

**INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA
ESCUELA DE SALUD PÚBLICA DE MÉXICO**

**“SUSCEPTIBILIDAD A VANCOMICINA, LINEZOLID Y DAPTOMICINA DE
Staphylococcus aureus RESISTENTE A METILICINA AISLADOS DE
PACIENTES HOSPITALIZADOS CON PROCESOS
INFECCIOSOS (2000-2014)”**

**Q.F.B. CARLOS EDUARDO GASPAR CASTILLO
GENERACIÓN 2014-2016**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS**

DIRECTORA: DRA. IRMA GABRIELA ECHÁNIZ AVILES

ASESORA: DRA. MARIA ELENA VELAZQUEZ MEZA

LECTOR EXTERNO: DR. RODOLFO GATICA MARQUINA

**CUERNAVACA, MORELOS.
AGOSTO 2016**

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, gracias por confiar en mí y apoyarme incondicionalmente. Gracias por inculcarme tantos valores, enseñanzas y doctrinas de vida y amor; por cooperar importantemente en ser quien soy, por dedicarme tantas oraciones.
¡Este logro también es de ustedes!

A la Dra. Gabriela Echániz por aceptarme en su laboratorio. Por sus consejos y apoyo constante. Además de ser una gran jefa es líder y ejemplo a seguir.

A la Dra. Maria Elena Velazquez por la capacitación, su apoyo en el laboratorio y sus consejos.

A la Dra. Volkow, Dra. Cornejo, Dra. Morfín, Dr. Rodríguez, Dr. Solórzano, Dra. Miranda, Q.F.B. Ayala, Q.F.B. Guajardo, Dr. Silva y al Dr. Gatica, por las cepas, los datos y las observaciones realizadas en la tesis.

A MC. Noemí Carnalla, MC. Araceli Soto y TS. Máxima Larios por su apoyo en el laboratorio y sus observaciones.

A Gerardo, Juan Carlos, Pamela y Sahira, por su apoyo en el laboratorio, por su cariño y amistad.

A mis amigos de generación Lupita, Fabiola, Fernanda y Alex por su amistad, los buenos momentos y su apoyo incondicional.

A mis compañeros de maestría: Alonso y Eduardo por su amistad y las observaciones realizadas.

A todos ustedes ¡muchas gracias!

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	8
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	8
3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	10
4. MARCO CONCEPTUAL.....	10
4.1. EPIDEMIOLOGÍA DE LAS INFECCIONES POR <i>S. aureus</i>	10
4.2. AGENTE ETIOLÓGICO.....	11
4.3. FACTORES DE VIRULENCIA Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE <i>S. aureus</i>	12
4.4. CARACTERÍSTICAS DE LA PARED BACTERIANA DE <i>S. aureus</i>	12
4.5. CRITERIOS PARA LA CLASIFICACIÓN DE LAS CEPAS DE <i>S. aureus</i>	13
4.6. SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE <i>S. aureus</i>	14
4.7. ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS PARA MRSA.....	17
4.7.1. Vancomicina.....	17
4.7.2. Linezolid.....	18
4.7.3. Daptomicina.....	19
4.8. RESISTENCIA A VANCOMICINA, LINEZOLID Y DAPTOMICINA.....	19
4.9. COMPLEJOS CLONALES.....	20
4.10. NUEVAS ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS.....	21
5. JUSTIFICACIÓN.....	22
6. OBJETIVO GENERAL.....	23
7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23

8. DISEÑO Y TIPO DE ESTUDIO.....	24
9. METODOLOGÍA.....	24
9.1. DIAGRAMA DE FLUJO.....	24
9.2. LUGAR Y DURACIÓN.....	25
9.3. POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	25
9.3.1. Criterios de inclusión.....	25
9.3.2. Criterios de exclusión.....	26
9.4. DESARROLLO DE ESTUDIO.....	26
9.4.1. Resiembra de las cepas de MRSA.....	26
9.4.2. Determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de los aislamientos de MRSA a vancomicina, linezolid y daptomicina.....	26
9.4.3. Identificación de aislamientos hVISA.....	27
9.4.3.1. Prueba de screening.....	27
9.4.3.2 Prueba de MIC TEST STRIP (LIOFILCHEM ®).....	27
9.4.3.3 Prueba confirmatoria para hVISA.....	27
9.4.4. Determinación del patrón clonal por electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE).....	28
9.4.5. Tifipicación por secuencia de multilocus (MLST).....	28
9.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	29
10. REFERENCIAS DE TESIS.....	30
11. RESULTADOS (ARTÍCULO CIENTÍFICO).....	34
12. CARTA DE RECEPCIÓN DE ARTÍCULO CIENTÍFICO.....	58

ABREVIATURAS

Cenetec. Centro Nacional de Excelencia Tecnológica en Salud.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute.

DNSA. *Staphylococcus aureus* no sensible a daptomicina.

hVISA. VISA heterogénea.

LRSA. *Staphylococcus aureus* resistente a linezolid.

MIC. Concentración mínima inhibitoria.

MLST. Tipificación por secuenciación de multilocus.

MRSA. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina.

MSSA. *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina.

NAG. N-acetilglucosamina.

NAM. Ácido N-acetilmurámico.

PBP. Proteínas de unión a penicilina.

PFGE. Electroforesis en gel de campos pulsado.

VISA. *Staphylococcus aureus* con resistencia intermedia a vancomicina.

VRSA. *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina.

RESUMEN

Actualmente se recomienda el uso de vancomicina, linezolid y daptomicina para el tratamiento de infecciones graves causadas por cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA, por sus siglas en inglés). Sin embargo, en varios países del mundo, se ha reportado un lento pero estable incremento en la concentración mínima inhibitoria (MIC) de vancomicina [“Vancomycin MIC Creep”] entre las cepas de MRSA; presencia de cepas con resistencia intermedia, franca y hetero-resistencia a vancomicina (VISA/VRSA/hVISA), a linezolid (LRSA) y no sensibles a daptomicina (DNSA). El objetivo general de este estudio fue analizar el comportamiento de las cepas invasoras de MRSA aisladas en el periodo 2000-2014 de pacientes procedentes de cuatro hospitales de tercer nivel de atención, con respecto a la susceptibilidad antimicrobiana de vancomicina, linezolid y daptomicina

Se utilizó un total de 448 cepas de MRSA para determinación de la MIC de cada antibiótico mediante microdilución en placa. La tendencia fue determinada con el coeficiente de correlación de Spearman. Dos pruebas de tamizaje (screening en 4.0 µg/mL de vancomicina y MIC Test Strip Liofilchem ®) fueron utilizadas para detectar cepas hVISA entre las 448 cepas de MRSA. Las cepas presuntamente positivas en al menos una prueba de tamizaje fueron confirmadas por perfil de análisis poblacional/área bajo la curva (PAP/AUC). A las cepas fenotípicamente resistentes por microdilución en placa o por PAP/AUC se les determinó el perfil clonal y la secuencia tipo (ST) mediante electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE) y tipificación por secuencia multilocus (MLST), respectivamente.

Del total de cepas (N=448), 39.5% (n=177) procedían del Instituto Nacional de Cancerología (H1), 16.3% (n=73) procedían de la Unidad Médica de Alta Especialidad (UMAE) Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI–IMSS (H2), 9.6% (n=43) del Hospital San José Tecnológico de Monterrey

(H3) y 34.6% (n=155) del Antiguo Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde” (H4). Se encontró tendencia de la MIC de vancomicina en el H1, de daptomicina en el H2 y de linezolid en el H3. Se obtuvieron tres cepas VISA y una de ellas era además DNSA; cuatro fueron hVISA de las cuales una era DNSA y una cepa más fue DNSA sin resistencia a vancomicina o linezolid. No se encontraron cepas LRSA. Todas las cepas fenotípicamente resistentes a vancomicina y daptomicina (n=8) pertenecían a la clona Nueva York/Japón. Dos secuencias tipo fueron identificados: ST5-SCCmec II (n=6) y ST1011-SCCmec II (n=2). Este es el primer reporte de cepas VISA, DNSA, hVISA-DNSA and VISA-DNSA en aislamientos de MRSA causantes de infecciones en México.

Durante los años 2011-2012, hubo un brote de *Enterococcus faecium* en el H1, lo cual pudo haber generado selección de cepas de MRSA con resistencia a este antibiótico y tendencia hacia a la resistencia. La tendencia de daptomicina observada en el H2, a pesar de no ser utilizado en este, puede explicarse, en parte, a que es un hospital de referencia y que los pacientes hayan sido previamente tratados con este antimicrobiano o con vancomicina, debido a la asociación positiva existente entre el incremento de la MIC de vancomicina y de daptomicina. En el H3, el uso cada vez mayor de linezolid, puede estar implicado en la tendencia observada. En el H4, durante el periodo de estudio, la vancomicina estuvo restringida, lo que explica probablemente la ausencia de tendencia.

Estos hallazgos pueden tener consecuencias clínicas e implicaciones de salud pública que plantean nuevos retos que se deben afrontar a través de la vigilancia activa de la resistencia antimicrobiana y reforzar la aplicación obligatoria de los programas de manejo de antimicrobianos en todos los hospitales.

1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones invasoras por *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) son de difícil tratamiento, aumentan la estancia hospitalaria, costos en atención médica y tasas de morbi-mortalidad¹. Algunos de los antibióticos recomendados para su tratamiento son: vancomicina, linezolid y daptomicina. No obstante, en diversas partes del mundo, se han reportado cepas de MRSA con resistencia o susceptibilidad disminuida a estos antibióticos, situación que disminuye las alternativas terapéuticas. Pese a esto, vancomicina, linezolid y daptomicina son algunas de las pocas opciones terapéuticas disponibles para el tratamiento de infecciones serias causadas por MRSA^{4, 5, 6}.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La resistencia antimicrobiana que presentan los MRSA dificulta el tratamiento de los padecimientos producidos por este microorganismo, aumenta la estancia hospitalaria, los costos en la atención médica e incrementa la tasa de morbi-mortalidad^{1, 7, 8, 9}. Las guías de referencia propuestas por el Centro Nacional de Excelencia Tecnológica en Salud (Cenetec) y diversas guías farmacoterapéuticas internacionales proponen el uso de vancomicina, linezolid y daptomicina para diversas patologías causadas por esta bacteria^{4, 10, 11, 12}.

Desafortunadamente, en diversas partes del mundo, se han reportado infecciones causadas por cepas de *S. aureus* con resistencia intermedia y resistencia franca a vancomicina (VISA/VRSA), *S. aureus* con sensibilidad a vancomicina, pero con subpoblaciones en el rango de la resistencia intermedia a este antibiótico (hVISA); *S. aureus* resistente a linezolid (LRSA) y no sensibles a daptomicina (DNSA)^{1, 13, 14}. En México, sólo se ha documentado el hallazgo de cepas hVISA^{5, 16, 17, 18, 19, 31, 32, 33}.

Las cepas hVISA han sido asociadas con infecciones como endocarditis, osteomielitis y bacteriemia; no son detectadas por las pruebas de susceptibilidad rutinarias o por los sistemas automatizados (p.ej. Vitek®, MicroScan®); muestran elevada prevalencia entre aislamientos con MICs cercanas al punto de corte de sensibilidad de vancomicina (1.5 a 2 µg/mL) y pueden conducir a falla terapéutica^{20, 21, 22, 23, 24}.

Adicionalmente, el fenómeno denominado “Vancomycin MIC Creep” (deslizamiento de la MIC de vancomicina) ha sido descrito en varios países, el cual denota un lento pero estable incremento en la MIC a través del tiempo con valores de 0.5 µg/mL a 1.5 µg/mL²⁵; esta misma tendencia se ha evidenciado en algunos hospitales de nuestro país, dónde se reportó un incremento de la MIC de 0.5 µg/mL a 2.0 µg/mL¹⁵. Dicho fenómeno es de especial preocupación debido a que denota un patrón de comportamiento hacia la resistencia de vancomicina, a la asociación significativa entre el incremento de la MIC de vancomicina y la presencia de cepas hVISA²³ y, aunque los aislamientos pudieran ser sensibles y no presentar hVISA, algunas patologías como endocarditis no deben ser tratadas con vancomicina cuando la MIC es ≥ 1 µg/mL debido a riesgo de fracaso del tratamiento, lo que disminuye las alternativas terapéuticas⁴.

Por otra parte, puede existir correlación positiva entre el aumento de la MIC de vancomicina y daptomicina, así como cepas hVISA con sensibilidad reducida a daptomicina²⁶, lo cual se debe a mutaciones genéticas que producen fenotipos con pared celular más gruesa y carga neta positiva en la membrana celular²⁷. Respecto a linezolid, mutaciones puntuales que codifican para modificaciones en el sitio de acción del fármaco causan cepas resistentes y, a pesar de que es un antibiótico sintético, se ha reportado un gen de resistencia natural, el cual en conjunto con el gen denominado *ermB*, causa resistencia a todos los antibióticos con el mismo mecanismo de acción que linezolid^{28, 29}.

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

1. ¿Cuál es la tendencia de las MICs de vancomicina, linezolid y daptomicina en las cepas aisladas en hospitales de segundo y tercer nivel durante los años 2000 a 2014?
2. ¿Cuál es la frecuencia de las hVISA, VISA, VRSA, LRSA y DNSA en las cepas analizadas?
3. ¿A qué secuencia tipo y perfil clonal pertenecen las cepas con las mayores MICs para los tres antimicrobianos?

4. MARCO CONCEPTUAL

Staphylococcus aureus ha demostrado tener la capacidad para desarrollar resistencia antimicrobiana de forma rápida y continua, la cual se observó un año después de la introducción de la penicilina¹. En 1961, dos años posteriores a la introducción de la meticilina, se generó la primera cepa MRSA¹ que actualmente es un patógeno importante en infecciones nosocomiales, así como en infecciones asociadas a la comunidad, a los cuidados de la salud y en la ganadería³.

