



UNIVERSIDADE DA CORUÑA  
FACULTADE DE CIENCIAS



SERVIZO  
GALEGO  
de SAÚDE | **Complexo Hospitalario  
Universitario A Coruña  
A Coruña**

***Staphylococcus epidermidis* resistente a linezolid en el  
Complejo Hospitalario de A Coruña. Estudio de  
mecanismos de resistencia. Impacto clínico.**

***Staphylococcus epidermidis* resistente a linezolid no  
Complejo Hospitalario da Coruña. Estudo dos  
mecanismos de resistencia. Impacto clínico.**

**Linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* in  
Complejo Hospitalario de A Coruña. Study of the resistance  
mechanisms. Clinical impact.**

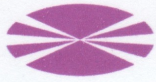
**Paula Romero Campo**

Trabajo de Fin de Grado

27 de julio de 2016

Directores: David Velasco Fernández  
Esther Rodríguez Belmonte





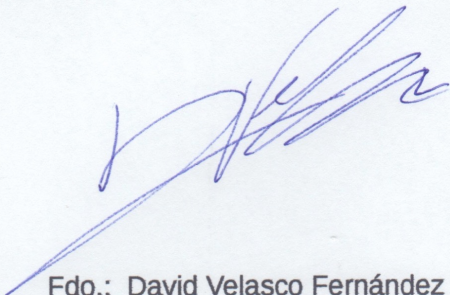
UNIVERSIDADE DA CORUÑA

FACULDADE DE CIENCIAS

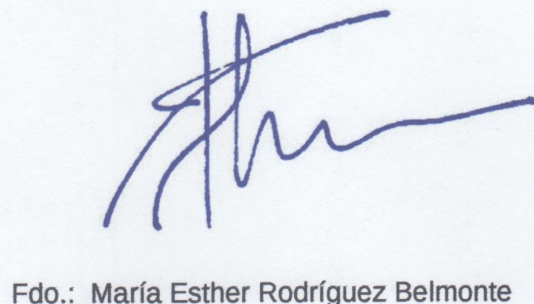
### TRABAJO FIN DE GRADO

D. David Velasco Fernández y Dña. María Esther Rodríguez Belmonte autorizan la presentación del trabajo de fin de grado "***Staphylococcus epidermidis* resistente a linezolid en el Complejo Hospitalario de A Coruña. Estudio de mecanismos de resistencia e impacto clínico**" presentado por **Paula Romero Campo** para su defensa ante el tribunal calificador.

En A Coruña, a 21 de Junio de 2016



Fdo.: David Velasco Fernández



Fdo.: María Esther Rodríguez Belmonte



# RESUMEN

Desde hace varios años se ha observado la aparición de un número cada vez mayor de casos de resistencia a linezolid entre los aislados de *Staphylococcus epidermidis* en el Complejo Hospitalario de A Coruña. Por la gravedad clínica que puede suponer el tener este fenotipo en la microbiota habitual de un centro sanitario, se ha llevado a cabo un estudio epidemiológico de todos los casos registrados de aislamientos de *S. epidermidis* desde el año 2011 hasta mayo de 2015, para determinar la capacidad de dispersión de las cepas resistentes a linezolid por los diferentes servicios del hospital. Se ha encontrado un alto porcentaje de resistencia en las áreas críticas del centro, así como asociado a aquellos pacientes sometidos a intervenciones quirúrgicas con implantación de catéteres y otros dispositivos protésicos. Se han seleccionado 30 aislamientos de *S. epidermidis* resistentes a linezolid correspondientes a los años 2013-2015, estudiando dos de los mecanismos de resistencia frente a linezolid que puede desarrollar esta bacteria. Los resultados mostraron que las cepas estudiadas no poseen el gen plasmídico *cfr*, que en caso de estar presente supondría un alto riesgo para la transmisión horizontal de la resistencia. Por el contrario, se confirmó la presencia de la mutación G2576T en el dominio V del rRNA 23S, siendo esta la mutación más prevalente de las posibles, aunque no podemos descartar que se den otras simultáneamente.

El estudio de clonalidad demostró que todos los aislados se corresponden con un mismo clon multiresistente, que solo presenta sensibilidad a vancomicina, tetraciclina, teicoplanina, fosfomicina y daptomicina, lo que deja un estrecho margen terapéutico, y establece la necesidad de continuar con una vigilancia exhaustiva de la evolución de estas cepas de *S. epidermidis*.

# ABSTRACT

The last few years have witnessed the appearance of a growing number of cases of linezolid resistance among the occurrences of *Staphylococcus epidermidis* in the Complejo Hospitalario de A Coruña. Due to the clinical threat that having this phenotype in the regular microbiota of a health center entails, an epidemiological study of all recorded cases of *S. epidermidis* from 2011 to May 2015 was conducted to examine the dispersion ability of linezolid resistant strains across hospital areas. A high percentage of resistant strains were found in critical areas of the building, as well as associated to surgery patients having catheters and other prosthetic devices implanted. Moreover, 30 strains of linezolid resistant *S. epidermidis* isolates from years 2013 to 2015 were selected to study two of the resistance mechanisms that this bacteria can develop. Results showed that the studied strains lack the plasmid gen *cfr*, which, if present, would constitute a high risk of horizontal transmission of the resistance. On the contrary, the presence of the G2576T mutation in the V domain of the 23S rRNA was confirmed. While this is the most probable mutation of all possible, additional concurrent mutations can not be ruled out.

Clonality study showed that all cultures consist entirely of a single multi-resistant clone, sensitive only to vancomycin, tetracycline, teicoplanin, fosfomicin and daptomycin, which greatly reduces therapeutic options and, also, demands constant close monitoring of the evolution of these strains of *S. epidermidis*.



# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>9</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>12</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>13</b>
Epidemiología	13
Estudio fenotípico: antibiograma	14
Extracción y cuantificación de DNA	16
Estudio de la clonalidad: DiversiLab®	17
Mecanismos moleculares de resistencia	18
<b>RESULTADOS</b>	<b>21</b>
Epidemiología	21
Estudio fenotípico: antibiograma	22
Estudio de la clonalidad: Diversilab®	23
Mecanismos moleculares de resistencia	24
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>25</b>
Epidemiología	25
Estudio fenotípico: antibiograma	26
Estudio de la clonalidad: Diversilab®	26
Mecanismos moleculares de resistencia	26
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>28</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>29</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>30</b>
<b>ANEXOS</b>	
ANEXO 1: EXTRACCIÓN DNA BACTERIANO OPTIMIZADO	34
ANEXO 2: DIVERSILAB®	35
ANEXO 3: PRIMERS UTILIZADOS	37
ANEXO 4: DENDROGRAMA Y MATRIZ DE SIMILITUD DE DIVERSILAB®	38



## INTRODUCCIÓN

*Staphylococcus epidermidis* es un estafilococo coagulasa negativo que se asocia mayoritariamente a infecciones oportunistas en pacientes hospitalizados (nosocomiales)<sup>1</sup>. Se trata de un microorganismo muy ubicuo que puede encontrarse como parte de la flora bacteriana saprofita habitual de la piel y mucosas de personas y animales<sup>2</sup>. A partir de este nicho ecológico en el que se desarrolla puede causar infecciones si atraviesa las barreras físicas de piel o mucosas del hospedador<sup>2</sup>. En consecuencia, *S. epidermidis* también es un frecuente contaminante de cultivos microbiológicos, especialmente cuando no se recogen las muestras biológicas adecuadamente<sup>3</sup>, sobre todo en muestras de exudados cutáneos y de mucosas.

*S. epidermidis*, en términos generales, es un microorganismo poco virulento<sup>4</sup>. No obstante, debido a su carácter oportunista, en pacientes comprometidos desde el punto de vista inmunológico o portadores de dispositivos protésicos (catéteres vasculares, sondas urinarias, prótesis vasculares, etc.), puede causar graves infecciones tanto locales como sistémicas (bacteremias)<sup>5</sup>. Presenta alta capacidad de agregación y adherencia a superficies inertes generando *biofilms* en catéteres intravenosos y otros dispositivos médicos que portan los pacientes hospitalizados<sup>6,7</sup>. El tratamiento antibiótico de las bacterias capaces de formar *biofilm* es especialmente comprometido ya que muchos antibióticos penetran muy pobremente en estos agregados bacterianos<sup>8</sup>. Entre las infecciones causadas por *S. epidermidis* las más graves son los casos de endocarditis e infecciones abdominales<sup>9</sup>.

En torno al 75% de los casos de *S. epidermidis* son resistentes a metilina<sup>10</sup>. La resistencia a este antibiótico conlleva la resistencia a todos los  $\beta$ -lactámicos, lo que provoca que el tratamiento de las infecciones causadas por este microorganismo se base en la administración de glucopéptidos<sup>3</sup>.

La aparición de cepas con sensibilidad disminuida a estos antimicrobianos ha llevado a la utilización de nuevos antibióticos, entre ellos el linezolid<sup>11</sup>. Este antimicrobiano sintético, cuya estructura química se refleja en la **Figura 1**, pertenece a la clase de las oxazolidinonas<sup>12,13</sup>.

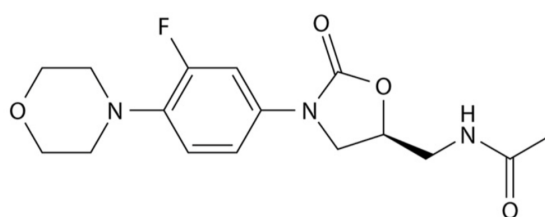


Figura 1. Estructura química del linezolid.

El mecanismo de acción de linezolid consiste en su unión al centro peptidil transferasa ribosomal dentro del rRNA 23S, situado en la subunidad 50S del ribosoma de la célula procariota, de forma que genera una distorsión del punto de unión del formilmetionil tRNA, evitando la formación del complejo de iniciación<sup>14</sup>. De esta forma actúa como un inhibidor de la síntesis proteica y detiene el crecimiento bacteriano<sup>14</sup>. Es efectivo únicamente frente a bacterias gram-positivas y micobacterias, ya que las bacterias gram-negativas son intrínsecamente resistentes a las oxazolidinonas<sup>15</sup>.

Desde su aparición en el mercado en el año 2000<sup>16</sup>, se ha usado principalmente para tratar aquellas infecciones causadas por bacterias gram-positivas que presentan resistencias a otros antibióticos, especialmente en enterococos vancomicina resistentes (VRE), *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes (MRSA) y otros microorganismos con altos niveles de resistencia, como *Streptococcus pneumoniae*<sup>13</sup>.

En todos los casos se mostró como un tratamiento muy eficaz en los casi setenta países que lo usaban<sup>17</sup>. Sin embargo, el uso cada vez mayor de linezolid, sobre todo en áreas de críticos, donde se ha aplicado tanto como tratamiento empírico como dirigido de forma masiva, ha condicionado la aparición de cepas resistentes<sup>18</sup>.

En los últimos años se ha detectado en el Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC) un aumento muy sustancial en el porcentaje de aislamientos de *S. epidermidis* resistentes a linezolid, sobre todo en aquellos pacientes que recibieron un tratamiento previo prolongado o varios sucesivos con este mismo medicamento. Se trata de pacientes que en su mayoría estaban ingresados en las áreas críticas del hospital (Unidad de cuidados intensivos y Reanimación) y que se habían sometido a diferentes intervenciones quirúrgicas.

