



# Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original

## Caracterización de cepas de *Staphylococcus epidermidis* y *S. haemolyticus* resistentes a meticilina y linezolid en un hospital español<sup>☆</sup>

Carmen Lozano<sup>a</sup>, Carmen Aspiroz<sup>b</sup>, Elena Gómez-Sanz<sup>a</sup>, Gabriel Tirado<sup>c</sup>, Blanca Fortuño<sup>b</sup>, Myriam Zarazaga<sup>a</sup> y Carmen Torres<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Área Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de La Rioja, Logroño, España

<sup>b</sup> Unidad de Microbiología, Hospital Royo Villanova, Zaragoza, España

<sup>c</sup> Servicio de Medicina Intensiva, Hospital Royo Villanova, Zaragoza, España

### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

#### Historia del artículo:

Recibido el 12 de junio de 2012

Aceptado el 27 de agosto de 2012

On-line el 6 de octubre de 2012

#### Palabras clave:

Linezolid

*Staphylococcus epidermidis*

*Staphylococcus haemolyticus*

ARNr 23S

G2603T

Lincomicina

L3

L4

Secuencia Tipo (ST) 2

### R E S U M E N

**Introducción:** La resistencia a linezolid se produce generalmente por mutaciones en el ARNr 23S. El objetivo de este estudio fue caracterizar cepas de *Staphylococcus epidermidis* (SE) y *S. haemolyticus* (SH) resistentes a linezolid y meticilina (SE-LM<sup>R</sup> y SH-LM<sup>R</sup>, respectivamente) detectadas en un hospital español.

**Métodos:** Se estudiaron todas las cepas SE-LM<sup>R</sup> y SH-LM<sup>R</sup> aisladas en el periodo de junio 2009 a agosto 2011, en un hospital de segundo nivel, así como las características epidemiológicas de los pacientes. Se tiparon las cepas (25 SE-LM<sup>R</sup> y 2 SH-LM<sup>R</sup>, procedentes de 20 pacientes) y se determinó su fenotipo y genotipo de resistencia y la presencia de genes de virulencia.

**Resultados:** En todas las cepas analizadas se detectó la mutación G2603T en el ARNr 23S y también cambios aminoacídicos en las proteínas ribosomales L3 y L4. Las 25 cepas SE-LM<sup>R</sup> pertenecieron a la secuencia tipo ST2, su SCCmec fue el tipo III y presentaron 2 patrones diferentes de PFGE. El SCCmec de las 2 cepas SH-LM<sup>R</sup> fue no tipable. Las cepas SE-LM<sup>R</sup> contenían los genes de resistencia *aac(6')-aph(2'')* y *dfrS1*, y las cepas SH-LM<sup>R</sup> poseían además el gen *erm(C)*. No se detectaron genes de resistencia a lincomicina en las cepas SE-LM<sup>R</sup> a pesar de mostrar sensibilidad disminuida a clindamicina y resistencia a lincomicina.

**Conclusiones:** La resistencia a linezolid en el ámbito hospitalario es preocupante y requiere una continua vigilancia. Esta resistencia se asoció a la mutación G2603T en el ARNr 23S y a la presencia de cambios aminoacídicos en L3 y/o L4.

© 2012 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

## Characterization of methicillin- and linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* and *S. haemolyticus* strains in a Spanish hospital

### A B S T R A C T

**Introduction:** Linezolid resistance is mainly due to mutations in the 23S rRNA target. The aim of this study was to characterize linezolid and methicillin resistant *Staphylococcus epidermidis* (SE-LM<sup>R</sup>) and *S. haemolyticus* (SH-LM<sup>R</sup>) strains detected in a Spanish hospital.

**Methods:** SE-LM<sup>R</sup> and SH-LM<sup>R</sup> strains obtained in the period June 2009–August 2011 in a second level hospital were recorded along with the epidemiological characteristics of the patients. These strains were typed, and their resistance, phenotype, genotype and the factors determining their virulence were analysed.

**Results:** Linezolid resistance was explained by the presence of G2603T mutation (23S rRNA) and aminoacid changes in L3 and L4 ribosomal proteins. The 25 SE-LM<sup>R</sup> strains belonged to sequence type ST2, presented SCCmec type III, and two different PFGE patterns. The two SH-LM<sup>R</sup> strains showed non-typeable SCCmec. SE-LM<sup>R</sup> strains harboured the resistance genes *aac(6')-aph(2'')*, and *dfrS1*. SH-LM<sup>R</sup> strains contained these genes and the gene *erm(C)*. No lincomycin resistance mechanism was identified in SE-LM<sup>R</sup> strains regardless of showing lincomycin resistance and diminished susceptibility to clindamycin.

#### Keywords:

Linezolid

*Staphylococcus epidermidis*

*Staphylococcus haemolyticus*

23S rRNA

G2603T

lincomycin

L3

L4

Sequence type (ST) 2

<sup>☆</sup> Este trabajo ha sido presentado parcialmente en el XVI Congreso de la SEIMC, Bilbao 2012.

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: carmen.torres@unirioja.es (C. Torres).

**Conclusions:** Linezolid resistance is of concern in hospitals, and requires continued vigilance. Several linezolid resistance mechanisms (mutation in 23S rRNA and amino acid changes in L3 and L4) were identified in this study.