4.1 EPIDEMIOLOGIA DE LAS INFECCIONES POR *S. aureus*

S. aureus es un patógeno importante de infecciones hospitalarias, siendo frecuente en áreas quirúrgicas, cuidados intensivos y áreas pediátricas³⁰.

Las infecciones por *S. aureus* y particularmente por MRSA están creciendo en todo el mundo. El rango de prevalencia mundial durante los años 1997-1999 de MRSA es de 23.3 a 73%. Los datos de la vigilancia antimicrobiana SENTRY realizada durante los años 1997 a 1998 reportó en Europa una prevalencia de MRSA aproximada del 26%; Grecia, Italia, Portugal y Turquía presentaron las tasas más altas, mientras Suiza, Holanda, Alemania y Austria representan la

contraparte. En Asia, durante 1998 a 1999, los países participantes fueron Japón, Singapur, Taiwán y Hong Kong en donde se encontraron tasas por encima del 40%. En este mismo periodo se encontró una tasa de 23.6% en Australia, mientras que en el continente africano osciló entre el 5 y el 45% con casos como Sudáfrica con 42.9% y Nigeria con 29.6%⁴⁸.

En América Latina, seis países incluido México, participaron en dicha vigilancia antimicrobiana durante el periodo 1997 al 2001. En esta región se encontró que *S. aureus* fue de los principales patógenos aislados (17.37%) causando sobre todo bacteriemias (56.56%), infecciones en tracto respiratorio bajo (22.38%) y piel y tejidos blandos (17.19%). El porcentaje de MRSA encontrado en todos los aislamientos fue 36.8%; los diagnósticos con mayor porcentaje de MRSA fueron bacteriemia (31.5%) y neumonía (56%), aunque no se encontraron cepas resistentes a vancomicina ni a linezolid³¹.

Recientemente, la vigilancia activa de MRSA en Estados Unidos reportó, durante el año 2012, una tasa de incidencia y mortalidad en infecciones hospitalarias de 5.1 y 1.1 por 100 000 pacientes hospitalizados, respectivamente³.

En México actualmente no se cuenta con una vigilancia epidemiológica activa y pública. Por tanto, los datos disponibles son los reportados por algunos grupos de investigación, los cuales oscilan entre 7.2 y 62% del total de aislamientos dependiendo del tiempo y lugar^{18, 31, 32, 33}.

4.2 AGENTE ETIOLÓGICO

S. aureus es una bacteria comensal principalmente de piel y mucosas del ser humano y otros animales; son cocos Gram positivos, tienen un diámetro entre 0.5 a 1.5 μm , se agrupan normalmente en racimos, son anaerobios facultativos, no móviles y no esporulados³⁵.

4.3 FACTORES DE VIRULENCIA Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE *S. aureus*

S. aureus puede expresar diversas enzimas que degradan componentes estructurales (proteasas, lipasas, nucleasas, hialuronidasas, fosfolipasas C, elastasas) involucradas en la invasión y penetración a tejidos; proteínas de unión a proteínas fibrilares (fibronectina, colágeno, elastina) que le permiten adaptarse e infectar; pueden contener genes que codifican proteínas implicadas en evasión y destrucción de componentes del sistema inmune del hospedero como proteína A, leucocidina Panton-Valentine, modulinas solubles en fenol y proteínas inhibidoras de quimiotaxis; otras más pueden producir enterotoxinas implicadas en intoxicación alimenticia, proteína 1 de shock tóxico causante del síndrome de choque tóxico y proteínas exfoliativas causantes de impétigo y síndrome de piel escaldada^{35, 36, 37, 38}.

Dichos factores de virulencia permiten que *S. aureus* cause, bajo condiciones apropiadas, infecciones oportunistas en diversos sitios anatómicos produciendo una amplia gama de manifestaciones clínicas que pueden ir desde abscesos en piel hasta neumonías necrotizantes, endocarditis y bacteriemias^{35, 36, 37, 38, 39}.

4.4 CARACTERÍSTICAS DE LA PARED BACTERIANA DE *S. aureus*

Por ser una bacteria Gram positiva, *S. aureus* tiene una gruesa capa de peptidoglicano y diversos componentes asociados como proteínas de unión a penicilina (PBP) implicadas en la síntesis del peptidoglicano, beta-lactamasas que proveen resistencia contra antibióticos beta-lactámicos; así como péptidos reticulados, ácido lipoteicoico, ácido teicoico que dan rigidez y elasticidad a la membrana celular y exopolisacáridos capsulares que facilita la adherencia y evita la fagocitosis^{37, 38}.

La síntesis de esta pared se produce por agregación de un pentapéptido al ácido N-acetilmurámico (NAM) y posteriormente a N-acetilglucosamina (NAG). Una glicosiltransferasa agrega diversos residuos de NAM y NAG. Finalmente la PBP (transpeptidasa) transfiere los pentapéptidos a cadenas de peptidoglicanos nacientes, formando los puentes entrecruzados característicos de la pared de peptidoglicano⁴⁰.

4.5 CRITERIOS PARA LA CLASIFICACIÓN DE LAS CEPAS DE *S. aureus*

De acuerdo a lo propuesto por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2015 se clasificará a las cepas como sensibles, intermedias, resistentes y no sensibles de acuerdo a la respuesta *in vitro* de *S. aureus* ante un determinado antibiótico. Los puntos de corte son con base a la MIC, que se define como la concentración mínima de un antibiótico que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo en una prueba de susceptibilidad, sea en agar o dilución en caldo³⁴.

Por tanto, será considerado como cepa sensible cuando los aislamientos sean inhibidos por la concentración de antibiótico establecida; intermedia cuando las MICs se acerquen a los valores establecidos y para quienes la tasa de respuesta pueden ser inferiores al de las cepas sensibles. Cepa resistente implica que el aislamiento no se inhibe con la concentración establecida de antibiótico y no sensible comprende a aislamientos que no entran dentro de la categoría de sensibles, pero aún no se define los valores de MIC a las cuales las cepas son intermedias o resistentes³⁴.

Para el caso específico de MRSA, VISA, VRSA, LRSA y DNSA los puntos de corte se resumen en el cuadro 1³⁴.

Cuadro 1. Rango de sensibilidad y resistencia para meticilina, vancomicina, linezolid y daptomicina (CLSI 2015).	
ANTIBIÓTICO	MIC (µg/mL)
METICILINA	MSSA ≤ 8 MRSA ≥ 16
VANCOMICINA	VSSA ≤ 2 VISA 4 - 8 VRSA ≥ 16
LINEZOLID	LSSA ≤ 4 LRSA ≥ 8
DAPTOMICINA	DSSA ≤ 1 DNSA > 1

Respecto a las cepas hVISA, estas se definen como cepas de MRSA fenotípicamente sensibles a vancomicina ($\text{MIC} \leq 2 \mu\text{g/mL}$) por métodos de laboratorio rutinarios pero que contienen subpoblaciones VISA en el cultivo ($\text{MIC} 4\text{-}8 \mu\text{g/mL}$), las cuales se presentan con una frecuencia entre 10^{-6} y 10^{-4} en el cultivo³⁴.

4.6 SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE *S. aureus*

Cuando los aislamientos de *S. aureus* son sensibles a meticilina (MSSA) se pueden utilizar diversos antibióticos (cuadro 2) como los beta-lactámicos que actúan en la vía de síntesis de peptidoglicanos, impidiendo su formación al unirse a la PBP^{40, 41}. Sin embargo, debido a diversos mecanismos como producción de beta-lactamasas o PBPs modificadas, se estima que a nivel global entre el 90 y 95% de los aislamientos clínicos de *S. aureus* son resistentes a penicilina, disminuyendo las alternativas terapéuticas y dificultando el tratamiento¹.

Cuadro 2. Antibióticos utilizados para infecciones causadas MSSA.		
Familia	Antibiótico	Mecanismo de acción
Penicilina/inhibidor de beta-lactamasas	Amoxicilina/ácido clavulánico	Inhibe síntesis de pared
Cefalosporina 1a generación	Cefalexina	
Penicilina resistente a betalactamas	Cloxacilina	
Inhibidores DHFR/Sulfonamida	Trimetopim/sulfametoxazol	Inhibe metabolismo de ácido fólico
Tetraciclina	Minociclina	Inhibe síntesis proteica (subunidad 30S)
Aminoglucósidos	Gentamicina	
Lincosamida	Clindamicina	Inhibe síntesis proteica (subunidad 50S)
Quinolonas	Levofloxacino	Inhibe replicación y transcripción de DNA (DNA girasa)
Rifamicinas	Rifampicina	Inhibe síntesis proteica (RNA polimerasa)
DHFR, Dihidrofolato reductasa. Modificado de Mensa J et al (2013) ⁴.		

Por otra parte, mediante transferencia horizontal de genes de resistencia de otras especies de *Staphylococcus* spp., *S. aureus* adquirió un gen denominado *mecA* que codifica para una PBP modificada denominada PBP2a, la cual es una proteína de 78 kDa, con baja afinidad a meticilina y a todos los beta-lactámicos semisintéticos⁴². La PBP2a participa en la síntesis del peptidoglicano de la pared celular de la bacteria aun cuando la PBP se encuentre modificada⁴¹.

El gen *mecA* está contenido en un elemento genético móvil denominado cassette cromosomal estafilocócico (*SCCmec*). *mecA* es un operón que contiene tres genes *mecI*, *mecR1*, *mecA*. *mecR1* codifica para una proteína regulatoria que censa la presencia de antibióticos beta-lactámicos con dominio extracelular y activa su dominio citoplásmico (proteasa), por rompimiento autocatalítico. Posteriormente, rompe la proteína inhibitoria (codificada por *mecI*), unida al sitio

operador de *mecA*, por tanto la represión de la transcripción cesa, y permite que se exprese PBP2a⁴³.

A la fecha se han descrito 11 tipos diferentes de SCCmec (Figura 1), todos contienen *mecA* y un gen que codifica para un complejo de recombinasas cromosomales (*ccr*) del SCCmec, que permitirán insertarse en diversas partes del cromosoma⁴³.

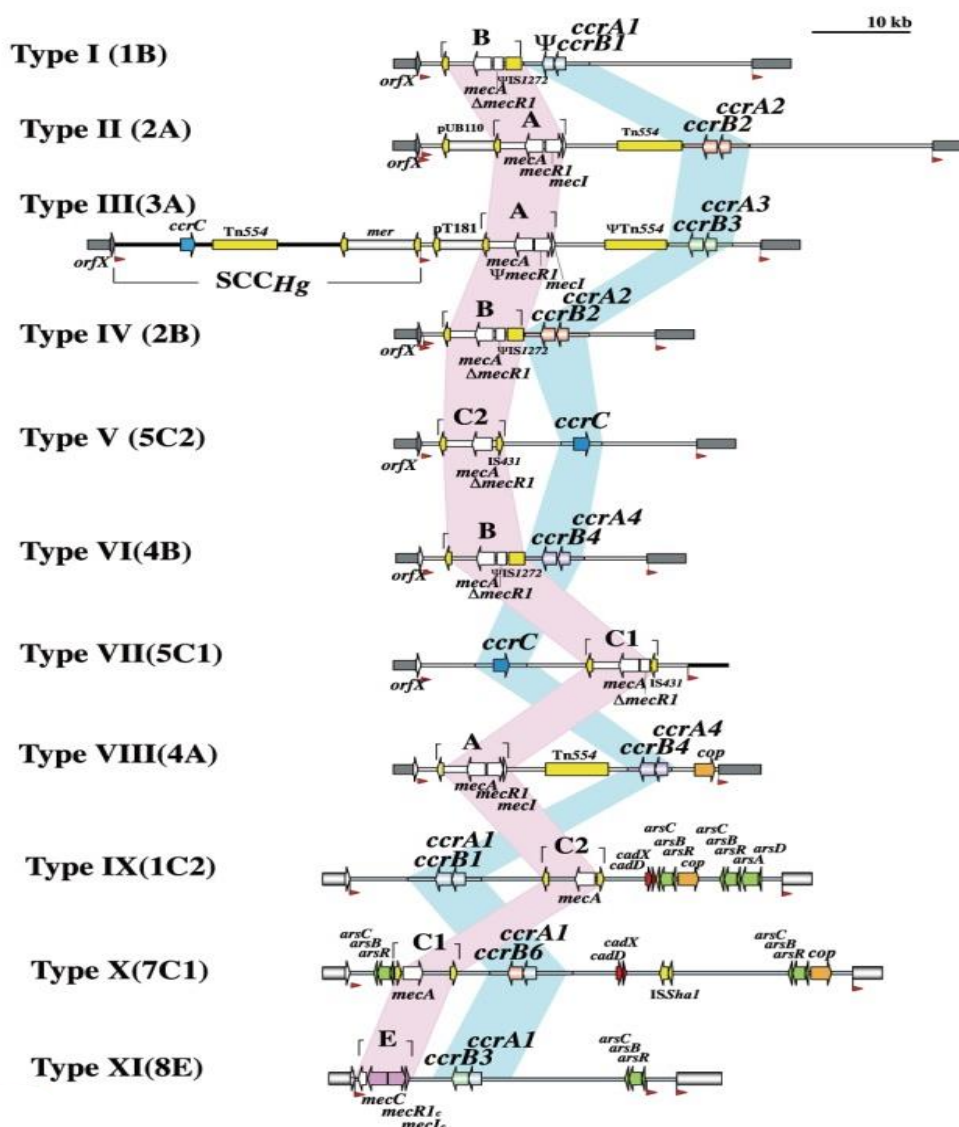


FIGURA 1. Componentes de los diferentes tipos de cassette cromosomal estafilocócico (SCCmec). Obtenido de Hiramatsu K et al (2013)⁴³.

