomicina en biocapas y su actividad *in vitro* frente a biocapas de *S. epidermidis*.

Correspondencia: Dr. J.M. Rodríguez-Martínez.
Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina.
Apdo. 914. Sevilla 41080. España.
Correo electrónico: jmrodriguez@us.es

Manuscrito recibido el 7-7-2006; aceptado el 9-1-2007.

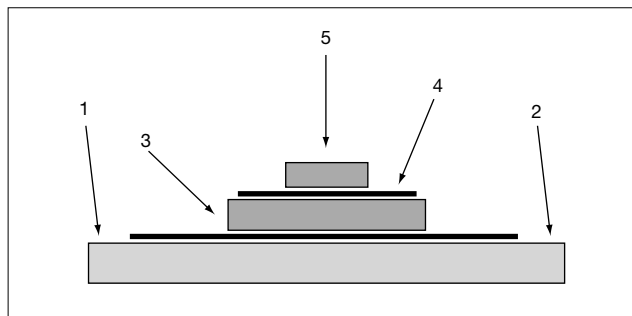


Figura 1. Descripción esquemática del método empleado para determinar la permeabilidad de las biocapas a los antimicrobianos. Las biocapas (3) se desarrollaron sobre membranas de policarbonato de 25 mm (2) depositadas en medio MH agar (1). Sobre la biocapa se colocó otra membrana de policarbonato de 13 mm (4). Finalmente, sobre esta estructura en sándwich se depositó el disco de antimicrobiano (5).

Métodos

Cepas bacterianas y estudios de sensibilidad antibiótica

Se usaron las cepas de colección *S. epidermidis* ATCC 12228 (no productora de *slime*) y *S. epidermidis* ATCC 35984 (productora de *slime*). Las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) y concentraciones bactericidas mínimas de linezolid (Laboratorios Pfizer, Madrid, España) y vancomicina (Sigma, Madrid, España) se determinaron de acuerdo a la normativa del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)¹¹.

Actividad de los agentes antimicrobianos frente a biocapas bacterianas

Se evaluó la actividad de linezolid y vancomicina frente a biocapas de 24 h de acuerdo con un método previamente desarrollado en nuestro laboratorio¹². Las biocapas para ambas cepas se prepararon incubando segmentos de 1 cm de longitud de catéteres de silicona (8FR/CH; 0,33 mm) Foley (Sherwood Medical, Tullamore, Irlanda) en caldo de Mueller-Hinton (MH) conteniendo bacterias a una concentración de 10^5 UFC/ml durante 24 h a 35 °C. Una vez formadas las biocapas bacterianas sobre los segmentos de catéteres, éstos se lavaron tres veces con una solución de tampón fosfato (PBS) a 4 °C para eliminar las bacterias no adheridas y se incubaron durante 24 h a 35 °C en caldo MH conteniendo diferentes concentraciones de linezolid o vancomicina ($1 \times \text{MIC}$, $8 \times \text{MIC}$ y $16 \times \text{MIC}$) y sin antimicrobiano.

Después de este período, los segmentos de catéteres se lavaron tres veces bajo las condiciones anteriormente descritas, se depositaron en

tubos conteniendo 1 ml de PBS y se sonicaron (1 min 40 kHz) para despegar las bacterias adheridas. De la suspensión bacteriana obtenida o de las diluciones correspondientes se plaquearon 50 μl sobre placas de medio sólido de MH. Tras un período de incubación de 24 h a 35 °C se realizó recuento en placa del número de bacterias viables. Todos los experimentos se realizaron por cuadruplicado para cada cepa y antimicrobianos en días diferentes.

Permeabilidad de las biocapas a los antimicrobianos

La permeabilidad de las biocapas bacterianas de *S. epidermidis* a linezolid y vancomicina se determinó de acuerdo al método publicado por Anderl et al¹³. La preparación de las biocapas se realizó usando una suspensión diluida de un cultivo estacionario de bacterias planctónicas crecido durante 24 h (densidad óptica a 600 nm = 0,2). Sobre un filtro de policarbonato estéril (25 mm de diámetro; tamaño de poro de 0,2 μm) depositado en una placa de MH sólido, se inocularon 10 μl de esta dilución, incubándose 24 h a 35 °C. Sobre la biocapa formada tras las 24 h se coloca otro filtro estéril de policarbonato (13 mm de diámetro; tamaño de poro de 0,2 μm) y por último, sobre todo lo anterior, un disco de linezolid (30 μg) o vancomicina (30 μg) humedecido con caldo MH (fig. 1). Para comparar la permeabilidad de estas biocapas se usaron dos controles; un control de permeabilidad sin biocapa entre los filtros de policarbonato y un control impermeable, es decir, una barrera plástica de un 1 cm² (Parafilm, Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA) entre los 2 filtros de policarbonato que impedía el paso del antimicrobiano. Tras diferentes períodos de incubación (1, 3 y 6 h), el disco de antimicrobiano fue retirado y la concentración de antibiótico que quedó en el disco se cuantificó mediante un bioensayo en el que se usó la cepa *Micrococcus luteus* ATCC 58297 como indicador. Se aplica la fórmula: antibiótico que atraviesa la biocapa (μg) = carga inicial del disco (μg) – carga residual del disco (μg) para cada tiempo evaluado. Todos los experimentos se realizaron por cuadruplicado para cada cepa y antimicrobianos en días diferentes.