© 2012 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

## Introducción

Linezolid es el primer antibiótico comercializado del grupo de las oxazolidinonas. Este compuesto se utiliza principalmente para el tratamiento de infecciones graves causadas por patógenos gram positivos que son resistentes a varios grupos de antibióticos, incluyendo cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (SARM). Su mecanismo de acción consiste en la inhibición de la síntesis de proteínas a través de la unión de N-formilmetionil-ARNt al ribosoma, afectando a la subunidad 50S. Desde su aprobación en el año 2000, la resistencia a este antibiótico ha aparecido raramente, siendo más común en estafilococos coagulasa-negativos (ECN)<sup>1</sup>. Esta resistencia se debe sobre todo a mutaciones en la diana (ARNr 23S)<sup>1</sup>, aunque también se ha descrito asociada a cambios aminoacídicos, inserciones y deleciones en las proteínas ribosomales L3, L4 y L22<sup>2</sup>. Recientemente se ha reportado un gen (*cfr*) capaz de conferir resistencia a este antibiótico y a lincosamidas, estreptograminas, fenicoles, pleuromutilinas y oxazolidinonas<sup>3</sup>.

Los ECN son una causa importante de infecciones hospitalarias, que pueden estar implicados en casos graves y causar brotes nosocomiales, particularmente preocupantes si estos se producen por cepas que presentan resistencia a linezolid<sup>4-6</sup>. Entre los ECN, *Staphylococcus epidermidis* (SE) es el más frecuente y el de mayor relevancia y se asocia a infecciones principalmente en pacientes con catéteres intravenosos y otros dispositivos, debido a la capacidad de este microorganismo de producir biofilm<sup>7</sup>. En cuanto al resto de los ECN, *Staphylococcus haemolyticus* (SH) es uno de los más importantes en nuestros hospitales<sup>5</sup>. El objetivo de este estudio fue caracterizar todas las cepas clínicas de ECN resistentes a linezolid detectadas en un hospital español.

## Material y métodos

### Cepas estudiadas

Se estudiaron todos los aislados de ECN resistentes a linezolid obtenidos en el Hospital Royo Villanova (HRV) de Zaragoza durante 2 años consecutivos (junio 2009-agosto 2011), comenzando con el primer aislado de estas características obtenido en dicho hospital. El HRV es un hospital español de segundo nivel, con 225 camas y una unidad de cuidados intensivos (UCI) polivalente con 10 camas. En este periodo se obtuvieron 25 aislados de SE y 2 de SH resistentes a linezolid, los cuales presentaron también resistencia a meticilina (denominados respectivamente SE-LM<sup>R</sup> y SH-LM<sup>R</sup>). Estos 27 aislados procedían de 20 pacientes no relacionados, y fueron caracterizados en este estudio.

Se recogieron los siguientes datos de los 20 pacientes: edad, sexo, servicio de procedencia, tratamiento previo con linezolid, tiempo de estancia previa al aislamiento de los ECN, relevancia clínica y evolución, así como los datos proporcionados por el servicio de Farmacia del consumo de linezolid en el periodo 2008-2011.

### Fenotipo y genotipo de resistencia

La sensibilidad a penicilina, oxacilina, cefoxitina, eritromicina, telitromicina, clindamicina, quinupristina-dalfopristina, gentamicina, tobramicina, tetraciclina, ciprofloxacina, levofloxacina, sulfametoxazol-trimetoprim, vancomicina, teicoplanina, mupirocina, linezolid, fosfomicina, nitrofurantoina, ácido fusídico

y rifampicina se estudió por el sistema VITEK-2® (Bio-Mérieux); la sensibilidad a clindamicina, lincomicina, eritromicina y trimetoprim, por el método de dilución en agar<sup>8</sup>, y a linezolid, por el sistema E-test. Se estudió por PCR la presencia de los genes de resistencia *mecA*, *lnu(A)*, *lnu(B)*, *vga(A)*, *vga(B)*, *vga(C)*, *vga(E)*, *cfr*, *lsa(B)*, *aac(6')-aph(2'')*, *ant(4')-Ia*, *aph(3')-IIIa*, *dfrS1*, *dfrD*, *drfG* y *dfrK*<sup>3,9</sup>. Se analizó la presencia y número de mutaciones en el gen ARNr 23S por PCR y secuenciación y por digestión con la enzima de restricción *NheI*<sup>10</sup>. Mediante PCR y secuenciación se estudiaron también las mutaciones que conducen a cambios aminoacídicos en las proteínas L3, L4, L22 (resistencia a linezolid) y GrlA y GyrA (resistencia a quinolonas)<sup>2,11</sup>.

### Tipado molecular

Todas las cepas fueron caracterizadas por el tipo de SCCmec (*Staphylococcal Cassette Chromosome mec*) por PCR múltiple<sup>12</sup>. Las cepas SE-LM<sup>R</sup> fueron, además, tipadas por la técnica del MLST (*MultiLocus Sequence Typing*) (<http://sepidermidis.mlst.net/>). Se llevó también a cabo en todas las cepas el tipado mediante la técnica de PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*) y se comparó con el patrón obtenido en cepas previamente publicadas que se habían obtenido en otro hospital de la misma ciudad<sup>6</sup>.

