

NUEVA  
EDICIÓN  
2018

# INTERPRETACIÓN DEL ANTIBIOGRAMA EN LA PRÁCTICA CLÍNICA DIARIA

CURSO  
ONLINE

18 DE ABRIL - 13 DE JUNIO 2018 - [ATBgrama2018.evimed.net](http://ATBgrama2018.evimed.net)



redEMC  
Infectología

EUCAST



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA

evimed

# Mecanismos de resistencia a los antibióticos

Dra. Ana C. Gales  
Dr. Rafael Vignoli  
(Coordinadores)



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



## Tabla de contenido

### Sección I: Mecanismos de resistencia a los antibióticos que actúan sobre la envoltura bacteriana 4

<b>1. Resistencia a las Polimixinas</b>	4
1.1. Mecanismo de Acción de las Polimixinas	6
1.2. Mecanismo de Resistencia a las Polimixinas	8
1.3. Mecanismo Genético de Control de la Resistencia a las Polimixinas	13
1.4. Detección en Laboratorio de la Resistencia a las Polimixinas	17
1.5. Referencias	19
<b>2. Resistencia a Fosfomicina</b>	22
2.1. Mecanismo de Acción de la Fosfomicina	22
2.2. Mecanismo de Resistencia a la Fosfomicina	24
2.3. Detección en Laboratorio del Fenotipo de Resistencia a la Fosfomicina	29
2.4. Referencias	31
<b>3. Resistencia a Antibióticos <math>\beta</math>-lactámicos en Bacilos Gram negativos</b>	34
3.1. Generalidades	34
3.2. Mecanismo de acción	39
3.3. Clasificación por grupos	39
3.4. Mecanismos de resistencia adquirida a $\beta$ -lactámicos	42
3.5. Diagnóstico de laboratorio	48
3.6. Referencias	54
<b>4. Resistencia a Antibióticos <math>\beta</math>-lactámicos en Cocos Gram positivos</b>	59
4.1. Introducción	59
4.2. Mecanismos de resistencia	59
4.3. Métodos de estudio en el laboratorio clínico	70
4.4. Referencias	74
<b>5. Resistencia a los glicopéptidos</b>	78
5.1. Mecanismo de acción de los glicopéptidos	78
5.2. Mecanismo de resistencia a los glicopéptidos	80
5.3. Detección en el laboratorio del fenotipo de resistencia a los glicopéptidos	79



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



5.4. Referencias	87
<b>6. Lipopéptidos</b>	91
6.1. Mecanismo de acción de los lipopéptidos	92
6.2. Mecanismo de resistencia a los lipopéptidos	95
6.3. Detección laboratorial del fenotipo de resistencia a los lipopéptidos	101
6.4. Referencias	102
Sección II: Principales antibióticos que actúan en la síntesis proteica	107
<b>7. Resistencia a Aminoglucósidos</b>	107
7.1. Mecanismo de acción de los aminoglucósidos	110
7.2. Mecanismos de resistencia a los aminoglucósidos	111
7.3. Referencias	120
<b>8. Gliciliclinas</b>	126
8.1. Breve Historia y Surgimiento de las Gliciliclinas	126
8.2. Mecanismo de Acción de las Gliciliclinas	128
8.3. Mecanismos de Resistencia a las Gliciliclinas	129
8.4. Detección en Laboratorio del Fenotipo de Resistencia a las Gliciliclinas	132
8.5. Referencias	134
<b>9. Macrólidos y Lincosaminas</b>	137
9.1. Macrólidos	137
9.2. Lincosamidas	144
9.3. Referencias	146
<b>10. Resistencia a las Oxazolidinonas</b>	150
10.1. Mecanismo de acción de la Oxazolidinonas	151
10.2. Mecanismo de resistencia a las Oxazolidinonas	151
10.3. Prueba de sensibilidad a las Oxazolidinonas	155
10.4. Referencias	157
Sección 3: Antibióticos activos sobre la síntesis del ADN	160
<b>11. Resistencia a Quinolonas</b>	160
11.1. Estructura química	160
11.2. Evidencia del impacto de la resistencia de bajo nivel a fluoroquinolonas	168



GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



## Sección I: Mecanismos de resistencia a los antibióticos que actúan sobre la envoltura bacteriana

### 1. Resistencia a las Polimixinas

#### **Willames Marcos Brasileiro da Silva Martins**

Biomédico y Magíster en Biociencias y Biotecnología en Salud;  
Doctorando en Ciencias Básicas en la Disciplina de Infectología,  
Departamento de Medicina,  
Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP),  
Brasil.

#### **Ana Cristina Gales**

Profesora Adjunta de Infectología del Departamento de Medicina,  
Escuela Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP);  
Investigadora 1A del Consejo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (CNPq);  
Miembro de la Cámara Técnica de Resistencia Microbiana (CATREM),  
Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria (ANVISA);  
Coordinadora Clínica del Consejo Brasileiro de Susceptibilidad Antimicrobiana (BrCAST),  
Brasil.

Las polimixinas son antimicrobianos polipéptidos con actividad bactericida, fueron descubiertas en 1947, como un producto de microorganismos ambientales pertenecientes al género *Paenobacillus* spp. Se descubrieron cinco tipos de polimixinas (polimixina A-E), no obstante, dada la gran toxicidad de algunos de estos compuestos, sólo están disponibles para uso clínico la polimixina B (producida por el *Paenobacillus polymyxa*) y la polimixina E (producida por el *Paenobacillus colistinus*), también conocida como colistina<sup>1,2</sup>. Ambas polimixinas presentan idéntica actividad *in vitro*, compartiendo un mismo mecanismo de acción, mostrando diferencias sólo en su estructura química (**Figura 1**). La polimixina B se utiliza en el formato de sulfato de polimixina B, mientras que la colistina se utiliza en forma de colistimetato de sodio, una prodroga que precisa ser inicialmente metabolizada para ser transformada en un compuesto farmacológicamente activo (colistina)<sup>2,3</sup>.

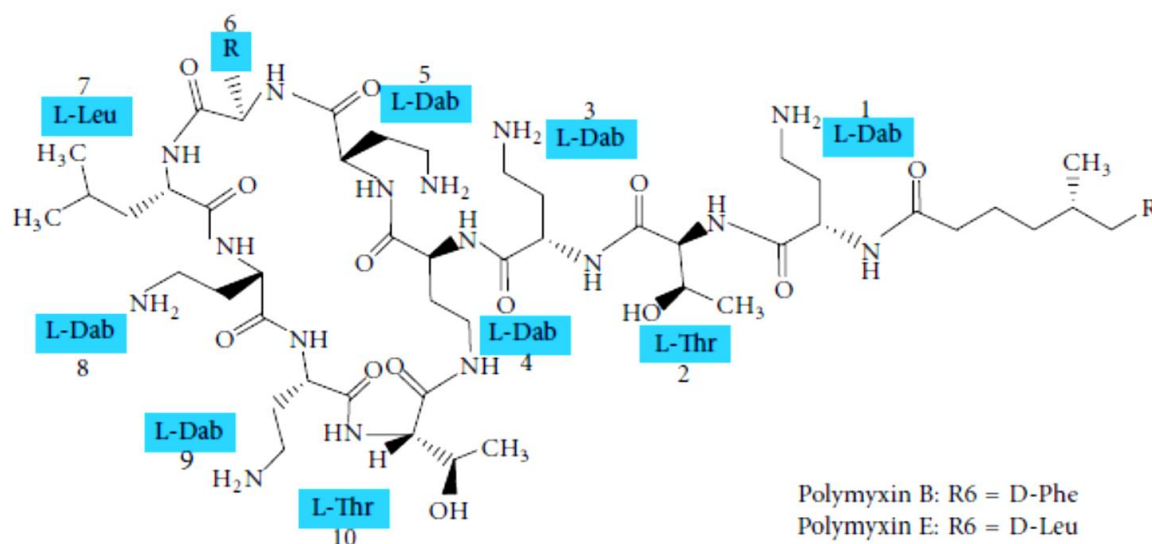


redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



**Figura 1.** Estructura química de la molécula de polimixina. La diferencia entre las moléculas de las polimixinas B y E se caracteriza por la presencia de una D-fenilalanina en la posición seis, en la polimixina B, mientras que la colistina (polimixina E) presenta una D-leucina.

Figura adaptada de Yu *et al.* *BioMed Research International* 2015; 2015, 1-11.

Si bien presenta buena actividad en el combate de infecciones causadas por bacterias Gram negativas, el uso prolongado de polimixina presentaba graves efectos colaterales, incluyendo la neurotoxicidad y nefrotoxicidad. Por esta razón, estos compuestos fueron ampliamente utilizados hasta la década del 60, cuando comenzaron a ser gradualmente sustituidos por las cefalosporinas y aminoglucósidos, compuestos todos ellos menos tóxicos que las polimixinas. A causa del surgimiento del fenómeno de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos, las polimixinas volvieron a usarse, debido a la ausencia de opciones terapéuticas disponibles a fines de la década del 90. Las polimixinas no presentan actividad contra bacterias Gram positivas y normalmente son prescritas para tratar infecciones causadas por microorganismos Gram negativos resistentes a los carbapenemes. En consecuencia, se las considera antimicrobianos de última elección para el tratamiento de infecciones causadas por este tipo de patógenos<sup>1-3</sup>.

redEMC  
Infectología

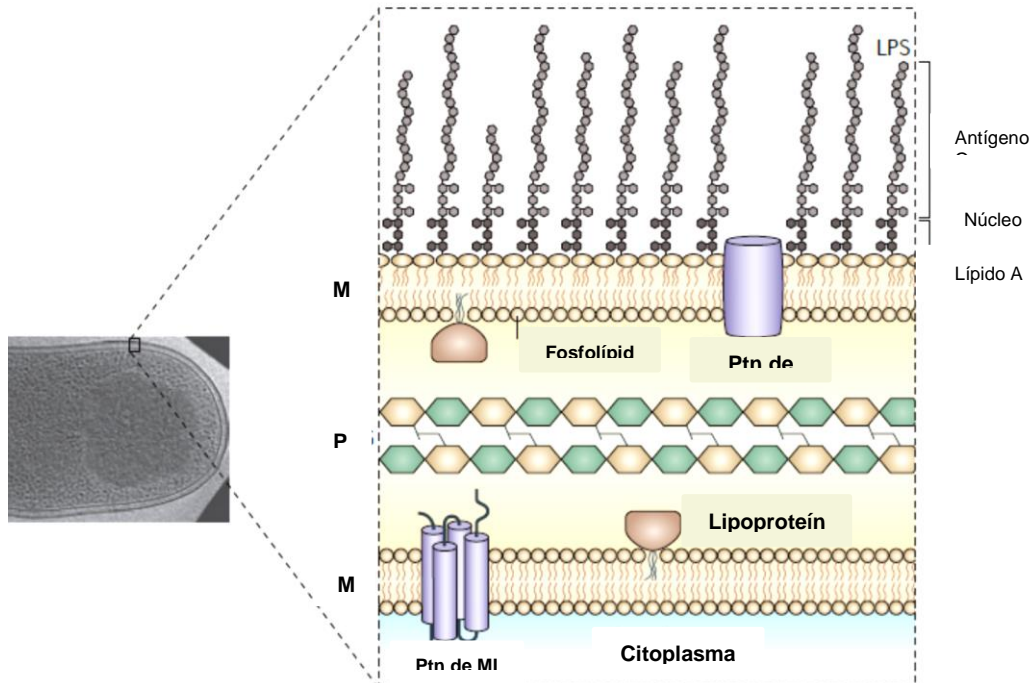
EUCAST

UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAYGESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA

## 1.1. Mecanismo de Acción de las Polimixinas

Para comprender el mecanismo de acción de las polimixinas es necesario conocer los componentes químicos presentes en la estructura de su molécula. Las polimixinas son lipopolipéptidos cíclicos, constituidas por una secuencia de diez péptidos, cinco residuos no proteogénicos de ácido diaminobutírico (DAB) (que le confiere a las polimixinas una característica policatiónica, con pH 7,4); residuos hidrofóbicos en la posición seis y siete y, por último, una molécula de ácido graso en su extremo N-terminal (**Figura 1**). Así como en otros antimicrobianos peptídicos, la presencia de residuos lipofílicos e hidrofílicos en una misma molécula confiere a las polimixinas un carácter anfipático<sup>3</sup>.

Las polimixinas ejercen su actividad bactericida a partir de la atracción electrostática que establecen inicialmente con el lípido A presente en la membrana externa de las bacterias Gram negativas. El lípido A es uno de los tres constituyentes del LPS bacteriano, que también presenta en su región central un núcleo constituido por una unidad oligosacáridica y una región más externa denominada antígeno O (**Figura 2**). Las moléculas del lípido A sirven de soporte al LPS bacteriano, manteniéndolo anclado a la membrana y, de esta forma, contribuyendo con la organización de la membrana externa bacteriana. Esas moléculas están fuertemente asociadas a la membrana mediante las interacciones de Van der Waals, estableciendo un “puente” con las moléculas del lípido A vecinas a través de los iones divalentes de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ )<sup>3,4</sup>.



**Figura 2.** Estructura de las membranas interna y externa de las bacterias Gram negativas. Anclada a la región superior de la membrana externa (ME), observamos la estructura del LPS bacteriano, que está constituido por el antígeno O, el núcleo y el lípido A. La región del lípido A es esencial para la acción de las polimixinas en las células bacterianas.

**Títulos:** Membrana Externa (ME); Peptidoglicano (PG); Membrana Interna (MI); Proteína de Membrana Interna (Ptn de MI); Proteína de Membrana Externa (Ptn de ME).

Figura adaptada de Needham y Trent. *Nature Reviews* 2013;11:467-481.

La atracción electrostática entre la molécula de polimixina y el lípido A se da por la diferencia de carga entre estas dos moléculas. Las polimixinas son compuestos catiónicos (carga positiva), al tiempo que el lípido A presenta carga predominantemente negativa. La interacción entre polimixina-lípido A promueve un desplazamiento de los iones de calcio y magnesio responsables del mantenimiento de la organización de la membrana externa. Tras el desplazamiento de estos iones y la desorganización del lípido A, el residuo de ácido graso en el extremo N-terminal de la molécula de polimixina se inserta en la membrana externa, causando lesiones en la misma.

Al llegar al espacio periplásmico, la molécula de polimixina causa el mismo tipo de daño en la membrana interna bacteriana. Estas lesiones aumentan la permeabilidad de las membranas, la pérdida de componentes intracelulares y, en consecuencia, la muerte de la célula bacteriana<sup>1,3,5</sup>.



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



## 1.2. Mecanismo de Resistencia a las Polimixinas

Dada la amplia utilización de las polimixinas, han ido aumentando las tasas de resistencia a estos antibióticos a lo largo de la última década. También, a consecuencia de la amplia utilización de estos compuestos, se ha podido verificar un mayor número de infecciones causadas por patógenos que presentan resistencia intrínseca a las polimixinas (patógenos pertenecientes al género *Serratia*, *Proteus*, *Providencia*, *Burkholderia*)<sup>5</sup>. Sin embargo, pese a los diversos estudios llevados a cabo en los últimos años respecto a la resistencia a esta clase de antimicrobiano, aún no se ha logrado la completa dilucidación de este mecanismo.

Se observan dos fenotipos de resistencia a las polimixinas: la resistencia natural y la resistencia adaptativa. El fenotipo de resistencia natural normalmente está mediado por mutaciones en el genoma bacteriano y promueve un aumento de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de las bacterias cercano al punto de corte establecido en las guías utilizadas. Este fenotipo es irreversible, e incluso en ausencia de presión de selección (presencia de polimixina en el medio) habrá un aumento de la CIM de polimixina B/colistina. En cambio, el fenotipo de resistencia adaptativa es provocado por una adaptación del microorganismo, ya que este se ve expuesto a concentraciones subinhibitorias de polimixina. Esta adaptación puede llevar la CIM de polimixina/colistina hasta valores por encima de 128 µg/ml. A diferencia del fenotipo de resistencia natural, el mecanismo que la resistencia adaptativa produce es reversible, en ausencia de presión selectiva. Cuando el microorganismo deja de estar expuesto a la polimixina, generalmente ocurre una reducción de la CIM de este compuesto<sup>1,5,6</sup>. En términos generales, el mecanismo de resistencia a las polimixinas es producido por una disminución/ausencia de la interacción entre el antimicrobiano y el lípido A presente en el LPS bacteriano. De esta forma, la bacteria queda “protegida” de la acción bactericida de la polimixina. Esa disminución de la interacción puede estar mediada por diferentes vías, las cuales serán presentadas a continuación.