Análisis estadístico de los datos

Todos los datos se expresan en términos de media \pm desviación estándar. Las diferencias entre los grupos se compararon mediante el método estadístico de la t de Student para datos pareados con un nivel de significación estadística de $p < 0,05$.

Resultados y discusión

El valor de CIM de linezolid para ambas cepas fue de 1 mg/l, mientras que los valores de CIM de vancomicina fueron de 1 y 2 mg/l para la cepa productora y no productora de *slime*, respectivamente. La actividad *in vitro* de ambos agentes antimicrobianos frente a biocapas de 24 h se muestra en la tabla 1. Aunque la actividad de linezolid

TABLA 1. Supervivencia bacteriana de *S. epidermidis* formando biocapas de 24 h sobre catéteres de silicona tras la exposición a diferentes concentraciones de linezolid y vancomicina. Control: biocapas no tratadas con antimicrobiano. Resultados expresados como media \pm desviación estándar (n = 4)

Concentración de antibiótico ($\mu\text{g/ml}$)	UFC $\times 10^3$ /segmento de catéter			
	<i>S. epidermidis</i> productor de <i>slime</i>		<i>S. epidermidis</i> no productor de <i>slime</i>	
	Linezolid	Vancomicina	Linezolid	Vancomicina
0 (control)	440 \pm 96		390 \pm 88	
1	1,1***,*** \pm 0,1	115* \pm 20	5,8*** \pm 0,8	186* \pm 30
8	0,6*** \pm 0,04	1,2* \pm 0,14	1,1*** \pm 0,6	3,9* \pm 0,8
16	0,012***,*** \pm 0,003	0,7*** \pm 0,05	0,18*** \pm 0,05	2,0* \pm 0,12

* $p < 0,05$ comparado con el valor obtenido para la misma cepa sin antimicrobiano (control).

** $p < 0,05$ comparado con el valor obtenido para la misma cepa frente a vancomicina.

*** $p < 0,05$ comparado con el valor obtenido para la cepa no formadora de biocapa y el mismo antimicrobiano.

UFC: unidades formadoras de colonias.

fue significativamente mayor que la de vancomicina, ninguna de las concentraciones evaluadas con ambos antimicrobianos logró erradicar completamente las bacterias presentes en las biocapas bacterianas sobre la superficie de los catéteres. A baja concentración (1 mg/l), linezolid fue significativamente más activo que vancomicina frente a biocapas de *S. epidermidis*. En el caso de la cepa de *S. epidermidis* productora de *slime*, la tasa de bacterias supervivientes en las biocapas incubadas con 1 mg/l de linezolid o vancomicina fue del 0,25 y 26%, respectivamente, respecto a los resultados obtenidos con la biocapa control sin tratamiento antimicrobiano (100% de supervivencia). En el caso de la cepa de *S. epidermidis* no productora de *slime*, estos valores fueron del 1,5 y 47,5%, respectivamente. A alta concentración de antimicrobiano (16 mg/l), el número de bacterias supervivientes sobre las biocapas bacterianas incubadas con linezolid fue 58 veces más bajo que la reducción de la viabilidad bacteriana observada con vancomicina para la cepa productora de *slime*.