Se han descrito tres mecanismos de resistencia al linezolid y en general para las oxazolidinonas<sup>19,20</sup>:

- Mutaciones nucleotídicas en el dominio V del rRNA 23S (gen *rrn*), muy diversas (**Figura 2**), pero fundamentalmente Gly2447Thr, Thr2500Ala y Gly2576Thr, siendo esta última la más frecuente. Este es el mecanismo de resistencia más frecuente y los niveles de resistencia aumentan en función del número de copias del gen RNAr 23S afectadas.
- Mutaciones en los genes que codifican las proteínas L3 y L4 de la subunidad ribosómica 50S, poco frecuentes y codificadas por los genes *rpIC* y *rpID*, respectivamente.
- Adquisición del gen *cfrr* que codifica la producción de una metiltransferasa ribosómica y que confiere resistencia a 5 clases de antimicrobianos (fenicoles, lincosamidas, oxazolidinonas, pleuromutilinas y estreptogramina A).

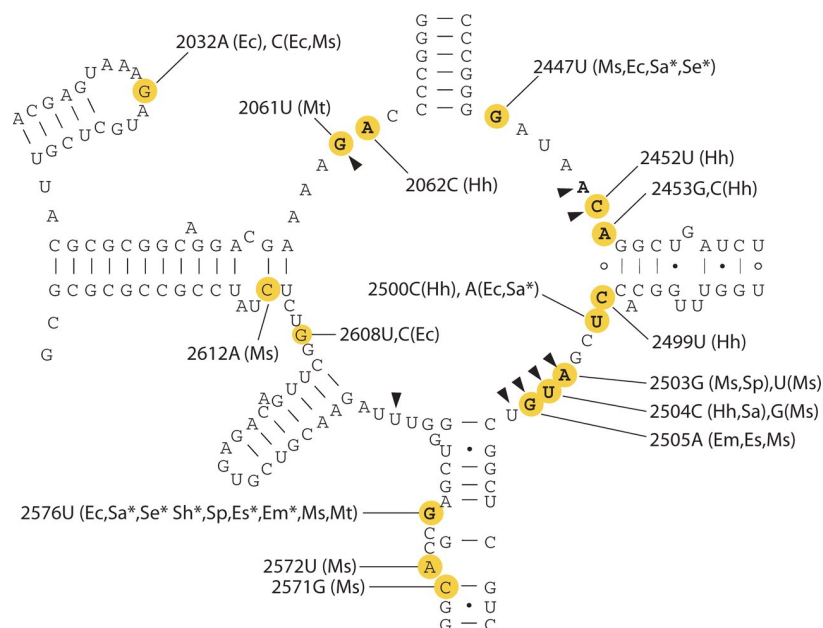


Figura 2. Detalle de las mutaciones descritas hasta la fecha en el rRNA 23S bacteriano.

Diversas combinaciones de estos mecanismos pueden coexistir en la misma cepa<sup>19</sup>. En el primer caso generalmente se observan CMI (concentración mínima inhibitoria) de linezolid elevadas (>32 mg/L), aunque también pueden ser inferiores dependiendo del número de alelos mutados, pero en el caso de la resistencia mediada por el gen *cfr* algunas cepas pueden presentar CMI en el rango de sensibilidad ( $\leq 4$  mg/L). Por ello siempre que se sospecha resistencia al linezolid (CMI en el rango alto de sensibilidad) es necesario analizar conjuntamente los resultados de sensibilidad con el resto de los antimicrobianos afectados por este mecanismo. Además, al tratarse de un mecanismo de resistencia transferible mediante conjugación bacteriana, hay riesgo de transmisión a otras cepas si no se implantan las medidas adecuadas<sup>21</sup>.

La incidencia de infecciones por microorganismos gram-positivos es elevada, tanto en el ambiente hospitalario como en la comunidad<sup>1</sup>. De igual manera, se ha venido observando una expansión en la diseminación de la resistencia en las diferentes áreas del CHUAC, de manera que es necesario establecer un patrón en la epidemiología de este microorganismo. El aumento de la resistencia a los antimicrobianos que se emplean con más frecuencia en los tratamientos de estas infecciones demanda cada vez más la detección precoz y eficaz de los mecanismos implicados, para orientar e incluso modificar las estrategias terapéuticas en beneficio del paciente<sup>22,23</sup>.

En concreto, en el CHUAC, los aislados resistentes a linezolid encontrados han resultado ser cepas multirresistentes, siendo inmunes a  $\beta$ -lactámicos, macrólidos, aminoglicósidos y trimetopim-sulfametoxazol. Únicamente se muestran sensibles a daptomicina y glucopéptidos, lo que deja un estrecho margen terapéutico. El aislamiento de estas cepas en el Servicio de Microbiología permite la detección de su resistencia antimicrobiana, tanto a nivel fenotípico como, eventualmente, genotípico, lo que posee gran trascendencia clínica y epidemiológica.

La aproximación fenotípica permite una rápida inferencia de los mecanismos de resistencia presentes así como de las resistencias asociadas a antimicrobianos no relacionados<sup>22</sup>. La presencia de bajos o altos niveles de expresión de resistencia a determinados antimicrobianos, así como de poblaciones multirresistentes, entre otros, se puede detectar a nivel fenotípico mediante la aplicación de técnicas y condiciones especiales. De este modo se facilitan actitudes terapéuticas correctas ante las infecciones causadas por microorganismos que expresan este tipo de mecanismos de resistencia.

## OBJETIVOS

La finalidad de este trabajo es conseguir una visión global de la situación del Complejo Hospitalario de A Coruña frente al avance de la resistencia a linezolid por parte de *S. epidermidis*, así como identificar los mecanismos moleculares presentes en el microorganismo que le permiten ser resistente a un antibiótico de amplio espectro como linezolid. Para ello se van a realizar los siguientes estudios:

- ◆ Analizar epidemiológicamente la presencia de *Staphylococcus epidermidis* resistente a linezolid (LRSE) en los pacientes ingresados en el Complejo Hospitalario de A Coruña durante los años 2011 a 2015.
- ◆ Describir el perfil de resistencia antibiótica en los aislamientos de los años 2013 a 2015.
- ◆ Estudiar la clonalidad de los aislados mediante el sistema automatizado Diversilab® y su posterior caracterización mediante MLST (*multilocus sequence typing*).
- ◆ Estudiar molecularmente los mecanismos de resistencia, comprobando la presencia o ausencia del gen plasmídico *cfr*, así como las posibles mutaciones en el dominio V de la subunidad 50S del rRNA 23S.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Epidemiología

Se recabó la información necesaria de las bases de datos internas del Servicio de Microbiología del CHUAC, recopilando más de 4300 aislamientos de *S. epidermidis* entre los años 2011-2015, a los que se les realizó un estudio de resistencia antibiótica. Es importante señalar que se muestreó únicamente una cepa por cada paciente y episodio infeccioso, aunque del mismo se hubieran recogido diferentes muestras. Por otro lado, se excluyeron del estudio los aislamientos representativos de contaminación de las muestras, es decir, no responsables del cuadro infeccioso de los pacientes. Se evitan así sesgos en los datos.

Esta enorme cantidad de datos se analizó estadísticamente, en función de la resistencia o sensibilidad a linezolid, permitiendo calcular la distribución de los casos tanto de forma global a lo largo de estos cinco años, como desglosando la información en las diferentes áreas hospitalarias o en las distintas muestras de procedencia.

Se agruparon los datos de localización anatómica de las infecciones en las categorías de infecciones respiratorias (respi), infecciones del sistema nervioso central (LCR), infecciones de heridas y líquidos estériles (BX), infecciones sistémicas (sangre), infecciones endovasculares (p. catéter) e infecciones urinarias (orinas).

En función del servicio de ingreso del paciente, se establecieron las categorías de críticos (Unidad de cuidados intensivos y Reanimación), cirugía, médicas (especialidades de Medicina Interna) y extrahospitalarias (centros de salud).

Para la tipificación fenotípica y para el estudio molecular se ha partido de un conjunto de 77 aislamientos de *S. epidermidis* resistentes a linezolid (LRSE), recogidas entre los años 2013 y 2015 y disponibles en el cepario del Servicio de Microbiología. Estos aislamientos se mantuvieron congelados a -80°C en una solución de glicerol hasta su uso en este estudio.

De los 77 aislados, se han seleccionado 30 de ellos por ser un volumen de muestras manejable para el estudio proyectado, atendiendo a la proporción de aislados en cada año y, a su vez, tratando de que se vean representados todos los servicios del hospital en los que se han detectado estos casos. De esta manera, las muestras con las que se ha trabajado se reflejan en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Relación de aislamientos de LRSE usados para el estudio.

Código	Nº muestra	Área hospital	Muestra
5	51315332	UCI 5ª	L.Perit
52	51323304	CIR CARD	Herida
211	51350687	REA	Billis
213	51350861	REA	Drenaje
264	51362056	NEUROCIRUGÍA	Herida
265	51362129	REA	L.Perit
268	51400619	UCI 5ª	Drenaje
271	51401204	REA	L.Perit
272	51401352	TRAUMA	Gasa
366	51420475	NEUROCIRUGÍA	Herida Quir
374	51422532	REA	L.Perit
379	51423350	UCI 5ª	Piel
431	51434391	REA	Drenaje
567	51456642	REA	L.Perit
574	51458024	REA	L.Perit
578	51458477	REA	L.Perit
620	51502865	REA	Herida Quir
644	51506571	NEUROCIRUGÍA	Herida Quir
648	51506819	CIR GENERAL	L.Perit
659	51509746	CIR GENERAL	Herida Quir
734	51517838	CIR MAXIL	Pus
738	51518492	REA	L.Perit
761	51523151	TRAUMA	Biopsia
765	51523841	REA	Pus
816	51531201	URGENCIAS	Tejido
996	51560731	TRAUMA	L.Articular
999	51561266	CIR GEN	L.Perit
1001	51561567	CIR TOR	L.Pleural
1028	51568115	REA	L.Perit
1037	51569959	CIR GEN	Herida Quir

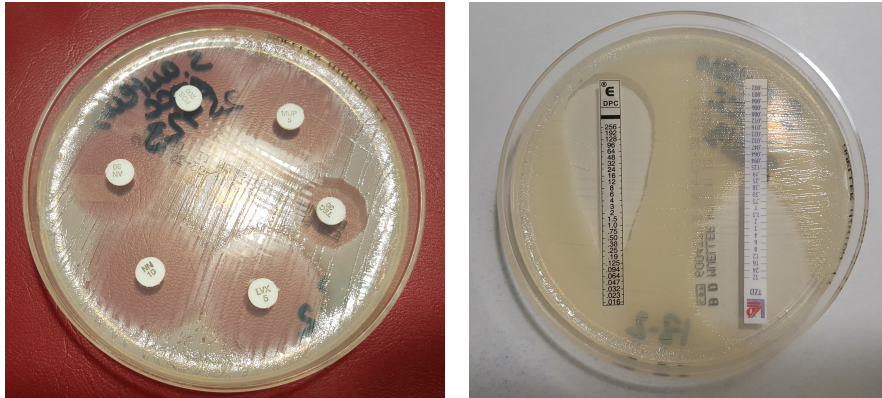
### Estudio fenotípico: antibiograma

Se efectuó un pase de las muestras congeladas a un medio TSA Sangre para obtener bacterias viables en fase exponencial de crecimiento. Para ello se raspó con una torunda estéril la superficie congelada de la muestra para recoger una porción que extender sobre el medio de cultivo. Tras una incubación de 24h a 37°C, se obtuvieron colonias aisladas visibles del microorganismo (Figura 3).