Adicionalmente, estos cassettes pueden contener genes reguladores y secuencias de inserción, como grupo de genes de cápsula, genes de resistencia a ácido fusídico, operón de resistencia a mercurio, elementos móviles del catabolismo de arginina, entre otros que permiten que la bacteria se adapte a ambientes poco favorables. Los tipos I, II y III están implicados en infecciones nosocomiales y resistencia a múltiples fármacos al contener transposones como *Tn554* que produce resistencia a macrólidos, mientras que los tipo IV y V se encuentran asociados a infecciones adquiridas en la comunidad, aunque contienen menos genes de resistencia a antibióticos¹². Todos los MRSA presentan resistencia antibacteriana frente a beta-lactámicos y, dependiendo del tipo de *SCCmec*, también se observará resistencia a otras familias de antibióticos como macrólidos, aminoglucósidos, lincosamidas, entre otros⁴³.

4.7 ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS PARA MRSA

Existe una disminución de alternativas terapéuticas para tratar las infecciones generadas por MRSA. Recientemente, se han aprobado nuevos fármacos para infecciones severas por este patógeno, como ceftarolina-furosemil y ceftobiprole (cefalosporinas de quinta generación); telavancin, dalvabancin y oritavancin (lipoglicopéptidos) y tedizolid (oxazolidinona).

Sin embargo, estos antibióticos son aún más costosos que vancomicina, linezolid y daptomicina, no forman parte del Cuadro Básico de Medicamentos de Salud de México, como vancomicina y linezolid y se encuentran poco disponibles en la República Mexicana^{4, 5, 6}.

4.7.1 Vancomicina

La vancomicina pertenece a la familia de los glicopéptidos, se sintetizó en 1958 pero su uso fue relegado debido a los efectos adversos que producía, tales como nefrotoxicidad y ototoxicidad^{1, 26}. A mediados de la década de 1970 se retomó su

uso principalmente contra *Clostridium difficile* y en los 80's se utilizó ampliamente contra MRSA¹. Su mecanismo de acción consiste en la unión a residuos D -Ala- D -Ala del pentapéptido unido a NAM y NAG, lo cual genera un cambio conformacional que bloquea la acción de la glicosilaciltransferasa, e inhibe a su vez la transpeptidación que conlleva a la interrupción de síntesis de pared celular y por ende la muerte celular²⁵.

No obstante, en el año 2002 se observaron en Estados Unidos las primeras cepas de MRSA resistentes a vancomicina, las cuales presentan una sustitución de D-Ala por un D-lactato en la estructura del pentapéptido, codificado por los genes *van*. Se han descrito varios genes: *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanL*, *vanM* y *vanN* en diversas especies de *Enterococcus* spp., pero los encontrados en MRSA son *vanA*, *vanB* y *vanC*^{25, 26}.

4.7.2 Linezolid

Linezolid, en el año 2000, fue el primer representante de la familia de las oxazolidinonas que se introdujo al mercado y es un fármaco completamente sintético, es decir no deriva de un antibiótico natural¹. Su mecanismo de acción consiste en la inhibición de síntesis de proteínas por unión al sitio 23S de la subunidad ribosomal 50S, evitando la formación de complejo 70S⁴⁴. La resistencia antimicrobiana generada por MRSA se observó un año después de su comercialización¹ y se debe a dos mecanismos, el primero es por mutaciones puntuales del gen 23S, en dónde se produce una sustitución de una guanina por una timina en la posición 2576 (G2576T), que genera una débil unión de linezolid a su sitio de acción⁴⁵. El segundo mecanismo se observó en una cepa de MRSA aislada por primera vez en Colombia en 2005 y es producto de un gen de resistencia natural denominado *cfr* que codifica para una metil-transferasa, la cual agrega un grupo metilo a la adenina ubicada en la posición 2503 (A2503) de la subunidad 23S del rRNA. La asociación de *cfr* con otro gen denominado *ermB* (operon *ermB/cfr*) genera resistencia a todos los antibióticos que se unen a la

subunidad 23S como oxazolidinonas, fenicoles, lincosamidas, pleuromutilinas y estreptogramina A. La asociación con transposones y plásmidos indica su posible carácter móvil⁴⁶.

4.7.3 Daptomicina

Respecto a daptomicina, es el primer representante de la familia de lipopéptidos introducido al mercado en el año 2003¹. Este se inserta en la membrana citoplasmática bacteriana, posteriormente polimeriza y forma canales iónicos, que genera transporte pasivo de potasio (K^+), alteración del potencial de membrana e incapacidad de generación de adenosin trifosfato (ATP) e inducción de la muerte celular. No obstante, al igual que los fármacos anteriores, también se observó generación de resistencia en diversas partes del mundo, obteniéndose las primeras cepas resistentes en el año 2005. El mecanismo de resistencia utilizado por MRSA se encuentra codificado por el factor de resistencia a múltiples péptidos (*mprF*), produce inserción de un residuo de lisina al fosfatidilglicerol de la membrana, y ocasiona un cambio en la carga neta de la membrana, que genera una disminución de la afinidad de daptomicina^{14, 47}.

Además, mutaciones en el gen de la RNA polimerasa bacteriana (*rpoB*), que también produce fenotipos con pared celular más gruesa y carga negativa reducida en la membrana celular puede generar cepas hVISA con baja susceptibilidad a daptomicina²⁷.

4.8 RESISTENCIA A VANCOMICINA, LINEZOLID Y DAPTOMICINA

En varias partes del mundo se han reportado casos de MRSA con resistencia intermedia a vancomicina (VISA), resistencia franca a vancomicina (VRSA); MRSA resistentes a linezolid (LRSA) y no susceptibles a daptomicina (DNSA)^{1, 13, 14} aunque en México no existe ningún caso descrito^{15, 16, 17, 18, 19, 31, 32, 33}.

Sin embargo, recientemente se han descrito hVISA, las cuales aparentemente son estadios tempranos en el desarrollo de VISA y han sido relacionadas con bacteriemias persistentes, endocarditis, osteomielitis, altas tasas de complicaciones y fallo terapéutico^{20, 21 22, 23}. Además, estas cepas se han encontrado en aislamientos con MIC = 2 µg/mL²³ y, contrario a los fenotipos de resistencia anteriormente mencionados, también han sido reportadas en aislamientos de pacientes hospitalizados en México²⁴.

4.9 COMPLEJOS CLONALES

Los fenotipos de resistencia se encuentran comprendidos en complejos clonales (CC)⁴⁹, formados a partir de las secuencias tipo (ST) y el perfil clonal. Las ST son variaciones alélicas de siete genes conservados (carbamato cinasa [*arc*], Shikimato deshidrogenasa [*aro*], glicerol cinasa [*glp*], guanilato cinasa [*gmk*], fosfato acetil transferasa [*pta*], triosafosfato isomerasa [*tpi*] y acetil co-A acetil transferasa [*yqiI*]) que producen un perfil alélico dependiendo de la combinación de mutaciones que se obtengan mediante la secuenciación de estos genes y su posterior análisis en una base de datos disponible en internet *Imperial Collage MLST Multi Locus Sequence Typing* (<http://www.mlst.net>)^{50, 51}. Por su parte, el perfil clonal permite la identificación de las clonas de MRSA, es decir, aislamientos bacterianos con un ancestro común. Se han descrito varias alrededor del mundo como la Chilena, Cordobesa, Pediátrica, Brasileña, Búlgara, Nueva York/Japón, entre otras⁴⁹.

Investigaciones realizadas en el Departamento de Evaluación de Vacunas del INSP han documentado que anteriormente, en nuestro país predominaban los aislamientos pertenecientes a la clona MRSA 16 o Mexicana, que tiene una ST30 y pertenece al CC30. Sin embargo, dicha clona fue desplazada en su totalidad por la Nueva York/Japón, encontrada por primera vez en Nueva York en 1997 y casi simultáneamente en Japón. Actualmente es la que predomina en los aislamientos de MRSA de nuestro país^{15, 16}. Esta clona, a la cual se le atribuyen

todos los aislamientos de VISA y VRSA encontrados en el mundo, tiene una ST5 y pertenece al CC5. Además contiene el *SCCmec* tipo II, es decir uno de los *SCCmec* asociados a infecciones hospitalarias y con la capacidad de albergar a genes productores de resistencia antimicrobiana adicionales a *mecA*^{15, 52}.

4.10 NUEVAS ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS

Afortunadamente, la aprobación de nuevos antibióticos para MRSA (ceftarolina, ceftobiprole, telavancin, dalvabancin, oritavancin y tedizolid), amplía las alternativas antimicrobianas cuando existe fracaso terapéutico de vancomicina, linezolid o daptomicina. No obstante, la mayoría de estos fármacos han sido aprobados sólo para neumonías e infecciones en piel y tejidos blandos, debido a que aún falta terminar ensayos clínicos que evalúen seguridad y eficacia en otras patologías. Además, cada nuevo antibiótico se ve mitigado por el desarrollo de la resistencia antimicrobiana. Por tanto, para garantizar la longevidad de estas opciones, se requiere el uso correcto de los fármacos existentes y de los de nueva generación⁵³.

5. JUSTIFICACIÓN

MRSA es un patógeno importante en infecciones nosocomiales y asociadas a la comunidad, que causa una amplia gama de patologías y capaz de adquirir resistencia a antibióticos de manera rápida¹.

Sin embargo, en México no existe una vigilancia epidemiológica activa y disponible públicamente que busque intencionadamente los aislamientos de MRSA, y los datos sobre la susceptibilidad de *S. aureus* son los reportados por vigilancia pasiva laboratorial establecida por algunos grupos de investigación^{31, 32, 33}.

Además, como se mencionó anteriormente, en nuestro país no se han reportado casos de VISA, VRSA, LRSA ni DNSA, pero recientemente se encontraron cepas hVISA las cuales están fuertemente asociados con la tendencia hacia la resistencia de la MIC de vancomicina, generación de cepas VISA, VRSA y DNSA, así como fallo terapéutico y persistencia de la infección^{15-20, 24, 31, 32}.

Algunas de las causas de la resistencia antimicrobiana son el mal uso de los antibióticos, automedicación, prescripción médica inadecuada y ausencia de una función rectora de los sistemas de salud; la plasticidad genética de los MRSA y la transferencia horizontal de genes de resistencia provenientes de diversos géneros bacterianos^{54, 55, 56}.

Bajo este contexto, no se puede evitar la generación de cepas resistentes a antibióticos debido a la capacidad de adaptación de la bacteria, generación de mutaciones en su genoma o ganancia de genes que permiten seleccionar cepas resistentes. Sin embargo, se puede contener e incluso disminuir la aparición de cepas multirresistentes, atacando las causas generadas por el uso y mal uso de antibióticos^{56, 57}.

Por tanto, este estudio es relevante para describir la susceptibilidad antimicrobiana a vancomicina, linezolid y daptomicina de MRSA y generar información que facilite la toma de decisiones en la modificación de los esquemas de tratamiento de los hospitales participantes, así como puede evidenciar la necesidad de generar políticas que favorezcan el uso racional de antibióticos dentro las mismas instituciones y el establecimiento de una vigilancia epidemiológica activa que garantice la longevidad de los fármacos existentes y los de nueva generación.

6. OBJETIVO GENERAL

Analizar el comportamiento de las cepas invasoras de MRSA aisladas en el periodo 2000-2014 de pacientes procedentes de cuatro hospitales de tercer nivel de atención, con respecto a la susceptibilidad antimicrobiana de vancomicina, linezolid y daptomicina.

7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

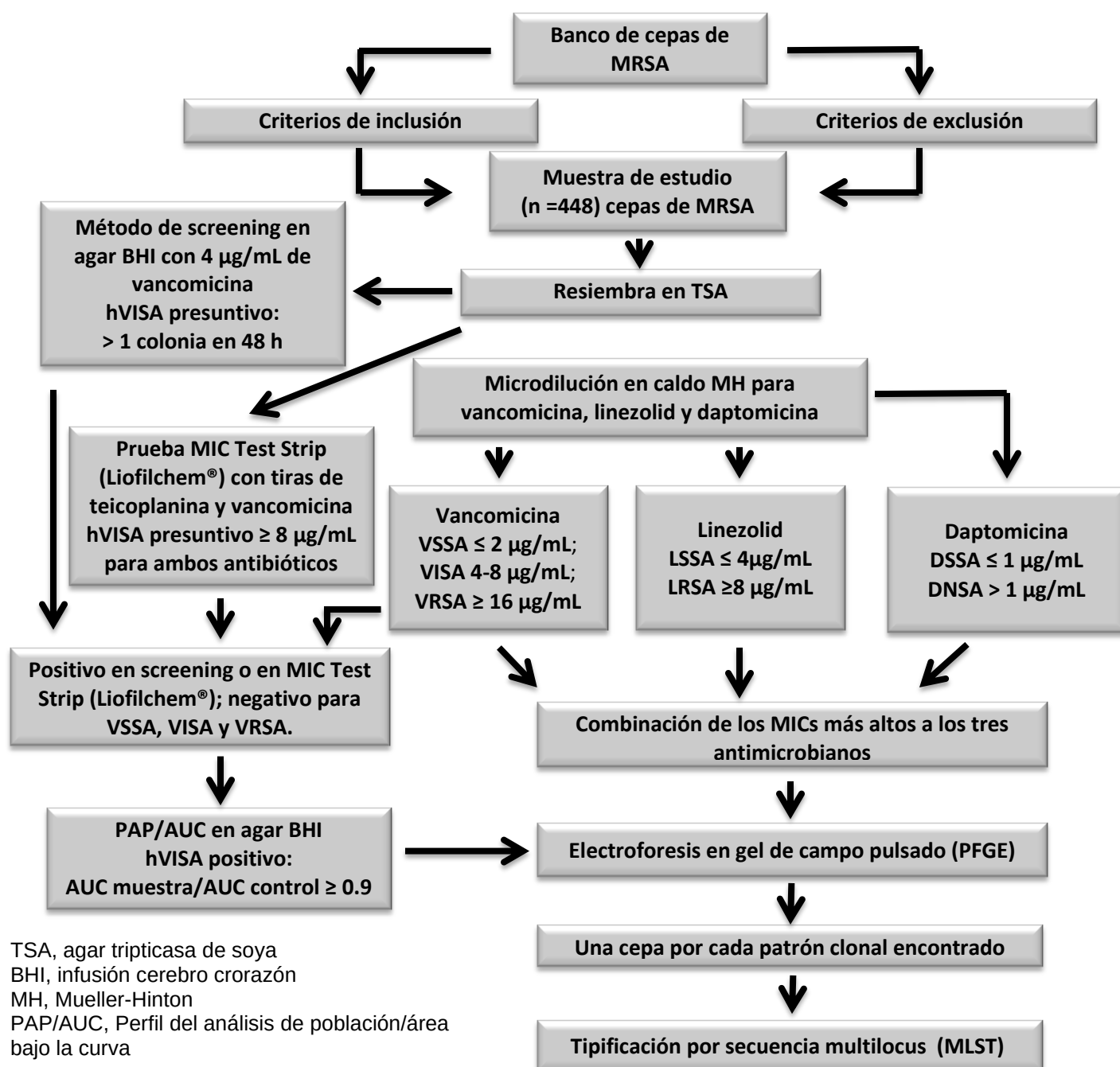
1. Analizar la tendencia de la MIC de vancomicina, linezolid y daptomicina en aislamientos de MRSA.
2. Detectar cepas de MRSA con hetero-resistencia a vancomicina.
3. Detectar las clonas de MRSA con las mayores MIC para los tres antimicrobianos.
4. Determinar las secuencias tipo (ST) de las cepas de MRSA con mayor MIC para los tres antimicrobianos.