### Factores de virulencia y producción de biofilm

Se analizó por PCR la presencia de los genes codificantes de la leucocidina de Panton-Valentine (PVL) *lukF/lukS-PV*, y de los genes relacionados con la formación de biofilm *icaA*, *icaB* e *icaC*<sup>6,9</sup>.

## Resultados

En la *tabla 1* se muestra un resumen de los datos epidemiológicos de interés de los pacientes en los que se aislaron las cepas de ECN resistentes a linezolid. Las 27 cepas pertenecieron a 20 pacientes diferentes, y la UCI fue el servicio de procedencia de la mayoría de ellos (14 pacientes), seguido por Cirugía (4 pacientes), Medicina Interna (un paciente) y Hematología (un paciente). En cuanto al origen de los aislados, por orden de frecuencia, fue: sangre, catéteres, muestras respiratorias (broncoaspirado y aspirado traqueal) y heridas. Por otro lado, 14 de los 20 pacientes habían sido previamente tratados con linezolid, o estaban siéndolo en el momento del aislamiento de la cepa. El consumo de linezolid durante los años 2008-2011 en el HRV, tanto global como en la UCI, se refleja en la *tabla 2*.

Las 25 cepas SE-LM<sup>R</sup> estudiadas pertenecieron a la secuencia tipo ST2 y presentaron el tipo III de SCCmec. El SCCmec de las 2 cepas SH-LM<sup>R</sup> fue no-tipable con la metodología utilizada. Se analizaron las cepas por PFGE y se obtuvieron 3 patrones de campos pulsados, A y B (en las cepas SE) y C (en las cepas SH). El patrón A se obtuvo en todas las cepas SE-LM<sup>R</sup>, excepto en una de ellas (en la cual se obtuvo el patrón B).

Todas las cepas SE-LM<sup>R</sup> fueron resistentes, además de a linezolid (CMI > 256 mg/l), también a lincomicina (16 mg/l), gentamicina, trimetoprim (64 mg/l), ciprofloxacina y levofloxacina, y mostraron sensibilidad disminuida a clindamicina (1-2 mg/l). Las dos cepas SH-LM<sup>R</sup> presentaron también un fenotipo de multirresistencia (*tabla 3*), detectándose los siguientes valores de CMI: linezolid

**Tabla 1**

Características clínicas de los 20 pacientes en los cuales se aislaron cepas de estafilococos coagulasa-negativos (ECN) resistentes a meticilina y linezolid

Paciente	Sexo/Edad	Servicio	Aislado	Especie	PFGE	Fecha del aislado	Origen de la muestra	Días y servicios de ingreso previos al aislamiento de ECN-LR		Tratamiento previo con linezolid <sup>a</sup>			Significación clínica <sup>b</sup>	Exitus <sup>c</sup>
								n	Planta	Sí/No	Días	Causa		
1	H/61	UCI	C1995	<i>S. epidermidis</i>	A	05/06/09	Exudado traqueal	29	UCI/Cirugía	No	–		No clara	No
2	H/60	UCI	C2357	<i>S. epidermidis</i>	A	06/08/09	Broncoaspirado	53	UCI	Sí	46	Tratamiento empírico	No	No
3	F/55	Cirugía	C2662	<i>S. epidermidis</i>	A	12/12/09	Herida quirúrgica	33	Cirugía	Sí	8	Tratamiento dirigido <i>S. epidermidis</i>	Sí	No
4	H/66	UCI	C2663	<i>S. epidermidis</i>	A	10/12/09	Sangre	31		Sí	6		No	
			C2708	<i>S. epidermidis</i>	A	04/01/10	Catéter	24	Urgencias/UCI	No	–	Sí		
			C2710	<i>S. epidermidis</i>	A	04/01/10	Sangre	24						
5	H/65	UCI	C2709	<i>S. haemolyticus</i>	C	05/01/10	Catéter	40	Cirugía/UCI	Sí	20	Neumonía/Tratamiento empírico	No	No
6	H/53	UCI	C2763	<i>S. haemolyticus</i>	C	18/01/10	Sangre	24	MI/UCI	No	–		Sí	Sí
7	F/73	Medicina Interna	C2818	<i>S. epidermidis</i>	A	18/01/10	Catéter	44	MI	Sí	11	SARM nasal y en orina	Sí	No
			C2819	<i>S. epidermidis</i>	B	02/02/10	Sangre	59		Sí			Sí	
			C2820	<i>S. epidermidis</i>	A	04/02/10	Catéter	61		Sí			Sí	
			C2762	<i>S. epidermidis</i>	A	18/02/10	Catéter	75		Sí			Sí	
8	H/38	UCI	C2817	<i>S. epidermidis</i>	A	04/02/10	Sangre	105	UCI/Cirugía	Sí	20	Peritonitis/Tratamiento dirigido	No	Sí
9	H/77	UCI	C3027	<i>S. epidermidis</i>	A	06/05/10	Sangre	25	Cirugía/UCI	Sí	8	Tratamiento empírico	No	No
10	H/53	Cirugía	C3658	<i>S. epidermidis</i>	A	15/09/10	Sangre	41	Cirugía	No	–		Sí	No
11	M/59	Cirugía	C3532	<i>S. epidermidis</i>	A	09/08/10	Sangre	49	UCI/Cirugía	Sí	14	Sepsis por catéter	Sí	No
12	H/61	Cirugía	C3533	<i>S. epidermidis</i>	A	09/08/10	Sangre	21	Cirugía	No	–		Sí	No
13	H/50	UCI	C3543	<i>S. epidermidis</i>	A	17/08/10	Broncoaspirado	34	UCI/Cirugía	Sí	7	Shock Séptico/Tratamiento empírico	No clara	No
14	M/69	MI/Neurología/UCI	C3777	<i>S. epidermidis</i>	A	09/11/10	Sangre	38	UCI/UCI/HMS/MI	Sí	6	SARM	Sí	Sí
			C3778	<i>S. epidermidis</i>	A	09/11/10	Sangre							
15	H/50	UCI	C4061	<i>S. epidermidis</i>	A	02/01/11	Sangre	7	UCI	No	–		Sí	No
16	H/66	UCI	C4059	<i>S. epidermidis</i>	A	07/02/11	Sangre	22	UCI	Sí	17	EPOC/SARM nasal	No	No
17	H/73	UCI	C4060	<i>S. epidermidis</i>	A	17/02/11	Broncoaspirado	46	Cardiología/UCI	Sí	15	NAVMSARM	No	No
18	H/73	UCI	C4065	<i>S. epidermidis</i>	A	23/02/11	Sangre	50	MI/UCI	Sí	4	Neumonía/Tratamiento empírico	No	Sí
19	H/72	Hematología	C4263	<i>S. epidermidis</i>	A	11/04/11	Sangre	24	Hematología	Sí	11	Neumonía/Tto. empírico	Sí	Sí
20	H/52	UCI	C4264	<i>S. epidermidis</i>	A	23/04/11	Sangre	25	Hematología/UCI	Sí	18	Shock séptico/Tratamiento empírico	Sí	Sí
			C4306	<i>S. epidermidis</i>	A	23/04/11	Broncoaspirado	25		Sí				