Figura 3. Crecimiento bacteriano en TSA Sangre.

El antibiograma se realizó mediante dos métodos de difusión (método disco placa y método E-test) en los que el antimicrobiano se aplica sobre medio sólido y difunde a través de él generando un gradiente de concentración (**Figura 4**). A medida que nos alejamos del lugar de aplicación la concentración irá descendiendo. El microorganismo sólo crecerá en las áreas del medio sólido con concentración de antibiótico inferior a su CMI.



**Figura 4.** Halos de inhibición con discos de difusión (izquierda) y E-test (derecha).

A su vez, se sembraron, también en TSA Sangre, dos cepas control: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 para el caso de las técnicas basadas en discos de difusión, y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 para el sistema E-test, siguiendo las especificaciones metodológicas del *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*<sup>24</sup> para comprobar la susceptibilidad del microorganismo a distintos antimicrobianos. El medio de cultivo utilizado siguiendo la norma del CLSI fue agar Muller-Hinton.

#### **Método disco-placa (Kirby-Bauer)**

Técnica cualitativa que consiste en inocular una disolución de la cepa problema de turbidez equivalente a 0,5 McFarland de manera uniforme sobre placas de Muller-Hinton (césped), dejando secar 10-15 minutos. Tras este tiempo, se colocan discos de papel impregnados con antibiótico (Becton Dickinson BBL™ Sensi-Disc) sobre las placas y se incuba 18-24h a 37°C. Transcurrido ese tiempo se procedió a la lectura de los halos de inhibición (diámetro en milímetros), y a su interpretación clínica según la norma que dicta el CLSI<sup>24</sup>.

Cuando el antimicrobiano es activo impide que el microorganismo crezca en la proximidad del disco, donde la concentración es alta. Sin embargo, más lejos del disco la concentración va disminuyendo hasta valores que el microorganismo puede tolerar y se produce crecimiento.

Si el antimicrobiano no es activo no se produce halo de inhibición<sup>24</sup>.

#### **Método del Épsilon test (E-Test)**

Técnica cuantitativa que usa tiras plásticas impregnadas con antibiótico en un gradiente de concentración que se representa en una escala graduada sobre la propia tira. Las placas de Muller-Hinton se inoculan de la misma manera que para el método de disco-placa. Sobre ellas se coloca la tira de E-test (Biomérieux®). Tras la incubación de 18-24h a 37°C el microorganismo crece hasta que encuentra una concentración de antibiótico que lo inhibe. Se forman elipses de

inhibición en los que la CMI corresponde con la intersección del halo de crecimiento con la tira graduada. Las CMIs se interpretaron según dicta el CLSI<sup>24</sup>.

**Tabla 2. Antibióticos utilizados para el antibiograma.**

Antibiótico	Abreviatura	Concentración
Oxacilina	OX	30 µg
Cefoxitina	FOX	30 µg
Ciprofloxacino	CIP	5 µg
Trimetopin-sulfametoxazol	SXT	1,25/23,75 µg
Gentamicina	GM	10 µg
Vancomicina	VA	30 µg
Linezolid	LZD	30 µg
Tetraciclina	TE	30 µg
Rifampicina	RA	5 µg
Eritromicina	E	15 µg
Clindamicina	CC	2 µg
Tobramicina	NN	10 µg
Amikacina	AN	30 µg
Teicoplanina	TEC	30 µg
Levofloxacino	LVX	5 µg
Fosfomicina	FOS	200 µg
Mupirocina	MUP	5 µg
Daptomicina	DPC	0,016-256 µg/ml
Tedizolid	TZD	0.002-32 µg/ml

Los antibióticos usados para este estudio fenotípico se ven reflejados en la **Tabla 2**.

### Extracción y cuantificación de DNA

Se prepararon cultivos líquidos de nuestros aislados usando 5 ml de medio base (LB) que fueron inoculados con colonias procedentes de las placas de TSA Sangre tras su incubación de 18-24h. Los tubos de medio líquido se incubaron durante 3 días a 37°C para obtener alta densidad bacteriana.

Para las técnicas de tipificación molecular se usaron como controles dos cepas de la misma especie no relacionadas con las cepas clínicas de nuestro estudio: *S. epidermidis* ATTC 35984 y *S. epidermidis* ATTC 12228.

Para la extracción de DNA, se usó el kit comercial UltraClean Microbial DNA Isolation Kit de MO BIO Laboratories<sup>25</sup>, siguiéndose escrupulosamente todas las instrucciones del fabricante, tal y como se ha desarrollado en estudios anteriores<sup>11</sup>. Sin embargo los resultados obtenidos no fueron satisfactorios ya que no obtuvimos una concentración de DNA suficiente. Posiblemente esta circunstancia esté relacionada con la dificultad de rotura de la pared gruesa de peptidoglucano en las bacterias gram positivas.

En consecuencia, se abandonó este protocolo de extracción y se probó con otro manual, optimizado previamente en el propio Servicio de Microbiología en estudios moleculares similares con bacterias gram positivas. Dicho protocolo se detalla en el **Anexo 1**.

La cantidad de DNA obtenido en ambos protocolos de extracción se cuantificó mediante espectrofotometría con el sistema automatizado BioDrop  $\mu$ LITE.

### Estudio de la clonalidad: DiversiLab®

DiversiLab® es un sistema estandarizado y automatizado de amplificación de DNA genómico bacteriano que genera un patrón característico de fragmentos de DNA cuyos tamaños van desde 200 pb a más de 2000 pb<sup>26</sup>. Entre otros muchos usos potenciales, este sistema permite realizar estudios de clonalidad de cepas bacterianas, proporcionando alta capacidad de resolución y medida de relación clonal entre los aislamientos.

El equipo Agilent® 2100 Bioanalyzer utiliza una tecnología de microfluidos LabChip® para integrar los pasos individuales de la electroforesis tradicional en un solo proceso automatizado. Los fragmentos amplificados de DNA se separan dentro de los microcanales del chip. A medida que los fragmentos separados de DNA atraviesan un haz láser, se genera una identificación genética de DNA en la forma de un electroferograma. Se comparan la identificación genética proveniente de diversas muestras utilizando el software DiversiLab®.

Este método de tipificación parte de una amplificación genética realizada mediante PCR de fragmentos repetidos (rep-PCR) según el protocolo expuesto en la **Tabla 3** y usando los reactivos que nos proporciona el kit comercial de Biotac, con un volumen final de reacción de 25  $\mu$ l. La PCR se llevó a cabo en un termociclador Eppendorf Mastercycler Nexus en el que se mantuvieron las siguientes condiciones: 2 minutos de lisis a 94°C, seguidos de 35 ciclos de desnaturalización, anillamiento y extensión a 94°C (30 segundos), 45°C (30 segundos) y 70°C (90 segundos) respectivamente, con 3 minutos finales de extensión a 70°C.

**Tabla 3. Proporciones de reactivos para la reacción de PCR para el análisis de clonalidad con Diversilab®.**

Reactivos	Cantidad ( $\mu$ l)
Buffer BIOTAC	1,5
Mg <sup>2+</sup> BIOTAC	1
Primer MIX	2
Taq BIOTAC	0,5
Rep PCRMM1	18
Muestra	2
<b>VOLUMEN FINAL</b>	<b>25</b>

Para optimizar los reactivos disponibles, se seleccionaron 20 de las cepas previamente seleccionadas (5, 52, 211, 213, 264, 265, 268, 271, 272, 366, 374, 379, 431, 648, 659, 738, 761, 765, 816 y 996), correspondiendo a 6 muestras del año 2013, 7 del año 2014 y otras 7 del año 2015. Además, se incorporó al análisis una cepa control de *S. epidermidis* ATTC 35984.

Como muestra para la reacción de amplificación se usó el DNA extraído en el punto anterior, previamente ajustado a una concentración de 35  $\mu\text{g/ml}$ . Los primers utilizados en la amplificación no se pueden detallar ya que es un kit comercial que no proporciona esa información.

Tras la amplificación, se siguió el protocolo detallado en el **Anexo 2** para la carga de los chips.

Tras los resultados del Diversilab, se realizó una tipificación *multilocus* de secuencias (MLST) para caracterizar taxonómicamente los LRSE presentes en el CHUAC. Para ello, tras una amplificación mediante PCR de fragmentos internos (entre 400 y 500 pb) de siete genes esenciales (carbamato kinasa (*arcC*), siquimato deshidrogenasa (*aroE*), transportador ABC (*gtr*), proteína reparadora por mal emparejamiento de DNA (*mutS*), operón de la regulación de pirimidinas (*pyrR*), trifosfato isomerasa (*tpiA*) y acetil coenzima A acetiltransferasa (*yqiL*)), todos ellos con secuencias conocidas con exactitud, se obtuvieron las secuencias mediante secuenciadores automáticos de DNA<sup>27</sup>. En el proceso, se le asigna un número particular de alelo a cada secuencia única que se encuentra en cada gen esencial para cada especie. Cada muestra se caracteriza por las secuencias únicas de alelos en cada uno de los siete *loci*, lo cual constituye su perfil alélico o tipo de secuencia (ST), que se compara con una base de datos propia de aislados de *S. epidermidis* disponible en internet (<http://sepidermidis.mlst.net/>) mediante el algoritmo BURST (<http://sepidermidis.mlst.net/eburst/>).

Los primers utilizados para la PCR se detallan en el **Anexo 3**. Las condiciones de la reacción de PCR fueron: 3 minutos de desnaturalización previa a 95°C, seguidos de 34 ciclos de desnaturalización, anillamiento y extensión a 95°C (30 segundos), 50°C (1 minuto) y 72°C (1 minuto) respectivamente, con 10 minutos finales de extensión a 72°C; llevadas a cabo en un termociclador Eppendorf Mastercycler Nexus.

## Mecanismos moleculares de resistencia

### Presencia del gen *cfr*

La detección del gen *cfr* se realizó mediante PCR específica<sup>28,29</sup>. Se utilizaron un control positivo representado por una cepa de *S. epidermidis* resistente a linezolid y portadora del gen *cfr* (suministrada por otro centro hospitalario), y un control negativo (*S. aureus* ATTC 25293) que no contiene el gen *cfr*.

**Tabla 4. Proporciones de reactivos para la reacción de PCR para el análisis de presencia del gen *cfr* y de mutaciones ribosómicas.**

Reactivos	Cantidad ( $\mu\text{l}$ )
Buffer	5
Mg <sup>2+</sup>	3
NTPs	1
Primer Fw	5
Primer Rv	5
Taq polimerasa	0,25
H <sub>2</sub> O	25,75
Muestra (hervido)	5
<b>VOLUMEN FINAL</b>	<b>50</b>

A partir de las colonias crecidas en TSA Sangre (tanto controles como muestras), se realizó una dilución 1 McFarland en tubos Eppendorf estériles de 1,5 ml, usando como diluyente agua estéril. Las preparaciones se llevaron a un termobloque, en el que se mantuvo una temperatura de 96°C durante 10 minutos para conseguir romper las células y liberar el DNA al medio.