8. DISEÑO Y TIPO DE ESTUDIO

Estudio descriptivo y transversal.

9. METODOLOGÍA

9.1 DIAGRAMA DE FLUJO



9.2 LUGAR Y DURACIÓN

El trabajo se realizó en el Departamento de Evaluación de Vacunas, laboratorio 1 planta alta, del Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas (CISEI) del INSP.

El proyecto tuvo una duración de un año.

9.3 POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se trabajó con una muestra total de 448 cepas de MRSA (N = 448), las cuales se encuentran conservadas en el banco de cepas del laboratorio. Del total de cepas, 177 procedían del Instituto Nacional de Cancerología, 73 de la Unidad Médica de Alta Especialidad (UMAE) Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI-IMSS, 155 del Antiguo Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde” y 43 del Hospital San José Tecnológico de Monterrey.

A cada hospital se le solicitó una carta de consentimiento para utilización de sus cepas. Asimismo, el protocolo fue sometido a los Comités de Ética en Investigación, Investigación y Bioseguridad del Instituto Nacional de Salud Pública.

La selección de las cepas se basó de acuerdo a los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

9.3.1 Criterios de inclusión

1. Cepa identificada como MRSA.
2. Aislamiento obtenido durante el periodo 2000 a 2014.
3. Contar con la carta de consentimiento del hospital para la utilización de sus cepas.
4. Un solo aislamiento por paciente.

5. Información de edad, sexo, hospital de procedencia, diagnóstico y sitio de aislamiento.
6. Diagnóstico de infecciones invasivas: bacteriemia, endocarditis, piel, neumonía.

9.3.2 Criterios de exclusión

1. Cepa identificada como MSSA.
2. No aislado durante el periodo de estudio.
3. Hospital no autorizó el uso de sus cepas
4. Presencia de un aislamiento previo del mismo paciente.
5. Información incompleta.

9.4 DESARROLLO DE ESTUDIO

9.4.1 Resiembra de las cepas de MRSA.

Las cepas estaban preservadas a -70 °C y para su utilización se requirió descongelar y sembrarlas en agar de soya tripticasa (TSA, por sus siglas en inglés) y posteriormente incubar durante 18 horas para su desarrollo.

9.4.2 Determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de los aislamientos de MRSA a vancomicina, linezolid y daptomicina.

Posterior al aislamiento de colonias en TSA, se realizó la prueba de microdilución en caldo Mueller- Hinton (MH) para el cual se utilizaron microplacas de 96 pozos y se realizó para cada antibiótico diluciones seriadas dependiendo de sus valores de corte (vancomicina: VSSA ≤ 2 $\mu\text{g/mL}$, VISA 4-8 $\mu\text{g/mL}$, VRSA ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$; linezolid: LSSA ≤ 4 $\mu\text{g/mL}$, LRSA 8 $\mu\text{g/mL}$; daptomicina: DSSA ≤ 1 $\mu\text{g/mL}$, DNSA > 1 $\mu\text{g/mL}$), siguiendo los lineamientos del CLSI 2015 ³⁴.

Los controles de calidad de este procedimiento consistieron en utilizar cepas estándar de la American Type Culture Collection ® (ATCC) de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) y *S. aureus* (ATCC 29213), así como controles de esterilidad y crecimiento.

9.4.3 Identificación de aislamientos hVISA.

9.4.3.1 Prueba de screening

Las cepas aisladas en TSA se sembraron nuevamente en agar infusión cerebro corazón (BHI, por sus siglas en inglés) el cual contenía 4 µg/mL de vancomicina. Se incubaron durante 48 horas a 35°C y al cabo de este tiempo se observó el crecimiento, si existe desarrollo fue considerado como presuntamente positivo para hVISA⁵⁸.

9.4.3.2 Prueba de MIC test strip (Liofilchem ®)

Se realizó mediante tiras de teicoplanina y vancomicina en agar BHI y se incubaron por 48 horas a 35°C. Las cepas que presentaron MICs ≥ 8 µg/mL para ambos antibióticos fueron consideradas como presuntamente positivas para hVISA⁵⁹.

Las cepas controles a utilizar en ambas pruebas fueron *S. aureus* Mu3 (ATCC 700698) y Mu5 (ATCC 700699).

9.4.3.3 Prueba confirmatoria para hVISA

Todas las cepas que fueron presuntamente hVISA en ambas pruebas fueron confirmadas por la metodología PAP/AUC. Para esta técnica se utilizó nuevamente cepas aisladas en TSA a las cuales se les realizó diluciones

seriadas en solución salina partiendo de una concentración de 1×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC) por mL hasta llegar a 1×10^1 UFC/mL. Se tomaron 25 μ L de cada dilución y se sembró en placas de agar BHI con concentraciones 0, 0.25, 0.5, 1, 2 y 4 μ g/mL de vancomicina. El periodo de incubación fue de 48 horas a 37°C. Posteriormente, se contaron las colonias de cada dilución que crecieron expuestas a cada concentración de vancomicina y mediante el software GraphPad Prism 5 (GraphPad Prism; San Diego, CA, USA). Se calculó el área bajo la curva. Finalmente, el AUC de cada cepa se dividió entre el AUC de la cepa control Mu3. El criterio para considerar una cepa de MRSA como hVISA fue un cociente ≥ 0.9 y ≤ 1.3 ⁶⁰.

9.4.4 Determinación del patrón clonal por electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE)

A todas las cepas hVISA confirmadas por PAP/AUC y las cepas que presenten las combinaciones de los MICs más altos a los tres antibióticos se les determinó su respectivo patrón clonal por PFGE. Para ello se empleó la metodología descrita por Chung M *et al.* (2000), la cual implica realizar una lisis bacteriana para la extracción del DNA cromosomal y su posterior digestión enzimática con *Sma*I. La electroforesis se realizó en un equipo CHEF-DR® II (Bio Rad)⁶¹. Los patrones de bandeo obtenidos por PFGE fueron analizados utilizando los criterios de Tenover⁶².

9.4.5 Tipificación por secuencia de multilocus (MLST)

A las cepas a las cuales se les determinó el perfil clonal, también se les determinó la secuencia tipo, mediante la previa extracción de DNA con el kit comercial (Wizard genomic DNA purification kit ®) bajo lo establecido por el fabricante. La amplificación de siete genes altamente conservados en las cepas de *S. aureus* (carbamato cinasa [*arc*], Shikimato deshidrogenasa [*aro*], glicerol cinasa [*glp*], guanilato cinasa [*gmk*], fosfato acetil transferasa [*pta*], triosafosfato

isomerasa [*tpi*] y acetil co-A acetil transferasa [*yqiI*]) se realizó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés)⁶³. Los productos de PCR amplificados, se limpiaron con el KIT Wizard® SV Gel and PCR clean-up System de Promega, siguiendo las indicaciones del fabricante, y se enviaron a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM, Cuernavaca, Mor.

El análisis de las secuencias obtenidas fue realizado con el software DNASTar Lasergen ® (Madison, WI), ingresadas y comparadas en la base de datos disponible en internet perteneciente al *Imperial Collage MLST Multi Locus Sequence Typing* (<http://www.mlst.net>). El establecimiento de los complejos clonales se realizará con el software eBURTS v3 desarrollado por *The Department of Infectious Disease Epidemiology Imperial College London* (<http://www.eburst.mlst.net/>).

9.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se determinó la distribución de las MICs utilizando la prueba de Shapiro-Wilk. La tendencia de las MICs se analizó con el coeficiente de correlación entre el tiempo y la MIC. Debido a que son datos no paramétricos, se utilizó coeficiente de correlación de Spearman. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo. Para representar los sitios de aislamientos de las cepas y el sexo de los pacientes se utilizó porcentajes, mientras que para representar la edad de los pacientes fue utilizado la mediana y rango intercuartílico.

10. REFERENCIAS DE TESIS

1. Sakoulas G, Moellering RC Jr. Increasing antibiotic resistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. Clin Infect Dis 2008; 46 (Suppl 5): S360-7.
2. Moellering RC Jr. Vancomycin: a 50-year reassessment. Clin Infect Dis 2006; 42 Suppl 1: S3-4.
3. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin—United States, 2002. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2002; 51 (26): 565-567.
4. Mensa J, Soriano A, Llinares P, Barberán J, Montejo M, Salavert M, et al. Guía de tratamiento antimicrobiano de la infección por *Staphylococcus aureus*. Rev Esp Quimioter 2013; 26 (Suppl. 1): 1-84.
5. David MZ, Daum RS. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. Clin Microbiol Rev 2010; 23 (3): 616-87.
6. Fung HB, Chang JY, Kuczyński S. A practical guide to the treatment of complicated skin and soft tissue infections. Drugs 2003; 63 (14): 1459-80.
7. Capitano B, Leshem OA, Nightingale CH, Nicolau DP. Cost effect of managing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a long-term care facility. J Am Geriatr Soc 2003; 51 (1): 10-16.
8. Moet GJ, Jones RN, Biedenbach DJ, Stilwell MG, Fritsche TR. Contemporary causes of skin and soft tissue infections in North America, Latin America, and Europe: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998- 2004). Diagn Microbiol Infect Dis 2007; 57 (1): 7-13.
9. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) [online]. Atlanta; The Organization; c2012 [Accessed 2016 Aug 03] Active Bacterial Core Surveillance (ABCS) Report Emerging Infections Program Network Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, 2010 [about 2 screens] Available at: <http://www.cdc.gov/abcs/reports-findings/survreports/mrsa10.pdf>
10. Centro Nacional de Excelencia Tecnológica en Salud (Cenetec). [página en internet]. Distrito Federal; La Organización; c2015 [citado 2016 agosto 03]. Catálogo maestro de guías de práctica clínica [aprox. 2 pantallas] Disponible en: <http://www.cenetec.salud.gob.mx/contenidos/gpc/catalogoMaestroGPC.html>
11. Hospital Infantil de México Federico Gómez. [página en internet]. Distrito Federal; El Hospital; c2011 [citado 2016 agosto 03] Guía para el tratamiento de la endocarditis infecciosa. [aprox 1 pantalla]. Disponible en: http://www.himfg.edu.mx/descargas/documentos/planeacion/Guias/GtrataENDOCARDITI_S_INFECCIOSA.pdf
12. Surgical Infection Society (SIS) [página en internet]; La Organización; c2009 [citado 2016 agosto 03] Estrategias para la prevención de la infección asociada a la atención en salud. [aprox 1 pantalla]. Disponible en: http://www.shea-online.org/Portals/0/Final_Spanish_Translation.pdf
13. Flamm RK, Mendes RE, Hogan PA, Ross JE, Farrell DJ, Jones RN. In vitro activity of linezolid as assessed through the 2013 LEADER surveillance program. Diagn Microbiol Infect Dis 2015; 81 (4): 283-9.
14. McDanel PM, Spooner LM, Mohr JF, Belliveau PP. Use of daptomycin to treat infections with MRSA isolates having vancomycin MIC of 1.5 to 2 µg/mL. Ann Pharmacother 2013; 47 (12): 1654-65.
15. Echániz-Aviles G, Velázquez-Meza ME, Aires-de-Sousa M, Morfín-Otero R, Rodríguez-Noriega E, Carnalla-Barajas N, et al. Molecular characterisation of a dominant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone in a Mexican hospital (1999-2003). Clin Microbiol Infect 2006; 12 (1): 22-28.