### 1.2.1. Modificación del LPS bacteriano

La modificación del LPS bacteriano es el mecanismo que se detecta más habitualmente en aislamientos bacterianos resistentes a las polimixinas pertenecientes a las especies *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. En razón de las





redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



características químicas del LPS, ya abordadas en este capítulo, este confiere carga predominantemente negativa a la membrana externa de las bacterias Gram negativas.

En tal sentido, la modificación del LPS bacteriano consiste en el agregado de agrupamientos químicos al lípido A bacteriano, ocasionando una disminución de la carga negativa de la membrana. Con la reducción de la carga negativa, habrá una menor atracción electrostática entre la molécula de polimixina y la membrana externa bacteriana<sup>5,7</sup>.

Se pueden agregar diferentes moléculas al lípido A bacteriano, haciendo menos negativa la carga de la membrana. Las dos principales moléculas que generalmente se agregan al lípido A de enterobacterias son la 4-amino-4-desoxi-L-arabinosa (L-Ara4N) y fosfoetanolamina (PEtN). El agregado de L-Ara4N reduce la carga negativa del lípido A de -1,5 a 0, mientras que el agregado de PEtN reduce esta carga de -1,5 a -1,0<sup>8</sup>. Así, el agregado de L-Ara4N parece mucho más eficiente para establecer el fenotipo de resistencia a las polimixinas, ya que se alcanza una mayor reducción de la carga negativa de la membrana externa. Las diversas especies bacterianas utilizan distintas vías metabólicas para realizar el agregado de estas moléculas al lípido A en su LPS. Las bacterias como *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *E. coli* presentan vías metabólicas de producción y agregado de L-Ara4N y PEtN, mientras que *A. baumannii* presenta tan solo la vía de síntesis y agregado de PEtN<sup>5</sup>. Otro punto importante es que la presencia de una determinada vía metabólica no significa que la misma se utilice (exprese) para establecer la resistencia a las polimixinas, dado que el agregado de moléculas al LPS bacteriano implica una disminución del *fitness* de algunos microorganismos. En la activación de estas vías parece estar involucrada una compleja cascada génica. Se sabe que algunos microorganismos como *K. pneumoniae* agregan preferentemente L-Ara4N, a su vez, *E. coli* y *A. baumannii*, PEtN. Este hecho justificaría el surgimiento de aislamientos de *K. pneumoniae* con CIM elevadas de polimixina B/colistina, recuperados, en general, en la clínica<sup>5,7</sup>. Otro hecho reciente que ha venido llamando la atención es el surgimiento de aislamientos de *K. pneumoniae* productores de KPC resistentes a las polimixinas. A diferencia de los aislamientos de *A. baumannii* y *P. aeruginosa*, cuyo *fitness se presenta* afectado una vez que se vuelven resistentes a las polimixinas (sea por el mecanismo que fuere), los aislamientos de *K. pneumoniae* comparten una única vía metabólica de producción de L-Ara4N y producción de cápsula polisacárida. El hecho de compartir una misma vía permite que el aislamiento de *K. pneumoniae* se vuelva resistente a las polimixinas (debido al agregado de L-Ara4N) y que, incluso, consiga producir más cápsula polisacárida. Al ser la cápsula uno



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



de los principales factores de virulencia en *K. pneumoniae*, estos aislamientos no ven alterado su *fitness*, pese a la resistencia presente<sup>5,7,9</sup>.

También es posible observar otras modificaciones en el lípido A (desacilación, hidroxilación, palmitoilación, glucosilación), principalmente en aislamientos de *E. coli*. Sin embargo, estas modificaciones no presentan alteraciones significativas en la CIM de polimixinas, y son, por consiguiente, alteraciones menos estudiadas en los aislamientos de bacterias Gram negativas<sup>10</sup>.

Todas las modificaciones en el LPS bacteriano son mediadas por activación/represión de maquinaria genética normalmente regulada por vía de sistemas de dos componentes (*Two Component Systems* - TCS). Estos TCS serán abordados más adelante, dentro del tema de los mecanismos genéticos de control de la resistencia a las polimixinas.

### 1.2.2. Hiperproducción de cápsula polisacárida

Se especula que la hiperproducción de cápsula polisacárida sea uno de los mecanismos que contribuye a la resistencia a las polimixinas en aislamientos de *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*<sup>11</sup>. Dicha hiperproducción funcionaría como un tipo de barrera física o *trapping*, lo cual provoca que la polimixina no consiga alcanzar la membrana externa de la bacteria. La cápsula polisacárida presenta características aniónicas (carga negativa) que interactúan con la molécula de polimixina en el medio extracelular y que reducen la cantidad de moléculas de antimicrobiano que interactuará con la membrana bacteriana. Estudios recientes realizados en el Laboratorio Alerta (UNIFESP) revelaron que, en presencia de polimixina B, los aislamientos de *K. pneumoniae* emiten estructuras con formato de proyecciones de su membrana externa, semejando el desprendimiento de cápsula polisacárida (**Figura 3**). Este hecho reitera la participación de la cápsula polisacárida en la resistencia a las polimixinas en aislamientos de *K. pneumoniae*.

Tal como se dijo en el punto anterior, en aislamientos de *K. pneumoniae* se puede observar la presencia de un mismo gen (*ugd*) involucrado en la síntesis de la cápsula polisacárida y la síntesis de L-Ara4N. La presencia de este gen sirve de puente para interconectar la síntesis de cápsula polisacárida con la resistencia a las polimixinas en estos aislamientos bacterianos.

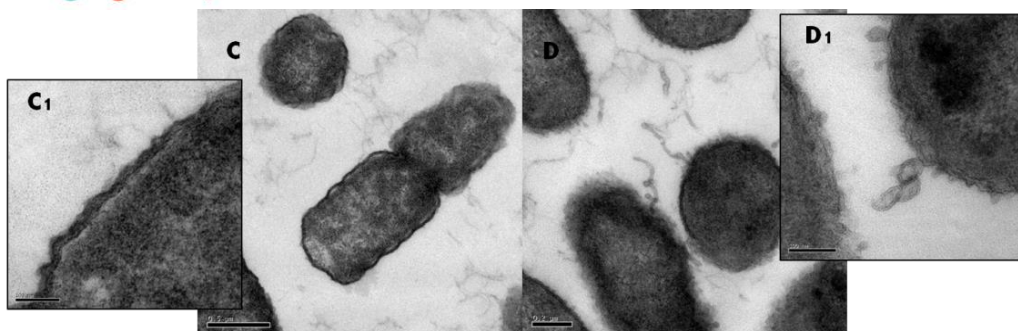


redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



**Figura 3.** Microscopía electrónica de transmisión de aislamientos de *K. pneumoniae* sometidos a crecimiento en presencia de polimixina B. En la cuadrícula arriba, se puede observar la presencia de proyecciones en el medio extracelular. Los autores asocian estas estructuras con partes desprendidas de la membrana celular externa bacteriana y con un aumento en la producción de cápsula polisacárida.

Figura tomada de Giraldeño *et al.*, 2016. [Manuscrito sometido a publicación DMID, 2016]

### 1.2.3. Pérdida Total del LPS Bacteriano

La pérdida total del LPS bacteriano es, hasta el momento, un mecanismo informado en aislamientos de *A. baumannii* y *A. nosocomialis*<sup>12,13</sup>. A diferencia de los otros mecanismos detectados en *A. baumannii*, este mecanismo confiere altas CIM a las polimixinas (>128 µg/ml). Este fenómeno es causado por eventos genéticos (mutaciones, deleciones o inserciones) producidos en los genes codificadores de las proteínas utilizadas en la síntesis del LPS bacteriano (*lpxA*, *lpxC*, *lpxD*). Este fenotipo fue informado por vez primera en el año 2010, en aislamientos bacterianos de *A. baumannii* provenientes de Corea del Sur<sup>12</sup>. Si bien los estudios iniciales para dilucidar este fenotipo fueron realizados por mutagénesis dirigida (inserción de transposones en genes específicos guiada en laboratorio) en la cepa de *A. baumannii* ATCC19606, meses después, los mismos autores confirmaron la presencia de este fenotipo en aislamientos provenientes de pacientes hospitalizados, en una provincia surcoreana<sup>12,14</sup>. Como las polimixinas interactúan con el lípido A del LPS bacteriano, la pérdida total de esta molécula es un mecanismo eficiente de resistencia a este antimicrobiano, y es irreversible (el fenotipo resistente se mantiene, incluso en ausencia de la presión selectiva). No obstante, algunos estudios señalaron que los aislamientos que pierden por completo el LPS bacteriano tienden a sufrir pérdida del *fitness* bacteriano. Estos aislamientos pierden la capacidad de infectar y dañar tejidos del hospedador y diseminarse. Este hecho estaría justificando que el mecanismo sea poco frecuente y se lo encuentre únicamente en aislamientos de *A. baumannii* provenientes de Corea del Sur<sup>12</sup>.



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



## 1.2.4. Hiperexpresión de Proteínas de Membrana Externa

El aumento en la expresión de proteínas de membrana externa (OMP, del inglés *outer membrane protein*) es un fenómeno que puede ocasionar un aumento en los niveles de la CIM a polimixina B/colistina entre los aislamientos de *P. aeruginosa*. En estudios, se ha demostrado que la hiperexpresión de la OMP OprH está involucrada en el fenotipo de resistencia a estos antimicrobianos en aislamientos clínicos de *P. aeruginosa*, fundamentalmente cuando se somete a este microorganismo a bajas concentraciones de iones de magnesio ( $Mg^{2+}$ )<sup>15</sup>.

La OprH es una proteína básica y de carga positiva que se inserta en la membrana externa bacteriana para realizar actividades vitales que contribuyen al metabolismo del microorganismo (como la participación en la entrada de nutrientes esenciales para la célula bacteriana). Por ser una proteína de carga positiva, la OprH termina reduciendo la carga negativa que resulta de la membrana externa bacteriana. O sea, la carga positiva presente en la OprH acaba anulando las cargas negativas presentes en el lípido A, provocando que haya esa “disminución” de la carga que resulta de la membrana. Con esa reducción, la interacción entre las moléculas de polimixina y la membrana externa bacteriana se compromete, haciendo que una cantidad menor de moléculas del antimicrobiano llegue a la membrana externa bacteriana. No obstante lo cual, algunos estudios sugieren que la sola presencia de este mecanismo no es capaz de producir resistencia a las polimixinas en *P. aeruginosa*. Es necesaria una asociación de mecanismos para establecer el fenotipo de resistencia, determinando que la hiperexpresión de OprH no sea tan relevante en la resistencia a las polimixinas en aislamientos clínicos de *P. aeruginosa*<sup>5</sup>.

Todos los mecanismos que contribuyen a la resistencia en aislamientos de *P. aeruginosa* (modificación del LPS bacteriano, hiperproducción de cápsula e hiperexpresión de OprH) reducen el *fitness* de este microorganismo.

## 1.2.5. Bombas de Eflujo

Las bombas de eflujo constituyen el grupo de mecanismos relacionados con la resistencia a las polimixinas con menos evidencia científica. Algunos estudios demostraron que las mutaciones en los genes que constituyen importantes bombas de eflujo en *K. pneumoniae* (gen *acrB*, que codifica la proteína AcrB que integra la bomba AcrAB-TolC) promueven un mayor nivel de sensibilidad a las polimixinas. Tal como se ve en AcrAB-TolC, los microorganismos mutantes en el sistema de eflujo KpnEF y KpnGH también presentaron una mayor sensibilidad a estos antimicrobianos<sup>16,17</sup>. Al mismo



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



tiempo, se hace difícil correlacionar la acción de una bomba de eflujo con un mecanismo de resistencia eficiente a las polimixinas, ya que la proteína responsable de la eyección del antimicrobiano está ubicada en la membrana interna bacteriana. O sea, para que la polimixina sea eyectada tendría, en principio, que entrar en contacto con la membrana externa, ingresar al espacio periplasmático y, por último, ser eyectada por una bomba de eflujo. La interacción entre las moléculas de polimixina y la membrana externa ya causaría grandes lesiones en la célula bacteriana y sería también casi inevitable la interacción de la molécula con la membrana interna. Por consiguiente, la correlación entre la hiperexpresión de bomba de eflujo y resistencia a las polimixinas todavía precisa ser mejor comprendida.

### 1.3. Mecanismo Genético de Control de la Resistencia a las Polimixinas

Pese a los numerosos estudios, el control genético de los mecanismos de resistencia a las polimixinas permanece sin ser completamente explicado. Se sabe que diferentes genes se activan/reprimen en una tentativa de señalarle a la célula bacteriana un peligro evidente, a efectos de que haya una remodelación de la expresión génica que vuelva a célula bacteriana capaz de responder a ese estrés específico.

Los mecanismos genéticos más estudiados, en general, se refieren a las cascadas de activación de genes específicos, seguido de la síntesis y agregado de compuestos al lípido A. Esta regulación génica es mediada por sistemas de dos componentes (*Two Component Systems* - TCS).

Los TCS son sistemas globales de control de la expresión génica de distintos factores de resistencia y virulencia. Son influidos por factores ambientales (como la presencia de hierro, alteración en la concentración de calcio y magnesio en el medio o, incluso, alteraciones en el pH) y/o por la presencia de antimicrobianos catiónicos<sup>1,5,18</sup>.



redEMC  
Infectología

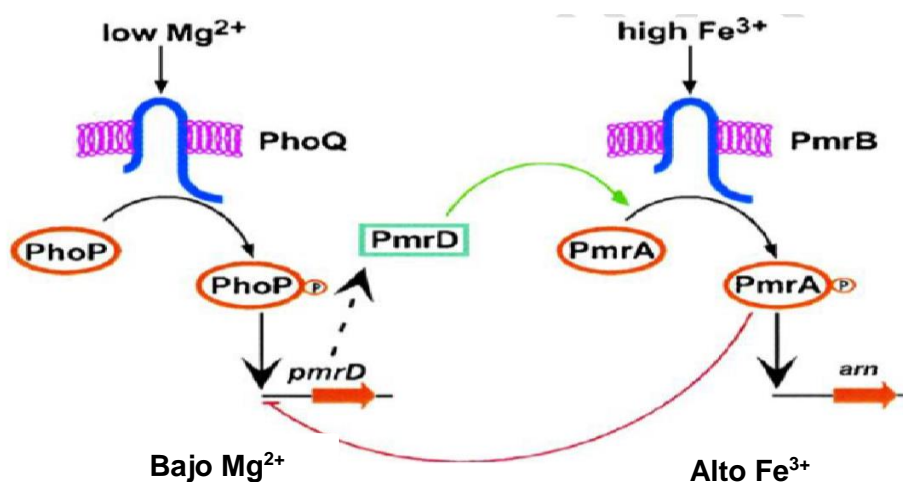


UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



Los TCS están constituidos por una proteína histidina quinasa sensible, que permanece ubicada en la membrana de la célula bacteriana, percibiendo todas las alteraciones en el medio, y por una segunda proteína, denominada proteína citoplasmática, que es responsable de promover la activación o represión de los genes blanco, desencadenando de esa forma la resistencia a las polimixinas<sup>19</sup> (Figura 4).



**Figura 4.** Esquema que representa la constitución de un TCS. Estos sistemas, además de ser activados por la presencia de antimicrobianos catiónicos, también pueden ser activados por factores ambientales tales como una variación en la concentración de algunos cationes. La proteína ubicada en la membrana (proteína sensible) percibe la alteración en el medio y activa una segunda proteína (proteína citoplasmática). Al ser activada, la proteína citoplasmática sufre fosforilación y, una vez fosforilada, actúa como activadora/represora de diversos genes.

Figura adaptada de Kato *et al. Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100(8):4706-11.

De modo general, la nomenclatura de los TCS está formada por la unión de las proteínas sensibles y citoplasmática. Si bien no es aplicable a todos los casos, la mayoría de las veces, la primera proteína hace referencia a la proteína citoplasmática, mientras que la segunda proteína hace referencia a la proteína citoplasmática histidina quinasa sensible (p. ej.: PmrAB, donde la proteína PmrA es la proteína citoplasmática, al tiempo que la proteína PmrB es la proteína histidina quinasa sensible). Distintos microorganismos presentan diferentes TCS involucrados en el fenotipo de resistencia a las polimixinas. Algunos de estos sistemas pueden ser compartidos por más de un microorganismo, como se muestra en la Tabla 1.



Microorganismos	<i>K. pneumoniae</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. enterica</i>
TCS	PmrAB	PmrAB	PmrAB	PmrAB	PmrAB
	PhoPQ		PhoPQ	PhoPQ	PhoPQ
	CrrAB		ColRS		
	RstAB		CprRS		
			ParRS		

**Tabla 1.** Sistemas de Dos Componentes asociados con la resistencia a la polimixina en distintas especies bacterianas.

Títulos: TCS – *Two Component Systems*.