Tras este paso, se realizó una amplificación por PCR, para lo cual se preparó cada muestra siguiendo las proporciones mostradas en la **Tabla 4**, llegando a un volumen final de 50  $\mu$ l. Las condiciones de la reacción de PCR fueron: 10 minutos de lisis a 96°C, seguidos de 30 ciclos de desnaturalización, anillamiento y extensión a 96°C (50 segundos), 60°C (50 segundos) y 72°C (1 minuto) respectivamente, con 10 minutos finales de extensión a 72°C; llevadas a cabo en un termociclador Eppendorf Mastercycler Nexus. Los *primers* utilizados para la reacción de PCR se detallan en el **Anexo 3**.

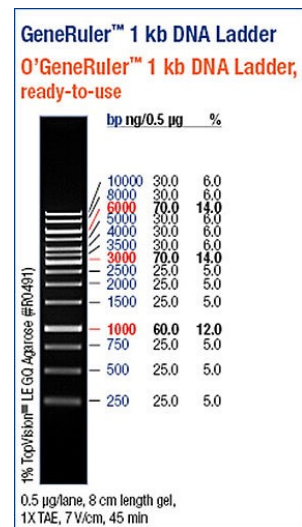
Una vez obtenido el fragmento amplificado, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1%, usando como marcador de fluorescencia RedSafe y como marcador de tamaño GenRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (**Figura 5**) con fragmentos que abarcan desde las 20000 a las 75 pb, y con una corriente de 120 mV que se mantuvo durante 1 hora, condiciones que permitieron que se separaran los fragmentos suficientemente. La presencia o ausencia del fragmento de amplificación de tamaño específico, previamente descrito<sup>29</sup>, nos indica la presencia o no del gen de resistencia *cf*r.

### Mutaciones RNA ribosómico

Tal y como indica Hong *et al.* (2007)<sup>30</sup> la presencia de la mutación G2576T en el dominio V del rRNA 23S está presente en un 67% de las cepas resistentes a linezolid en *S. epidermidis*, lo que la hace la mutación más prevalente que podemos encontrar. En consecuencia, se amplificó mediante PCR la zona de interés mediante los *primers* detallados en el **Anexo 3**, siguiendo las proporciones mostradas en la **Tabla 4**. Las condiciones de la PCR fueron: 5 minutos de lisis y desnaturalización a 94°C, seguidos por 32 ciclos de desnaturalización, anillamiento y extensión a 94°C (30 segundos), 55°C (30 segundos) y 72°C (1 minuto) respectivamente, con 10 minutos finales de extensión a 72°C; llevadas a cabo en un termociclador Eppendorf Mastercycler Nexus.

Posteriormente, el producto de la amplificación (420 pb) se incubó junto con la enzima de restricción NheI (proveniente de *Neisseria heidelbergensis*)<sup>30</sup>. Dicha enzima es capaz de romper el fragmento amplificado siempre y cuando se encuentre en él su diana específica, presente en las copias con la mutación descrita anteriormente y ausente en las copias no mutadas. En consecuencia, la restricción del fragmento amplificado refleja la existencia de la mutación específica que confiere resistencia a linezolid.

La reacción de restricción se desarrolló según lo descrito en la **Tabla 5**. Se incubaron las muestras durante 4 horas a 37°C.



**Figura 5. Detalle del marcador de tamaño GenRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder.**

**Tabla 5. Proporciones de reactivos para la reacción con la enzima de restricción NheI.**

Reactivos	Cantidad ( $\mu$ l)
NheI	1
10x Buffer Tango	2
Agua estéril	18
Producto PCR	10
<b>VOLUMEN FINAL</b>	<b>31</b>

Tras la digestión, los fragmentos de DNA fueron separados mediante electroforesis con gel de agarosa al 2% con TBE al 1x, usando como marcador de fluorescencia RedSafe y con una corriente de 100 mV que se mantuvo durante 90 minutos aproximadamente. Como marcador de tamaño se usó GenRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (**Figura 5**).

## RESULTADOS

### Epidemiología

En la **Figura 6 izquierda** se refleja el número de aislamientos totales y resistentes a linezolid en el CHUAC en el periodo de tiempo considerado. La **Figura 6 derecha** representa la evolución en la tasa de resistencia a linezolid entre los aislamientos de *S. epidermidis* durante el mismo periodo de tiempo.

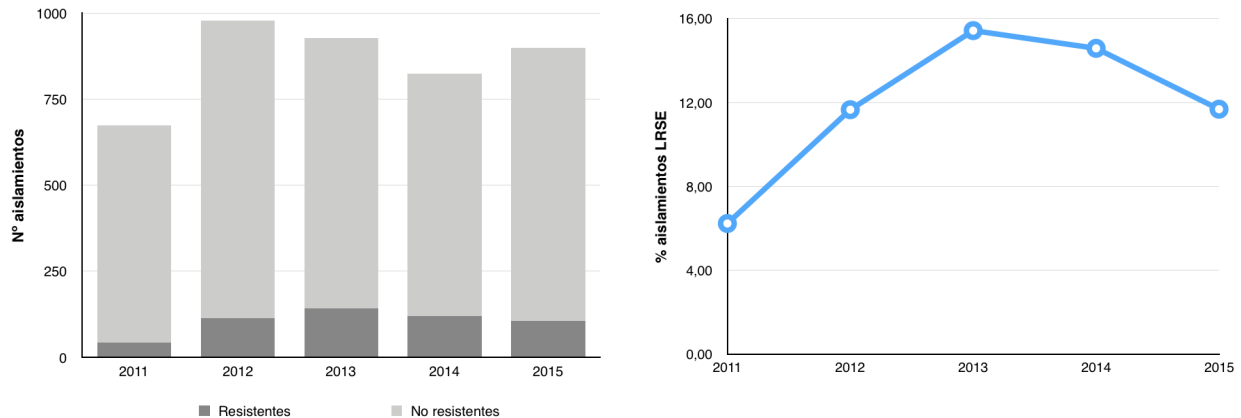


Figura 6. Número de aislamientos de *S. epidermidis* y *S. epidermidis* resistente a linezolid (LRSE) detectados durante los años 2011-2015 (izda.). Porcentaje de aislamientos de LRSE durante los años 2011-2015 (dcha.).

Al desglosar los datos según la muestra biológica de la que se habían obtenido los cultivos, tal y como apreciamos en la **Figura 7**, para la mayoría de muestras biológicas contempladas, existe un incremento al pasar del año 2011 a 2012 y 2013, y una posterior disminución o estancamiento en los años 2014 y 2015.

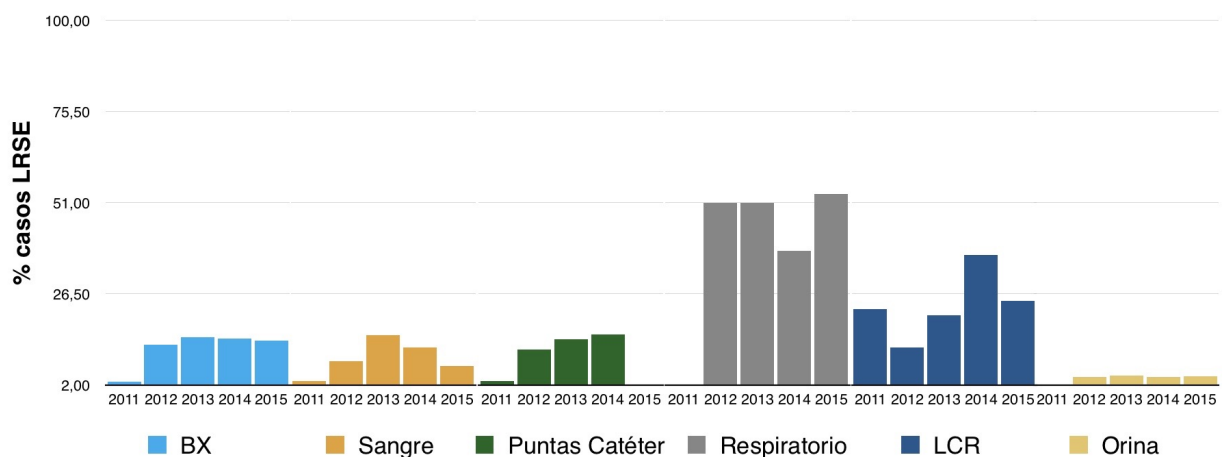


Figura 7. Variación del porcentaje de aislamientos de *S. epidermidis* resistente a linezolid (LRSE) durante los años 2011-2015 según la muestra del paciente analizada.

De igual manera, se apreció una tendencia similar al agrupar las muestras por áreas del hospital en las que se encontraban los pacientes, tal y como se refleja en la **Figura 8**.

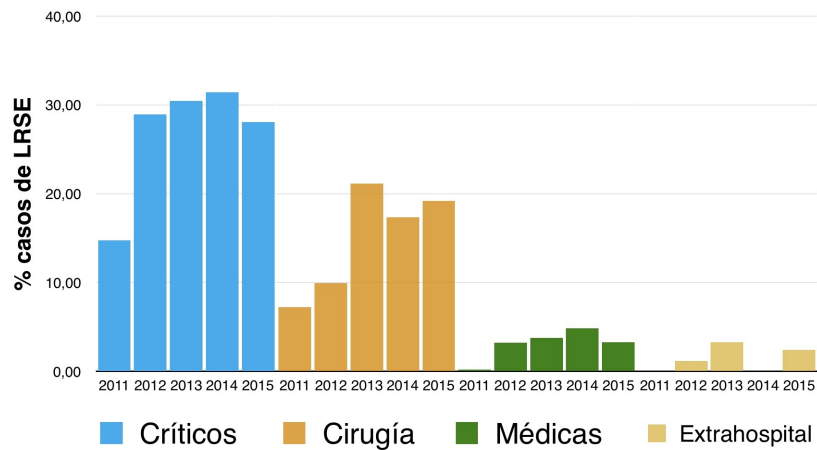


Figura 8. Variación del porcentaje de aislamientos de *S. epidermidis* resistente a linezolid (LRSE) durante los años 2011-2015 según el área hospitalaria analizada.

Desde un punto de vista diferente se representaron las proporciones de los aislados (Figura 9), tanto de las diferentes áreas hospitalarias (derecha) como según la muestra de procedencia (izquierda), a lo largo de los años.