16. Velázquez-Meza ME, Hernández-Salgado M, Contreras-Cordero JF, Pérez-Cortes P, Villarreal-Treviño L. Surveillance of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Causing Nosocomial Infections in Five Medical Centers of Monterrey, Nuevo León, México from 2005–2009. *Arch Med Res* 2013; 44 (7): 570-574.
17. Gales AC *et al.* *In vitro* activity of tigecycline, a new glycylcycline, tested against 1,326 clinical bacterial strains isolated from Latin America. *Braz J Infect Dis.* 2005;9(5):348-56.
18. Rivera JO, Ho H, Domínguez DC, Tyroch AH, Antony S, Norte A, et al. Study of MRSA on the U.S./Mexico border. *Travel Med Infect Dis* 2009; 7 (1): 30-34.
19. Llaca-Díaz JM, Mendoza-Olazarán S, Camacho-Ortiz A, Flores S, Garza-González E. One-year surveillance of ESKAPE pathogens in an intensive care unit of Monterrey, Mexico. *Chemotherapy* 2012; 58 (6): 475-481.
20. Charles PG, Ward PB, Johnson PD, Howden BP, Grayson ML. Clinical features associated with bacteremia due to heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 2004; 38 (3): 448-451.
21. Howden BP, Ward PB, Charles PG, Korman TM, Fuller A, du Cros P, et al. Treatment outcomes for serious infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced vancomycin susceptibility. *Clin Infect Dis* 2004; 38 (4): 521-528.
22. Maor Y, Hagin M, Belausov N, Keller N, Ben-David D, Rahav G. Clinical features of heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* bacteremia versus those of methicillin-resistant *S. aureus* bacteremia. *J Infect Dis* 2009; 199 (5): 619-624.
23. Bae IG, Federspiel JJ, Miró JM, Woods CW, Park L, Rybak MJ, et al. Heterogeneous vancomycin-intermediate susceptibility phenotype in bloodstream methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from an international cohort of patients with infective endocarditis: prevalence, genotype, and clinical significance. *J Infect Dis* 2009; 200 (9): 1355-1366.
24. Cázares-Domínguez V, Cruz-Córdova A, Ochoa SA, Escalona G, Arellano-Galindo J, Rodríguez-Leviz A, et al. Vancomycin tolerant, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* reveals the effects of vancomycin on cell wall thickening. *PLoS One* 2015; 10 (3): e0118791.
25. Rubinstein E, Keynan Y. Vancomycin revisited - 60 years later. *Front Public Health* 2014; 31 (2): 217.
26. Rodvold KA, McConeghy KW. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* therapy: past, present, and future. *Clin Infect Dis* 2014; 58 (Suppl 1): S20-7.
27. Cui L, Isii T, Fukuda M, Ochiai T, Neoh HM, Camargo IL, et al. An *RpoB* mutation confers dual heteroresistance to daptomycin and vancomycin in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54 (12): 5222-5233.
28. Seok-Ming Toh, 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. *Molecular Microbiology* 2007; 64 (6): 1506–1514.
29. 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 (2): 311-317.
30. Velazco E, Nieves B, Araque M, Calderas Z. Epidemiology of *Staphylococcus aureus* nosocomial infections in a high-risk neonatal unit. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2002; 20 (7): 321-325.

31. Sader HS, Jones RN, Gales AC, Silva JB, Pignatari AC; SENTRY Participants Group (Latin America). SENTRY antimicrobial surveillance program report: Latin American and Brazilian results for 1997 through 2001. *Braz J Infect Dis* 2004; 8 (1): 25-79.
32. Llaca-Díaz JM, Mendoza-Olazarán S, Camacho-Ortiz A, Flores S, Garza-González E. One-year surveillance of ESKAPE pathogens in an intensive care unit of Monterrey, Mexico. *Chemotherapy* 2012; 58 (6): 475-81.
33. Silva-Sanchez J, Reyna-Flores F, Velazquez-Meza ME, Rojas-Moreno T, Benitez-Diaz A, Sanchez-Perez A, et al. *In vitro* activity of tigecycline against extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* and MRSA clinical isolates from Mexico: a multicentric study. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; 70 (2): 270-273.
34. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. CLSI document M100-S25. Wayne, P.A: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.
35. Cervantes-García E, García-González R, Salazar-Schettino PM. Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Rev Latinoam Patol Clin Med Lab* 2014; 61(1):28-40
36. Bustos-Martínez JA, Hamdan-Partida A, Gutiérrez-Cárdenas M. *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. *Rev Biomed* 2006; 17: 287-305.
37. Gordon RJ, Lowy FD. Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis*. 2008; 46 (Suppl 5): S350-9.
38. InfectionLiu GY. Molecular pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infection. *Pediatr Res* 2009; 65 (5 Pt 2): 71R-77R.
39. Win WC. Cocos grampositivos. En: Win WC, Koneman EW, Allen SD, Procop GW, Jando WM, Woods G L, editores. *Koneman diagnóstico microbiológico. Texto y atlas en color*. 6ª edición. Buenos Aires: Panamericana; 2008. p. 593-638.
40. Prescott L. *Microbiology* 4ª edición, 1999. Mc Graw Hill.
41. Hartman B. Altered penicillin-binding proteins in MRSA. *Antimicrob Agents Chemother* 1981;19:726–735.
42. de Lencastre H, Tomasz A. Reassessment of the number of auxiliary genes essential for expression of high-level methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994; 38: 2590–2598.
43. Hiramatsu K, Ito T, Tsubakishita S, Sasaki T, Takeuchi F, Morimoto Y, et al. Genomic Basis for Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Infect Chemother* 2013; 45 (2): 117-36.
44. Food and Drug Administration (FDA) [online]. Silver Spring: The Organization; c2015 [accessed 2016 aug 03] Zyvox [about 5 screens] Available at: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2014/021130s032,021131s026,021132s031lbl.pdf
45. Klajn R. [online]. London: 2006 [accessed 2015 may 18]. Linezolid. Available at: <http://www.chm.bris.ac.uk/motm/linezolid/linezolid.htm>
46. 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 (6): 1506-14
47. Jörg Andrä, Goldmann T, Ernst CM, Peschel A, Gutschmann T. Multiple peptide resistance factor (mprf)-mediated resistance of *Staphylococcus aureus* against antimicrobial peptides coincides with a modulated peptide interaction with artificial membranes comprising lysyl-phosphatidylglycerol. *J Biol Chem* 2011; 286(21): 18692–18700.
48. Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, Smayevsky J, Bell J, Jones RN, et al. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe,

- and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. Clin Infect Dis 2001; 32 (Suppl 2): S114-32.
49. Rodríguez-Noriega E, Seas C, Guzmán-Blanco M, Mejía C, Alvarez C, Bavestrello L, et al. Evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America. Int J Infect Dis 2010; 14 (7): e560-6.
50. De Colsa Ranero A. *Staphylococcus aureus*: De la genómica a la clínica. Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría 2011; 24 (95): 91-94.
51. Imperial Collage London [online]. London; The University; c2015 [accessed 2016 aug 03] Multi Locus Sequence Typing (MLST) [about 2 screens] Available at: <http://www.mlst.net/>
52. Robinson DA, Enright MC. Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 2003; 47 (12): 3926–3934.
53. Holmes NE, Howden BP. What's new in the treatment of serious MRSA infection? Curr Opin Infect Dis. 2014; 27 (6): 471-478.
54. Collignon P, Athukorala PC, Senanayake S, Khan F. Antimicrobial resistance: the major contribution of poor governance and corruption to this growing problem. PLoS One 2015; 10 (3): e0116746.
55. Yared Santa-Ana-Tellez, Mantel-Teeuwisse AK, Dreser A, Leufkens HG, Wirtz VJ. Impact of Over-the-Counter Restrictions on Antibiotic Consumption in Brazil and Mexico. PLoS One 2013; 8 (10): e75550.
56. Dreser A, Wirtz VJ, Corbett KK, Echániz-Avilés GI. Uso de antibióticos en México: revisión de problemas y políticas. Salud Pública de México 2008; 50 (supl 4): s480-s487.
57. Kloss We, Bamerman TL. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA. Manual of Clinical Microbiology. 6th ed. Washington DC: ASM PressM; 1995.
58. Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, Kawasaki S, Hosoda Y, Hori S, et al. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. Lancet 1997; 350 (9092):1670-1673.
59. Liofilchem [online]. Roseto degli Abruzzi; The Company; c2016 [accessed 2016 aug 03] Multi Locus Sequence Typing (MLST) [about 2 screens] Available at: <http://www.liofilchem.net/it/contact.php>
60. Wootton M, Howe RA, Hillman R, Walsh TR, Bennett PM, MacGowan AP. A modified population analysis profile (PAP) method to detect hetero-resistance to vancomycin in *Staphylococcus aureus* in a UK hospital. J Antimicrob Chemother 2001; 47 (4): 399-403.
61. Chung M, de Lencastre H, Matthews P, Tomasz A, Adamsson I, Aires de Sousa M, et al. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis: comparison of results obtained in a multilaboratory effort using identical protocols and MRSA strains. Microb Drug Resist 2000;6(3):189-98.
62. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol 1995; 33 (9): 2233–2239.
63. Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2000;38(3):1008-15.

11. RESULTADOS (ARTÍCULO CIENTÍFICO)

Vancomycin, Linezolid and Daptomycin Minimum Inhibitory Concentration Creep Among Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from 2000-2014. Insights in Four Mexican Hospitals

Carlos E. Gaspar-Castillo¹, Maria Elena Velazquez-Meza¹; Patricia Cornejo-Juárez²; Patricia Volkow-Fernández²; Rayo Morfín-Otero³; Eduardo Rodríguez-Noriega³; Fortino Solórzano-Santos⁴; Guadalupe Miranda-Navales⁴; Jacobo Ayala-Gaytán⁵; Claudia E. Guajardo-Lara⁵; Jesús Silva-Sánchez¹; Maria Noemí Carnalla-Barajas¹; Gabriela Echániz-Aviles¹

¹ Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública. Cuernavaca, Mor. Mexico

² Instituto Nacional de Cancerología. Mexico City

³ Antiguo Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde”. Guadalajara, Jal. México

⁴ UMAE Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS. Mexico City

⁵ Hospital San José Tecnológico de Monterrey. Nuevo León. México

Corresponding author: Gabriela Echániz-Aviles, Ph.D. Instituto Nacional de Salud Pública. Av. Universidad 655, Colonia Santa María Ahuacatitlán, Cuernavaca, Morelos. México 62100. PN: +52-777-329 3046. E-mail: igechaniz@insp.mx

Running title: Vancomycin MIC “creep” in Mexico

ABSTRACT

Prevalence of MRSA infections has been increasing in Latin American countries including Mexico, along with a slow but stable increase in vancomycin minimum inhibitory concentration (MIC) (Vancomycin MIC creep). The objectives of this study were to assess the tendency of vancomycin, linezolid and daptomycin MIC among MRSA strains recovered from hospitalized patients in four tertiary-care hospitals during 2000-2014 and identify the clonal lineage of MRSA strains with decrease susceptibility (DS). From 448 MRSA clinical isolates collected, 380 (84.8%), 419 (93.5%) and 249 (55.6%) had MICs in the susceptibility breakpoint for vancomycin, linezolid and daptomycin, respectively and MIC creep was found for those antimicrobials in one of each participant hospitals. Three strains were vancomycin intermediate *S. aureus* (VISA) and one showed decreased susceptibility to daptomycin (DNSA); four were heteroresistant VISA (hVISA) and one of them DNSA. One MRSA isolate was DNSA. No isolates were found resistant to linezolid. Molecular analysis of MRSA isolates with DS to any of the antimicrobial tested showed a single clonal pattern related with the New York-Japan clone. Two sequence types were identified ST5-SCCmec II (n=6) and ST1011-SCCmec II (n=2). This is the first report of VISA, DNSA, hVISA-DNSA and VISA-DNSA MRSA strains causing infections in Mexico.

INTRODUCTION

The increasing trend in antimicrobial resistance has become a Public Health emergency driving the need to implement Antimicrobial Stewardship Programs in hospitals¹. This is particular relevant for certain antimicrobials used in hospitals like the glycopeptide vancomycin. This antimicrobial has been the frontline therapy of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) invasive diseases like osteomyelitis, endocarditis, pneumonia, bloodstream infections, toxic shock syndrome, and wound and joint infections²⁻⁴. Unfortunately, increasing reports of *S. aureus* with reduced susceptibility to glycopeptides are arising in many parts of the world including Mexico⁵⁻¹¹. These susceptibility changes include reports of vancomycin-intermediate resistant *S. aureus* (VISA), the presence of heterogeneously vancomycin-intermediate *S. aureus* (hVISA) and a slow but stable increase in vancomycin minimum inhibitory concentration (MIC) (vancomycin MIC creep)^{12,13}. Other antimicrobials such as linezolid and daptomycin were introduced in the past decade; nevertheless, linezolid-resistant *S. aureus* (LRSA) and daptomycin-non susceptible *S. aureus* (DNSA) were reported a few years after their introduction^{14,15}. These strains and vancomycin MIC creep have been associated with therapeutic failure and increase in morbidity and mortality^{16,17}.

According to different surveillance studies performed in several Latin American countries including Mexico, the prevalence of MRSA infections has been increasing rapidly during the last few years from 24.1% in 2005 to 80.0% in 2010¹⁸. In recent years, Cázares-Dominguez *et al*⁹ reported the first hVISA strains at a pediatric hospital. Hence, the objectives of this study were to assess the tendency of vancomycin, linezolid and daptomycin MIC among invasive MRSA strains causing nosocomial infections recovered from hospitalized patients in four tertiary-care hospitals during a period 2000-2014 and to

identify the clonal lineage of MRSA strains with decrease susceptibility to the antimicrobials tested.

MATERIALS AND METHODS

Hospitals and clinical isolates

MRSA isolates were collected from patients hospitalized in four hospitals located in three geographical regions: Center (H1 and H2), North (H3) and West (H4), during the period 2000-2014. All isolates were identified by standard methods. Only one isolate per patient was included for this study.