Las principales responsables de la activación de estos sistemas, cuando el microorganismo es expuesto a la polimixina (caso frecuente en el ambiente hospitalario), son las mutaciones en los genes codificadores del TCS. Estas mutaciones activan al TCS constitutivo, que activa los operones responsables de la modificación del lípido A (agregado de PEtN, L-Ara-4N, desacilación, palmitoilación, glucosilación e hidroxilación). En virtud de ello, se denomina regulación positiva a este tipo de regulación, pues los genes activados contribuirán positivamente al fenotipo esperado (en este caso, resistencia a las polimixinas). Aunque presenten más de un TCS que puede conferir el mismo fenotipo, normalmente solo uno es activado y contribuye al mecanismo de resistencia a las polimixinas, ya que este proceso de activación y regulación de la resistencia es un proceso que le demanda a la célula bacteriana mucha energía, ocasionándole una disminución de su *fitness* (para aislamientos de *A. baumannii* y *P. aeruginosa*)<sup>5,7</sup>. No obstante, algunos sistemas pueden estar intercomunicados mediante proteínas conectoras, uniendo dos sistemas distintos con el objetivo de alcanzar el mismo fenotipo.

En aislamientos de *K. pneumoniae*, el TCS PmrAB puede activar PhoPQ por medio de PmrD (proteína conectora). De esa forma, dos TCS contribuirían con la resistencia a las polimixinas<sup>20</sup>.

### 1.3.1. Reguladores Genéticos Negativos y su Relación con la Resistencia a las Polimixinas

Así como los reguladores positivos, los reguladores negativos ejercen un papel fundamental para establecer la resistencia a las polimixinas. Los reguladores negativos actúan ejerciendo un *feedback*



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



negativo frente los genes que constituyen los principales TCS relacionados con la resistencia a las polimixinas<sup>5</sup>. En aislamientos de *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*, se señala al regulador negativo *mgrB* como el principal factor de desarrollo de la resistencia a la polimixina en aislamientos de estas especies bacterianas<sup>21-23</sup>. El gen *mgrB* presenta ubicación cromosómica y, por lo general, es conservado en todas las enterobacterias. No obstante ello, su relación con la resistencia a la polimixina se ha descrito únicamente en aislamientos bacterianos pertenecientes al género *Klebsiella*. Este gen codifica una pequeña proteína (47 aminoácidos) de igual nombre (MgrB), que regula negativamente el TCS PhoPQ. Una vez que esta proteína está activa, impide que PhoPQ actúe regulando los genes que modifican al lípido A del LPS bacteriano. El principal mecanismo de resistencia a las polimixinas actualmente en estudio en *K. pneumoniae* es la inactivación de *mgrB*<sup>21</sup>. Una vez que la proteína está inactiva, a causa de eventos genéticos de inserción de secuencias de inserción o mutaciones en el gen que codifica a esta proteína, la misma perderá su funcionalidad y ya no será capaz de regular negativamente el sistema PhoPQ.

En aislamientos de *E. coli*, se ha informado al regulador negativo MicA como el principal regulador de este tipo involucrado en la resistencia a las polimixinas. A su vez, debido a que la resistencia a las polimixinas es menos frecuente en aislamientos clínicos de *E. coli*, cuando se los compara con aislamientos de *K. pneumoniae*, este mecanismo ha sido poco estudiado e informado<sup>5</sup>.

### 1.3.2. Mecanismo Plasmídico de Resistencia a las Polimixinas

Hasta fines del año 2015, los mecanismos de resistencia a las polimixinas eran considerados fundamentalmente como cromosómicos. Los genes codificadores del TCS, así como los genes que codifican las proteínas que modifican al LPS bacteriano, presentan ubicación cromosómica en las enterobacterias. Por tal motivo, se creía que la resistencia a las polimixinas no podía ser transferida por mecanismos genéticos horizontales dentro de una unidad hospitalaria y que la diseminación de aislamientos bacterianos con resistencia a estos antimicrobianos obedecía a la diseminación clonal o que era debido a la exposición de diferentes clones bacterianos a concentraciones subóptimas de polimixina B/colistina.

En diciembre de 2015, Liu y colaboradores<sup>24</sup> identificaron un gen de ubicación plasmídica denominado *mcr-1* (*mobile colistin resistance*) capaz de conferir resistencia a las polimixinas en muestras de orígenes ambiental y clínico, en China. El gen *mcr-1* fue detectado con mayor frecuencia





redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



en aislamientos de *E. coli* y con menos frecuencia en aislamientos de *K. pneumoniae*. Este gen codifica una proteína de igual nombre (Mcr-1), que es responsable de agregar PETN al lípido A del LPS bacteriano. Tal como fuera visto previamente, esta modificación en el lípido A altera la carga resultante de la membrana en forma menos significativa, cuando se lo compara con el agregado de L-Ara4N.

Si bien fue descubierto a fines de 2015, los estudios han detectado aislamientos productores de Mcr-1 en diferentes aislamientos bacterianos de *E. coli*, *S. entérica*, *K. pneumoniae* y *Enterobacter spp.* esparcidos por diferentes regiones del mundo. Por consiguiente, se cree que este mecanismo esté ampliamente diseminado en muestras ambientales, fundamentalmente en *E. coli*. Esta amplia diseminación hizo resurgir la discusión sobre el uso irracional de antimicrobianos en la práctica agrícola/agropecuaria. La detección de mcr-1 fue rápidamente puesta de manifiesto en América Latina tanto en muestras ambientales como humanas<sup>25,26</sup>.

Ya a partir del 2016, se describen las primeras variantes alélicas de dicho gen denominadas mcr-1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7<sup>27</sup> y paralelamente nuevos genes denominados *mcr2*, *mcr-3*, *mcr-4* y *mcr-5* han sido descritos. Estos genes codifican para fosfoetanolamina transferasas que adiciona PetN a lipopolisacárido. Puede presentarse en microorganismos con altas CIM, como ser 4-64 µg/ml, a valores de CIM de polimixina tan bajas como 0,125 µg/ml<sup>28-31</sup>

Desde el primer informe de *mcr-1*, se ha relacionado a distintos plásmidos como vectores de transmisión de este gen. Como resultado, se espera una mayor frecuencia de este mecanismo también en muestras clínicas (en muestras ambientales, dicho mecanismo parece ser ya altamente frecuente).

## 1.4. Detección en Laboratorio de la Resistencia a las Polimixinas

La detección en laboratorio de la resistencia a las polimixinas aún se realiza, principalmente, mediante pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos<sup>32</sup>.

Se han empleado cuatro metodologías diferentes para determinar el perfil de sensibilidad a las polimixinas: determinación de la CIM por i) microdilución en caldo; ii) Etest®; iii) dilución en ágar, y iv) determinación del tamaño del halo de inhibición por disco difusión. A pesar de contar con cuatro metodologías disponibles, la correcta elección del método con el cual realizar la prueba de sensibilidad a las polimixinas es fundamental para el correcto *screening* de aislamientos resistentes



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



pues, dependiendo de la metodología utilizada, es posible observar un cambio de categoría en el perfil de sensibilidad.

Los estudios indican que no hay una buena correlación entre la prueba por disco difusión y la CIM de las polimixinas (polimixina B y colistina), y que pueden producirse errores graves de categorización si se utiliza el método de difusión con discos. Las pruebas para determinar la CIM en ágar (dilución en ágar o E-test®) tienden a sobrestimar en hasta una dilución la CIM de polimixina en los aislamientos. Por esta razón, según EUCAST, se considera la microdilución en caldo como *gold standard* para determinar la susceptibilidad a las polimixinas<sup>32</sup>. Otro punto importante para el éxito de la prueba de sensibilidad es el correcto ajuste del medio de cultivo utilizado en la realización del test. Tal como ya se demostró, los cationes con  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Fe^{3+}$  pueden activar los TCS y desencadenar la resistencia a las polimixinas. Por consiguiente, se recomienda ajustar la concentración de iones de  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  en la realización de técnicas de dilución en caldo (microdilución)<sup>33-35</sup>.

A consecuencia de la emergencia de resistencia a las polimixinas, se ha sugerido recientemente por parte de investigadores franceses y suizos un medio de cultivo denominado SuperPolymyxin, capaz de realizar en laboratorio el cribado de enterobacterias resistentes a las polimixinas de manera rápida y eficiente<sup>36</sup>. Este nuevo método de detección consiste en un medio de cultivo, Eosine-Methylene-Blue (EMB), suplementado con 3,5  $\mu g/ml$  de polimixina B, además de otros antimicrobianos que inhiben el crecimiento de hongos y bacterias Gram positivas (10  $\mu g/ml$  de daptomicina y 5  $\mu g/ml$  de anfotericina B). La prueba se mostró de ejecución simple, ya que solamente se necesita sembrar el microorganismo a evaluar en el medio de cultivo; en caso de producirse el crecimiento del mismo, se lo podrá considerar como potencialmente resistente. Los datos preliminares indicaron una buena sensibilidad y especificidad en la detección de enterobacterias resistentes a las polimixinas<sup>36</sup>.

Por otro lado, en el instituto Malbrán de Argentina a través de su página [www.antimicrobianos.com.ar](http://www.antimicrobianos.com.ar) pueden encontrarse protocolos para realizar estudios de este tipo en base a métodos de tamizaje por "colistin-agar spot" que se presenta similar al previamente descrito o realización de determinación de CIM por microdilución en caldo en policubetas de plástico. Ver sección algoritmos, manuales, protocolos.



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



En la actualidad, los puntos de corte recomendados tanto por EUCAST como por CLSI sugieren que se considere resistentes a enterobacterias, pseudomonas y acinetobacter con CIM de colistin superior a 2 µg/ml.

En el caso de las normas CLSI, se debe de tener en cuenta que no se determinan puntos de corte de sensibilidad y resistencia, sino de corte epidemiológico.

Con la emergencia de la resistencia transferible a colistin, se hace necesaria la detección de los genes mcr debido a su potencial diseminación mediante técnicas de biología molecular.

## 1.5. Referencias

1. Giraldeiro R, Gales AC. Resistência às polimixinas: velhos antibióticos, últimas opções terapêuticas. *Rev de Epidemiol e Control de Infecção*. 2012;2(2):1-4.
2. Velkov T, Soon RL, Chong PL, Huang JX, Cooper MA, Azad MA, Baker MA, Thompson PE, Roberts K, Nation RL, Clements A, Strugnell RA, Li J. Molecular basis for the increased polymyxin susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* strains with under-acylated lipid A. *Innate Immun*. 2013 Jun;19(3):265-77.
3. Yu Z, Qin W, Lin J, Fang S, Qiu J. Antibacterial Mechanisms of Polymyxin and Bacterial Resistance. *BioMed Research International*. 2015;1-11.
4. Needham BD, Trent MS. Fortifying the barrier: the impact of lipid A remodelling on bacterial pathogenesis. *Nat Rev Microbiol*. 2013;11:467-481.
5. Olaitan AO, Morand S, Rolain JM. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol*. 2014 Nov 26;5:643.
6. Skiada A, Markogiannakis A, Plachouras D, et al. Adaptive resistance to cationic compounds in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents*. 2011;37:187-193.
7. Ah YM, Kim AJ, Lee JY. Colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Antimicrob Agents*. 2014 Jul;44(1):8-15.
8. Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2013;67:593-656.
9. Lee H, Hsu FF, Turk J, Groisman EA. The PmrA-regulated *pmrC* gene mediates phosphoethanolamine modification of lipid A and polymyxin resistance in *Salmonella enterica*. *J Bacteriol*. 2004;186:4124-4133.
10. Raetz CR, Reynolds CM, Trent MS, Bishop RE. Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. *Annu Rev Biochem*. 2007;76:295-329.
11. Llobet E, Campos MA, Gimenez P, Moranta D, Bengoechea JA. Analysis of the networks controlling the antimicrobial peptide-dependent induction of *Klebsiella pneumoniae* virulence factors. *Infect Immun*. 2008;79:3718-3732.
12. Moffatt JH, Harper M, Harrison P, Hale JD, Vinogradov E, Seemann T, Henry R, Crane B, St Michael F, Cox AD, Adler B, Nation RL, Li J, Boyce JD. Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Dec;54(12):4971-7.



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



13. Vila-Farrés X, Ferrer-Navarro M, Callarisa AE, Martí S, Espinal P, Gupta S, Rolain JM, Giralt E, Vila J. Loss of LPS is involved in the virulence and resistance to colistin of colistin-resistant *Acinetobacter nosocomialis* mutants selected in vitro. *J Antimicrob Chemother.* 2015 Nov;70(11):2981-6.
14. Moffatt JH, Harper M, Mansell A, Crane B, Fitzsimons TC, Nation RL, Li J, Adler B, Boyce JD. Lipopolysaccharide-deficient *Acinetobacter baumannii* shows altered signaling through host Toll-like receptors and increased susceptibility to the host antimicrobial peptide LL-37. *Infect Immun.* 2013 Mar;81(3):684-9.
15. Young ML, Bains M, Bell A, Hancock RE. Role of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein OprH in polymyxin and gentamicin resistance: isolation of an OprH-deficient mutant by gene replacement techniques. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992;36:2566-2568.
16. Padilla E, Llobet E, Doménech-Sánchez A, Martínez-Martínez L, Bengoechea JA, Albertí S. *Klebsiella pneumoniae* AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Jan;54(1):177-83.
17. Srinivasan VB, Rajamohan G. KpnEF, a New Member of the *Klebsiella pneumoniae* Cell Envelope Stress Response Regulon, Is an SMR-Type Efflux Pump Involved in Broad-Spectrum Antimicrobial Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2013;57(9):4449-4462.
18. Adams MD, Nickel GC, Bajaksouzian S, et al. Resistance to Colistin in *Acinetobacter baumannii* Associated with Mutations in the PmrAB Two Component System. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(9):3628-3634.
19. Gooderham WJ; Hancock REW. Regulation of virulence and antibiotic resistance by two component regulatory systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Rev.* 2009;33:279-294.
20. Cheng HY, Chen YF, Peng HL. Molecular characterization of the PhoPQ-PmrD-PmrAB mediated pathway regulating polymyxin B resistance in *Klebsiella pneumoniae* CG43. *J Biomed Sci.* 2010 Jul 24;17:60.
21. Poirel L, Jayol A, Bontron S, Villegas MV, Ozdamar M, Türkoglu S, Nordmann P. The *mgrB* gene as a key target for acquired resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 2015 Jan;70(1):75-80.
22. Jayol A, Poirel L, Villegas MV, Nordmann P. Modulation of *mgrB* gene expression as a source of colistin resistance in *Klebsiella oxytoca*. *Int J Antimicrob Agents.* 2015 Jul;46(1):108-10.
23. Olaitan AO, Rolain JM. Interruption of *mgrB* in the mediation of colistin resistance in *Klebsiella oxytoca*. *Int J Antimicrob Agents.* 2015 Sep;46(3):354-5.
24. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G, Dong B, Huang X, Yu LF, Gu D, Ren H, Chen X, Lv L, He D, Zhou H, Liang Z, Liu JH, Shen J. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis.* 2016 Feb;16(2):161-8.
25. Fernandes MR, Moura Q, Sartori L, Silva KC, Cunha MP, Esposito F, Lopes R, Otutumi LK, Gonçalves DD, Dropa M, Matté MH, Monte DF, Landgraf M, Francisco GR, Bueno MF, de Oliveira Garcia D, Knöbl T, Moreno AM, Lincopan N. Silent dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli* in South America could contribute to the global spread of the *mcr-1* gene. *Euro Surveill.* 2016 Apr 28;21(17).
26. Rapoport M, Faccione D, Pasteran F, Ceriana P, Albornoz E, Petroni A; MCR-Group, Corso A. *mcr-1*-mediated colistin resistance in human infections caused by *Escherichia coli*: First description in Latin America. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016 Apr 18. pii: AAC.00573-16. [Epub ahead of print].
27. Zhao F, Feng Y, Lü X, McNally A, Zong Z. Remarkable Diversity of *Escherichia coli* Carrying *mcr-1* from Hospital Sewage with the Identification of Two New *mcr-1* Variants. *Frontiers in Microbiology.* 2017;8.