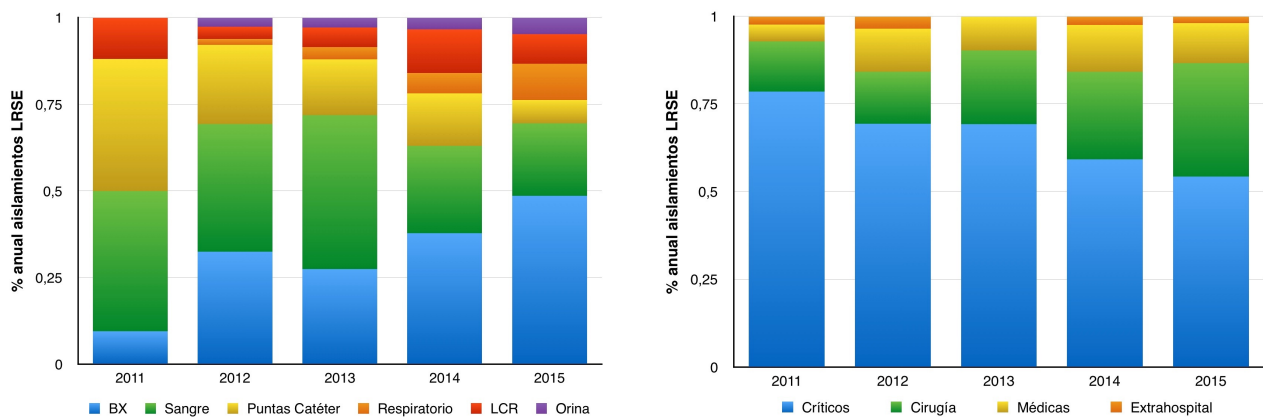


Figura 9. Proporción de aislamientos de LRSE en función de tipo de muestra (izquierda) y área de hospitalización (derecha).

### Estudio fenotípico: antibiograma

Los resultados del antibiograma se muestran en la **Tabla 6**. Se observó que de forma reiterada, hay una uniformidad en la sensibilidad a los antibióticos vancomicina (VA), tetraciclina (TE), teicoplanina (TEC), fosfomicina (FOS) y daptomicina (DPC); así como resistencia al resto de compuestos antimicrobianos.

Se observó que la cepa 734, originalmente registrada como *S. epidermidis* resistente a linezolid, resultó no serlo, dando un patrón en el antibiograma completamente diferente al del resto de muestras, por lo que se retiró del estudio. Además, la cepa 272 mostró sensibilidad a antibióticos β-lactámicos (OX y FOX), al contrario que el resto de las cepas.

Tabla 6. Antibiograma de las muestras detalladas en la columna de la izquierda. La cifra representa valores de CMI para DPZ y TDZ, y milímetros del halo de inhibición para el resto. Según los estándares del CLSI<sup>24</sup>, se han coloreado en rojo aquellos casos que por el valor obtenido implica una resistencia al antibiótico, en amarillo los que presentan una resistencia intermedia y en verde los que resultan sensibles a ese antibiótico concreto.

Código	ANTIBIÓTICOS																		
	OX	FOX	SXT	TE	RA	E	CC	GM	NN	AN	VA	TEC	CIP	LVX	FOS	MUP	DPC	TZD	LZD
5	0	0	0	19	0	0	0	0	0	0	21	30	0	0	32	11	1	>32	0
52	0	0	0	21	0	18	16	0	0	11	22	21	0	12	26	14	0,5	>32	0
211	0	0	0	22	0	13	12	0	0	11	22	21	0	11	26	11	0,5	>32	0
213	0	0	0	23	0	13	11	0	0	12	23	23	0	12	24	12	0,5	>32	0
264	0	0	0	23	0	17	13	0	0	12	23	21	0	13	34	16	0,5	>32	0
265	0	0	0	23	0	17	12	0	0	11	24	21	0	12	30	13	0,5	>32	0
268	0	0	0	23	0	17	13	0	0	9	22	18	0	11	26	0	1	>32	0
271	0	0	0	26	0	17	14	0	0	10	23	20	0	12	24	12	0,25	>32	0
272	26	27	0	28	0	17	13	0	0	10	23	18	0	10	40	0	0,5	>32	0
366	0	0	0	23	0	17	14	0	0	10	23	19	0	9	26	0	0,5	>32	0
374	0	0	0	24	0	11	12	0	0	11	20	20	0	10	23	0	0,5	>32	0
379	0	0	0	24	0	11	13	0	0	9	23	19	0	11	22	0	1	>32	0
431	0	0	0	23	0	16	10	0	0	10	22	19	0	12	36	0	0,5	>32	0
567	0	0	0	23	0	18	14	0	0	11	24	21	0	10	30	14	0,5	>32	0
574	0	0	0	24	0	18	15	0	0	10	25	20	0	11	28	12	0,5	>32	0
578	0	0	0	23	0	16	13	0	0	9	22	19	0	9	24	0	0,5	>32	0
620	0	0	0	32	0	21	17	0	0	0	24	20	0	10	24	9	0,5	>32	0
644	0	0	0	29	0	21	17	0	0	0	22	21	0	12	24	9	0,5	>32	0
648	0	0	0	28	0	20	15	0	0	0	22	20	0	10	26	9	0,5	>32	0
659	0	0	0	27	0	18	16	0	0	0	23	19	0	12	38	10	1	>32	0
734	0	21	30	26	44	10	28	32	36	30	23	20	0	0	0	33	0,5	0,25	34
738	0	0	0	30	0	21	18	0	0	10	25	21	0	12	30	11	0,25	>32	0
761	0	0	0	32	0	18	18	0	0	11	26	22	0	10	26	12	0,5	>32	0
765	0	0	0	32	0	17	15	0	0	0	27	22	0	11	26	11	0,5	>32	0
816	0	0	0	34	0	15	13	0	0	0	27	22	0	10	26	13	0,5	>32	0
996	0	0	0	30	0	21	19	0	0	9	25	22	0	11	27	10	0,5	>32	0
999	0	0	0	36	0	18	15	0	0	11	29	24	0	10	26	11	0,25	>32	0
1001	0	0	0	36	0	17	15	0	0	0	28	22	0	9	29	10	0,5	>32	0
1028	0	0	0	32	0	17	17	0	0	0	26	21	0	0	28	0	0,25	>32	0
1037	0	0	0	32	0	19	16	0	0	0	22	21	0	11	28	10	0,5	>32	0
ATCC25923	19	26	27	26	26	27	25	23	24	22	19	17	20	26	38	22			22
ATCC29213																	0,5	1	

### Estudio de la clonalidad: Diversilab®

Los resultados obtenidos con el sistema DiversiLab® reflejan que todas las cepas tienen una relación genética muy alta, lo que hace pensar que se trata de un único clon extendido por el hospital.

Tal y como se muestra en la figura del **Anexo 4**, las correlaciones entre las diferentes cepas fueron muy altas, todas superiores al 90% y la mayoría por encima del 95%, lo que nos indicó que todas ellas tienen secuencias repetidas palindrómicas extragénicas (REP) muy similares, lo que proporciona un criterio de clonalidad genético muy potente.

A su vez, el análisis de MLST de las muestras, concluyó que pertenecen al tipo ST2.

## Mecanismos moleculares de resistencia

### Presencia del gen plasmídico *cfr*

Se confirmó la ausencia del gen plasmídico *cfr* de resistencia a linezolid en la totalidad de cepas estudiadas, tal y como se muestra en la **Figura 10**, en donde solo apreciamos la banda correspondiente al gen *cfr* (746 pb) en el carril que corresponde al control positivo (*S. epidermidis cfr* positivo). El resto de aislamientos no presentan banda específica, lo que indica que carecen del gen *cfr*.

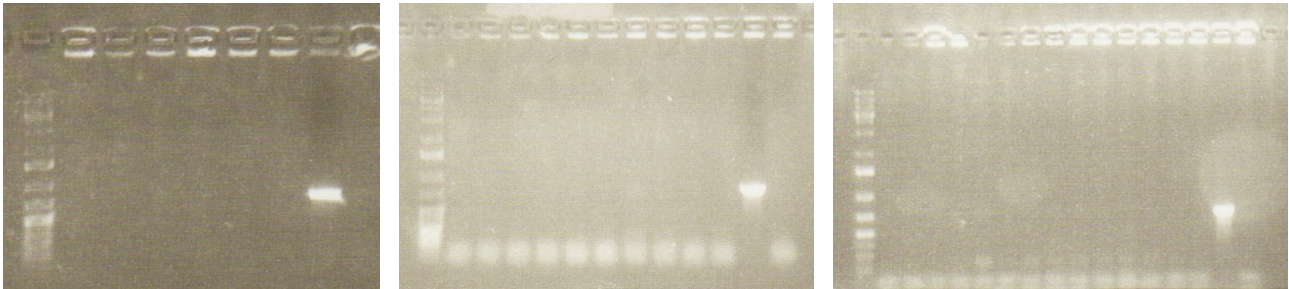


Figura 10. Geles de agarosa tras la electroforesis. Se corresponden con las muestras del año 2013 (izquierda), 2014 (centro) y 2015 (derecha). En todos ellos se ha añadido un control positivo (penúltima columna de cada gel) y un control negativo representado por el *S. aureus* ATTC 25293 (última columna de cada gel).

### Mutaciones DNA cromosómico

Después de comprobar con Diversilab® que todos los aislamientos del estudio pertenecían al mismo clon, se seleccionaron aleatoriamente cuatro de ellos para realizar el protocolo para detectar la presencia o ausencia de la mutación G2576T en el dominio V del rRNA 23S.

Tal y como muestra la **Figura 11**, se confirmó que el fragmento amplificado ha sido cortado por la enzima de restricción, ya que se aprecian tres bandas claramente diferenciadas que corresponden, de arriba a abajo, con los tamaños de 420 (fragmento original), 322 y 98 pb respectivamente.

La banda de 420 pb aparece porque la eficacia de la enzima no es total, de manera que parte de los fragmentos de la amplificación quedan sin digerir.

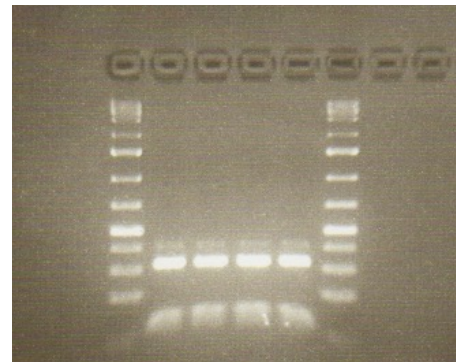


Figura 11. Gel de agarosa revelado tras la electroforesis que confirma la digestión enzimática.

## DISCUSIÓN

### Epidemiología

Desde que se comenzó a usar linezolid en el ámbito hospitalario, surgieron rápidamente casos aislados de resistencia a este antibiótico en *S. epidermidis*<sup>31</sup>, sin embargo es en los últimos años cuando se ha detectado un enorme incremento en los registros de LRSE igualmente como diseminaciones clonales endémicas<sup>32,33,34</sup> que como brotes puntuales<sup>35,36,37</sup>, lo que ha llevado a que países como Estados Unidos instauren un programa especial de seguimiento de estas formas de resistencia debido a su potencial peligro clínico<sup>38</sup>.

En el CHUAC se ha podido constatar este rápido ascenso en los casos de LRSE detectados desde el año 2011, duplicando los aislamientos en el año 2012 y casi triplicándolos en 2013. Sin embargo, la tendencia de aparición de casos de *S. epidermidis* resistente a linezolid parece que se ha estancado en los últimos dos años.

Hay que tener en cuenta que el porcentaje de LRSE puede estar infraestimado debido a que algunos aislamientos se hayan considerado como colonizaciones<sup>11</sup>, sin transcendencia clínica, y por lo tanto no se les haya efectuado el correspondiente estudio de sensibilidad.