Si bien la acción de linezolid y vancomicina se acentuaba frente a *S. epidermidis* productor de *slime*, la actividad mostrada por los dos antimicrobianos fue parecida frente a ambas cepas. Aunque este ensayo tiene la limitación del uso de sólo 2 cepas, este resultado se podría explicar por variaciones en los niveles de expresión del operón *ica* cuya producción depende de factores ambientales los cuales son difíciles de reproducir completamente *in vitro*¹⁴. En un modelo de farmacodinamia *in vitro*, Wiederhold et al¹⁵ mostraron que tanto linezolid como vancomicina suprimían el crecimiento bacteriano sobre catéteres, e igualmente ningún antimicrobiano eliminó totalmente la colonización bacteriana del catéter. En otro modelo en el que se usaron bloques de poliuretano sobre un dispositivo modificado de Robbins, linezolid a 2 mg/l fue más eficaz en la eliminación de las biocapas de *S. epidermidis* que vancomicina a 10 mg/l¹⁰. Es importante resaltar las diferencias en la metodología utilizada cuando se compara estudios sobre actividad de antimicrobianos sobre biocapas.

Las diferencias observadas en la actividad de linezolid y vancomicina frente a biocapas podrían ser debidas a diferencias en el mecanismo de acción de ambos antimicrobianos así como a diferencias estructurales de estas moléculas relacionadas con su capacidad para acceder a sus dianas^{7,16}. De acuerdo a estas ideas, se propuso determinar la capacidad de linezolid y vancomicina para penetrar en biocapas de *S. epidermidis*. En ambas cepas, más del 60% de la concentración inicial de los discos de linezolid (30 µg) se liberó en los primeros 60 min. Este porcentaje llegó al 75% después de 3 h de incubación (fig. 2). De nuevo, no se observaron diferencias entre la cepa de *S. epidermidis* productora y no productora de *slime*. En el caso de vancomicina, el 13% de la carga inicial del disco (30 µg) se liberó después de una hora de incubación. Después de 6 h de incubación este porcentaje sólo llegó hasta el 20% en la cepa productora de *slime* y alcanzó el 55% en la cepa no productora (fig. 2). Wilcox et al¹⁷, encontraron concentraciones más elevadas de vancomicina que de linezolid en biocapas bacterianas que se podrían explicar por la unión del glicopéptido al glicocálix. Este hecho también podría explicar las diferencias obtenidas en la liberación de vancomicina frente a ambas cepas debido a que el gradiente de concentración que existe en la cepa no productora de *slime* favorecería la liberación del antibiótico. Este gra-

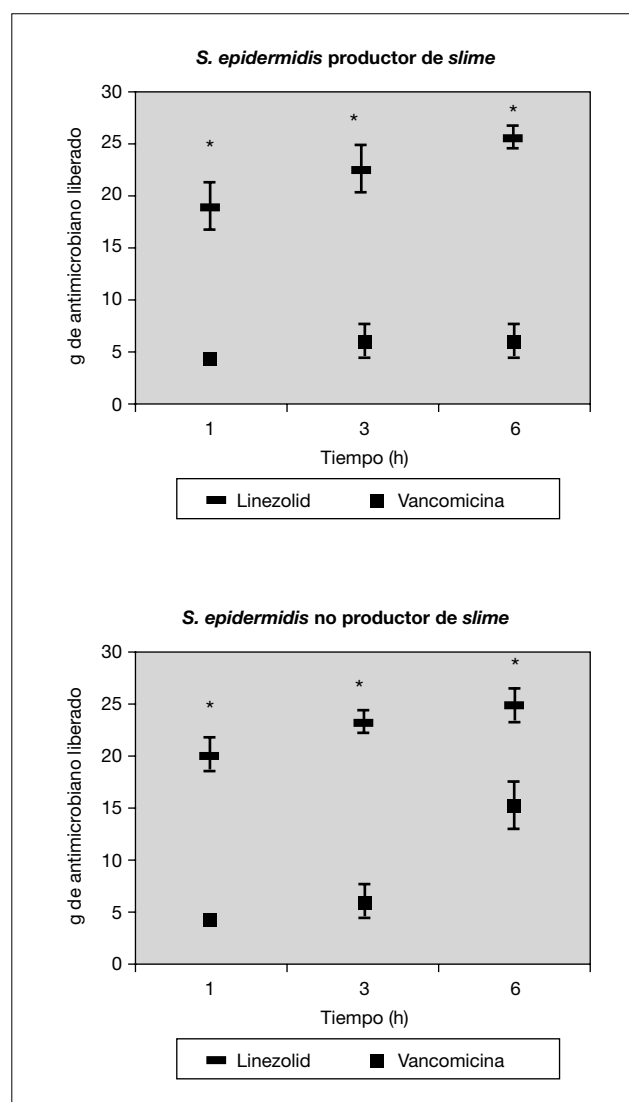


Figura 2. Penetración de los antimicrobianos a través de biocapas bacterianas sobre filtros de policarbonato. Los datos (media ± desviación estándar) se expresan como µg de antimicrobiano liberados de discos de 30 µg de linezolid y vancomicina (n = 4). *p < 0,05 comparado con vancomicina.