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



28. Xavier BB, Lammens C, Ruhel R, et al. Identification of a novel plasmid-mediated coli stinresistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, june 2016. *Eurosurveillance*. 2016;21(27):6-11. doi:10.2807/1560-7917.ES.2016.21.27.30280.
29. Yin W, Li H, Shen Y, et al. Novel Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene *mcr-3* in *Escherichia coli*. *MBio*. 2017;8(3). doi:10.1128/mBio.00543-17.
30. Carattoli A, Villa L, Feudi C, et al. Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4 g* ene in *Salmonella* and *Escherichia coli* , Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. *Eurosurveillance*. 2017;22(31):30589. doi:10.2807/1560-7917.ES.2017.22.31.30589.
31. Borowiak M, Fischer J, Hammerl JA, Hendriksen RS, Szabo I, Malorny B. Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, *mcr-5*, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B. *J Antimicrob Chemother*. 2017;72(12):3317-3324.
32. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Version 1.0, December 2013. Disponible en: [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Resistance\\_mechanisms/EUCAST\\_detection\\_of\\_resistance\\_mechanisms\\_v1.0\\_20131211.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_v1.0_20131211.pdf)
33. Behera B, Mathur P, Das A, Kapil A, Gupta B, Bhoi S, Farooque K, Sharma V, Misra MC. Evaluation of susceptibility testing methods for polymyxin. *Int J Infect Dis*. 2010 Jul;14(7):e596-601.
34. Tan TY, Ng SY. Comparison of Etest, Vitek and agar dilution for susceptibility testing of colistin. *Clin Microbiol Infect*. 2007 May;13(5):541-4.
35. Gales AC, Reis AO, Jones RN. Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing methods for polymyxin B and colistin: review of available interpretative criteria and quality control guidelines. *J Clin Microbiol*. 2001 Jan;39(1):183-90.
36. Nordmann P, Jayol A, Poirel L. A Universal Culture Medium for Screening Polymyxin-Resistant Gram-Negative Isolates. *J Clin Microbiol*. 2016 May;54(5):1395-9.



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



## 2. Resistencia a Fosfomicina

### **Cecília Helena Vieira Franco de Godoy Carvalhaes**

Médica Patóloga Clínica y Doctora en Infectología

Coordinadora de la Sección de Microbiología del Laboratorio Central del Hospital São Paulo

Investigadora en Medicina Laboratorial, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)

Brasil

### **Ana Cristina Gales**

Profesora Adjunta de Infectología de la Escola Paulista de Medicina,

Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)

Investigadora 1A del Consejo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (CNPq)

Miembro de la Cámara Técnica de Resistencia Microbiana (CATREM),

Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria (ANVISA)

Coordinadora clínica del Consejo Brasileiro de Susceptibilidad Antimicrobiana (BrCAST)

Brasil

La fosfomicina es un compuesto natural producido por diversas especies de *Streptomyces*. Fue aislada por primera vez en España en 1969<sup>1</sup>. Este compuesto ejerce actividad bactericida contra varias bacterias Gram positivas y Gram negativas<sup>2</sup>. La molécula de fosfomicina presenta bajo peso molecular, alcanzando una buena concentración en la mayoría de los tejidos<sup>3</sup>.

Diferentes estudios mostraron que la fosfomicina demuestra actividad clínica e *in vitro* contra aislamientos de *E. coli*, *Citrobacter diversus*, *C. freundii*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*, *P. vulgaris*, *Providencia rettgeri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. faecalis* y *E. faecium*, incluyendo *Enterococcus* resistentes a la vancomicina y *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM)<sup>4,5</sup>. No obstante, *A. baumannii* es intrínsecamente resistente a este compuesto<sup>5</sup>.

### 2.1. Mecanismo de Acción de la Fosfomicina

La fosfomicina causa la inhibición de la etapa inicial de la síntesis de peptidoglicano. Al presentar este antimicrobiano una estructura química análoga al fosfoenolpiruvato, se une a la MurA (UDP-GlcNAc



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

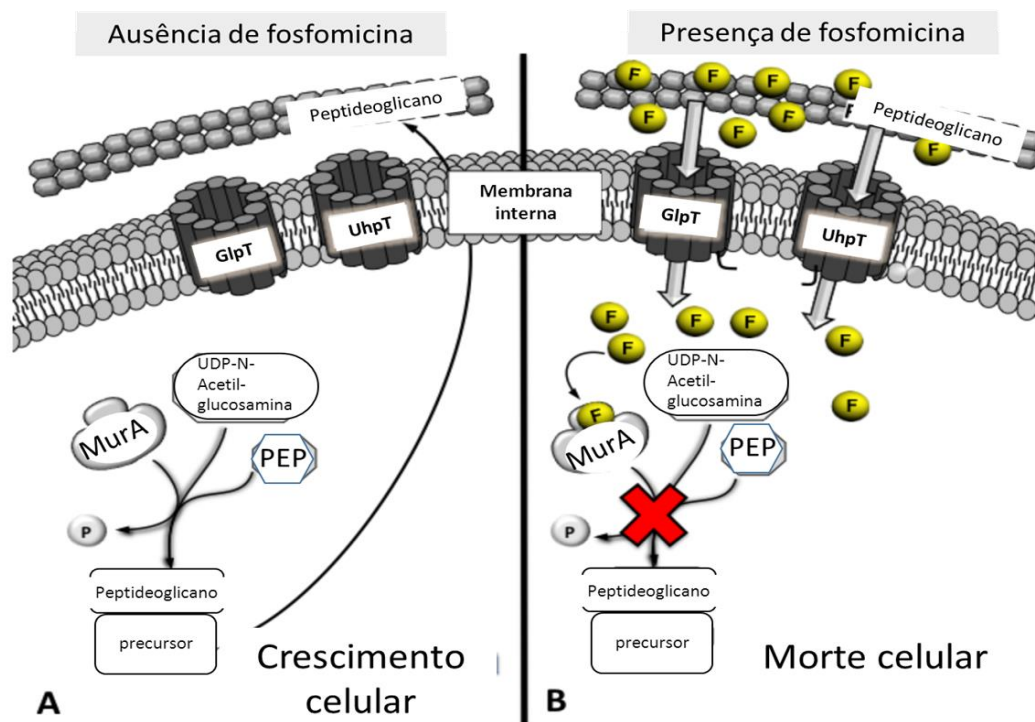
GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



enolpiruvil transferasa), una enzima esencial para la síntesis de peptidoglicano<sup>6</sup>. De esa forma, no ocurre la formación del UDP-GlcNAc-3-O-enolpiruvato a partir del UDP-GlcNAc y del fosfoenolpiruvato durante la primera etapa de biosíntesis del peptidoglicano, llevando a la lisis de la célula bacteriana y, en consecuencia, a la muerte celular (**Figura 1**)<sup>7</sup>.

La fosfomicina está disponible en tres formulaciones: dos por vía oral ( $C_7H_{18}NO_7$  P, fosfomicina-trometamina y  $C_3H_5O_4$  PCa, sal de calcio) y otra de uso endovenoso (fosfomicina disódica,  $C_3H_5O_4$  PNa<sub>2</sub>), que ha sido utilizada en Europa y en menor medida en sudamérica, combinada con otros agentes antimicrobianos, para tratar infecciones por enterobacterias resistentes a los carbapenemes. En algunos países de América Latina, solo está disponible comercialmente la FOS-TROM, la formulación de fosfomicina trometamol. Cada sobre de 5,61 g de FOS-TROM contiene 3 g de fosfomicina<sup>8</sup>.

Como la presentación de FOS-TROM presenta bajas concentraciones séricas, se ha indicado este agente antimicrobiano para tratar únicamente infecciones urinarias bajas no complicadas y bacteriuria asintomática, en embarazadas.



**Figura 1.** Biosíntesis del peptidoglicano y mecanismos de acción de la fosfomicina.



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



La MurA cataliza la formación del UDP-GlcNac-3-O-enolpiruvato, un precursor del peptidoglicano, a partir del UDP-GlcNac y PEP, durante los primeros pasos de la síntesis del peptidoglicano, permitiendo el crecimiento celular (A). Cuando está presente la fosfomicina (F), es transportada al interior de la célula por GlpT y UhpT, bloqueando la síntesis del UDP-GlcNac-3-O-enolpiruvato, al mimetizar el sustrato original de la MurA, PEP, impidiendo la síntesis de la pared celular y llevando a la célula bacteriana a la muerte (B).

Figura adaptada de Castañeda-García, *Antibiotics*, 2013.

## 2.2. Mecanismo de Resistencia a la Fosfomicina

La resistencia a la fosfomicina se ha demostrado *in vitro* e *in vivo*, particularmente cuando se utiliza como monoterapia. Por lo tanto, no se recomienda la monoterapia con fosfomicina en pacientes críticos<sup>9</sup>. La resistencia a la fosfomicina es primariamente cromosómica, pese a que también se ha descrito resistencia mediada por plásmidos. La resistencia cromosómica ocurre a causa de mutaciones que interfieren con sistemas de transporte de la célula bacteriana. Estas mutaciones no son comunes y no están asociadas con la resistencia a otros agentes antimicrobianos<sup>7</sup>.

### 2.2.1. Reducción de la permeabilidad a la fosfomicina

En aislamientos clínicos, el principal mecanismo de adquisición de resistencia a la fosfomicina está relacionado con la alteración de su entrada en la célula bacteriana. En aislamientos de *E. coli*, son dos los principales sistemas de transporte de nutrientes responsables de la entrada de la fosfomicina a la célula bacteriana: los transportadores de glicerol-3-fosfato (GlpT) y de glucosa-6-fosfato (UhpT). La expresión de estos transportadores es inducida por sus sustratos y requiere la presencia de adenosina monofosfato cíclico (cAMP) (Figura 2)<sup>10</sup>.

#### Transportador GlpT

La GlpT es una glicerol-3-P permeasa, una proteína de la *Major Facilitator Superfamily* (MFS), que transporta fosfomicina hacia el interior de la célula bacteriana. La GlpR actúa como proteína represora del GlpT y bloquea la transcripción del gen *glpT*, al unirse próximo a la región promotora de este gen, generando la resistencia a la fosfomicina. Cuando la GlpR se une al glicerol-3-P, este deja de unirse a la región promotora del *glpT*, y mantiene activa la síntesis del GlpT<sup>11</sup>. La inactivación de la GlpR también lleva a la expresión constitutiva del *glpT*, manteniendo la sensibilidad de la bacteria a la fosfomicina (Figura 2).





redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



## Transportador UhpT

A su vez, el UhpT es un transportador de hexosa-fosfato, responsable de la acumulación de glucosa-6-P y de la entrada de fosfomicina a la célula bacteriana. El UhpT también pertenece a la *Major Facilitator Superfamily*. El sistema de transporte UhpT es controlado por diversos componentes regulatorios, incluyendo *uhpA*, *uhpB* y *uhpC*, cuyos productos son necesarios para la elevada expresión del transportador UhpT. La inactivación de cualquiera de estos genes puede generar resistencia a la fosfomicina, debido a la inhibición o reducción de la expresión del UhpT, que impide la entrada de fosfomicina a la célula bacteriana (Kadner, 1983)<sup>12</sup> (**Figura 2**). Cualquier mutación en los genes estructurales de estos transportadores puede generar diferentes niveles de resistencia a la fosfomicina<sup>10</sup>.

## Adenosina monofosfato cíclico (cAMP)

La regulación mediante la cAMP ocurre porque se necesitan altos niveles de este complejo para la expresión de los transportadores de fosfomicina GlpT y UhpT, en enterobacterias. A su vez, la síntesis de cAMP depende de la actividad de la adenilciclase (CyaA). La enzima fosfotransferasa, PtsI, un componente del sistema de transporte de la azúcar fosfotransferasa PEP, también regula los niveles de cAMP. Las mutaciones en *cyaA* y *ptsI* causan una reducción de los niveles intracelulares de cAMP y, en consecuencia, una reducción en la síntesis de ambos transportadores de fosfomicina<sup>13,14</sup>.

Además, la inactivación de la proteína receptora de cAMP, CRP, impide la expresión de ambos sistemas de transporte. La cAMP-CRP reconoce diferentes sitios de unión sobre el operón *glpTQ*, en la cadena de ADN, que son controlados negativamente por GlpR y positivamente por cAMP-CRP (**Figura 2**)<sup>15</sup>.

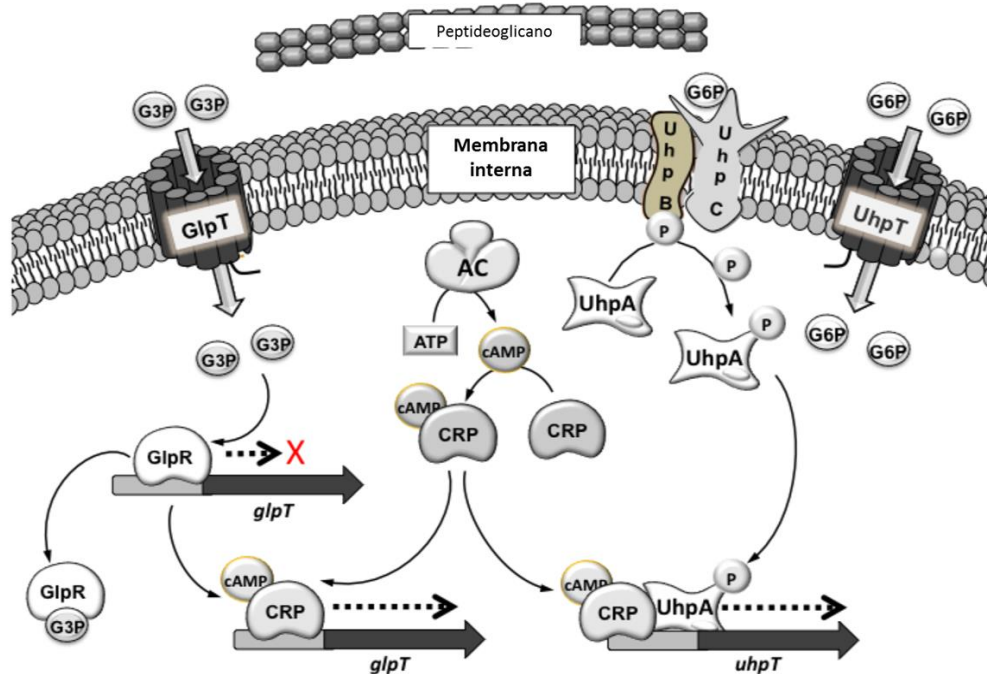


redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



**Figura 2.** Regulación del GlpT y UhpT. En *E. coli* y distintas enterobacterias, la expresión del *glpT* y *uhpT* necesita la presencia del cAMP, que, en conjunto con el complejo proteico receptor (CRP), forma el complejo proteico receptor cAMP (cAMP-CRP). Este complejo se une a sitios específicos en el promotor de ambos genes, *glpT* y *uhpT*, y promueve la expresión de los mismos, respectivamente. Además, están presentes otros mecanismos regulatorios. Por un lado, la expresión del gen *glpT* también es controlada por el represor, GlpR, que se vuelve inactivo cuando se acopla al glicerol-3-P (G3P), y, por otro, la expresión de alto nivel del *uhpT* requiere los genes reguladores, *uhpA*, *uhpB* y *uhpC*, que detectan hexosa-fosfatos y traducen sus señales por fosforilación, regulando positivamente la transcripción del gen.

Figura adaptada de Castañeda-García, *Antibiotics*, 2013.

Los aislamientos bacterianos con deficiencia en los sistemas de transporte de carbohidratos no son capaces de crecer utilizando algunos sustratos como única fuente de carbono, como, por ejemplo, glicerol-3-P o glucosa-6-P, en GlpT-deficientes o Uhp-deficientes, respectivamente.

Los mutantes, en ambos sistemas de transporte, con frecuencia no consiguen crecer en presencia de diferentes fuentes de carbono. De hecho, se ha observado que agregar glucosa-6-P inducía la sensibilidad a la fosfomicina en aislamientos resistentes, por deficiencia de GlpT, debido a que induce la síntesis del UhpT<sup>16</sup>. Por consiguiente, el *European Committee on Antimicrobial susceptibility testing* (EUCAST) recomienda agregar glucosa-6-P para determinar la CIM, dado que muestra mayor precisión en los resultados, al compararlos con los resultados de aislamientos estudiados en ausencia de glucosa-6-P<sup>17</sup>.



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



En *Pseudomonas aeruginosa*, solo se describió al sistema de transporte GlpT como responsable de la entrada de fosfomicina a la célula bacteriana<sup>18</sup>. Por consiguiente, en *P. aeruginosa*, basta la mutación en el gen *glpT* para conferir resistencia a la fosfomicina, siendo esta una mutación aparentemente sin costo funcional para esta especie.

### 2.2.2. Modificación en el blanco MurA

La modificación en el sitio de acción del antibiótico es uno de los mecanismos de adquisición de resistencia más comunes en bacterias. Sin embargo, este es un evento bastante raro entre los aislamientos clínicos resistentes a la fosfomicina. La MurA, una enzima esencial en la síntesis de peptidoglicano, es el blanco de la fosfomicina. Este antibiótico inactiva a la enzima MurA mediante una unión irreversible y de manera dependiente de la dosis. En *E. coli*, las mutaciones en Cys115, sitio de unión de la fosfomicina en la MurA, resulta en resistencia a este antibiótico<sup>19</sup>. Lo mismo sucede con especies que presentan resistencia intrínseca a la fosfomicina, como *Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamydia trachomatis* y *Borrelia burgdoferi*<sup>20,21</sup>. No obstante lo cual, la modificación adquirida en el blanco de la fosfomicina parece ser un evento raro, en aislamientos clínicos.