Tal y como sucedió en centros hospitalarios de diferentes países<sup>11,39,40</sup>, en el CHUAC los primeros casos de *S. epidermidis* resistentes a linezolid surgieron en las zonas de cuidados intensivos, y desde ahí se fueron diseminando por el resto de zonas hospitalarias en los años subsiguientes. Cabe destacar que en el caso del CHUAC el foco inicial en el que se originó la resistencia a linezolid de *S. epidermidis* fueron las áreas de críticos, que corresponden a las Unidades de Reanimación (REA) o de Cuidados Intensivos (UCI), servicios en los que se suministra de forma continuada linezolid a los pacientes para prevenir posibles infecciones tras una intervención quirúrgica.

Debido a la capacidad de crecimiento formando biofilms en superficies inertes<sup>7</sup>, las muestras principales en las que se encontró LRSE inicialmente fueron las puntas de catéter y otros dispositivos protésicos. Posteriormente, debido a su capacidad de invasividad, aparecieron aislamientos a nivel sistémico<sup>6</sup>. Este hecho se fue modificando paulatinamente, de manera que en 2015 el grupo de muestras principal con presencia de LRSE lo constituyeron las heridas y líquidos estériles (BX)<sup>23</sup>, siendo las puntas de catéter un grupo minoritario.

La utilización empírica y prolongada de linezolid para tratar infecciones producidas por microorganismos gram-positivos en las unidades de cuidados intensivos de los hospitales es generalizada en España<sup>3,23,34,35,36</sup>, administrándose el medicamento en más del 78% de los casos que requieren tratamiento antibiótico<sup>41</sup>.

La utilización de linezolid como tratamiento antibiótico empírico de amplio espectro condiciona radicalmente la aparición y persistencia de cepas LRSE<sup>38,42</sup>. Este hecho explica la resistencia encontrada en aislamientos de *S. epidermidis* en zonas críticas del hospital, así como la presencia de estos LRSE en muestras tomadas de infecciones a nivel respiratorio y del sistema nervioso central, afecciones para las cuales el linezolid es el antibiótico de amplio espectro de preferencia por su buena penetrabilidad a través del tejido pulmonar y la barrera hematoencefálica<sup>43</sup>.

## Estudio fenotípico: antibiograma

En este estudio se amplió la batería de antibióticos utilizados por Baos (2013)<sup>11</sup>.

Tras observar que los resultados del antibiograma son prácticamente iguales entre sí hace pensar que todos ellos pueden pertenecer a un mismo clon.

Quedó patente que nuestros aislados presentaban multirresistencia, tal y como ya apuntaban los estudios previos en los hospitales españoles<sup>23</sup>, lo que dificulta su tratamiento al ofrecer muy pocas opciones terapéuticas, siendo sensibles únicamente a daptomicina, vancomicina, teicoplanina, fosfomicina y tetraciclina.

En cuanto a la cepa 272, que mostró sensibilidad a oxaciclina y cefoxitina, suponemos que sufrió alguna mutación en su gen *mecA*, que confiere resistencia a meticilina, de manera que no sintetiza correctamente la proteína PBP2', cuya baja afinidad por la oxacilina condiciona la resistencia a dicho antibiótico<sup>35</sup>.

El método cuantitativo más adecuado para detectar la resistencia al linezolid es el de microdilución<sup>44</sup>. No obstante, considerando que el antibiograma no tuvo efectos para el paciente ya que únicamente se usó como método descriptivo, y que los métodos cualitativos detectan adecuadamente la resistencia con un coste muy inferior, fueron estos últimos los usados para el estudio.

Hay que tener en cuenta que habitualmente los resultados de CMI obtenidos por E-test son ligeramente más bajos, principalmente cuando la resistencia está mediada por el gen *cf*r y por lo tanto las CMIs pueden aparentar estar dentro de la categoría de sensibilidad<sup>19</sup>.

## Estudio de la clonalidad: Diversilab®

Los resultados obtenidos con Diversilab® confirman desde un punto de vista molecular que todos los aislamientos de *S. epidermidis* considerados pertenecen a un solo clon que se ha diseminado por todo el hospital, y que ha persistido desde su aparición en 2011 hasta la actualidad.

Los estudios de MLST sitúan el clon de *S. epidermidis* resistente a linezolid presente en el CHUAC es el grupo ST2, que a su vez es el ST más prevalente de los observados a nivel mundial<sup>45,46</sup> entre los LRSE. Esto coincide con los estudios llevados a cabo previamente por Wong *et al.* (2012)<sup>45</sup> en Estados Unidos, en los que señalaba al ST2 como el predominante, con un 45% de los casos<sup>52</sup>; así como también con los estudios realizados en Europa<sup>8,22,33,35,47</sup>.

## Mecanismos moleculares de resistencia

Se ha descrito previamente en la literatura que la resistencia de *S. epidermidis* a linezolid suele provenir de la acción conjunta de varios mecanismos de resistencia<sup>19</sup>. El mecanismo más frecuente es la presencia de mutaciones en el RNA ribosómico<sup>14</sup>. Los niveles de resistencia dependen no solo de las mutaciones acumuladas, sino también del número de copias de RNA ribosómico afectadas<sup>12</sup>.

Aunque minoritario desde el punto de vista de la frecuencia, el mecanismo de resistencia asociado a la presencia del gen *cf*r es el más peligroso debido a la transmisión horizontal, ya que es el

único que puede transformarse en plásmidos mediante conjugación entre bacterias no relacionadas. La posibilidad de transmisión de la resistencia a linezolid a bacterias mucho más patógenas que *S. epidermidis*, como *S. aureus*, podría reportar consecuencias clínicas mucho más graves en los pacientes ingresados en el hospital<sup>47</sup>.

Una vez descartada la presencia del gen *cfr*, continuamos la con la caracterización molecular de la resistencia a linezolid de nuestro clon, buscando la presencia de mutaciones frecuentes en el RNAr asociadas a resistencia.

El clon presente en el Complejo Hospitalario da Coruña, contiene la mutación G2576T, ya descrita por Treviño *et al.* (2009)<sup>34</sup> y Potoski *et al.* (2006)<sup>48</sup> en sus centros. Esta mutación se ha asociado a la prolongada exposición a tratamientos con linezolid<sup>4,49,50</sup>.

Con frecuencia, las cepas LRSE contienen más de una mutación causante de la resistencia<sup>43,51,52,53</sup>. En este estudio únicamente se ha comprobado la presencia de la más frecuente de ellas, aún sabiendo que puede haber simultáneamente algunas otras, dejando la puerta abierta a un análisis molecular más exhaustivo del clon.

## CONCLUSIONES

- ◆ El 12% de los aislados de *Staphylococcus epidermidis* en el Complejo Hospitalario de A Coruña son resistentes a linezolid, con una importante concentración de ellos (28%) en áreas críticas del hospital, como pueden ser la REA y UCI.
- ◆ La totalidad de los aislados resistentes a linezolid estudiados pertenecen a un mismo clon, que además presenta multiresistencia a numerosos fármacos como los  $\beta$ -lactámicos, macrólidos o aminoglucósidos entre otros, dejando un estrecho margen terapéutico (daptomicina y glucopeptidos).
- ◆ Ninguno de los aislados presenta el gen plasmídico *cfr*, de manera que se puede descartar la transferencia horizontal de la resistencia a linezolid.
- ◆ Se ha comprobado la existencia de la mutación G2576T en el dominio V del rRNA 23S, lo que justifica la resistencia a linezolid del microorganismo, no siendo esto excluyente de que existan otras mutaciones simultáneas que contribuyan a la resistencia.

## CONCLUSIONS

- ◆ 12% of the occurrences of *Staphylococcus epidermidis* in the Complejo Hospitalario de A Coruña are linezolid-resistant, with a sizeable fraction of these cases (28%) in critical areas of the hospital, such as REA or ICU.
- ◆ All of the studied linezolid resistant cultures consist of a single clone that is also multi-resistant to a host of drugs such as  $\beta$ -lactams, macrolides and aminoglycosides among others, substantially reducing the available therapeutic options to, mainly, daptomycin and glycopeptides.
- ◆ None of the cultures contain the *cfr* plasmid gene, ruling out horizontal transference of the linezolid resistance.
- ◆ The presence of the G2576T mutation in the V domain of the 23S rRNA was verified, which is enough to explain the linezolid resistance of this microorganism, although it does not rule out the existence of concurrent mutations contributing to the resistance.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no hubiera sido posible sin la inestimable ayuda de mi tutor, David Velasco Fernández, que no solo me ha guiado y asesorado en el trabajo experimental propiamente dicho, sino que me ha demostrado su gran implicación personal con el proyecto desde el primer momento, mostrándose infatigable ante cada eventualidad que nos ha surgido.

También quisiera mencionar a Ana Fernández González, por ayudarme a entender los entresijos de los aparatos y programas informáticos utilizados en este trabajo, siempre con una sonrisa. Además, el resto del personal del Servicio de Microbiología del CHUAC, siempre colaboradores y atentos con cualquier necesidad que surgiera.

Llegar hasta aquí no ha sido tarea sencilla y, de alguna manera, ha sido gracias a personas que me han ayudado por el camino con sus consejos y acciones.

Gracias a Manuel Pimentel porque, el primer día de clase, y en un idioma diferente al mio, me hizo sentir como en casa pese a estar muy lejos de ella.

Gracias a Esther Rodríguez, tutora académica de este trabajo, por seguir mis pasos a lo largo de estos cuatro años, aconsejándome cada vez que lo he necesitado.

Gracias a Andrés Martínez, por iluminar el camino cuando había demasiadas opciones donde elegir.

Gracias a mis chicas, Laura y Silvia, por ser como sois, por saber estar sin juzgar, por reiros de la vida cuando hace falta.

Gracias a mi familia, por confiar siempre en mí.

En especial, gracias a Ana González Tizón, mi guía espiritual, amiga y madre postiza cuando ha sido necesario. Por enseñarme que la universidad es algo más que estudiar, porque nada ha sido igual desde tus frases cargadas de ironía en medio de clase.

Gracias a Carlos Eiras, por ser mi compañero de viaje, mi bastón a cada paso. Por mirarme como lo haces y por crearme capaz de todo.