Antimicrobial susceptibility test

MIC for vancomycin (Sigma-Aldrich; St. Louis, USA), linezolid (Toku-E; Tokyo, Japan), and daptomycin (Sigma-Aldrich; St. Louis, USA) were determined by broth microdilution using Mueller Hinton broth (MHB) (BD; Franklin Lakes, USA) and interpreted according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines¹⁹: VISA (MIC 4-8 µg/mL), VRSA (MIC ≥ 16 µg/mL), LRSA (MIC ≥ 8µg/mL) and DNSA (MIC ≥ 2µg/mL)¹⁵. hVISA were defined by the identification of subpopulations of organisms, amongst vancomycin-susceptible strains, that are able to grow in vancomycin concentrations of ≥4 µg/mL . hVISA Mu3 (ATCC 700698), VISA Mu50 (ATCC 700699), and vancomycin susceptible *S. aureus* (ATCC 29213) were used as control strains.

Screening for hVISA

All MRSA isolates were tested by two methods for detection of hVISA strains:

- a) MIC test strips: Inoculum was prepared from overnight growth on tripticase soy agar (TSA) (BD; Franklin Lakes, USA) plates; bacterial suspension equivalent to a 0.5 McFarland was plated and streaked onto brain heart infusion agar (BHIA) (BD; Franklin Lakes, USA) plates with 5% of blood sheep and vancomycin/teicoplanin MIC test strip (Liofilchem; Roseto Degli Abruzzi, Italy) were applied, according to manufacturer's instructions.
- b) Screening plates: The screening method was performed as described by Hiramatsu *et al*²⁰. This involved inoculating 10 µL of bacterial suspension in MHB equivalent to a 0.5 McFarland on BHIA plates containing 4 µg/mL vancomycin. Plates were incubated for 48 hr at 35°C and growth was detected at 24 and 48 hr. Growth at 24 hr denoted VISA and growth at 48 hr. denoted hVISA.

PAP/AUC method

All MRSA isolates detected as hVISA for at least one method were confirmed by the population analysis profile/area under the curve (PAP/AUC) as described by Wotton *et al*²¹. Briefly, after 24 hr incubation in triptic soy broth (TSB) (BD, Franklin Lakes, USA), cultures were diluted in saline to 1×10^{-3} and 1×10^{-6} , and 10 µL of each dilution were inoculated onto BHIA plates containing 0.5, 1.0, 2.0, 2.5 and 4 µg/mL vancomycin. Colonies were counted after 48 hr incubation at 35°C and the viable count (log₁₀

CFU/ml) was plotted against vancomycin concentration using GraphPad Prism 5 (GraphPad; San Diego, USA). The AUC was measured for each sample and the ratio of test isolate AUC/mean Mu3 AUC was calculated. The criteria to define hVISA and VSSA were a PAP/AUC ratio ≥ 0.90 and a PAP/ AUC ratio <0.90 , respectively. hVISA Mu3 (ATCC 700698), VISA Mu50 (ATCC 700699), and vancomycin susceptible *S. aureus* (ATCC 29213) were used as control strains. AUC was measured for each sample and the ratio of test isolate AUC/mean Mu3 AUC was calculated.

Molecular typing

The genomic relationship of hVISA, VISA, VRSA, LRSA and DNSA strains was investigated by pulse-field gel electrophoresis (PFGE) using *SmaI* digests of chromosomal DNA as described previously²². Strains HPV107, BK2464 and USA300 representing the Iberian, New York/Japan-USA and USA300 clones, respectively, were included in the PFGE gels for comparison. Tenover's criteria were used for interpretation of the PFGE patterns²³ and the relatedness among PFGE profiles was evaluated with BioNumerics software (Applied Maths, Ghent, Belgium). Staphylococcal cassette chromosome *mec* element (SCC*mec*) typing was performed according to Oliveira D. C. et al²⁴. Multilocus sequence typing (MLST) based on sequencing internal fragments of seven *S. aureus* housekeeping genes (*arc*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi* and *yqiL*) was used to define the allelic profile and a sequence type (ST), according to the MLST database (<http://www.mlst.net>) as previously published²⁵.

Statistical analysis

Statistical analysis was carried out using GraphPad Prism 5 software. For analysis of MIC trends over time, correlation Spearman's r was used. Statistical significance was considered with p values less than 0.05. Gender of patients and isolates were indicated by percentage. The age of patients was indicated by the median and interquartile range (IR).

RESULTS

A total of 448 MRSA isolates were collected from four hospitals during the period 2000-2014. The strains were recovered from clinical specimens: blood cultures (181/42.2%), wound samples (105/24.5%), secretions (41/9.6%), cerebrospinal fluid (38/8.9%), abscesses (27/6.3%), bronchial alveolar lavage (17/4.0%), pleural fluid (15/3.5%) and other specimens (24/5.4%). The median age of the patients by hospitals was 46 years (IR: 34-60 years), 0.5 years (IR: 0.06-3.0 years), 41 years (IR: 27-58 years) and 38 years (IR: 24-53 years) for H1 to H4, respectively. Overall, 55.6% of patients were male (H1: 41.5%; H2: 63.5%; H3: 62.8% and H4: 66.5%).

Antimicrobial susceptibility

MIC values for vancomycin ranged from 0.5 to 4.0 $\mu\text{g/mL}$, for linezolid from 1.0 to 4.0 $\mu\text{g/mL}$, and from 0.06 to 2.0 $\mu\text{g/mL}$ for daptomycin. Of the total strains, 380 (84.8%), 419 (93.5%) and 249 (55.6%) had MIC in the susceptibility breakpoint for vancomycin, linezolid and daptomycin, respectively. No isolates were resistant to linezolid. Three strains were VISA and one of those was DNSA; two MRSA strains were DNSA as shown

in Table 1. DNSA from hospital H3 was isolated from a pediatric patient who had never been in contact with daptomycin.

Assessment of MIC creep

Strains recovered at H1 hospital had an increase in the vancomycin MIC from 0.5 to 2 µg/mL from 76.9% in 2007 to 90% in 2013 (Figure 1 A), showing a definite increase over the period 2007-2013 ($p<0.0002$). In the other 3 hospitals the vancomycin MIC range remained relatively stable. H2 hospital showed a sharp increase in the percentage of isolates with daptomycin MIC = 1 µg/mL from null percentage in 2000 to 40% in 2014 ($p<0.0035$) (Figure 1 B). For linezolid there was a MIC increase over time in H3 where the proportion of isolates with a MIC = 4 µg/mL increased from 62.5% in 2008 to 100% in 2014 ($p<0.011$) as shown in Figure 1C. No changes were observed in the rest of the participant hospitals.

Screening for hVISA

- a) MIC test strips: The double vancomycin/teicoplanin MIC test strips detected 21 (4.7%) VISA strains and 117 (26.1%) hVISA strains. Of these MRSA strains five isolates showed resistance for both vancomycin and teicoplanin and other six showed resistance only to teicoplanin.
- b) Screening method (4.0 µg/mL vancomycin). Two MRSA strains showed the phenotype of VISA and were detected in hospital H2. Additionally, the same four VISA strains detected by MHB microdilution were positive with the screening method.

PAP/AUC method

A total of 140 MRSA strains (138 from the MIC test strips and 2 from the screening method) were analyzed with this method. Only four strains were confirmed as hVISA, as shown in Figure 2.

Molecular typing

Analysis of the eight MRSA strains with decrease susceptibility to any of the antimicrobials tested showed a single clonal pattern related to the New York-Japan clone, profile C (n=5), C21 (n=2) and C29 (=1). Only two STs were found ST5-SCCmec II (n=6) and a single locus variant ST1011-SCCmec II (n=2) of ST5, all related to the New York/Japan clone. Characteristics of these strains are shown in Table 2.

DISCUSSION

Vancomycin, linezolid and daptomycin are considered alternatives for the treatment of invasive MRSA infections^{26,27}. In this study we analyzed the MIC tendency for the three antibiotics and we report the presence of hVISA, VISA and DNSA strains in four Mexican hospitals during the 2000-2014 period. The MIC trends of vancomycin, linezolid and daptomycin have been analyzed in other countries around the world. However, the MIC creep phenomenon in MRSA strains has produced conflicting results. Several factors may be involved, including the sensitivity of the methods used for susceptibility testing, type of isolates analyzed and statistical analysis applied²⁸. In this study, we found vancomycin; linezolid and daptomycin MIC creep in three of the participant hospitals (H1, H2 and H3, respectively), no increase in vancomycin MIC was found in hospital H4 in

which the use of vancomycin has been restricted for the last 10 years (RMO personal communication). These findings are consistent with other authors. A study in two German cities²⁹ only reported vancomycin MIC creep in isolates from one city, whereas the other city did not show a relevant increase in vancomycin MIC. In five Greek hospitals³⁰, a study of MRSA strains showed a significant increase of linezolid MIC, meanwhile daptomycin and vancomycin MIC decreased. In a study in India³¹ reported MIC tendency in vancomycin and linezolid increased but not in daptomycin.

The clinical implications of our findings underscore the importance of the slow but sustained increase in resistance to vancomycin, daptomycin, and linezolid. In a 2004 report Sakoulas et al. described that in the treatment of MRSA bacteremia with vancomycin, treatment success occurred more frequently (55.6%) when the isolate had a vancomycin MIC < 0.5 mic/ml versus 9.5% effective with a vancomycin MIC of 1-2 µg/mL³². In a different approach Moise et al. in 2007³³ demonstrated that the time to clearance of MRSA bacteremia in patients treated with vancomycin was longer with MRSA isolates with a vancomycin MIC of 2.0 µg/mL compared to the clearance that occurred when the MRSA isolate had a MIC of <1.0 µg/mL, and concluded that these findings would help in the selection of a more appropriate therapy for MRSA bacteremia. Finally, mortality associated with MRSA bacteremia is greater when the MRSA strain had a vancomycin MIC > 1 µg/mL, and persistent or recurrent MRSA bacteremia occurs more frequently in isolates with an elevated teicoplanin or vancomycin MIC.^{13,34}

The prevalence of VISA, VRSA, LRSA and DNSA isolates is still uncommon worldwide. The SENTRY Antimicrobial Surveillance Program in which 2878 *S. aureus* (both methicillin susceptible and MRSA) were analyzed, among others from the 2011-2014 period, all were sensitive for vancomycin, linezolid and daptomycin³⁵. Recently, Maor et

al³⁶ reported the presence of 14 hVISA and 32 MRSA causing infectious endocarditis in an 8-year study in Israel with daptomycin MIC higher in hVISA strains and high mortality rates (57-66%) in both groups. The LEADER surveillance program reported data during the period 2000-2014 from 1465 MRSA strains, and found no resistance to vancomycin, only one MRSA strain with MIC of 4 µg/ml, three MRSA strains that were resistant to linezolid and one DNSA³⁷. Garza-González et al¹⁸ reported on the prevalence of MRSA in Latin America between 2004 and 2010 as part of the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial and found all MRSA isolates (1467) susceptible to linezolid and vancomycin. Fortunately, vancomycin resistant *S. aureus* (VRSA) are seldom reported. By the end of 2013, there were 13 VRSA reported in the United States (US)³⁸, one in Portugal³⁹ and another one in Brasil⁴⁰. Even though it has been demonstrated that the particular mutated genes responsible for the VISA phenotype are not unique to a particular MRSA lineage⁴¹, it is interesting to mention that twelve of the 13 VRSA reported in the US belong to the clonal complex CC5 as the MRSA strains reported with decreased susceptibility to vancomycin, linezolid and daptomycin in this study. The New York/Japan clonal lineage is widely found in the US and Europe⁴², and has been circulating in Mexican hospitals (H1, H2 and H4, among others) since the beginning of year 2000⁴³⁻⁴⁵. The ST1011 found in this study has been reported since 2009 in California, US and is SLV of ST5 (<http://www.mlst.net>).

Although, most MRSA strains in this study were susceptible to vancomycin, an important percentage (84.6%) had MICs in the upper susceptibility breakpoint. However, this data is consistent with previously studies reported in other Mexican hospitals^{43,46} and the rate of VISA strains found in this study (n=3/0.7%) is similar to the VISA prevalence rate described around the world (<1%)^{6,31,47,48}. This is the first report of VISA, DNSA, hVISA-DNSA and VISA-DNSA strains causing infections in Mexico. The frequent use of

vancomycin to treat MRSA infections has increased the selective pressure of MRSA with reduced susceptibility to vancomycin. VISA strains represent bacterial mutant with modestly increased vancomycin MIC (3-8 µg/mL), and emerge during antimicrobial therapy with vancomycin⁴². This pattern has continued in linezolid and daptomycin, but unlike any of the anti-staphylococcal antimicrobials, resistance to vancomycin took several decades to be reported. For linezolid, there were no LRSA strains, but nonetheless, 93.5% of the isolates had a MIC in the upper susceptibility value. This result may have been influenced by the methodology or type of antimicrobial used. For daptomycin, the proportion of MRSA strains with MIC in the range of 0.5-1 µg/mL was 94%, and the rate of DNSA strains was low. A worrying issue is the fact that one pediatric patient in the study presented with a DNSA without previous exposure to this antibiotic. It has been shown that *S. aureus* strains with higher vancomycin MICs also tend to have higher daptomycin MICs and this can occur without exposure to daptomycin⁴⁹

A variable rate of hVISA strains has been described, ranging for 0 to 50%, depending on the geographic location, population under study and the methodology applied. The rate of hVISA strains obtained in this study was lower (0.89%) compared with other studies¹². Several factors may have influenced our results. Detection of hVISA is difficult and thus several methodologies have been tested. In our hands, detection by the double MIC test strip did not allow us to detect hVISA strains and we identified hVISA strains by the screening method. PAP/AUC is the gold standard method for detection of heterogenous resistance to vancomycin but might not be available in many clinical settings. Another important factor is the instability of the phenotype once some isolates are frozen and stored. This phenomenon is more prevalent in hVISA than in more-stable VISA isolates, probably due to their heterogeneous expression of susceptibility⁵⁰. In our study, all strains were stored at -80°C and thawed a maximum of two times.