Por otro lado, el aumento de la síntesis de la MurA en *E. coli* se correlaciona con un aumento en los niveles de resistencia a la fosfomicina, que llega a CIM elevadas y clínicamente significativas (32 ug/ml), con un bajo costo para la célula bacteriana<sup>22</sup>.

### 2.2.3. Modificación en el antimicrobiano

Pese a que un gran número de enzimas son capaces de modificar la fosfomicina, lo cual resulta en su inactivación, la importancia de estas enzimas en aislamientos clínicos parece ser pequeña. La resistencia bacteriana a la fosfomicina por inactivación involucra a una de estas tres distintas proteínas: FosA, FosB y FosX. Todas catalizan la apertura del anillo oxirano del antibiótico, inactivándolo; son, sin embargo, diferentes en cuanto al mecanismo químico, utilizando diferentes sustratos para añadir grupos químicos al antibiótico<sup>23</sup>. Los diversos genes *fos*, dado que presentan una gran homología en sus secuencias, pueden sufrir recombinación homóloga, generando la formación de enzimas recombinantes. Las proteínas FosA, FosB y FosX son miembros de la misma superfamilia de metaloenzimas, dependientes de iones metálicos divalentes.



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



**FosA.** El gen *fosA* fue identificado por primera vez en un plásmido conjugativo proveniente de aislamientos clínicos de *Enterobacteriaceae*, residiendo en el transposón Tn2921, en algunos plásmidos<sup>24</sup>. La FosA se detectó en aislamientos de *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *K. oxytoca*, *K. pneumoniae* y *E. coli*. Hasta el momento, no se la ha descrito en bacterias Gram positivas. La secuencia de nucleótidos es muy semejante a la de los genes cromosómicos de *Enterobacter cancerogenus* y los genes del genoma de *P. aeruginosa*, inclusive con propiedades catalíticas muy semejantes<sup>25</sup>. La FosA es dependiente de  $Mn^{+2}$  e inactiva a la fosfomicina mediante el agregado de glutatión al anillo oxirano. Además, la FosA necesita  $K^+$  para una actividad óptima, dado el efecto cien veces mayor cuando este interactúa con su sitio catalítico (**Figura 3**)<sup>26</sup>.

**FosB.** Se describió al gen *fosB*, inicialmente, en un plásmido, confiriéndole resistencia a la fosfomicina en *Staphylococcus epidermidis*, aunque ha sido ampliamente detectado en cromosomas y plásmidos de bacterias Gram positivas, incluyendo *Bacillus subtilis*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *S. aureus*, *S. epidermidis* y *E. faecium*<sup>27</sup>. Los análisis cinéticos de FosB proveniente de *S. aureus* confirmaron que esta enzima es una tiol transferasa dependiente de ion metálico divalente ( $Mg^{+2}$  o  $Mn^{+2}$ ), constituyéndose el bacilitiol en el sustrato tiol preferido, en condiciones fisiológicas (Roberts, 2013)<sup>28</sup>.

**FosX.** Las FosX hidrolasas son una subfamilia de enzimas relacionadas con las FosA y las FosB, que contiene 30-35% de identidad con ambos grupos de enzimas; se las puede detectar en el cromosoma de microorganismos, e incluyen secuencias homólogas en *L. monocytogenes*, *Clostridium botulinum* y *Brucella melitensis*. La FosX es dependiente de  $Mn^{+2}$ , que cataliza la adición de agua al antibiótico, rompiendo el anillo oxirano. La reacción requiere un residuo de ácido glutámico en el sitio activo de la enzima FosX<sup>29</sup>.

**Otras enzimas inactivadoras de la fosfomicina.** Los microorganismos capaces de sintetizar fosfomicina, como algunos *Streptomyces* y *Pseudomonas syringae*, son resistentes a altas concentraciones de este antibiótico. Estos microorganismos producen fosfomicina quinasa no relacionadas con las metaloenzimas Fos. En *Streptomyces* spp., dos fosfomicina quinasa modifican secuencialmente al antibiótico en presencia de ATP y  $Mg^{+2}$ . La FomA convierte fosfomicina en fosfomicina monofosfato, mientras que la FomB produce fosfomicina difosfato, usando la forma monofosfato como sustrato (**Figura 3**)<sup>30</sup>. La resistencia intrínseca de *P. syringae* está relacionada con la fosfomicina quinasa denominada FosC, que ha sido recientemente identificada como un ortólogo



redEMC  
Infectología



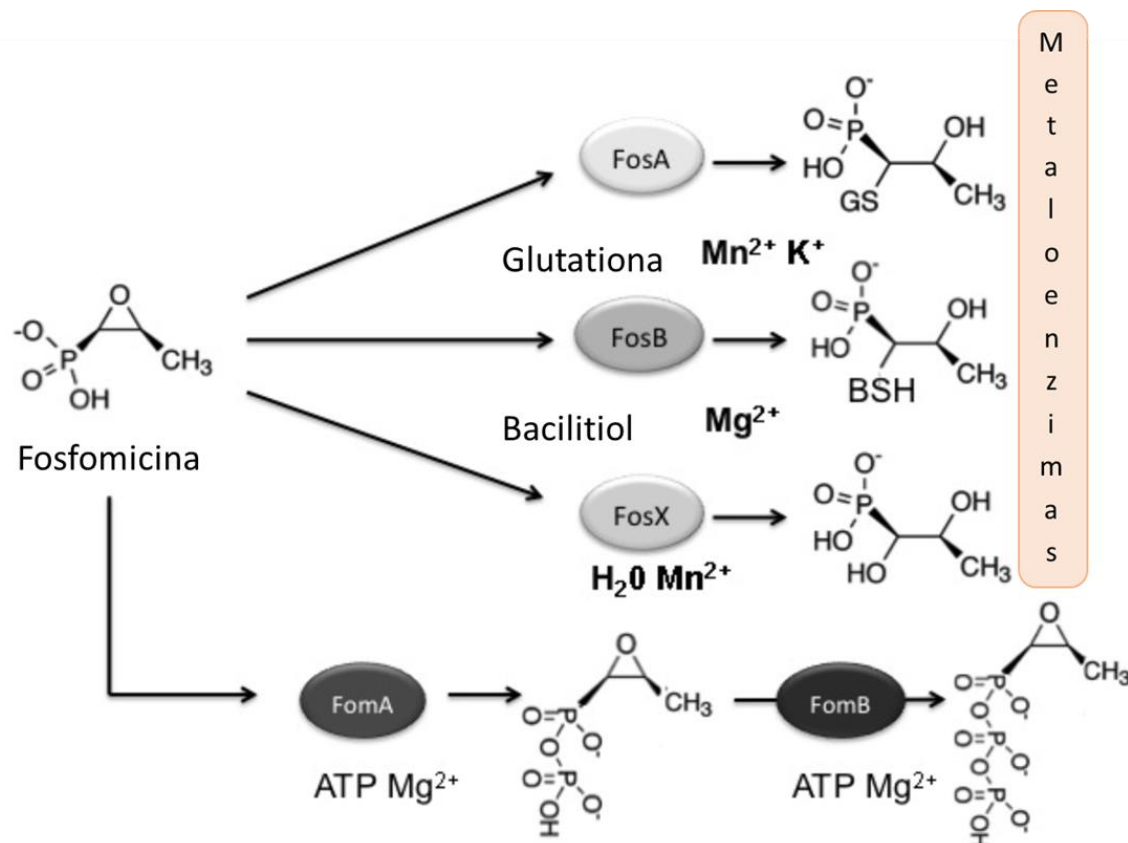
UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



de *fomA* que modifica al antibiótico, produciendo fosfomicina monofosfato mediante la utilización de ATP como fuente de energía<sup>31</sup>.

En la siguiente Figura se muestran los sustratos y metales necesarios para la actuación de cada enzima.



**Figura 3.** Reacciones catalizadas por las metaloenzimas Fos (FosA, FosB y FosX) y quinasas fosfomicina (FosC, FomA y FomB). Las enzimas inactivadoras de fosfomicina modifican al antibiótico, volviéndolo inactivo, mediante el rompimiento del anillo oxirano (metaloenzimas) o a través de la fosforilación (quinasas fosfomicina). Figura adaptada de Castañeda-García, *Antibiotics*, 2013.

## 2.3. Detección en Laboratorio del Fenotipo de Resistencia a la Fosfomicina

La determinación de la sensibilidad a la fosfomicina presenta sus dificultades a la hora de la interpretación de los resultados. En primer lugar, pese a actuar contra diferentes patógenos, se cuenta con puntos de corte para disco difusión solamente para *E. coli* tanto EUCAST como CLSI.



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



Sin embargo mientras EUCAST establece dichos valores tanto para la presentación oral como para la I/V sin hacer discriminación de la procedencia del aislamiento, CLSI solo lo hace para aislamientos urinarios únicamente. En ambas normas se utilizan los discos de 200µg que debe contener 50µg de glucosa-6-fosfato. No obstante esto, los puntos de corte para una y otra norma presentan importantes diferencias como se ve en la tabla 1. Para la interpretación de los resultados de discodifusión, no deben tenerse en cuenta las colonias aisladas que puedan aparecer dentro del halo.

En relación a la determinación de la CIM, CLSI establece puntos de corte solo para *E. coli* aislado de infección urinaria, mientras que EUCAST valida dichos resultados para enterobacterias en general y para *Staphylococcus* spp. Es importante resaltar que la sensibilidad a la fosfomicina se debe determinar en presencia de glucosa-6-fosfato (25 mg/L)<sup>17,32</sup>.

En el caso de CLSI también presenta puntos de corte para aislamientos urinarios de *Enterococcus faecalis*<sup>32</sup>

En la Tabla 2 se enumeran los puntos de corte recomendados por EUCAST y CLSI para clasificar la categoría de sensibilidad a la fosfomicina<sup>17,32</sup>.

EUCAST proporciona, incluso, un documento explicativo sobre el uso de la fosfomicina IV y su derivado, fosfomicina-trometamol, administrado por vía oral. Este último es indicado para infecciones del tracto urinario bajo no complicadas, principalmente aquellas causadas por *E. coli*, con eficacia clínica bien documentada<sup>33</sup>. Su uso ha despertado gran interés, ya que los aislamientos de *E. coli* productores de BLEE o multirresistentes mantienen sensibilidad a la fosfomicina. Además, una única dosis de 3 g es capaz de mantener la concentración urinaria por encima de los 128 mg/ml, durante 24-36 horas; en consecuencia, se recomienda la fosfomicina para el tratamiento de infecciones del tracto urinario bajo no complicadas<sup>34</sup>. Asimismo, la fosfomicina administrada por vía endovenosa presenta también buena actividad contra otras enterobacterias distintas de *E. coli* contra la mayoría de los *Staphylococcus aureus*, incluyendo SARM y SCoN, pudiendo ser utilizada en pacientes críticos, normalmente en terapia combinada.



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



	Potencia de disco (µg)	EUCAST				CLSI					
		Diámetro de disco (mm)		CIM <sup>a</sup> (mg/l)		Diámetro de disco (mm)			CIM <sup>a</sup> (mg/l)		
Microorganismo		S	R	S	R	S	I	R	S		R
<b><i>Staphylococcus spp.</i></b>											
Fosfomicina IV	-			≤32	≥64						
<b><i>Enterobacteriaceae</i></b>											
Fosfomicina oral <sup>c</sup>	200 <sup>b</sup>	≥24 <sup>d</sup>	<24 <sup>d</sup>	≤32	>32	≥16	13-15	<12	≤64	128	≥256
Fosfomicina IV	200 <sup>b</sup>	≥24 <sup>d</sup>	<24 <sup>d</sup>	≤32	>32						
<b><i>Enterococcus faecalis</i></b>											
Fosfomicina oral <sup>c</sup>	200 <sup>b</sup>					≥16	13-15	<12	≤64	128	≥256

**Tabla 1.** Puntos de corte de fosfomicina para las formulaciones oral y endovenosa, en aislamientos de *Staphylococcus spp.* y *Enterobacteriaceae*, de acuerdo con las recomendaciones de EUCAST<sup>17</sup>.

- El método de referencia para la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) es la dilución en agar. Ésta debe realizarse con la adición de 25 mg/L de glucosa-6-fosfato
- El disco de fosfomicina debe incluir 50µg de glucosa-6-fosfato
- Indicado solo para aislamientos procedentes de infecciones del tracto urinario.
- Los puntos de corte para discodifusión son aplicables a aislamientos de *E. coli*, para otras enterobacterias debe realizarse determinación de CIM.

## 2.4. Referencias

- Raz R. Fosfomycin: an old--new antibiotic. Clin Microbiol Infect. 2012 Jan;18(1):4-7.
- Hendlin, D.; Stapley, E.O.; Jackson, M.; Wallick, H.; Miller, A.K.; Wolf, F.J.; Miller, T.W.; Chaiet, L.; Kahan, F.M.; Foltz, E.L.; et al. Phosphonomycin, a new antibiotic produced by strains of Streptomyces. Science 1969, 166, 122–123.
- Sauermann R, Karch R, Langenberger H, et al. Antibiotic abscess penetration: fosfomycin levels measured in pus and simulated concentration-time profiles. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49(11):4448–4454.
- Popovic M, Steinort D, Pillai S, et al. Fosfomycin: an old, new friend? Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2010; 29: 127-42
- Falagas ME, Kastoris AC, Karageorgopoulos DE, Rafailidis PI. Fosfomycin for the treatment of infections caused by multidrug-resistant non-fermenting Gram-negative bacilli: a systematic review of microbiological, animal and clinical studies. Int J Antimicrob Agents. 2009;34(2):111–120.
- Brown ED, Vivas EI, Walsh CT, Kolter R. MurA (MurZ), the enzyme that catalyzes the first committed step in peptidoglycan biosynthesis, is essential in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 1995, 177;4194-4197.
- Castañeda-García A, Blázquez J, Rodríguez-Rojas A. Molecular Mechanisms and Clinical Impact of Acquired and Intrinsic Fosfomycin Resistance. Antibiotics (Basel). 2013 Apr 16;2(2):217-36.