Cambio vía: cambio de catéter; EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; H: hombre; LZ: linezolid; M: mujer; MI: Medicina Interna; NAVM: neumonía asociada a ventilación mecánica; SARM nasal: colonización nasal por *S. aureus* resistente a meticilina (SARM); UCI: unidad de cuidados intensivos del Hospital Royo Villanova; UCI HMS: UCI del Hospital Miguel Servet de Zaragoza.

<sup>a</sup> Días de tratamiento con linezolid antes del aislamiento de la cepa resistente y causa de dicho tratamiento.

<sup>b</sup> Significación clínica del aislado (Sí) versus colonización o valoración como aislado no significativo (No). En algunos casos la significación no se pudo establecer con seguridad (no clara o dudosa).

<sup>c</sup> Únicamente el aislamiento del caso 20 tuvo una implicación clara en la muerte del paciente. En el resto no se pudo comprobar una relación directa.

**Tabla 2**

Consumo de linezolid: número de dosis diarias definidas (DDD)/100 estancias-día

Año	Hospital	UCI
2008	0,65	9,27
2009	0,90	12,87
2010	0,99	11,60
2011	0,84	11,18

UCI: unidad de cuidados intensivos.

(> 256 mg/l), eritromicina (32 mg/l), lincomicina (16 mg/l), clindamicina (16 mg/l) y trimetoprim (128 mg/l).

Las cepas SE-LM<sup>R</sup> contenían los genes de resistencia *aac(6')-aph(2'')* y *dfiS1*, y las cepas SH-LM<sup>R</sup> poseían además el gen *erm(C)* (tabla 3). No se detectaron genes de resistencia a lincomicina en las cepas SE-LM<sup>R</sup>. Se identificó, según la numeración de *Staphylococcus*, la mutación G2603T (G2576T según la numeración de *Escherichia coli*) en el gen ARNr 23S en todas las cepas. El análisis del cromatograma reveló la ausencia de dobles picos, lo que hizo pensar que todas las copias del gen se hallaban mutadas. Esto se corroboró tras la digestión con *NheI*, donde se obtuvo un único patrón consistente en 2 bandas (322 y 98 pb). Además, en las cepas SE se detectaron las sustituciones V27D, A69G, L101V, V154L y S214L en la proteína L3 y N64K en la L4 (según numeración de *Staphylococcus*). No se detectó la presencia del gen *cfr* en ninguna de las cepas estudiadas. Se identificaron los siguientes cambios aminoacídicos en las dianas de quinolonas: S80F y/o D84Y (en SE) y S80L (en SH) en GrIA; y S84F y/o E88K (en SE) y S84L y D88N (en SH) en GyrA (tabla 3). Todas las cepas presentaron los genes *icaA*, *icaB*, *icaC*, y ninguna los genes *lukF/lukS-PV*.

Se realizó una comparación por PFGE de cepas SE-LM<sup>R</sup> de los patrones A y B de nuestro estudio con una cepa SE-LM<sup>R</sup> obtenida en otro hospital de la misma ciudad con pulsotipo 1b y caracterizada previamente<sup>6</sup>. El patrón A de nuestro estudio y el 1b del estudio referido fueron indistinguibles.