Important limitations of our study include the lack of consecutive isolates in some hospitals, as we did not have access to the clinical reports including type and time of antimicrobial treatments; we could not assess the efficacy of treatment. We consider taking this in consideration for future studies.

We describe MIC trends for vancomycin, linezolid and daptomycin in MRSA Mexican hospitals, and report for first time VISA strains in Mexico. Vancomycin is the cornerstone of MRSA therapy and even though most of clinical *S. aureus* isolates remain susceptible, the vancomycin creep reported in this and other studies is evidence that, MRSA antimicrobial susceptibility trends are changing. These findings can have clinical consequences and Public Health implications that pose new challenges that need to be tackled through active surveillance of antimicrobial resistances and reinforce the mandatory implementation of Antimicrobial Stewardship Programs in all hospitals.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank physicians, microbiologists and patients from the participant hospitals. CE Gaspar-Castillo is a M. Sc. student from the Program of Infectious Diseases of the Instituto Nacional de Salud Pública, supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). We very much appreciate laboratory support from students Juan Carlos Soto-Benitez and Oliver Gerardo Moreno-Aguilera.

Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

Reference List

1. **Spellberg, B., M. Blaser, R. J. Guidos, H. W. Boucher, J. S. Bradley, B. I. Eisenstein, D. Gerding, R. Lynfield, L. B. Reller, J. Rex, D. Schwartz, E. Septimus, F. C. Tenover, and D. N. Gilbert.** 2011. Combating antimicrobial resistance: policy recommendations to save lives. *Clin. Infect. Dis.* **52 Suppl 5**:S397-S428.
2. O'Neill, J. Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations. 1-76. 19-5-2016. London, UK, Wellcome Trust.
3. **Rice, L. B.** 2008. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *J. Infect. Dis.* **197**:1079-1081.
4. **Lowy, F. D.** 1998. *Staphylococcus aureus* infections. *N. Engl. J. Med.* **339**:520-532.
5. **Walters, M. S., P. Eggers, V. Albrecht, T. Travis, D. Lonsway, G. Hovan, D. Taylor, K. Rasheed, B. Limbago, and A. Kallen.** 2015. Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* - Delaware, 2015. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* **64**:1056.
6. **Huang, S. H., Y. C. Chen, Y. C. Chuang, S. K. Chiu, C. P. Fung, P. L. Lu, L. S. Wang, T. L. Wu, and J. T. Wang.** 2015. Prevalence of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) and heterogeneous VISA among methicillin-resistant *S. aureus* with high vancomycin minimal inhibitory concentrations in Taiwan: A multicenter surveillance study, 2012-2013. *J. Microbiol. Immunol. Infect.*
7. **Di, G. S., B. Perazzi, A. M. Ordonez, G. S. De, M. Foccoli, M. B. Lasala, S. Garcia, C. Vay, A. Famiglietti, and M. Mollerach.** 2015. Clinical, microbiological, and genetic characteristics of heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* bacteremia in a teaching hospital. *Microb. Drug Resist.* **21**:25-34.
8. **Liu, C., Z. J. Chen, Z. Sun, X. Feng, M. Zou, W. Cao, S. Wang, J. Zeng, Y. Wang, and M. Sun.** 2015. Molecular characteristics and virulence factors in methicillin-susceptible, resistant, and heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* from central-southern China. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **48**:490-496.

9. **Cazares-Dominguez, V., A. Cruz-Cordova, S. A. Ochoa, G. Escalona, J. Arellano-Galindo, A. Rodriguez-Leviz, R. Hernandez-Castro, E. O. Lopez-Villegas, and J. Xicohtencatl-Cortes.** 2015. Vancomycin tolerant, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* reveals the effects of vancomycin on cell wall thickening. *PLoS. One.* **10**:e0118791.
10. **Mirza, H. C., B. Sancak, and D. Gur.** 2015. The prevalence of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* and heterogeneous VISA among methicillin-resistant strains isolated from pediatric population in a Turkish university hospital. *Microb. Drug Resist.* **21**:537-544.
11. **Gardete, S., M. Aires-de-Sousa, A. Faustino, A. M. Ludovice, and L. H. de.** 2008. Identification of the first vancomycin intermediate-resistant *Staphylococcus aureus* (VISA) isolate from a hospital in Portugal. *Microb. Drug Resist.* **14**:1-6.
12. **Dhand, A. and G. Sakoulas.** 2012. Reduced vancomycin susceptibility among clinical *Staphylococcus aureus* isolates ('the MIC Creep'): implications for therapy. *F1000. Med. Rep.* **4**:4.
13. **Uckay, I., L. Bernard, M. Buzzi, S. Harbarth, P. Francois, E. Huggler, T. Ferry, J. Schrenzel, A. Renzoni, P. Vaudaux, and D. P. Lew.** 2012. High prevalence of isolates with reduced glycopeptide susceptibility in persistent or recurrent bloodstream infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**:1258-1264.
14. **Marty, F. M., W. W. Yeh, C. B. Wennersten, L. Venkataraman, E. Albano, E. P. Alyea, H. S. Gold, L. R. Baden, and S. K. Pillai.** 2006. Emergence of a clinical daptomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate during treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia and osteomyelitis. *J. Clin. Microbiol.* **44**:595-597.
15. **Tsiodras, S., H. S. Gold, G. Sakoulas, G. M. Eliopoulos, C. Wennersten, L. Venkataraman, R. C. Moellering, and M. J. Ferraro.** 2001. Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *Lancet* **358**:207-208.
16. **Hu, H. C., K. C. Kao, L. C. Chiu, C. H. Chang, C. Y. Hung, L. F. Li, T. P. Liu, L. C. Lin, N. H. Chen, C. C. Huang, C. T. Yang, and J. J. Lu.** 2015. Clinical outcomes and molecular typing of heterogenous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* bacteremia in patients in intensive care units. *BMC. Infect. Dis.* **15**:444.

17. **Chang, W., X. Ma, P. Gao, X. Lv, H. Lu, and F. Chen.** 2015. Vancomycin MIC creep in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates from 2006 to 2010 in a hospital in China. *Indian J. Med. Microbiol.* **33**:262-266.
18. **Garza-Gonzalez, E. and M. J. Dowzicky.** 2013. Changes in *Staphylococcus aureus* susceptibility across Latin America between 2004 and 2010. *Braz. J. Infect. Dis.* **17**:13-19.
19. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. CLSI document M100-S25. Wayne, P.A: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.
20. **Hiramatsu, K., N. Aritaka, H. Hanaki, S. Kawasaki, Y. Hosoda, S. Hori, Y. Fukuchi, and I. Kobayashi.** 1997. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet* **350**:1670-1673.
21. **Wootton, M., R. A. Howe, R. Hillman, T. R. Walsh, P. M. Bennett, and A. P. MacGowan.** 2001. A modified population analysis profile (PAP) method to detect hetero-resistance to vancomycin in *Staphylococcus aureus* in a UK hospital. *J. Antimicrob. Chemother.* **47**:399-403.
22. **Chung, M., L. H. de, P. Matthews, A. Tomasz, I. Adamsson, S. M. Aires de, T. Camou, C. Cocuzza, A. Corso, I. Couto, A. Dominguez, M. Gniadkowski, R. Goering, A. Gomes, K. Kikuchi, A. Marchese, R. Mato, O. Melter, D. Oliveira, R. Palacio, R. Sa-Leao, S. Santos, I, J. H. Song, P. T. Tassios, and P. Villari.** 2000. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis: comparison of results obtained in a multilaboratory effort using identical protocols and MRSA strains. *Microb. Drug Resist.* **6**:189-198.
23. **Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing, and B. Swaminathan.** 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* **33**:2233-2239.

24. **Oliveira, D. C. and L. H. de.** 2002. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the mec element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* . Antimicrob. Agents Chemother. **46**:2155-2161.
25. **Enright, M. C., N. P. Day, C. E. Davies, S. J. Peacock, and B. G. Spratt.** 2000. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. **38**:1008-1015.
26. **Stefani, S., F. Campanile, M. Santagati, M. L. Mezzatesta, V. Cafiso, and G. Pacini.** 2015. Insights and clinical perspectives of daptomycin resistance in *Staphylococcus aureus*: A review of the available evidence. Int. J. Antimicrob. Agents **46**:278-289.
27. **Pea, F., N. Petrosillo, and J. Garau.** 2015. Clinical pharmacological approach for balancing the use of daptomycin and linezolid in comparison with that of vancomycin in the treatment of MRSA-related infections. Expert. Rev. Anti. Infect. Ther. **13**:927-937.
28. **Edwards, B., K. Milne, T. Lawes, I. Cook, A. Robb, and I. M. Gould.** 2012. Is vancomycin MIC "creep" method dependent? Analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* susceptibility trends in blood isolates from North East Scotland from 2006 to 2010. J. Clin. Microbiol. **50**:318-325.
29. **Kehrmann, J., M. Kaase, F. Szabados, S. G. Gatermann, J. Buer, P. M. Rath, and J. Steinmann.** 2011. Vancomycin MIC creep in MRSA blood culture isolates from Germany: a regional problem?. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **30**:677-683.
30. **Papadimitriou-Olivgeris, M., F. Kolonitsiou, L. Zerva, E. Lebessi, C. Koutsia, E. Drougka, S. Sarrou, N. Giormezis, S. Vourli, A. Doudoulakakis, C. Konsolakis, M. Marangos, E. D. Anastassiou, E. Petinaki, and I. Spiliopoulou.** 2015. Activity of vancomycin, linezolid, and daptomycin against staphylococci and enterococci isolated in 5 Greek hospitals during a 5-year period (2008-2012). Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **83**:386-388.
31. **Niveditha, N. and S. Sujatha.** 2015. Worrisome trends in rising minimum inhibitory concentration values of antibiotics against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* - Insights from a tertiary care center, South India. Braz. J. Infect. Dis. **19**:585-589.

32. **Sakoulas, G., P. A. Moise-Broder, J. Schentag, A. Forrest, R. C. Moellering, Jr., and G. M. Eliopoulos.** 2004. Relationship of MIC and bactericidal activity to efficacy of vancomycin for treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *J. Clin. Microbiol.* **42**:2398-2402.
33. **Moise, P. A., G. Sakoulas, A. Forrest, and J. J. Schentag.** 2007. Vancomycin in vitro bactericidal activity and its relationship to efficacy in clearance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:2582-2586.
34. **Soriano, A., F. Marco, J. A. Martinez, E. Pisos, M. Almela, V. P. Dimova, D. Alamo, M. Ortega, J. Lopez, and J. Mensa.** 2008. Influence of vancomycin minimum inhibitory concentration on the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin. Infect. Dis.* **46**:193-200.
35. **Sader, H. S., M. Castanheira, D. J. Farrell, R. K. Flamm, R. E. Mendes, and R. N. Jones.** 2016. Tigecycline antimicrobial activity tested against clinical bacteria from Latin American medical centres: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2011-2014). *Int. J. Antimicrob. Agents.*
36. **Maor, Y., N. Belausov, D. Ben-David, G. Smollan, N. Keller, and G. Rahav.** 2014. hVISA and MRSA endocarditis: an 8-year experience in a tertiary care centre. *Clin. Microbiol. Infect.* **20**:O730-O736.
37. **Flamm, R. K., R. E. Mendes, P. A. Hogan, J. M. Streit, J. E. Ross, and R. N. Jones.** 2016. Linezolid Surveillance Results for the United States (LEADER Surveillance Program 2014). *Antimicrob. Agents Chemother.* **60**:2273-2280.
38. **Limbago, B. M., A. J. Kallen, W. Zhu, P. Eggers, L. K. McDougal, and V. S. Albrecht.** 2014. Report of the 13th vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from the United States. *J. Clin. Microbiol.* **52**:998-1002.
39. **Melo-Cristino, J., C. Resina, V. Manuel, L. Lito, and M. Ramirez.** 2013. First case of infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *Lancet* **382**:205.

40. **Panesso, D., P. J. Planet, L. Diaz, J. E. Hugonnet, T. T. Tran, A. Narechania, J. M. Munita, S. Rincon, L. P. Carvajal, J. Reyes, A. Londono, H. Smith, R. Sebra, G. Deikus, G. M. Weinstock, B. E. Murray, F. Rossi, M. Arthur, and C. A. Arias.** 2015. Methicillin-Susceptible, Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus*, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **21**:1844-1848.
41. **Mwangi, M. M., S. W. Wu, Y. Zhou, K. Sieradzki, L. H. de, P. Richardson, D. Bruce, E. Rubin, E. Myers, E. D. Siggia, and A. Tomasz.** 2007. Tracking the in vivo evolution of multidrug resistance in *Staphylococcus aureus* by whole-genome sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **104**:9451-9456.
42. **Gardete, S. and A. Tomasz.** 2014. Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Invest* **124**:2836-2840.
43. **Cornejo-Juarez, P., P. Volkow-Fernandez, J. Sifuentes-Osornio, G. Echaniz-Aviles, A. Diaz-Gonzalez, C. Velazquez-Acosta, M. Bobadilla-del-Valle, P. Gordillo-Molina, and M. E. Velazquez-Meza.** 2010. Tracing the source of an outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a tertiary-care oncology hospital by epidemiology and molecular methods. *Microb. Drug Resist.* **16**:203-208.
44. **Echaniz-Aviles, G., M. E. Velazquez-Meza, M. Aires-de-Sousa, R. Morfin-Otero, E. Rodriguez-Noriega, N. Carnalla-Barajas, S. Esparza-Ahumada, and L. H. de.** 2006. Molecular characterisation of a dominant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone in a Mexican hospital (1999-2003). *Clin. Microbiol. Infect.* **12**:22-28.
45. **Velazquez-Meza, M. E., S. M. Aires de, G. Echaniz-Aviles, F. Solorzano-Santos, G. Miranda-Novales, J. Silva-Sanchez, and L. H. de.** 2004. Surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a pediatric hospital in Mexico City during a 7-year period (1997 to 2003): clonal evolution and impact of infection control. *J. Clin. Microbiol.* **42**:3877-3880.