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



8. Monurol Package Insert. St. Louis: Forest Laboratories, Inc.; 1997.
9. Taneja N and Kaur H. Insights into Newer Antimicrobial Agents Against Gram-negative Bacteria. *Microbiology Insights* 2016;9:9-19
10. Kadner RJ, Winkler HH. Isolation and characterization of mutations affecting the transport of hexose phosphates in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1973 Feb;113(2):895-900.
11. Larson TJ, Ye SZ, Weissenborn DL, Hoffmann HJ, Schweizer H. Purification and characterization of the repressor for the sn-glycerol 3-phosphate regulon of *Escherichia coli* K12. *J Biol Chem.* 1987 Nov 25;262(33):15869-74.
12. Kadner RJ, Shattuck-Eidens DM. Genetic control of the hexose phosphate transport system of *Escherichia coli*: mapping of deletion and insertion mutations in the uhp region. *J Bacteriol.* 1983 Sep;155(3):1052-61.
13. Cordaro JC, Melton T, Stratis JP, Atagün M, Gladding C, Hartman PE, Roseman S. Fosfomycin resistance: selection method for internal and extended deletions of the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase genes of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol.* 1976 Dec;128(3):785-93.
14. Sakamoto Y, Furukawa S, Ogihara H, Yamasaki M. Fosmidomycin resistance in adenylate cyclase deficient (*cya*) mutants of *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2003 Sep;67(9):2030-3.
15. Larson TJ, Cantwell JS, van Loo-Bhattacharya AT. Interaction at a distance between multiple operators controls the adjacent, divergently transcribed *glpTQ-glpACB* operons of *Escherichia coli* K-12. *J Biol Chem.* 1992 Mar 25;267(9):6114-21.
16. Kahan, F.M.; Kahan, J.S.; Cassidy, P.J.; Kropp, H. The mechanism of action of fosfomycin (phosphonomycin). *Ann. NY Acad. Sci.* 1974, 235, 364-386.
17. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Disponible en:  
[http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v\\_8.0\\_Breakpoint\\_Tables.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_8.0_Breakpoint_Tables.pdf)
18. Castañeda-García A, Rodríguez-Rojas A, Guelfo JR, Blázquez J. The glycerol-3-phosphate permease *GlpT* is the only fosfomycin transporter in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 2009 Nov;191(22):6968-74.
19. Kim DH, Lees WJ, Kempell KE, Lane WS, Duncan K, Walsh CT. Characterization of a Cys115 to Asp substitution in the *Escherichia coli* cell wall biosynthetic enzyme UDP-GlcNAc enolpyruvyl transferase (*MurA*) that confers resistance to inactivation by the antibiotic fosfomycin. *Biochemistry.* 1996 Apr 16;35(15):4923-8.
20. De Smet KA, Kempell KE, Gallagher A, Duncan K, Young DB. Alteration of a single amino acid residue reverses fosfomycin resistance of recombinant *MurA* from *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology.* 1999 Nov;145 ( Pt 11):3177-84.
21. Jiang S, Gilpin ME, Attia M, Ting YL, Berti PJ. Lyme disease enolpyruvyl-UDP-GlcNAc synthase: fosfomycin-resistant *MurA* from *Borrelia burgdorferi*, a fosfomycin-sensitive mutant, and the catalytic role of the active site Asp. *Biochemistry.* 2011 Mar 29;50(12):2205-12.
22. Horii T, Kimura T, Sato K, Shibayama K, Ohta M. Emergence of fosfomycin-resistant isolates of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* O26. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999 Apr;43(4):789-93.
23. Rigsby RE, Fillgrove KL, Beihooffer LA, Armstrong RN. Fosfomycin resistance proteins: a nexus of glutathione transferases and epoxide hydrolases in a metalloenzyme superfamily. *Methods Enzymol.* 2005;401:367-79.





redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



24. Llanea J, Villar CJ, Salas JA, Suarez JE, Mendoza MC, Hardisson C. Plasmid-mediated fosfomycin resistance is due to enzymatic modification of the antibiotic. *Antimicrob Agents Chemother.* 1985 Jul;28(1):163-4.
25. Seoane A, Sangari FJ, Lobo JM. Complete nucleotide sequence of the fosfomycin resistance transposon Tn2921. *Int J Antimicrob Agents.* 2010 Apr;35(4):413-4.
26. Bernat BA, Laughlin LT, Armstrong RN. Elucidation of a monovalent cation dependence and characterization of the divalent cation binding site of the fosfomycin resistance protein (FosA). *Biochemistry.* 1999 Jun 8;38(23):7462-9.
27. Zilhao R, Courvalin P. Nucleotide sequence of the fosB gene conferring fosfomycin resistance in *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Microbiol Lett.* 1990 Mar 15;56(3):267-72.
28. Roberts AA, Sharma SV, Strankman AW, Duran SR, Rawat M, Hamilton CJ. Mechanistic studies of FosB: a divalent-metal-dependent bacillithiol-S-transferase that mediates fosfomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Biochem J.* 2013 Apr 1;451(1):69-79.
29. Fillgrove KL, Pakhomova S, Schaab MR, Newcomer ME, Armstrong RN. Structure and mechanism of the genomically encoded fosfomycin resistance protein, FosX, from *Listeria monocytogenes*. *Biochemistry.* 2007 Jul 10;46(27):8110-20.
30. Kobayashi S, Kuzuyama T, Seto H. Characterization of the fomA and fomB gene products from *Streptomyces wedmorensis*, which confer fosfomycin resistance on *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000 Mar;44(3):647-50.
31. Kim SY, Ju KS, Metcalf WW, Evans BS, Kuzuyama T, van der Donk WA. Different biosynthetic pathways to fosfomycin in *Pseudomonas syringae* and *Streptomyces* species. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Aug;56(8):4175-83.
32. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 26th informational supplement. M100-S27. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2017.
33. Patel SS, Balfour JA, Bryson HM. Fosfomycin tromethamine. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy as a single-dose oral treatment for acute uncomplicated lower urinary tract infections. *Drugs.* 1997 Apr;53(4):637-56.
34. Mazzei T, Cassetta MI, Fallani S, Arrigucci S, Novelli A. Pharmacokinetic and pharmacodynamic aspects of antimicrobial agents for the treatment of uncomplicated urinary tract infections. *Int J Antimicrob Agents.* 2006 Aug;28 Suppl 1:S35-41.



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



## 3. Resistencia a Antibióticos $\beta$ -lactámicos en Bacilos Gram negativos

**Prof. Agdo. Dr. Rafael Vignoli**

Departamento de Bacteriología y Virología, Facultad de Medicina,  
Universidad de la República, Uruguay.

Integrante del Sistema Nacional de Investigadores de Uruguay (Nivel I).

### 3.1. Generalidades

Los  $\beta$ -lactámicos son antibióticos que actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana como se comentará más adelante.

El primer antibiótico de esta clase, la penicilina, fue descubierto en 1928 por Alexander Fleming mientras estudiaba cultivos del género *Staphylococcus* spp. y era producida por una especie no caracterizada hasta el momento de *Penicillium*<sup>1</sup>.

Si bien se realizaron algunos ensayos preliminares<sup>2</sup> no fue hasta el año 1940 que se consigue purificar la penicilina, lo que permitió realizar los primeros trabajos en ratón y en humanos con el antibiótico purificado<sup>3,4</sup>.

Desde ese momento, la familia de  $\beta$ -lactámicos como producto natural, semi-sintético o en asociación a inhibidores no ha parado de crecer<sup>5,6</sup>.

#### 3.1.1. Estructura química

De acuerdo a su estructura química, pueden describirse cuatro clases de  $\beta$ -lactámicos: penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenemes (ver **Figura 1**). La generación de un número creciente de subclases, dentro de las dos primeras, hace que sean los grupos más grandes dentro de la familia.

Las penicilinas tienen como núcleo base al ácido 6-aminopenicilánico o grupo penam, el cual está compuesto por la fusión del anillo  $\beta$ -lactámico (común a toda la familia) y un anillo tiazolidínico (ver **Figura 1**). Las sustituciones en la cadena lateral del C6 permiten modificar el espectro de acción y las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de estos compuestos<sup>7</sup>.

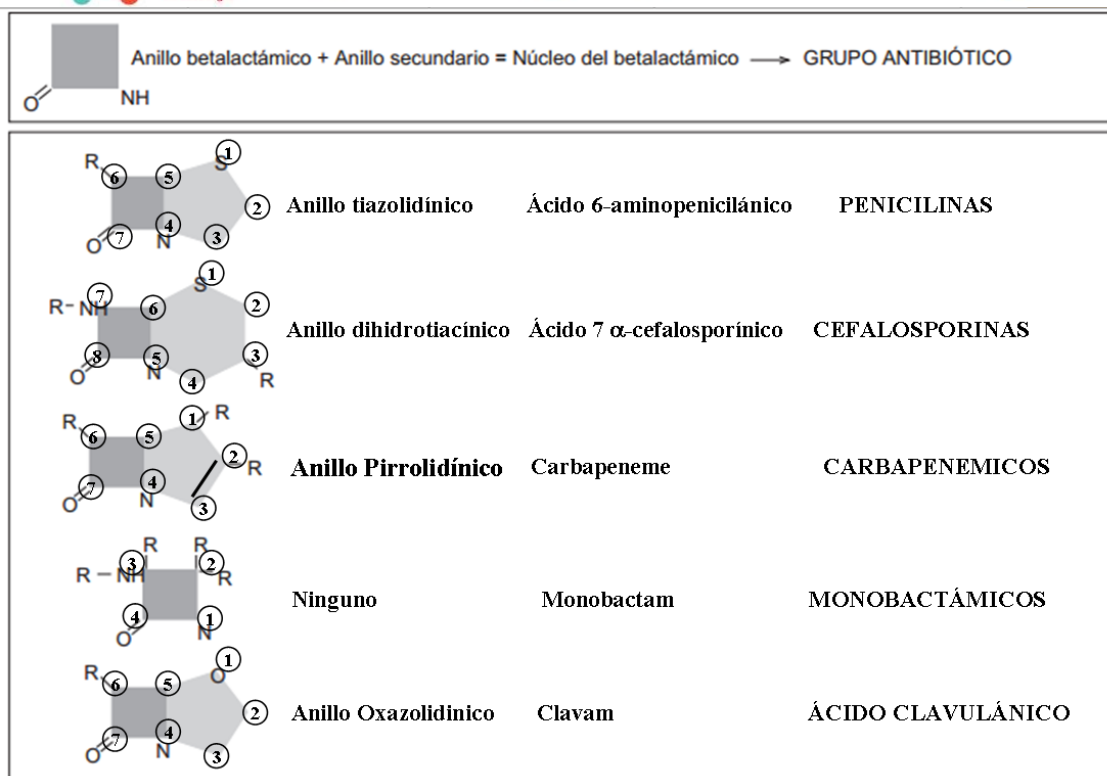


redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



**Figura 1:** Estructura química de los diferentes antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Tomada y modificada de Suárez & Guidol<sup>8</sup>.

El núcleo base de las cefalosporinas es el ácido 7 $\alpha$ -cefalosporánico o grupo cefem, el cual queda constituido por la fusión del anillo  $\beta$ -lactámico a un anillo dihidrotiacínico. Se generan así compuestos de 8 miembros pudiéndose introducir cadenas laterales en las posiciones 3 y 7 (ver **Figura 1**). Éstas cambian las características de las moléculas en lo que tiene que ver con sus propiedades farmacocinéticas, farmacodinámicas (fundamentalmente en C3), espectro de acción y estabilidad ante determinadas enzimas inactivantes de  $\beta$ -lactámicos denominadas  $\beta$ -lactamasas (principalmente relacionado a C7)<sup>9</sup>.

Los carbapenemes fusionan el anillo  $\beta$ -lactámico a un anillo pirrolidínico, que se diferencia del anillo tiazolidínico de las penicilinas fundamentalmente en tres características: se trata de un anillo insaturado que permite el agregado de cadenas laterales en C1 y C2; presenta un grupo metileno en lugar del grupo sulfuro en la posición 1 y contiene un doble enlace entre los carbonos 2 y 3 (ver **Figura 1**). Se trata de los  $\beta$ -lactámicos más estables ante la presencia de  $\beta$ -lactamasas y con mayor espectro antimicrobiano dentro de la familia<sup>10</sup>.



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



Finalmente, los monobactámicos consisten solamente en el anillo  $\beta$ -lactámico, y tienen como característica distintiva su alta estabilidad frente a las metalo  $\beta$ -lactamasas. El aztreonam es el único antibiótico disponible<sup>10</sup>.

### 3.1.2. Sitio blanco “El Peptidoglicano”

Los  $\beta$ -lactámicos ejercen su efecto por inhibición de la síntesis del peptidoglicano o mureína, actuando sobre las etapas finales de la misma.

Para comprender mejor esta acción se repasará brevemente el mecanismo de síntesis del peptidoglicano, el cual es el componente fundamental de la pared celular tanto funcional como estructuralmente.

Dicha síntesis comprende tres etapas:

- Una etapa citoplasmática, que comprende la síntesis de la molécula precursora y unidad estructural de la mureína compuesta por N-acetil glucosamina $\beta$ 1-N-acetilmurámico pentapéptido (NAcGlc-NAcMur-penta).
- Una etapa transmembrana, la cual culmina con la translocación de NacGlc-NacMur-penta desde el citoplasma hacia el espacio extracelular.
- Una etapa extracelular, donde se produce el ensamblaje y maduración del peptidoglicano.

**Etapla citoplasmática:** El primer paso consiste en la síntesis de UDP-NAcMur a partir de UDP-NAcGlc, la cual ocurre por formación de un enol piruvato éster (a partir de fosfoenolpiruvato) y su reducción a lactil éter mediada por NADPH. Estas reacciones son llevadas a cabo por los productos de los genes de MurA y MurB<sup>11</sup>.

El siguiente paso es el agregado del componente peptídico de la mureína al grupo D-lactoyl del UDP-NAcMur para formar el UDP-NAcMur pentapéptido (UDP-NAcMur-penta).

En una primera etapa se agregan los tres primeros aminoácidos, para generar la forma UDP-NAcMur tripéptido (UDP-NAcMur tri). Este paso puede ocurrir por dos vías:

A. por el agregado sucesivo de L-alanina, ácido D-glutámico y un diaminoácido relativamente variable que en general para Gram negativos es el ácido meso-diaminopimelico (meso-A<sub>2</sub>pm).

B. por el agregado del tripéptido preformado, surgido en el proceso de reciclaje del péptidoglicano.

En el primer caso el proceso está mediado por la acción sucesiva de las ligasas MurC, MurD y MurE, mientras que en el segundo se lleva a cabo por acción de la ligasa Mpl.



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



Sobre el UDP-NAcMur tri se agrega el di péptido D-alanil-D-alanina por acción de la ligasa MurF lo que da lugar al UDP-NAcMur-penta soluble<sup>11</sup>.

**Etapa transmembrana:** Esta etapa comienza con la transferencia del UDP-NAcMur-penta soluble, al lípido aceptor fosforilado undecaprenil fosfato por parte de la transferasa MraY<sup>12</sup>. Se forma así el denominado lípido I o undecaprenil-pirofosforil-UDP-NAcMur-penta. Finalmente, MurG le transfiere al lípido I una molécula de NAcGlc para formar el lípido II. Si bien se desconoce exactamente el mecanismo de pasaje desde un lado de la membrana al otro, los últimos trabajos disponibles señalan a FtsW (una proteína transmembrana conservada en todas las bacterias que tienen peptidoglicano) como responsable de este paso<sup>13</sup>.

**Etapa extracelular:** Es la etapa en que la mureína adquiere funcionalidad. El peptidoglicano a la vez que confiere protección osmótica debido a la alta osmolaridad intracelular también determina la forma de cada microorganismo. Como este proceso, además, debe acoplarse al crecimiento y división bacteriana, resulta necesario entender a la mureína como una macromolécula en permanente remodelación. A los efectos de ponerle inicio a un proceso continuo, diremos que las primeras reacciones que deben ocurrir entonces son la formación de cadenas glicosídicas y el entrecruzamiento de las mismas. La enlongación de las cadenas glicosídicas se producen por la realización de enlaces  $\beta$ -1-4 entre moléculas de NAcGlc-NAcMur-penta mediante reacciones de transglicosilación asociados a membrana. El entrecruzamiento por su parte, involucra el componente peptídico del peptidoglicano e involucra reacciones de transpeptidación<sup>14</sup>. A las enzimas que actúan sobre esta etapa de síntesis y presentan actividad transglicosilasa y/o transpeptidasa se les denomina genéricamente peptidoglican sintetasas. Dado que la actividad de transpeptidación es inhibida por  $\beta$ -lactámicos, estas enzimas reciben clásicamente el nombre de PBP (por penicillin binding proteins)<sup>15,16</sup>.

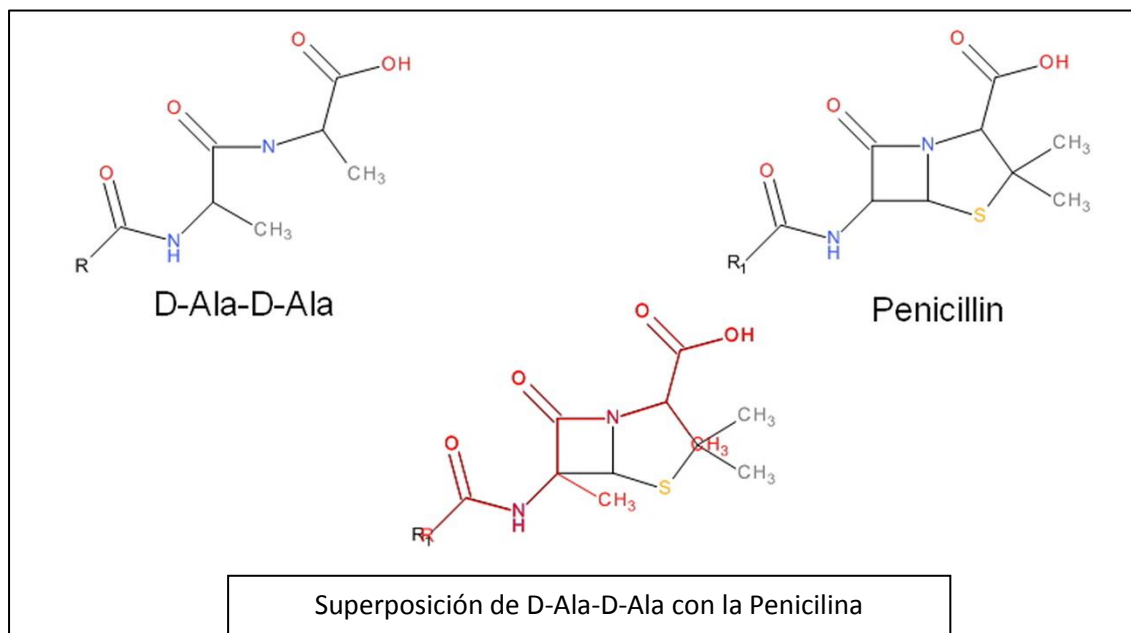
Las PBP pueden dividirse en aquellas de alta masa molecular (AMM) y baja masa molecular (BMM)<sup>14</sup>. Las AMM son bifuncionales con un dominio conservado transpeptidasa y un segundo dominio, ya sea con actividad transglicosilasa (AAM sub clase A) u otra actividad relacionada al mantenimiento y reciclaje del peptidoglicano (AAM sub clase B)<sup>14</sup>.