## Discusión

Este estudio describe las características moleculares de cepas SE-LM<sup>R</sup> y SH-LM<sup>R</sup> aisladas en un hospital español durante un periodo de 27 meses desde el aislamiento de la primera cepa con esa característica en junio de 2009. Linezolid es una opción terapéutica de relevancia para el tratamiento de infecciones producidas por estos microorganismos, aunque ya se han descrito con anterioridad cepas ECN resistentes a linezolid en otros estudios<sup>5,10</sup>. De forma similar a lo que se ha descrito en otros centros<sup>13</sup>, posiblemente la presión antibiótica en la UCI y el consumo especialmente elevado de linezolid en los años 2009 y 2010 en nuestro hospital han favorecido la diseminación clonal de una cepa SE-LM<sup>R</sup>. Se han descrito previamente situaciones epidémicas que han afectado a diferentes especies de ECN, como SE<sup>6,14-16</sup>, SH<sup>5</sup> y *Staphylococcus hominis*<sup>17,18</sup>.

Hoy por hoy, tanto en España como en otros países, aunque la resistencia a linezolid continúa siendo poco común, el mecanismo de resistencia detectado más frecuentemente se debe a la presencia de mutaciones en la región V del gen ARNr 23S<sup>4</sup>. Hasta el momento se han descrito múltiples mutaciones en este gen que, siguiendo la numeración de *Staphylococcus*, corresponden a G2447T, G2474T, T2500A, T2530A, C2534T y G2603T<sup>1,15,17</sup>. De todas ellas, G2603T es la más frecuentemente identificada hasta el momento<sup>10</sup>, y se ha descrito en especies distintas de ECN procedentes de diferentes países. Este es el caso de cepas de SE en Brasil y en Grecia<sup>4,19</sup>, de cepas de *S. hominis* en el sur de España<sup>17</sup> y en Mallorca<sup>18</sup> y de cepas de *Staphylococcus simulans* en Italia<sup>20</sup>. La mutación G2603T se encontró en todas las cepas de este estudio, y se observó que todas las copias estaban mutadas. El valor de CMI a este antibiótico fue

**Tabla 3**  
Mecanismos de resistencia detectados en las cepas de *Staphylococcus epidermidis* y *S. haemolyticus* resistentes a linezolid

Especie	Número de cepas	Fenotipo de resistencia	Genes de resistencia	PFGE	Mutación ARNr 23S <sup>a</sup>	Cambios aminoacídicos <sup>a</sup>			
						L3	L4	GrIA	GyrA
<i>S. epidermidis</i>	7	OX-FX-LZ-LI-GE-TR-CP-LV	<i>mecA</i> , <i>aac(6')-aph(2'')</i> , <i>dfiS1</i>	A	G2603T	L101V, V154L	N64K	S80F, D84Y	S84Y, E88K
	1	OX-FX-LZ-LI-GE-TR-CP-LV	<i>mecA</i> , <i>aac(6')-aph(2'')</i> , <i>dfiS1</i>	B	G2603T	L101V, V154L	N64K	S80F, D84Y	S84Y, E88K
	5	OX-FX-LZ-LI-GE-TR-CP-LV	<i>mecA</i> , <i>aac(6')-aph(2'')</i> , <i>dfiS1</i>	A	G2603T	V154L	N64K	S80F, D84Y	S84Y, E88K
	2	OX-FX-LZ-LI-GE-TR-CP-LV	<i>mecA</i> , <i>aac(6')-aph(2'')</i> , <i>dfiS1</i>	A	G2603T	L101V, V154L	N64K	S80F, D84Y	S84Y
	2	OX-FX-LZ-LI-GE-TR-CP-LV	<i>mecA</i> , <i>aac(6')-aph(2'')</i> , <i>dfiS1</i>	A	G2603T	V154L	N64K	S80F, D84Y	S84Y
	1	OX-FX-LZ-LI-GE-TR-CP-LV	<i>mecA</i> , <i>aac(6')-aph(2'')</i> , <i>dfiS1</i>	A	G2603T	L101V, S214L	N64K	S80F, D84Y	S84Y
	1	OX-FX-LZ-LI-GE-TR-CP-LV	<i>mecA</i> , <i>aac(6')-aph(2'')</i> , <i>dfiS1</i>	A	G2603T	L101V	N64K	S80F, D84Y	S84Y, I88N
	1	OX-FX-LZ-LI-GE-TR-CP-LV	<i>mecA</i> , <i>aac(6')-aph(2'')</i> , <i>dfiS1</i>	A	G2603T	V27D, L101V, V154L	N64K	S80F, D84Y	S84Y
	1	OX-FX-LZ-LI-GE-TR-CP-LV	<i>mecA</i> , <i>aac(6')-aph(2'')</i> , <i>dfiS1</i>	A	G2603T	L101V, V154L, S214L	N64K	S80F, D84Y	S84Y, E88K
	1	OX-FX-LZ-LI-GE-TR-CP-LV	<i>mecA</i> , <i>aac(6')-aph(2'')</i> , <i>dfiS1</i>	A	G2603T	L101V, V154L, S214L	N64K	S80F, D84Y	S84Y
	1	OX-FX-LZ-LI-GE-TR-CP-LV	<i>mecA</i> , <i>aac(6')-aph(2'')</i> , <i>dfiS1</i>	A	G2603T	V154L	N64K	S80F, D84Y	E88K
	1	OX-FX-LZ-LI-GE-TR-CP-LV	<i>mecA</i> , <i>aac(6')-aph(2'')</i> , <i>dfiS1</i>	A	G2603T	V154L, S214L	N64K	S80F, D84Y	S84Y, E88K
	1	OX-FX-LZ-LI-GE-TR-CP-LV	<i>mecA</i> , <i>aac(6')-aph(2'')</i> , <i>dfiS1</i>	A	G2603T	A69G, L101V, V154L	N64K	S80F, D84Y	S84Y, E88K
	2	OX-FX-LZ-ER-LI-GE-TR-CP-LV	<i>mecA</i> , <i>aac(6')-aph(2'')</i> , <i>dfiS1</i> , <i>erm(C)</i>	C	G2603T	NM	NM	S80L	D88N, S84L

CP, ciprofloxacina; ER, eritromicina; FX, cefoxitina; GE, gentamicina; LI, lincomicina; LV, levofloxacina; LZ, linezolid; NM, no se detectó ninguna mutación; OX, oxacilina; TR, trimetoprim.