46. **Silva-Sanchez, J., F. Reyna-Flores, M. E. Velazquez-Meza, T. Rojas-Moreno, A. Benitez-Diaz, and A. Sanchez-Perez.** 2011. In vitro activity of tigecycline against extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae and MRSA clinical isolates from Mexico: a multicentric study. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **70**:270-273.
47. **Zhang, S., X. Sun, W. Chang, Y. Dai, and X. Ma.** 2015. Systematic review and meta-analysis of the epidemiology of vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* isolates. *PLoS. One.* **10**:e0136082.
48. **Rong, S. L. and S. N. Leonard.** 2010. Heterogeneous vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*: a review of epidemiology, diagnosis, and clinical significance. *Ann. Pharmacother.* **44**:844-850.
49. **Sakoulas, G., J. Alder, C. Thauvin-Eliopoulos, R. C. Moellering, Jr., and G. M. Eliopoulos.** 2006. Induction of daptomycin heterogeneous susceptibility in *Staphylococcus aureus* by exposure to vancomycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:1581-1585.
50. **Riederer, K., S. Iyer, S. Shemes, V. Dejaeghere, M. Sharma, S. Szpunar, and R. Khatib.** 2015. Effects of frozen storage on detection of intermediate vancomycin susceptibility and heteroresistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* blood isolates. *J. Clin. Microbiol.* **53**:2392.

Table 1. Distribution of minimal inhibitory concentrations (MIC) of MRSA clinical isolates for vancomycin, linezolid and daptomycin in four tertiary-care hospitals in Mexico.

ANTIMICROBIAL	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	H1 (n=177)		H2 (n=73)		H3 (n=43)		H4 (n=155)		TOTAL (N=448)	
		No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
VANCOMYCIN	0.5	2	1.1	0	0.0	0	0.0	0	0.0	2	0.4
	1	38	21.5	19	26.0	5	11.6	2	1.3	64	14.3
	2	134	75.7	54	74.0	38	88.4	153	98.7	379	84.6
	4	3	1.7	0	0.0	0	0.0	0	0.0	3	0.7
LINEZOLID	1	0	0.0	0	0.0	2	4.7	1	0.6	3	0.7
	2	12	6.8	3	4.1	4	9.3	8	5.2	27	6.0
	4	165	93.2	70	95.9	37	86.0	146	94.2	418	93.3
DAPTOMYCIN	0.25	1	0.6	1	1.4	2	4.7	5	3.2	9	2.0
	0.5	43	24.3	28	38.4	28	65.1	74	47.7	173	38.6
	1	132	74.6	42	57.5	12	27.9	63	40.6	249	55.6
	2	1	0.6	1	1.4	1	2.3	0	0.0	3	0.7

The antimicrobial were tested by MHB microdilution, according the CLSI (2016) criteria. VSSA $\leq 2\mu\text{g/mL}$; VISA 4-8 $\mu\text{g/mL}$; VRSA $\geq 16\mu\text{g/mL}$. LSSA $\leq 4\mu\text{g/mL}$; LNSA $\geq 8\mu\text{g/mL}$. DSSA $\leq 1\mu\text{g/mL}$; DNSA $\geq 2\mu\text{g/mL}$.

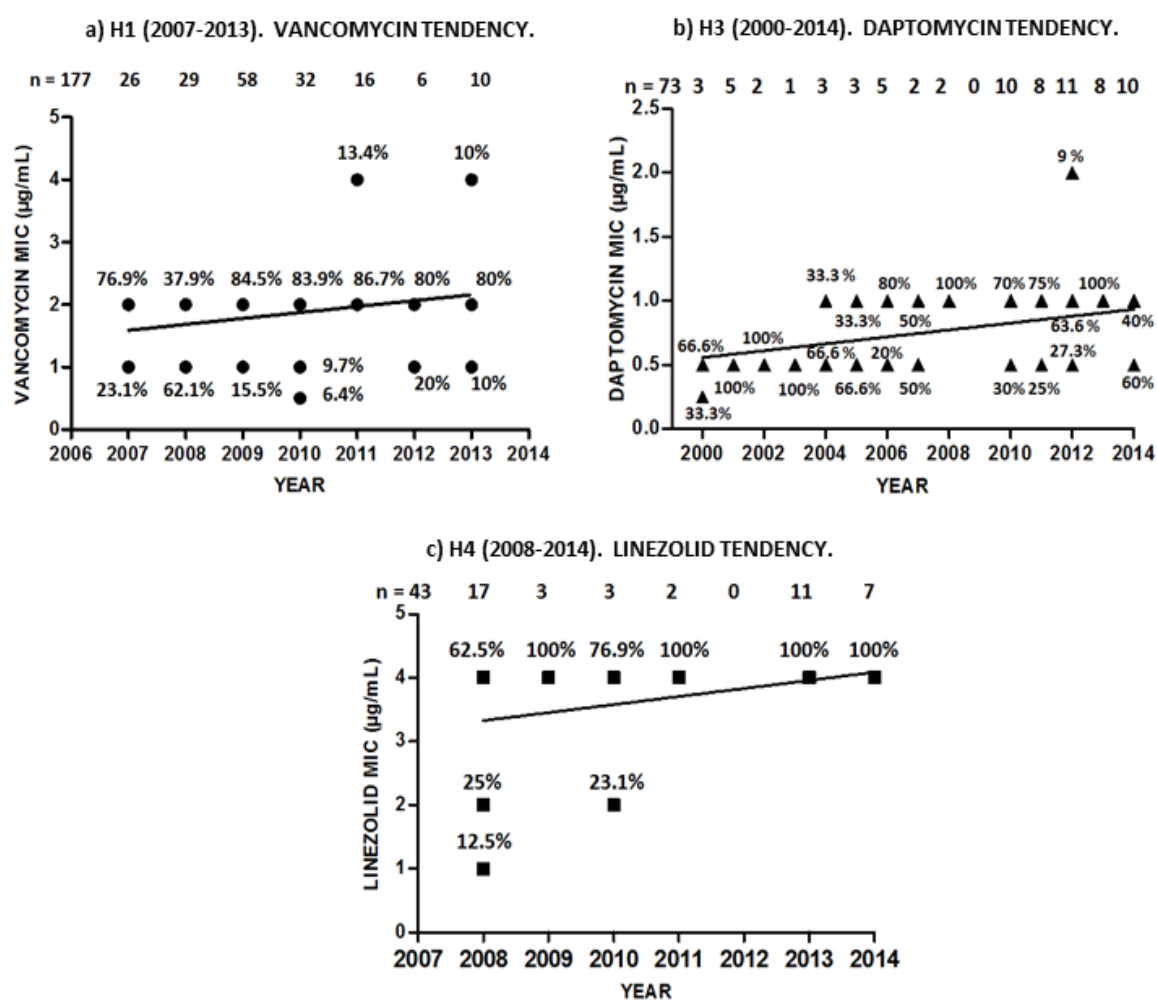
Table 2. Characteristics of MRSA clinical isolates with decreased susceptibility to vancomycin and daptomycin isolated in four Mexican hospitals (2000-20014).

Strain	Sex	Age (year)	Clinical sources	Date of sample	Hospital ward	Vancomycin MIC (µg/mL)	Linezolid MIC (µg/mL)	Daptomycin MIC (µg/mL)	Clonal pattern	Sequence type
254 H1	F	47	Retromolar trigone	2011	Head and neck	4 VISA	4.0 LSSA	1 DSSA	C	ST5
255 H1	F	48	Blood culture	2011	Gynecology	4 VISA	4.0 LSSA	1 DSSA	C21	ST5
256 H1	F	47	Surgical wound	2011	Gastro-enterology	2 VISA	4.0 LSSA	0.5 DSSA	C29	ST5
290 H1	M	35	Blood culture	2013	Hematology	4 VISA	4.0 LSSA	2 DNSA	C21	ST5
3099 H2	M	4	Blood culture	2012	PICU	2 hVISA	4.0 LSSA	2 DNSA	C	ST1011
50 H3	F	63	CSF	2010	Surgery	2 VSSA	4.0 LSSA	2 DNSA	C	ST1011
189 h4	M	36	Pleural liquid	2003	Infectology	2 hVISA	4.0 LSSA	0.5 DSSA	C	ST5
309 H4	M	12	CSF	2003	MLP	2 hVISA	4.0 LSSA	0.5 DSSA	C	ST5

VSSA ≤ 2 µg/mL; VISA 4-8 µg/mL; hVISA: VSSA strains with VISA subpopulation. LSSA ≤ 4 µg/mL. DSSA ≤ 1 µg/mL; DNSA > 1 µg/mL (CLSI, 2016)

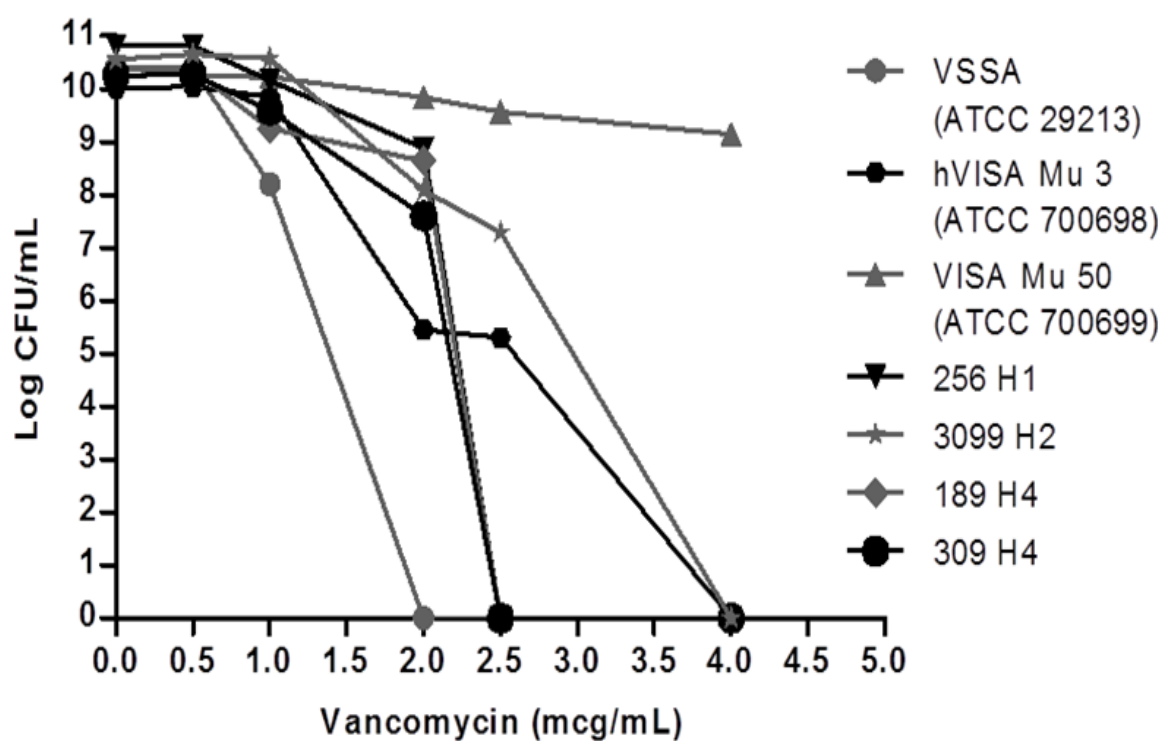
F, Female. M, Male. CSF, cerebrospinal fluid. PICU, pediatric intensive care unit.

Figure 1. Vancomycin, daptomycin and linezolid MIC “creep” in MRSA clinical strains isolated in Mexico. Figure 1a) Vancomycin MIC tendency in hospital H1; Figure 1b) Daptomycin MIC tendency in hospital H3; Figure 1c) Linezolid MIC tendency in hospital H4.



Correlation Spearman's r for vancomycin MIC in H1 was 0.294 (95% CI: 0.148-0.426). For Daptomycin MIC in H2 was 0.3132 (95% CI: 0.083-0.51) and Linezolid MIC in H3 was 0.387 (95% CI: 0.089-0.622)

Figure 2. Population analysis profile of the heterogeneous vancomycin intermediate MRSA (hVISA) strains recovered from clinical isolates during 2000-2014.



PAP/AUC method was completed for 140 MRSA strains were positive at least one screening method. Each MRSA strains were compared with AUC of hVISA Mu3 (AUC = 23.0) according Wootton M., et al (2001). 256 H1: 22.59/23.0 = 0.98; 3099 H2: 29.25/23 = 1.27; 189 H4: 21.20/23.0 = 0.92; 309 H4 = 20.6/23.0 = 0.9.

Dear Dr. Echaniz-Aviles:

Your manuscript entitled "Vancomycin, Linezolid and Daptomycin Minimum Inhibitory Concentration Creep Among Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from 2000-2014. Insights in Four Mexican Hospitals" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in *Microbial Drug Resistance*.

Your manuscript ID is MDR-2016-0214.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <https://mc.manuscriptcentral.com/mdr> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/mdr>.

Thank you for submitting your manuscript to *Microbial Drug Resistance*.

Sincerely,
Microbial Drug Resistance Editorial Office