Por su parte las BMM son monofuncionales y sólo presentan actividad sobre el componente peptídico de la mureína. Estas reacciones en general implican el reconocimiento del dipéptido D-alanil-D-alanina con la consiguiente ruptura del enlace peptídico y liberación de la última molécula de



## 3.2. Mecanismo de acción

Teniendo en cuenta lo expresado anteriormente, el mecanismo de acción de los  $\beta$ -lactámicos, implica la inhibición de los dominios transpeptidasa y carboxi peptidasa de las PBP. Esto lleva a la detención total del proceso de síntesis de peptidoglicano, pero no al proceso de degradación. El balance es la pérdida de continuidad de la malla de mureína con el consiguiente estallido osmótico del microorganismo. Como se muestra en la **Figura 3**, la acción de estos antibióticos se debe a la similitud estereoquímica entre la D-alanil-D-alanina con las moléculas de antibióticos.



**Figura 3.** Modelo estructural donde se muestran las similitudes conformacionales del dímero D-ala-D-ala y penicilina. Tomada de <http://proteopedia.org>

## 3.3. Clasificación por grupos

Como se mencionó anteriormente, penicilinas y cefalosporinas son las clases de antibióticos con más derivados en cuanto a espectro de acción, a continuación, se describirán brevemente estos grupos.

### 3.3.1. Penicilinas

Las penicilinas pueden sub clasificarse en cinco grupos en base a características estructurales que modifican su espectro de acción: 1) penicilinas naturales: penicilina G y penicilina V; 2) penicilinas



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



resistentes a penicilinasas: meticilina, nafcilina, y penicilinas isoxazolil; 3) aminopenicilinas: ampicilina y amoxicilina; 4) carboxipenicilinas: carbenicilina y ticarcilina; 5) acil ureidopenicilinas: azlocilina, mezlocilina, y piperacilina<sup>7</sup>.

Las penicilinas naturales y las resistentes a penicilinasas presentan un reducido perfil de actividad, limitado fundamentalmente a Gram positivos. Para el caso de las amino, carboxi y ureidopenicilinas, el espectro de acción se va ampliando hacia los gram negativos, llegando a cubrir incluso *Pseudomonas* spp. en el caso de las carboxi y ureidopenicilinas<sup>7</sup>.

### 3.3.2. Cefalosporinas

Las cefalosporinas son productos derivados de la fermentación del hongo *Cephalosporium acremonium* (también llamado *Acremonium chrysogenum*) y se clasifican por generaciones según características generales de su actividad antibacteriana. Las de primera generación, como la cefalotina y la cefazolina, presentan buena actividad contra bacterias Gram positivas y una actividad relativa contra bacterias Gram negativas. A partir de las cefalosporinas de segunda generación (cefuroxime), el agregado en la cadena lateral del C7 de un grupo oxiiimino (ver **Figura 4**) les confiere estabilidad a ciertas  $\beta$ -lactamasas encontradas en bacterias Gram negativas como TEM-1 y SHV-1 (ver más adelante). Presentan una actividad aumentada contra bacilos Gram negativos y mantienen un variado grado de actividad sobre cocos Gram positivos. Las cefalosporinas de tercera generación como ceftriaxona, cefotaxime y ceftazidime, tienen como sustituyente un grupo oxiiimino, lo que les da el nombre de oxiiiminocefalosporinas y presentan un marcado aumento de la potencia frente a bacilos Gram negativos. Se encuentran dos subgrupos entre estos agentes, aquellos con potente actividad contra *P. aeruginosa* (ceftazidime y cefoperazona) y aquellos que no presentan dicha actividad (cefotaxime, ceftriaxona). Las cefalosporinas de cuarta generación, como cefepime y cefpirome, presentan el espectro de actividad más amplio, ya que son oxiiiminocefalosporinas resistentes a las  $\beta$ -lactamasas de clase C. Estas drogas tienen actividad contra la mayoría de los bacilos Gram negativos inclusive *P. aeruginosa* y mantienen su actividad contra cocos Gram positivos<sup>9</sup>.



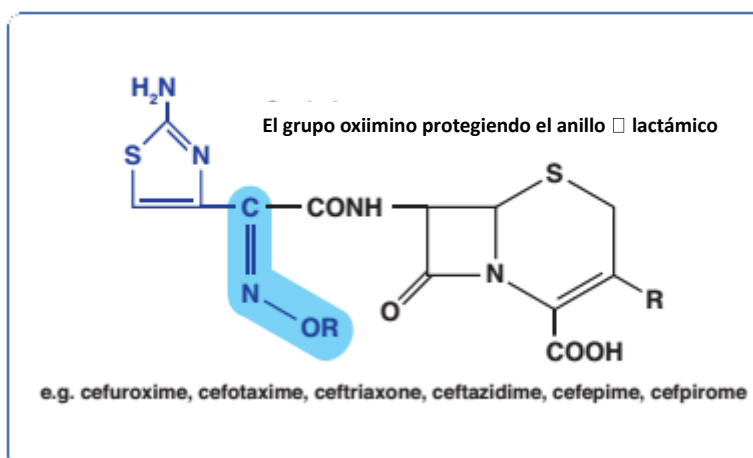


redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



**Figura 4.** Se muestra el grupo oximino presente en las oximinocefalosporinas que confiere protección al anillo  $\beta$ -lactámico de la acción de ciertas  $\beta$ -lactamasas de clase A. Tomada de Mast Group<sup>62</sup>.

Recientemente se han desarrollado una nueva clase de oximinocefalosporinas, particularmente diseñadas para tener actividad sobre *Staphylococcus* spp. resistentes a meticilina y *Streptococcus pneumoniae* con diverso grado de resistencia a otros  $\beta$ -lactámicos como el ceftobiprole y la ceftarolina, que no presenta ventajas sobre las cefalosporinas de tercera y cuarta generación en relación a enterobacterias y presentan menor actividad sobre bacilos gram negativos no fermentadores<sup>6,18</sup>.

### 3.3.3. Inhibidores de $\beta$ -lactamasas

Los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas originalmente comprendían moléculas derivadas de  $\beta$ -lactámicos, como ácido clavulánico y derivados sulfonados del ácido penicilánico (ver **Figura 1**)<sup>7</sup>. Estos compuestos que presentan una débil actividad antibacteriana, son potentes inhibidores de  $\beta$ -lactamasas fundamentalmente de clase A, y en menor medida de clase D, restableciendo en buena parte la actividad antibacteriana del  $\beta$ -lactámico al cual se lo asocia. Los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas actúan principalmente como "sustratos suicidas" a través de la formación de un complejo acil enzima irreversible con la  $\beta$ -lactamasa, llevando a la pérdida de la actividad enzimática. Pertenecen a esta clase de inhibidores ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam<sup>7</sup>.

En los últimos años se han desarrollado nuevas moléculas inhibitoras, no derivadas de  $\beta$ -lactámicos, como el avibactam, con capacidad para inhibir  $\beta$ -lactamasas de clase A, C y D, existiendo ya algunas combinaciones con aztreonam, ceftazidime y ceftaroline<sup>5,6</sup>.



## 3.4. Mecanismos de resistencia adquirida a $\beta$ -lactámicos

En el año 2015, Santiago-Rodríguez y col. describen a partir de estudios metagenómicos sobre microbiota del tracto digestivo de una momia precolombina del siglo XI, la presencia de múltiples genes putativos de resistencia a diversos antibióticos. Dentro de estos se encuentran distintas clases de  $\beta$ -lactamasas<sup>19</sup>.

Con este dato como precedente más ancestral, la utilización desmedida de los antibióticos tanto en humanos como en animales y la eliminación al medio de enormes cantidades de restos de antibióticos derivados de dicho consumo, han ejercido una fuerte presión de selección que ha permitido la evolución y agrupamiento de múltiples mecanismos de resistencia.

Particularmente, los mecanismos de resistencia a  $\beta$ -lactámicos clásicamente pueden dividirse en tres tipos:

- Alteración del Sitio Blanco de acción
- Trastornos de Permeabilidad y eflujo activo
- Hidrólisis enzimática mediada por  $\beta$ -lactamasas.

### 3.4.1. Alteración del sitio blanco de acción

Se reconocen fundamentalmente dos alternativas:

A. La producción de PBPs adicionales de baja afinidad por el antibiótico. En este caso, enzimas inexistentes en las cepas sensibles son expresadas en las cepas resistentes. Estas nuevas PBPs son funcionalmente activas y reemplaza la acción de las PBP originales, como ocurre con *Staphylococcus aureus* meticilino resistente<sup>20</sup>.

B. La producción de modificaciones en las PBP originales que generan la formación de una enzima con baja afinidad por los  $\beta$ -lactámicos. En este caso se pueden describir dos posibilidades:

1. La producción de eventos de recombinación interespecie, en los que se reemplazaron partes del gen normal que codifica la PBP, por fracciones de genes homólogos de especies altamente relacionadas como sucede con *Streptococcus pneumoniae*<sup>21</sup>.

2. la ocurrencia de mutaciones puntuales en los genes que codifican para las PBP, que también generan disminución de la afinidad de dichas enzimas. Este tipo de resistencia puede observarse en



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



especies como *Neisseria gonorrhoeae*<sup>22</sup>, *Haemophilus influenzae*<sup>23</sup>, *Pseudomonas aeruginosa*<sup>24</sup> y recientemente se ha asociado a resistencia a meticilina y cefalosporinas de quinta generación<sup>25,26</sup>.

### 3.4.2. Impermeabilidad y eflujo

Dentro de este mecanismo, el más importante y estudiado se produce en bacilos Gram negativos, y es debido a la aparición de mutantes deficientes en una o más porinas de la membrana externa<sup>24,27,28</sup>.

Como ejemplo se encuentra la resistencia a Imipenem en cepas de *Pseudomonas aeruginosa*<sup>24</sup> donde la deficiencia en una porina denominada D2, por donde ingresa el antibiótico, juega un rol preponderante.

En enterobacterias incluyendo *E. coli* se ha reportado resistencia a carbapenemes mediado por la interacción de alteraciones de porinas y presencia de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido, que *per se* sólo hidrolizan carbapenemes de forma marginal<sup>27,28</sup>.

La resistencia por eflujo es un mecanismo inespecífico, que afecta a diferentes grupos de antibióticos como los  $\beta$ -lactámicos, quinolonas, tetraciclinas y cloranfenicol entre otros<sup>24,29</sup>.

### 3.4.3. Producción de $\beta$ -lactamasas

Es el mecanismo más importante y frecuente de los observados y consiste en la hidrólisis enzimática de penicilinas, cefalosporinas, pudiendo alcanzar a los carbapenemes.

**Clasificación:** Basándose en datos de la secuencia parcial del DNA de las  $\beta$ -lactamasas, Ambler and Scott (Ambler RP and Scott GK 1980) propusieron una clasificación estructural, definiendo 4 clases: A, B, C y D<sup>30</sup>.

Las pertenecientes a las clases A, C y D son serin-enzimas (peniciloil-serin-transferasas)<sup>31,32</sup>, caracterizadas por la presencia obligada de una serina en el sitio activo, que media la reacción de hidrólisis.

Por su parte, las enzimas de clase B tienen una o dos moléculas de zinc asociados al sitio activo, por lo que se las considera metalo- $\beta$ -lactamasas. Estas enzimas actúan a través de un mecanismo diferente, ya que no se forman uniones covalentes entre la enzima y el antibiótico, sino que son las moléculas de Zinc las que atacan directamente a los grupos carbonilo y amida de todos los  $\beta$ -lactámicos en general, salvo los monobactámicos<sup>33</sup>.

En las cuatro clases de enzimas, se encuentran variantes capaces de hidrolizar oximiinocefalosporinas, mientras que sólo las de clase B (todas) y algunas pocas variantes de las de clase A y D alcanzan a hidrolizar carbapenemes<sup>34,35</sup>.

NUEVA  
EDICIÓN  
2018

# INTERPRETACIÓN DEL ANTIBIOGRAMA EN LA PRÁCTICA CLÍNICA DIARIA

CURSO  
ONLINE

18 DE ABRIL - 13 DE JUNIO 2018 - ATBgrama2018.evimed.net



redEMC  
Infectología

EUCAST



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA

evimed

Las  $\beta$ -lactamasas de mayor relevancia sobre la salud humana son las de clase A. Esto es debido al aumento de su perfil de sustratos que llegan a hidrolizar oxiiiminocefalosporinas y carbapenemes y a su gran diseminación mundial entre diferentes géneros bacterianos.

Dentro de las carbapenemasas de clase A se destacan KPC-2 y sus derivados y en menor medida algunas variantes de GES, como ser GES-2, GES-4, GES-5<sup>35</sup>.

Las enzimas de clase A, capaces de inactivar oxiiiminocefalosporinas, y son a su vez inhibibles por moléculas de tipo ácido clavulánico, reciben el nombre de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE).

En el año 1989, Karen Bush establece una clasificación funcional de las  $\beta$ -lactamasas, la cual es actualizada en 1995 por Bush, Jacoby y Medeiros y vuelta a revisar en el año 2010 por Bush y Jacoby<sup>34,36,37</sup>. En éstas se incluyen aspectos como los pesos moleculares, puntos isoeléctricos, perfiles de sustrato y capacidad de ser inhibidas por sustancias como el ácido clavulánico y tazobactam o EDTA.

Esta clasificación, que presenta una gran utilidad para presumir enzimas en el laboratorio clínico, tiene buena correlación con la clasificación de Ambler, como puede verse en la tabla 1.



GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



Clase molecular según Ambler	Clasificación de Bush/Jacoby (2010)	Principales sustratos	Inhibibles por		Característica enzimática	Enzimas representativas
			CLA o TZB	EDTA		
A	2a	Penicilinas	+	-	Hidrolizan mejor benzilpenicilinas que cefalosporinas	PC1
	2b	Penicilinas y cefalosporinas de primera generación	+	-	Perfil de hidrólisis similar para benzilpenicilinas y C1aG	TEM-1, TEM-2, SHV-1
	2be	Oxiiminocefalosporinas, monobactámicos	+	-	Hidrolisis aumentada para oxiiminocefalosporinas y monobactámicos	BLEE de la familia CTX-M, PER-1/2, derivadas de TEM1/2 o SHV-1, TEM-30 a 40, 44-45; SHV-10, 26, 49
	2br	Penicilinas	-	-	Resistencia a CLA/TZB/SLB	TEM-50, 68, 89, 109, 121, 125, 151-52, 154, 158
	2ber	Oxiiminocefalosporinas, monobactámicos	-	-	Hidrolisis aumentada para oxiiminocefalosporinas con resistencia a CLA/TZB/SLB	
	2c	Carbenicilina	+	-	Hidrolisis aumentada para carbenicilina	PSE-1, CARB-3
	2ce	Carbenicilina, cefepime	+	-	Hidrolisis aumentada para carbenicilina, cefepime, cefpirome	RTG-4
	2e	Oxiiminocefalosporinas	+	-	Hidrolisis de cefalosporinas, inhibibles por CLA pero no por TZB	CepA
	2f	Carbapenemes	Variable	-	Hidrólisis de carbapenemes y oxiiminocefalosporinas	KPC-2, IMI-1, SME-1
B (B1)	3a	Carbapenemes	-	+	Amplio espectro de hidrólisis incluyendo carbapenemes pero no aztreonam	VIM-2, IMP-1, SPM-1, NDM-1
B (B3)						L1, CAU-1, GOB-1 FEZ-1
B (B2)	3b	Carbapenemes	-	+	Hidrólisis preferencial de carbapenemes	CphA, Sfh-1
C	1	Cefalosporinas	-	-	mejor hidrólisis de cefalosporinas que penicilinas, hidrolisis de cefamicinas	AmpC de E. coli, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MR-1
	1e	Cefalosporinas	-	-	Hidrólisis aumentada a CAZ y a veces otras oxiiminocefalosporinas	GC-1, CMY37
D	2d	Cloxacilina	variable	-	Hidrolisis aumentada para doxacilina u oxacilina	OXA-1-10
	2de	Oxiiminocefalosporinas	variable	-	Hidrolisis de doxacilina, oxacilina y oxiiminocefalosporinas	OXA-11, 14-19
	2df	Carbapenemes	variable	-	Hidrolisis de doxacilina, oxacilina y carbapenemes	OXA-23-27, 33, 40, 48, 49, 51, 54, 55, 58,

**Tabla 1.** Principales propiedades de los distintos grupos de  $\beta$ -lactamasas. Se muestra la correlación entre la clasificación de Ambler de 1980 y la Bush y Jacoby de 2010(30,34).