<sup>a</sup> Según la numeración de *Staphylococcus*.



> 256 mg/l en todas las cepas estudiadas. La mutación G2603T se ha descrito en cepas de estafilococos proporcionando valores de CMI a linezolid de 16- > 256 mg/l<sup>6,10,21</sup>. Las variaciones en los valores se deben a las especies en las cuales se han detectado, al número de copias mutadas y a la presencia o no de otros mecanismos asociados de resistencia a linezolid. Así, en nuestro caso, se encontraron también cambios aminoacídicos en las proteínas L3 y/o L4 que complementarían la resistencia a este antibiótico. En cualquier caso, se ha observado que cambios en L3 y L4 producen resistencia a linezolid, pero de bajo nivel<sup>2</sup>. Si analizamos los cambios aminoacídicos detectados en la proteína L3 vemos como L101 V y V154 L ya habían sido descritas en otros estudios<sup>2,22</sup>. Sin embargo, no existen datos sobre las modificaciones S214 L, V27 D y A69 G. Tampoco existen publicaciones anteriores que indiquen la presencia de la mutación N64 K en la proteína L4.

Ninguna de nuestras cepas presentó el gen *cfr*, el cual, aunque fue descrito inicialmente en cepas de origen animal<sup>3</sup>, ya ha sido reportado por otros autores en cepas clínicas tanto de *S. aureus*<sup>23</sup> como de ECN<sup>20,24</sup>. En España se identificó el primer brote de SARM portador del gen *cfr* en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid<sup>25</sup>. Desde entonces, este gen se ha hallado también en 2 casos de infecciones respiratorias en Mallorca causadas por SARM<sup>26</sup>, y en un caso muy grave producido por SE-LM<sup>R</sup> en Alicante<sup>27</sup>.

Por otro lado, la mutación G2603T ha sido detectada con anterioridad en cepas de SE pertenecientes a la ST2<sup>6,16</sup>. Se ha sugerido, de hecho, que este clon podría tener facilidad para adquirir mutaciones en el ARNr 23S<sup>16</sup>. En un estudio llevado a cabo en un hospital de tercer nivel de la misma ciudad y unos meses antes que el nuestro (octubre 2008-agosto 2009)<sup>6</sup>, se identificaron cepas SE-LM<sup>R</sup> ST2. Las características de las cepas fueron similares a las de este trabajo, presentando el SCCmec tipo III, el mismo perfil de resistencia, el mismo patrón de PFGE e identificándose también la mutación G2603T. Parece evidente, por tanto, que el mismo clon fue capaz de diseminarse en 2 hospitales de la misma ciudad. Este fenómeno ya había sido previamente descrito, tanto entre hospitales de la misma ciudad como entre diferentes países relacionados o no geográficamente, habiéndose aislado cepas SE resistentes a meticilina ST2 en más de 25 países de todo el mundo<sup>28</sup>.

Otro punto a destacar es que las cepas SE-LM<sup>R</sup> de nuestro estudio mostraron resistencia a lincomicina y sensibilidad disminuida a clindamicina. Se han hallado resultados similares en algunos de los estudios mencionados anteriormente<sup>6,18,19</sup>. En estos trabajos las cepas presentaban la misma mutación (G2603T) en el ARNr 23S y no se identificaron genes de resistencia a lincosamidas. Parece probable que esta mutación pueda estar implicada en dicho fenotipo, y estudios posteriores deberían esclarecer este punto. No obstante, aunque en nuestros aislados no se detectó ninguno de los genes *vga* descritos, en otro estudio llevado a cabo en Italia se hallaron cepas SE-LM<sup>R</sup> ST2 con la mutación G2603T y resistencia a lincomicina, que sí que contenían el gen *vga*<sup>20</sup>.

Es interesante reseñar también que todas las cepas del estudio presentaron los genes de patogenidad *icaA*, *icaB* y *icaC*, los cuales se relacionan con la capacidad de formación de biofilm, favoreciendo la diseminación y la patogenidad de las cepas en ambientes hospitalarios<sup>6</sup>. La presencia del operón *ica* en cepas SE ST2 no era de extrañar teniendo en cuenta los resultados obtenidos por otros autores<sup>6,29,30</sup>. Estos factores de virulencia tienen probablemente repercusión en la elevada frecuencia con que se asocian estos microorganismos con graves infecciones como las bacteriemias relacionadas con catéteres, y que en este, como en otros trabajos<sup>6</sup>, constituyen las infecciones más prevalentes.