## REFERENCIAS

- 1 Kloos W E. Taxonomy and systematics of staphylococci indigenous to humans. In: Crossley B, Archer G L, editors. *The staphylococci in human disease*. New York, N.Y: Churchill Livingstone; 1997. p.113–117.
- 2 Otto M. *Staphylococcus epidermidis* – the ‘accidental pathogen’. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7:555–567. DOI: 10.1038/nrmicro2182
- 3 Martínez C. Caracterización fenotípica y genotípica de *Staphylococcus coagulasa* negativos resistentes a linezolid emergentes en un hospital de distrito durante los años 2012-2013 [trabajo de fin de grado]. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia; 2014.
- 4 Büttner H, Mack D, Rohde H. Structural basis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation: mechanisms and molecular interactions. *Front Cell Infect Microbiol*. 2015;5:14-14. DOI: 10.3389/fcimb.2015.00014
- 5 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: 2329–2335. DOI:10.1093/jac/dkq331
- 6 Widerström M, Wistrom J, Sjöstedt A, Monsen T. Coagulase-negative staphylococci: update on the molecular epidemiology and clinical presentation, with a focus on *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31(1):7-20. DOI 10.1007/s10096-011-1270-6
- 7 Gomes F, Teixeira P, Oliveira R. Mini-review: *Staphylococcus epidermidis* as the most frequent cause of nosocomial infections: old and new fighting strategies. *Biofouling*. 2014;30(2):131-141. DOI: 10.1080/08927014.2013.848858
- 8 Schoenfelder SM, Lange C, Eckart M, Hennig S, Kozytska S, Ziebuhr W. Success through diversity - how *Staphylococcus epidermidis* establishes as a nosocomial pathogen. *Int J Med Microbiol*. 2010;300(6):380-386. DOI: 10.1016/j.ijmm.2010.04.011
- 9 Rupp M. Clinical characteristics of infections in humans due to *Staphylococcus epidermidis*. *Methods Mol Biol*. 2014;1106:1-16. DOI: 10.1007/978-1-62703-736-5\_1
- 10 Otto M. Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections. *Semin Immunopathol*. 2012;34:201–214. DOI 10.1007/s00281-011-0296-2
- 11 Baos E, Candel FJ, Merino P, Pena I, Picazo JJ. Characterization and monitoring of linezolid-resistant clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* in an intensive care unit 4 years after an outbreak of infection by cfr-mediated linezolid-resistant *Staphylococcus aureus*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013;76:325–329. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2013.04.002
- 12 Fulle S, Saini JS, Homeyer N, Gohlke H. Complex long-distance effects of mutations that confer linezolid resistance in the large ribosomal subunit. *Nucleic Acids Research*. 2015;43(16):7731–7743. DOI: 10.1093/nar/gkv729
- 13 Curtin J, Cormican M, Fleming G, Keelehan J, Colleran 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(10):3145-3148. DOI: 10.1128/AAC.47.10.3145–3148.2003
- 14 Long KS, Vester B. Resistance to linezolid caused by modifications at its binding site on the ribosome. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(2):603-612. DOI:10.1128/AAC.05702-11

- <sup>15</sup> Schumacher A, Trittler R, Bohnert JA, Kümmerer K, Pagès JM, Kern WV. Intracellular accumulation of linezolid in *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii* and *Enterobacter aerogenes*: role of enhanced efflux pump activity and inactivation. *J Antimicrob Chemother.* 2007;59(6):1261-1264. DOI: 10.1093/jac/dkl380
- <sup>16</sup> Brickner SJ, Barbachyn MR, Hutchinson DK, Manninen PR. Linezolid (ZYVOX), the first member of a completely new class of anti-bacterial agents for treatment of serious gram-positive infections. *J Med Chem.* 2008;51:1981–1990. DOI: 10.1021/jm800038g
- <sup>17</sup> Gabriel EM, Fitzgibbon S, Clairb J, Coffeya A, O'Mahony JM. Characterisation of clinical methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* demonstrating high levels of linezolid resistance (>256 µg/ml) resulting from transmissible and mutational mechanisms. *J Infect Chemother.* 2015;21(7):1-3. DOI: 10.1016/j.jiac.2015.03.012
- <sup>18</sup> Kosowska-Shick K, Julian KG, McGhee PL, Appelbaum PC, Whitener CJ. Molecular and epidemiologic characteristics of linezolid-resistant coagulase-negative staphylococci at a tertiary care hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2010;68:34–9. DOI:10.1016/j.diagmicrobio.2010.05.007
- <sup>19</sup> Ardanuy C, Cercenado E, Morosini MI, Torres C. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en grampositivos [monografía en internet]. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica: Cercenado E, Cantón R; 2011 [acceso 14 de julio de 2016]. <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia39.pdf>
- <sup>20</sup> Mendes RE, Deshpande LM, Jones RN. Linezolid update: stable in vitro activity following more than a decade of clinical use and summary of associated resistance mechanisms. *Drug Resist Updat.* 2014;17:1–12. DOI: 10.1016/j.drug.2014.04.002
- <sup>21</sup> Mendes RE, Deshpande LM, Bonilla HF et al. Dissemination of a pSCFS3-like *cfr*-carrying plasmid in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates recovered from hospitals in Ohio. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57:2923–2928. DOI:10.1128/AAC.00071-13
- <sup>22</sup> Bongiorno D, Campanile F, Mongelli G, Baldi M, Provenzani R, Reali S et al. DNA methylase modifications and other linezolid resistance mutations in coagulase-negative staphylococci in Italy. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(11):2336-2340. DOI:10.1093/jac/dkq344
- <sup>23</sup> Cuevas O, Cercenado E, Vindel A, Guinea J, Sánchez-Conde M, Sánchez-Somolinos M et al. Evolution of the antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. in Spain: five nationwide prevalence studies, 1986 to 2002. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(11):4240–4245. DOI: 10.1128/AAC.48.11.4240-4245.2004
- <sup>24</sup> M100S: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Wayne (PA): Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI); 2016 [consultado el 16 de julio de 2016]. 256 p. [http://shop.clsi.org/c.1253739/site/Sample\\_pdf/M100S26\\_sample.pdf](http://shop.clsi.org/c.1253739/site/Sample_pdf/M100S26_sample.pdf)
- <sup>25</sup> UltraClean® Microbial DNA Isolation Kit. Carlsbad (CA): MO BIO Laboratories; 2015 [consultado el 16 de julio de 2016]. 17 p. <https://mobio.com/media/wysiwyg/pdfs/protocols/12224.pdf>
- <sup>26</sup> Diversilab Guide: 325-Test Kit. Athens (GA): Bacterial Barcodes, Inc.; 2008 [consultado el 16 de julio de 2016]. 26 p. [http://www.biomerieux-usa.com/sites/subsidiary\\_us/files/instructions\\_for\\_use\\_of\\_labchip\\_devices\\_270670-1.pdf](http://www.biomerieux-usa.com/sites/subsidiary_us/files/instructions_for_use_of_labchip_devices_270670-1.pdf)
- <sup>27</sup> Thomas JC, Vargas MR, Miragaia M, Peacock SJ, Archer GL, Enright MC. Improved multilocus sequence typing scheme for *Staphylococcus epidermidis*. *J Clin Microbiol.* 2007;45(2):616-619. doi: 10.1128/JCM.01934-06

- <sup>28</sup> Kehrenberg C, Schwarz S. Distribution of florfenicol resistance genes *fexA* and *cfp* among chloramphenicol-resistant *Staphylococcus* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50:1156-1163. DOI: 10.1128/AAC.50.4.1156-1163.2006
- <sup>29</sup> Morales G, Picazo JJ, Baos E, Candel FJ, Arribi A, Peláez B *et al.* Resistance to linezolid is mediated by the *cfp* gene in the first report of an outbreak of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis.* 2010;50:821–825. DOI: 10.1086/650574
- <sup>30</sup> Hong T, Li X, Wang J, Sloan C, Cicogna C. Sequential linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* isolates with G2576T mutation. *J Clin Microbiol.* 2007;45(10):3277-3280. DOI:10.1128/JCM.02048-06
- <sup>31</sup> Tsiodras S, Gold HS, Sakoulas G, Eliopoulos GM, Wennersten C, Venkataraman L *et al.* Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *Lancet.* 2001;358:207–208. DOI: 10.1016/S0140-6736(01)05410-1
- <sup>32</sup> 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;67:768–769. DOI:10.1093/jac/dkr538
- <sup>33</sup> 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;65:1070–107. DOI:10.1093/jac/dkq065
- <sup>34</sup> 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;28:527–533. DOI: 10.1007/s10096-008-0657-5
- <sup>35</sup> Seral C, Sáenz Y, Algarate S, Duran E, Luque P, Torres C *et al.* Nosocomial outbreak of methicillin- and linezolid- resistant *Staphylococcus epidermidis* associated with catheter-related infections in intensive care unit patients. *Int J Med Microbiol.* 2011;301:354–358. DOI:10.1016/j.ijmm.2010.11.001
- <sup>36</sup> Bonilla H, Huband MD, Seidel J, Schmidt H, Lescoe MK, McKurdy SP *et al.* Multicity outbreak of linezolid- resistant *Staphylococcus epidermidis* associated with clonal spread of a *cfp*-containing strain. *Clin Infect Dis.* 2010;51:796–800. DOI: 10.1086/656281
- <sup>37</sup> Collins J, Maguire M, Gowing C, Flanagan M, Kelly S, Donnelly M *et al.* An outbreak of colonization with linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* in an intensive therapy unit. *J Antimicrob Chemother.* 2008;61(4):901-907. DOI: 10.1093/jac/dkn043
- <sup>38</sup> Flamm RK, Mendes RE, Hogan PA, Streit JM, Ross JE, Jones RN. Linezolid Surveillance Results for the United States (LEADER Surveillance Program 2014). *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(4):2273-2280. DOI: 10.1128/AAC.02803-15
- <sup>39</sup> Bender J, Strommenger B, Steglich M, Zimmermann O, Fenner I, Lensing C *et al.* Linezolid resistance in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* from German hospitals and characterization of two *cfp*-carrying plasmid. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70:1630–1638. DOI: 10.1093/jac/dkv025
- <sup>40</sup> 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(4):901-907. DOI: 10.1093/jac/dkn043
- <sup>41</sup> Álvarez-Lerma F, Martínez MP, Astigarraga PO, Ordeñana JI, Pueyo MJL, Arnillas MPG *et al.* Analysis of treatments used in infections caused by gram-positive multiresistant cocci in critically ill patients admitted to the ICU. *Rev Esp Quimioter* 2012;25:65–73.

- <sup>42</sup> Mulanovich VE, Huband MD, McCurdy SP, Lemmon MM, Lescoe M, Jiang Y, Rolston KV *et al.* Emergence of linezolid-resistant coagulase-negative *Staphylococcus* in a cancer centre linked to increased linezolid utilization. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65:2001–20044. DOI: 10.1093/jac/dkq238
- <sup>43</sup> Chavanet P. The ZEPHyR study: A randomized comparison of linezolid and vancomycin for MRSA pneumonia. *Med Maladies Infect.* 2013;43(11-12):451-455. DOI: 10.1016/j.medmai.2013.09.011
- <sup>44</sup> Rodríguez JAG. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos [monografía en internet]. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica: Picazo JJ; 2000 [acceso 16 de julio de 2016]. <http://www.seimc.org/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia11.pdf>
- <sup>45</sup> Wong A, Reddy S, Smyth D, Agüero-Rosenfeld M, Sakoulas G, Robinson DA *et al.* Polyphyletic emergence of linezolid-resistant Staphylococci in the United States. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(2):742-748. DOI:10.1128/AAC.00621-09
- <sup>46</sup> Mendes, RE, Deshpande LM, Costello AJ, Farrel DJ. Molecular epidemiology of *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates from US hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012;56(9):4656-4661. DOI:10.1128/AAC.00279-12
- <sup>47</sup> Decousser JW, Desroches M, Bourgeois-Nicolaos N, Potier J, Jehl F, Lina G *et al.* Susceptibility trends including emergence of linezolid resistance among coagulase-negative staphylococci and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from invasive infections. *Int J Antimicrob Agents.* 2015;46(6):622-30. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2015.07.022
- <sup>48</sup> Potoski BA, Adams J, Clarke L, Shutt K, Linden PK, Baxter C *et al.* Epidemiological profile of linezolid-resistant coagulase-negative staphylococci. *Clin Infect Dis.* 2006;43:165–71. DOI: 10.1086/505114
- <sup>49</sup> Mutnick A, Enne V, Jones R. Linezolid Resistance Since 2001: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Ann Pharmacother.* 2003;37(6):769-774.
- <sup>50</sup> Ishiwada N, Takaya A, Kimura A, Watanabe M, Hino M, Ochiai H *et al.* Linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* associated with long-term, repeated linezolid use in a pediatric patient. *J Infect Chemother.* 2016;22(3):187-190. DOI: 10.1016/j.jiac.2015.10.004
- <sup>51</sup> Sorlozano A, Gutierrez J, Martinez T, Yuste ME, Perez-Lopez JA, Perez Lopez JA *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(1):73-80. DOI 10.1007/s10096-009-0823-4
- <sup>52</sup> Lincopan N, de Almeida L, Mamizuka E, Lincopan N, Elmor de Araújo MR. Linezolid resistance in *Staphylococcus epidermidis* associated with a G2603T mutation in the 23S rRNA gene. *Int J Antimicrob Agents.* 2009;34(3):281-282. DOI:10.1016/j.ijantimicag.2009.02.023
- <sup>53</sup> Liakopoulos A, Neocleous C, Klapsa D, Kanellopoulou M, Spiliopoulou I, Mathiopoulos K *et al.* A T2504A mutation in the 23S rRNA gene responsible for high-level resistance to linezolid of *Staphylococcus epidermidis*. *J Antimicrob Chemother.* 2009;64(1):206-207. DOI:10.1093/jac/dkp167