diente desaparecería en la cepa productora de *slime* y el glicopéptido retenido por el glicocálix retrasaría la liberación del antibiótico desde el disco. En un trabajo anterior, Darouiche et al¹⁸ demostraron que a pesar de conseguir una concentración elevada de vancomicina en un modelo de biocapas sobre acero inoxidable, ésta no consiguió erradicar a las bacterias. Un reciente trabajo, Curtin et al¹⁰ han puesto de manifiesto que linezolid fue capaz de erradicar las biocapas de *S. epidermidis* más rápidamente que vancomicina en infecciones relacionadas con catéteres sobre catéter venoso central.

En conclusión, linezolid ha mostrado una mayor actividad *in vitro* que vancomicina frente a biocapas de *S. epidermidis* sobre catéteres de silicona, independientemente de la producción de *slime* y esta actividad puede ser debida, al menos parcialmente, a la rápida difusión de linezolid a través de estas biocapas bacterianas.

Agradecimientos

Este estudio fue financiado parcialmente por Laboratorios Pfizer y se desarrolló bajo los auspicios científicos de REIPI C013/14 (Red Española para la Investigación en Patología Infecciosa) y del PI05/1019, Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Salud y Consumo, España.

Bibliografía

1. Gotz F. *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol*. 2002;43:1367-78.
2. Frebourg NB, Lefebvre S, Baert S, Lemeland JF. PCR-Based assay for discrimination between invasive and contaminating *Staphylococcus epidermidis* strains. *J Clin Microbiol*. 2000;38:877-80.
3. Pascual A. Microbiological aspects of biomaterial-related infections. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2001;19:459-61.
4. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol*. 2004;2:95-108.
5. Pascual A, Ramírez E, Martínez L, Perea EJ. Effect of polyurethane catheters and bacterial biofilms on the *in vitro* activity of antimicrobials against *Staphylococcus epidermidis*. *J Hosp Infect*. 1993;24:211-8.
6. Ramírez E, Pascual A, Martínez L, Perea EJ. Activity of eight antimicrobials on *Staphylococcus epidermidis* attached to Teflon® catheters. *J Med Microbiol*. 1994;40:43-7.
7. Pascual A. Pathogenesis of catheter-related infections: lessons for new designs. *Clin Microbiol Infect*. 2002;8:256-64.
8. Dresser LD, Rybak MJ. The pharmacologic and bacteriologic properties of oxazolidinones, a new class of synthetic antimicrobials. *Pharmacotherapy*. 1998;18:456-62.
9. Carmona PM, Roma E, Monte E, García J, Gobernado M. Role of linezolid in antimicrobial therapy. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2003;21:30-41.
10. Curtin J, Cormican M, Fleming G, Keelehan J, Collieran E. Linezolid compared with eperezolid, vancomycin, and gentamicin in an *in vitro* model of antimicrobial lock therapy for *Staphylococcus epidermidis* central venous catheter-related biofilm infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47:3145-8.
11. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Fifteenth informational supplement. Document M100-S15. Clinical and Laboratory Standards, Wayne, Pa. Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. 2005.
12. Pascual A, Ramírez de Arellano E, Perea EJ. Activity of glycopeptides in combination with amikacin or rifampin against *Staphylococcus epidermidis* biofilms on plastic catheters. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1994;13:515-7.
13. Anderl JN, Franklin MJ, Stewart PS. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44:1818-24.
14. Conlon KM, Humphreys H, O'Gara JP. *icaR* encodes a transcriptional repressor involved in environmental regulation of *ica operon* expression and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. *J Bacteriol*. 2002;184:4400-8.
15. Wiederhold NP, Coyle EA, Raad II, Prince RA, Lewis RE. Antibacterial activity of linezolid and vancomycin in an *in vitro* pharmacodynamic model of gram-positive catheter-related bacteraemia. *J Antimicrob Chemother*. 2005;55:792-5.
16. Stewart PS. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int J Med Microbiol*. 2002;292:107-13.
17. Wilcox MH, Kite P, Mills K, Sugden S. *In situ* measurement of linezolid and vancomycin concentrations in intravascular catheter-associated biofilm. *J Antimicrob Chemother*. 2001;47:171-5.
18. Darouiche RO, Dhir A, Miller AJ, Landon GC, Raad II, Musher DM. Vancomycin penetration into biofilm covering infected prostheses and effect on bacteria. *J Infect Dis*. 1994;170:720-3.