En el presente estudio, además de la resistencia a linezolid, las cepas presentaron también resistencia a otros antimicrobianos. Así, en las cepas SE-LM<sup>R</sup> se identificaron los genes de resistencia *aac(6')-aph(2'')* y *dfpS1*, y en las cepas SH-LM<sup>R</sup> se detectó también el gen *erm(C)*. Todas las cepas fueron resistentes a quinolonas y

se encontraron diferentes cambios aminoacídicos en las proteínas GyrA y ParC. Las modificaciones encontradas en estas proteínas en nuestras cepas SE-LM<sup>R</sup> y SH-LM<sup>R</sup> ya habían sido descritas previamente<sup>31,32</sup>.

Por otro lado, respecto al consumo de linezolid —que, como ya se ha comentado, se ha demostrado determinante en la aparición de estas cepas—, la tasa de  $\geq 13$  DDDs/100 pacientes-día se ha considerado el umbral para la posible aparición de un brote<sup>12</sup>. Este fue el valor límite que se alcanzó en el año 2009 en la UCI de nuestro hospital (12,87 DDD), y en junio de ese año se detectó la primera cepa resistente en ese servicio. En nuestro caso particular, la aparición de los primeros casos de ECN resistentes a linezolid alertaron sobre el peligro de un brote y se extremaron en la UCI tanto las precauciones de contacto como la vigilancia de su consumo, de modo que en años sucesivos (2010 y 2011) se frenó la tendencia ascendente, el consumo disminuyó ligeramente y se mantuvo por debajo de ese umbral, mientras que en el resto del hospital en el año 2010 el consumo aumentó ligeramente.

Dada la importante emergencia de este microorganismo en pacientes especialmente comprometidos, y con la cada vez más frecuente presencia de catéteres u otros dispositivos, la detección de SE multirresistente es altamente preocupante. Si a esto le unimos, además, la presencia de múltiples mecanismos de resistencia a linezolid, como es el caso de mutaciones en ARNr 23S y/o cambios aminoacídicos en las proteínas L3 y L4, es importante la rigurosa vigilancia de estas cepas para conocer más sobre su epidemiología, prevenir su aparición y eventual diseminación, y asegurar el éxito terapéutico.

## Financiación

Este trabajo ha sido financiado en parte por el proyecto SAF2009-08570 del Ministerio de Ciencia e Innovación. Carmen Lozano tiene una beca FPU del Ministerio de Ciencia e Innovación de España y Elena Gómez-Sanz una beca FPI del Gobierno de La Rioja.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## Agradecimientos

Nuestro agradecimiento a la Dra. Ohiana Horna, del Servicio de Farmacia del Hospital Royo Villanova, por proporcionar los datos de consumo de linezolid, y a la Dra. Ana Ezpeleta, médico de la UCI y miembro de la comisión de infecciones del HRV, por su apoyo en el desarrollo del trabajo.

## Bibliografía

- Meka VG, Pillai SK, Sakoulas G, Wennersten C, Venkataraman L, DeGirolami PC, et al. Linezolid resistance in sequential *Staphylococcus aureus* isolates associated with a T2500A mutation in the 23S rRNA gene and loss of a single copy of rRNA. *J Infect Dis*. 2004;190:311–7.
- Mendes RE, Deshpande LM, Farrell DJ, Spanu T, Fadda G, Jones RN. Assessment of linezolid resistance mechanisms among *Staphylococcus epidermidis* causing bacteraemia in Rome, Italy. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65:2329–35.
- Kehrenberg C, Schwarz S, Jacobsen L, Hansen LH, Vester B. A new mechanism for chloramphenicol, florfenicol and clindamycin resistance: methylation of 23S ribosomal RNA at A2503. *Mol Microbiol*. 2005;57:1064–73.
- Liakopoulos A, Spiliopoulou I, Damani A, Kanellopoulou M, Schoina S, Papafragas E, et al. Dissemination of two international linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* clones in Greek hospitals. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65:1070–1.
- Rodríguez-Aranda A, Daskalaki M, Villar J, Sanz F, Otero JR, Chaves F. Nosocomial spread of linezolid-resistant *Staphylococcus haemolyticus* infections in an intensive care unit. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009;63:398–402.
- Seral C, Sáenz Y, Algarate S, Duran E, Luque P, Torres C, et al. Nosocomial outbreak of methicillin- and linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* asso-