## ANEXOS

### ANEXO 1: EXTRACCIÓN DNA BACTERIANO OPTIMIZADO

- Incorporar cierta cantidad de los inóculos bacterianos a tubos con medio base (LB) y dejar crecer durante 3 días a 37°C.
- Transcurrido ese tiempo, centrifugar los tubos durante 5 minutos a 3500 rpm, eliminando el sobrenadante resultante.
- Resuspender el pellet formado con 45  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O MiliQ estéril (Braun) y se trasvasan 45  $\mu$ l a un tubo Eppendorf estéril de 2 ml.
- Añadir 45  $\mu$ l de lisostafina (1 mg/ml) (Sigma-Aldrich Química), vorteando la mezcla.
- Incubar durante 10 minutos a 37°C.
- Añadir 45  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O MiliQ estéril (Braun), 20  $\mu$ l de proteinasa K (2 mg/ml) y 150  $\mu$ l de tampón Tris-HCl (0,1 M, pH 7,4), vorteando la mezcla.
- Incubar durante 10 minutos a 60°C.
- Hervir 5 minutos a 100°C.
- Centrifugar durante 3 minutos a 12000 rpm, trasvasando el sobrenadante a un tubo Eppendorf estéril de 2 ml.
- Almacenar a -20°C hasta su uso.

## ANEXO 2: DIVERSILAB®

### ANTES DE COMENZAR:

- Reemplazar la jeringa en caso de que empecemos un kit nuevo (**Figura 12a**).
- Abrir estación de impresión y colocar la placa base en posición C (**Figura 12b**).
- Ajustar el clip de la jeringa en la posición más baja (**Figura 12cc**).

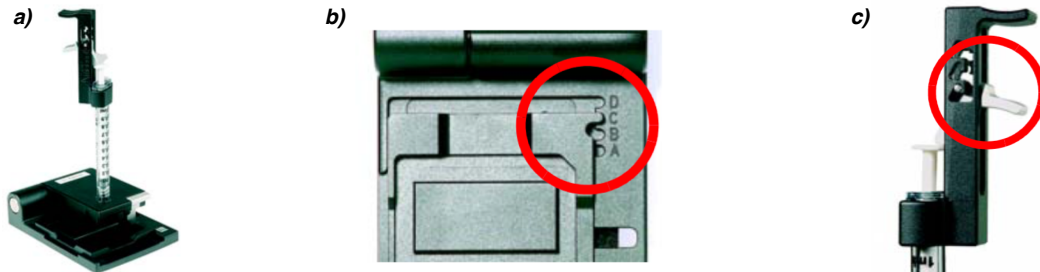


Figura 12. Ajustes previos al comienzo de la técnica con el chip de DNA.

### ADVERTENCIAS

- Guardar los reactivos y mezclas refrigerados a 4°C cuando no los estemos usando.
- Sacarlos a temperatura ambiente 30 minutos antes de usarlos.
- Proteger de la luz los colorantes, quitándoles la tapa solo cuando se vayan a usar, ya que el colorante se descompone con la exposición a la luz y reduce la intensidad de señal.
- Insertar la pipeta siempre hasta el fondo en vez de pipetear a la pared, que podría dar peores resultados.
- Usar una nueva jeringa y limpiadores de los electrodos con cada nuevo kit.
- Usar los chips en los próximos 5 minutos a haberlos preparado. Los reactivos se pueden evaporar, dando peores resultados.

### PREPARACIÓN DE LA MEZCLA GEL-COLORANTE

- Sacar a temperatura ambiente el **DNA dye concentrate (azul)** y el **DNA gel matrix (rojo)** 30 minutos antes de comenzar.
- Vortear el **DNA dye concentrate (azul)** durante 10 segundos y darle un spin, asegurándonos que está completamente derretido.
- En un tubo limpio de 1,5 ml, pipetear 10 µl del tubo **azul** y 200 µl del vial **rojo**. Almacenar a 4°C en oscuridad.
- Vortear el tubo e inspeccionar que se hayan mezclado completamente el gel y el colorante.
- Transferir la mezcla a un tubo con filtro y centrifugarlo a 1500 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Reservar el filtrado en un tubo limpio.

### CARGA DE LA MEZCLA GEL-COLORANTE

- Dejar que atempere a temperatura ambiente la mezcla de gel y colorante previamente preparada, protegiéndola de la luz.
- Coger un nuevo chip de DNA y colocarlo en la estación de impresión.

- Pipetear 9.0  $\mu$ l de la mezcla gel-colorante al fondo del pocillo marcado (**Figura 13a**).
- Preparar el temporizador en 60 segundos, asegurarnos de que el émbolo está colocado en 1 ml y cerrar la estación de impresión con el chip dentro.
- Presionar el émbolo de la jeringa hasta que se sujete con el clip (**Figura 13b**).
- Esperar 60 segundos y liberar el émbolo del clip.
- Lentamente retirar el émbolo hasta la marca de 1 ml.
- Abrir la estación de impresión.
- Pipetear 9.0  $\mu$ l de la mezcla gel-colorante en cada uno de los pocillos marcados (**Figura 13c**).

### CARGA DEL MARCADOR

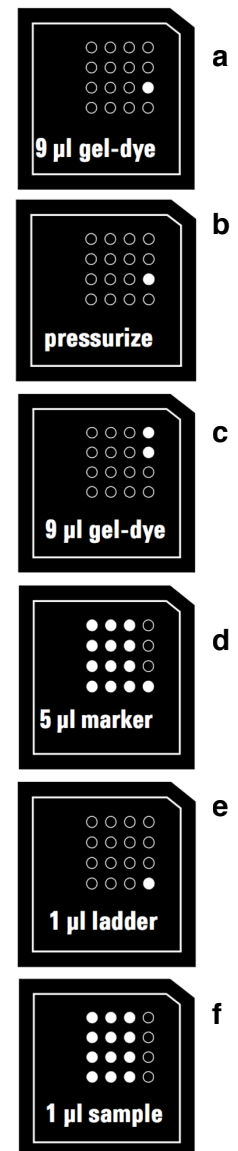
- Pipetear 5  $\mu$ l del **marcador (verde)** en los pocillos marcados con el símbolo de la escalera y en cada uno de los 12 pocillos para muestras (**Figura 13d**).

### CARGA DEL MARCADOR DE TAMAÑO

- Pipetear 1  $\mu$ l del **marcador de tamaño (amarillo)** en el pocillo con el símbolo de la escalera (**Figura 13e**).

### CARGA DE LAS MUESTRAS

- Pipetear 1  $\mu$ l de muestra (en los pocillos que usamos) o de agua desionizada (pocillos sin usar) en cada uno de los 12 pocillos para muestras (**Figura 13f**).
- Ajustar el temporizador en 60 segundos.
- Colocar el chip en el vortex con adaptador (**Figura 14**) y vortexear durante 60 segundo a 2400 rpm.



**Figura 13.**  
Esquema de la carga del chip.

### INSERTAR EL CHIP EN EL BIOANALIZADOR

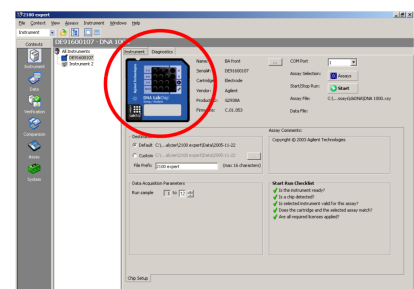
- Abrir la tapa del bioanalizador.
- Comprobar que los electrodos están colocados adecuadamente.
- Colocar el chip en el receptáculo (solo encaja en una posición).
- Cerrar la tapa con cuidado de que los electrodos encajen en los pocillos del chip.
- El programa debería mostrar que hemos insertado el chip y cerrado la tapa en el display con un icono en la parte superior izquierda de la pantalla (**Figura 15**).



**Figura 14.** Vortex con adaptador.

### COMENZAR EL ENSAYO

- Seleccionar el ensayo apropiado del menú.
- Pulsar **start** para comenzar el ensayo.



**Figura 15.** Detalle de la página principal del programa.

**ANEXO 3: PRIMERS UTILIZADOS**

Reacción		Dirección	Secuencia	Tamaño del producto PCR (pb)
Dominio V de rRNA 23S		forward	5-GCGGTCGCCTCCTAAAAG-3	420
		reverse	5-ATCCCGGTCCTCTCGTACTA-3	
Gen <i>cfr</i>		forward	5-TGAAGTATAAAGCAGGTTGGGAGTCA-3	746
		reverse	5-ACCATATAATTGACCACAAGCAGC-3	
MLST	<i>arcC</i>	forward	5-TGTGATGAGCACGCTACCGTTAG-3	465
		reverse	5-TCCAAGTAAACCCATCGGTCTG-3	
	<i>aroE</i>	forward	5-CATTGGATTACCTCTTTGTTTCAGC-3	420
		reverse	5-CAAGCGAAATCTGTTGGGG-3	
	<i>gtr</i>	forward	5-CAGCCAATCTTTTATGACTTTT-3	438
		reverse	5-GTGATTAAGGTATTGATTTGAAT-3	
	<i>mutS</i>	forward	5-GATATAAGAATAAGGGTTGTGAA-3	412
		reverse	5-GTAATCGTCTCAGTTATCATGTT-3	
	<i>pyrR</i>	forward	5-GTTACTAATACTTTTGCTGTGTTT-3	428
		reverse	5-GTAGAATGTAAAGAGACTAAAATGAA-3	
	<i>tpiA</i>	forward	5-ATCCAATTAGACGCTTTAGTAAC-3	424
		reverse	5-TTAATGATGCGCCACCTACA-3	
	<i>yqiL</i>	forward	5-CACGCATAGTATTAGCTGAAG-3	416
		reverse	5-CTAATGCCTTCATCTTGAGAAATAA-3	

**ANEXO 4: DENDROGRAMA Y MATRIZ DE SIMILITUD DE DIVERSILAB®**