- ciated with catheter-related infections in intensive care unit patients. *Int J Med Microbiol*. 2011;301:354–8.
7. Ziebuhr W, Krimmer V, Rachid S, Lössner I, Götz F, Hacker J. A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesion synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256. *Mol Microbiol*. 1999;32:345–56.
  8. CLSI, Clinical Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement. M100-S22. Wayne, PA, USA: CLSI; 2012.
  9. Lozano C, Aspiroz C, Ara M, Gómez-Sanz E, Zarazaga M, Torres C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 in a farmer with skin lesions and in pigs of his farm: clonal relationship and detection of *lnu(A)* gene. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17:923–7.
  10. Hong T, Li X, Wang J, Sloan C, Cicogna C. Sequential linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* isolates with G2576T mutation. *J Clin Microbiol*. 2007;45:3277–80.
  11. Yamada M, Yoshida J, Hatou S, Yoshida T, Minagawa Y. Mutations in the quinolone resistance determining region in *Staphylococcus epidermidis* recovered from conjunctiva and their association with susceptibility to various fluoroquinolones. *Br J Ophthalmol*. 2008;92:848–51.
  12. Zhang K, McClure JA, Elsayed S, Louie T, Conly JM. Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 2005;43:5026–33.
  13. Mulanovich VE, Huband MD, McCurdy SP, Lemmon MM, Lescoe M, Jiang Y, et al. Emergence of linezolid-resistant coagulase-negative *Staphylococcus* in a cancer centre linked to increased linezolid utilization. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65:2001–4.
  14. Treviño M, Martínez-Lamas L, Romero-Jung PA, Giráldez JM, Alvarez-Escudero J, Regueiro BJ. Endemic linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* in a critical care unit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2009;28:527–33.
  15. Kelly S, Collins J, Maguire M, Gowing C, Flanagan M, Donnelly M, et al. An outbreak of colonization with linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* in an intensive therapy unit. *J Antimicrob Chemother*. 2008;61:901–7.
  16. de Almeida LM, Lincopan N, de Araújo MR, Mamizuka EM. Dissemination of the linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* clone ST2 exhibiting the G2576T mutation in the 23S rRNA gene in a tertiary-care hospital. *Brazil J Antimicrob Chemother*. 2012;67:768–9.
  17. Sorlozano A, Gutierrez J, Martinez T, Yuste ME, Perez-Lopez JA, Vindel A, et al. Detection of new mutations conferring resistance to linezolid in glycopeptide-intermediate susceptibility *Staphylococcus hominis* subspecies *hominis* circulating in an intensive care unit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010;29:73–80.
  18. Gopegui ER, Iuliana Marinescu C, Díaz P, Socías A, Garau M, Ayestarán JI, et al. Nosocomial spread of linezolid-resistant *Staphylococcus hominis* in two hospitals in Majorca. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29:339–44.
  19. Lincopan N, de Almeida LM, Elmor de Araújo MR, Mamizuka EM. Linezolid resistance in *Staphylococcus epidermidis* associated with a G2603T mutation in the 23S rRNA gene. *Int J Antimicrob Agents*. 2009;34:281–2.
  20. Bongiorno D, Campanile F, Mongelli G, Baldi MT, Provenzano R, Reali S, et al. DNA methylase modifications and other linezolid resistance mutations in coagulase-negative staphylococci in Italy. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65:2336–40.
  21. Endimiani A, Blackford M, Dasenbrook EC, Reed MD, Bajaksouszian S, Hujer AM, et al. Emergence of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* after prolonged treatment of cystic-fibrosis patients in Cleveland. *Ohio Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55:1684–92.
  22. Long KS, Vester B. Resistance to linezolid caused by modifications at its binding site on the ribosome. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56:603–12.
  23. Toh SM, Xiong L, Arias CA, Villegas MV, Lolans K, Quinn J, et al. Acquisition of a natural resistance gene renders a clinical strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* resistant to the synthetic antibiotic linezolid. *Mol Microbiol*. 2007;64:1506–14.
  24. Mendes RE, Deshpande LM, Castanheira M, DiPersio J, Saubolle MA, Jones RN. First report of *cfr*-mediated resistance to linezolid in human staphylococcal clinical isolates recovered in the United States. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52:2244–6.
  25. Morales G, Picazo JJ, Baos E, Candel FJ, Arribi A, Peláez B, et al. Resistance to linezolid is mediated by the *cfr* gene in the first report of an outbreak of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis*. 2010;50:821–5.
  26. Gopegui ER, Juan C, Zamorano L, Pérez JL, Oliver A. Transferable multidrug resistance plasmid carrying *cfr* associated with *tet(L)*, *ant(4'')*-Ia, and *dfxK* genes from a clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST125 strain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56:2139–42.
  27. Lozano C, Ruiz-García M, Gómez-Sanz E, López-García P, Royo-García G, Zarazaga M, Torres C. Characterization of a *cfr*-positive methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain of the lineage ST22 implicated in a life-threatening human infection. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012;73:380–2.
  28. Widerström M, Monsen T, Karlsson C, Edebro H, Johansson A, Wiström J. Clonality among multidrug-resistant hospital-associated *Staphylococcus epidermidis* in northern Europe. *Scand J Infect Dis*. 2009;41:642–9.
  29. Li M, Wang X, Gao Q, Lu Y. Molecular characterization of *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from a teaching hospital in Shanghai. *China J Med Microbiol*. 2009;58:456–61.
  30. Iorio NL, Caboclo RF, Azevedo MB, Barcellos AG, Neves FP, Domingues RM, et al. Characteristics related to antimicrobial resistance and biofilm formation of widespread methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* ST2 and ST23 lineages in Rio de Janeiro hospitals. *Brazil J Microbiol Infect Dis*. 2012;72:32–40.
  31. Dubin DT, Fitzgibbon JE, Nahvi MD, John JF. Topoisomerase sequences of coagulase-negative staphylococcal isolates resistant to ciprofloxacin or trovafloxacin. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43:1631–7.
  32. Betanzos-Cabrera G, Juárez-Verdayes MA, González-González G, Cancino-Díaz ME, Cancino-Díaz JC. Gatifloxacin, moxifloxacin, and balofloxacin resistance due to mutations in the *gyrA* and *parC* genes of *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from patients with endophthalmitis, corneal ulcers and conjunctivitis. *Ophthalmic Res*. 2009;42:43–8.