Tomada y modificada de Bush y Jacoby 2010.

CLA: ácido clavulánico.

TZB: tazobactam.



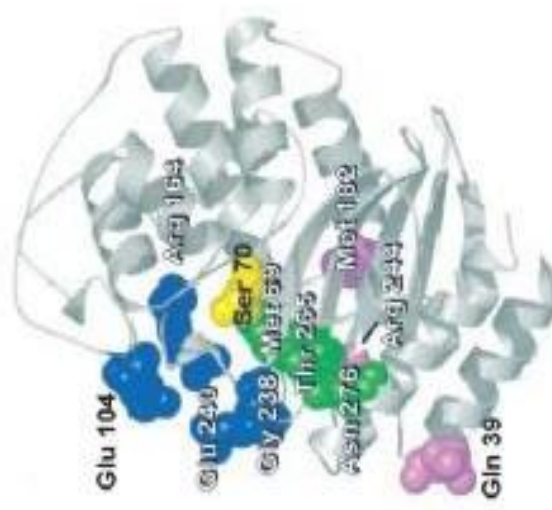
## Modificaciones del perfil de sustrato

Desde el punto de vista evolutivo, se reconocen dos alternativas para que una  $\beta$ -lactamasa de clase A tenga capacidad hidrolítica para ser una BLEE de significado clínico: la ocurrencia de mutaciones puntuales en el gen codificante de una  $\beta$ -lactamasa de espectro ampliado (BLEA) y modificaciones o reordenamiento del entorno genético del gen.

En el primer caso, se produce la expansión del perfil de sustrato debido a mutaciones puntuales del gen codificante, a partir de enzimas con capacidad de hidrólisis reducida a penicilinas y cefalosporinas de primera generación.

El grupo prototipo de estas BLEE son las derivadas de TEM-1 y 2. Estas enzimas constituyen uno de los grupos más extensos de  $\beta$ -lactamasas, incluyendo al día de hoy más de 220 variantes (K Bush, T Palzkill y GA Jacoby, <http://www.lahey.org/studies/webt.htm>).

En general éstas se originan por 1 a 4 modificaciones aminoacídicas de TEM-1 o TEM-2 que son responsables por la actividad de las  $\beta$ LEE derivadas de TEM, siendo las más frecuentes: Glu-104, Arg-164, Ala-237, Gly-238 and Glu-240<sup>31,38</sup>.



**Figura 5.** Modelo tridimensional de TEM-1 donde se señalan los principales aminoácidos involucrados en la modificación del perfil de sustrato de dicha enzima. En azul se resaltan las principales posiciones que se modifican en las BLEE (según Majiduddin & Palzkill<sup>38</sup>).



redEMC  
Infectología



EUCAST



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



Otro grupo importante de  $\beta$ -lactamasas que evoluciona de esta manera son las derivadas de SHV, de las cuales se describen más de 190 variantes (K Bush, T Palzkill y GA Jacoby <http://www.lahey.org/studies/webt.htm>).

Alternativamente, las modificaciones pueden ocurrir no en el gen codificante, sino en el entorno genético. En este caso se trata de modificaciones que aumentan la expresión del gen y no las capacidades de la enzima codificada (que constituye una BLEE aunque no sea detectable).

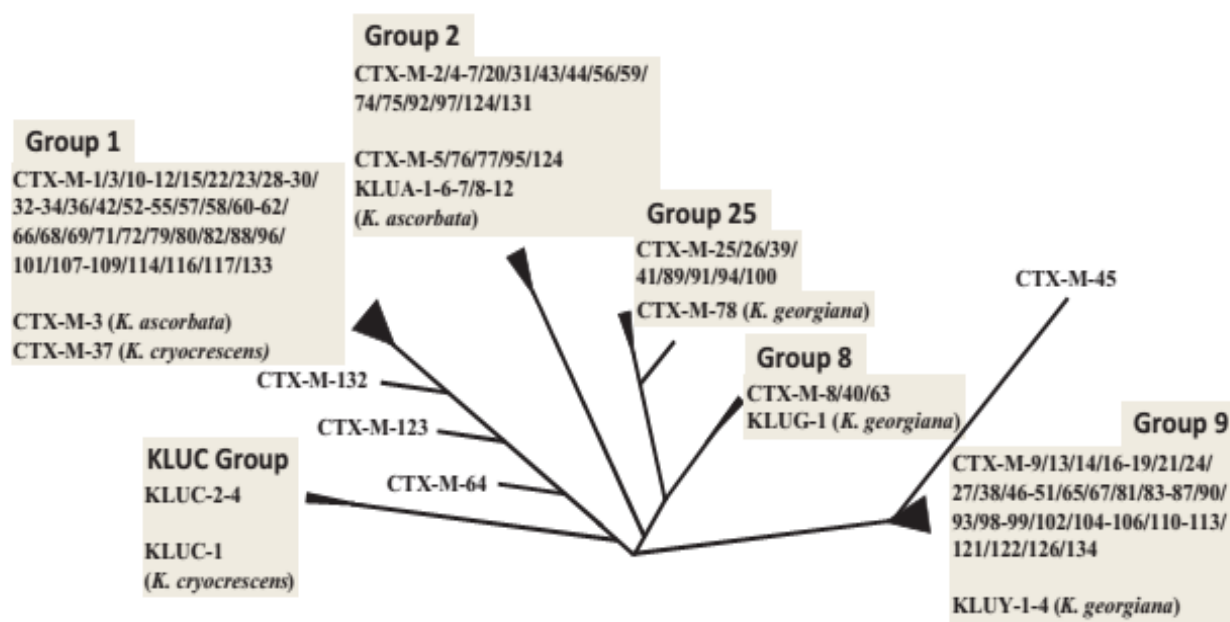
Las  $\beta$ -lactamasas más importantes en salud afectadas por estas modificaciones, son las pertenecientes al grupo de las CTX-M. Así, los precursores prácticamente inalterados de éstas, se han encontrado en el cromosoma de especies de *Kluyvera* spp., las cuales las expresan a bajo nivel<sup>39,40</sup>.

Existen además grupos de  $\beta$ -lactamasas de los que no se conocen sus ancestros o su evolución como ocurre con PER-1 y PER-2<sup>41</sup>.

Las BLEE pertenecientes a la familia de CTX-M son por lejos las más diseminadas a nivel mundial, considerándose las como pandémicas<sup>42,43</sup>.

Como ya se mencionó, estas enzimas tienen su origen en el cromosoma de especies de *Kluyvera* spp. y al día de hoy se reconocen 168 variantes (<http://www.lahey.org/studies/>)<sup>44,45</sup>. En base a su identidad de secuencias se reconocen 5 grupos, denominados de acuerdo al número de la primera enzima detectada en el mismo, siendo éstas 1, 2, 8, 9 y 25 o en base al primer integrante detectado de cada uno de ellos (ver **Figura 6**).

Así, el grupo 1 está constituido por las BLEE relacionadas a CTX-M-1 e incluye a una de las enzimas más diseminadas en el mundo como es CTX-M-15; en el grupo 2 se encuentran las enzimas relacionadas a CTX-M-2 que es una de las más frecuentes en el Cono sur(44), el grupo de 8 es uno de los más pequeños y tiene a su representante característico en CTX-M-8, el grupo 9 es uno de los más grandes e incluye además de CTX-M-9, a CTX-M-14 y CTX-M-19 y finalmente el grupo 25 incluye a CTX-M-25 y algunas pocas derivadas<sup>44,45</sup>.



**Figura 6.** Diagrama de árbol mostrando las relaciones entre los distintos grupos de las familias de BLEE CTX-M y sus principales integrantes. Tomado de D'Andrea y cols.<sup>45</sup>

## 3.5. Diagnóstico de laboratorio

### 3.5.1. Resistencia a oximiinocefalosporinas

Dentro de las 4 clases de  $\beta$ -lactamasas (de acuerdo a clasificación de Ambler) las más frecuentemente encontradas son las de clase A (que constituyen las  $\beta$ -lactamasas de Espectro Extendido o BLEE) y las de clase C (cefalosporinasas o AmpC)<sup>44</sup>.

Las  $\beta$ -lactamasas de clase C, naturalmente se encuentran codificadas a nivel cromosómico en algunos géneros bacterianos como *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Morganella* spp. o *Pseudomonas aeruginosa*, adicionalmente, la presencia de AmpC codificadas en plásmidos es un hecho frecuente<sup>46-49</sup>.

De modo que en aquellos microorganismos no productores de AmpC (o productores débiles) como *Salmonella* spp., *E. coli*, *Klebsiella* spp., etc., la detección de resistencia a oximiinocefalosporinas suele estar dada por la presencia de BLEE o AmpC en ambos casos codificadas en plásmidos<sup>50</sup>.

Desde el laboratorio se pueden realizar aproximaciones diagnósticas mediante test fenotípicos de modo de intentar discriminar un mecanismo de otro<sup>50</sup>.

Contamos con al menos cuatro datos del antibiograma que nos pueden orientar hacia un lado u otro:

1. Inhibición de la resistencia mediante inhibidores del tipo clavulánico, sulbactam, tazobactam (test de sinergia).





redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



2. Inhibición de la resistencia mediante el uso de discos de ácido borónico.
3. Sensibilidad a cefepime.
4. Sensibilidad a ceftazidina.

Si bien estos test pueden ser muy útiles cuando se presentan fenotipos puros de resistencia, pueden ser insuficientes cuando se intrinca más de un mecanismo.

Típicamente la presencia de  $\beta$ -lactamasas de clase C (**AmpC**) muestra el siguiente fenotipo:

- Resistencia a inhibidores tipo clavulánico (test de sinergia negativo)
- Inhibición positiva con ácido borónico
- Sensibilidad al cefepime
- Resistencia a ceftazidina.

Por otro lado un perfil de **BLEE** típico dará:

- Inhibición mediante clavulánico (test de sinergia positivo)
- Inhibición con borónico negativa
- Sensibilidad a cefepime variable (en general resistente cuando se encuentran BLEE de tipo CTX-M)
- Sensibilidad al ceftazidina.

Cuando queremos detectar la presencia de BLEE en productores naturales de AmpC el mejor rendimiento se obtiene realizando un test de sinergia que incluya cefepime dentro de los discos a ensayar<sup>50</sup>.

Con respecto a la interpretación de la resistencia a oximiinocefalosporinas ante la presencia de BLEE, las posiciones son encontradas: las guías norteamericanas (CLSI) y europeas (EUCAST) están de acuerdo en que cuando la concentración inhibitoria mínima (CIM) de cefotaxime o ceftriaxona son menores o iguales a 1  $\mu\text{g/ml}$ , debe informarse como sensible independientemente de la producción o no de BLEE. Sin embargo, con respecto a las otras oximiinocefalosporinas existen importantes diferencias, mientras que para EUCAST el valor de MIC para ceftazidime y cefepime sigue siendo  $\leq 1$ ; para CLSI valores  $\leq 4$  para ceftazidime y  $\leq 2$  para cefepime deben ser considerados sensibles.



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



Para el caso de cefepime, CLSI a partir del año 2015 ha establecido una categorización denominada Sensibilidad Dependiente de la Dosis (SDD) en sustitución de la categorización de resistencia intermedia, para aquellos valores de CIM que se encuentran entre 4 y 8 µg/ml.

Sin embargo, altas tasas de mortalidad se han descrito en pacientes que han recibido tratamientos con cefepime para combatir microorganismos que presentaban CIM de cefepime correspondientes a SDD<sup>51,52</sup>.

En cualquier caso, si las infecciones son del tracto urinario bajo, no habría inconvenientes en utilizar ceftazidime si se obtienen valores de MIC ≤1 incluso ≤4.

A nivel latinoamericano se ha observado un cambio paulatino en la preponderancia de BLEE, con un aumento sostenido de BLEE de los grupos de CTX-M-15 y CTX-M-9 (fundamentalmente las primeras)<sup>53-55</sup>. Esta nueva epidemiología regional conlleva dos problemas adicionales: por un lado el predominio de BLEE que confieren niveles relativamente altos de MIC tanto a cefotaxime y cefepime como a ceftazidime, y por otro la codificación de mecanismos de resistencia transferibles a quinolonas como *qnr* o *aac(6')Ib-cr*<sup>54-56</sup>.

### 3.5.2. Resistencia a carbapenemes

El principal mecanismo de resistencia en bacilos Gram negativos es la producción de β-lactamasas, debiendo diferenciarse los casos de carbapenemasas propiamente dichas de enzimas tipo BLEE o AmpC sumado a la alteración de permeabilidad.

La diferencia radica en que, mientras en el primer caso se debe interpretar al microorganismo como resistente a todos los carbapenemes, en el segundo caso se debe interpretar el resultado de sensibilidad directamente como da, pudiendo tratarse con aquel carbapenem que diera sensible.

No obstante, hay que tener en cuenta que aún en presencia de carbapenemasas, el agregado de carbapenemes fundamentalmente en tri terapia unido a dos antibióticos para la cual la bacteria es sensible, para el tratamiento de infecciones bacteriémicas por microorganismos productores de carbapenemasas se ha asociado a mejora en la sobrevida de los pacientes<sup>57,58</sup>.

Las β-lactamasas con actividad de carbapenemasa pertenecen a tres de las cuatro clases de Ambler. Dentro de la clase A: se destaca KPC-2 a 18.

Dentro de clase B (metalo-β-lactamasas: VIM 1 a 41 e IMP 1 a 48) y las recientemente descritas NDM-1 a NDM-12.



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



Dentro de las de clase D se encuentran aquellas detectadas fundamentalmente en *Acinetobacter* spp. como Oxa-23, Oxa-25 a 27, Oxa-40, Oxa-51, Oxa-55 Oxa-58, Oxa-72 y Oxa-143 entre otras (<http://www.lahey.org/studies/>). Recientemente un grupo creciente de carbapenemasas derivadas de Oxa ha sido descrito en enterobacterias. Centrado en Oxa-48, estas enzimas confieren grado variable de resistencia a carbapenemes, no afectando en general a cefalosporinas de tercera generación<sup>59</sup>. Una excepción es la recientemente descrita en Argentina, Oxa-163 la cual confiere resistencia a ambos grupos de antibióticos y son inhibidas por ácido clavulánico, a diferencia de las demás integrantes del grupo<sup>59</sup>. Dentro de estas  $\beta$ -lactamasas se encuentran: Oxa-162, Oxa-181, Oxa-244 y Oxa-245.

Para el diagnóstico de laboratorio de carbapenemasas de clase A (fundamentalmente KPC) o de clase B (metalo betalactamasas como NDM, VIM, IMP) en enterobacterias, existen test de tamizaje basados en combinaciones de carbapenemes con diferentes inhibidores, como ser ácido borónico (inhibidor de KPC y  $\beta$ -lactamasas de clase C), dicloxacilina (inhibidor de  $\beta$ -lactamasas de clase C) y EDTA o ácido dipicolínico como inhibidor de metalo  $\beta$ -lactamasas.



**Figura 7.** Test con ácido borónico para la detección de carbapenemasas de tipo KPC o cefalosporinasas de tipo AmpC. El efecto puede ser más evidente en relación a una oxiiiminocefalosporina que al propio carbapenem. En la foto se muestra una cepa productora de KPC-2.

En las **Figuras 7 y 8** se muestran los test de sinergia con ácido borónico y EDTA, mientras que en la **Figura 9** se muestra un test comercial.



**Figura 8.** Test de inhibición de metalo  $\beta$ -lactamasas con EDTA. Se observa efecto inhibitorio sobre ceftazidime (CAZ), cefepime (FEP) y meropenem (MEM)

Dentro de los test fenotípicos disponibles para la detección de carbapenemasas, se cuenta con un Kit comercial, constituido por Meropenem, Meropenem + ácido dipicolínico, Meropenem + ácido fenil



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



borónico y Meropenem + cloxacilina. Dicho test se basa en la respuesta diferencial a los inhibidores utilizados, que tienen los distintos tipos de carbapenemasas, de acuerdo al mecanismo de resistencia sospechado.

Para confirmar que el mecanismo de resistencia es una metalo carbapenemasa, debe producirse un incremento del halo de ácido dipicolínico de 5 cm. o más. Este corte presenta una sensibilidad del 90% y una especificidad del 96% para la detección de este tipo de enzimas.

Por su parte, la obtención de un agrandamiento de halo en los discos conteniendo ácido fenil borónico y cloxacilina (de 5 cm. o más para ambos) es indicador de la presencia de beta lactamasas de clase C.

Finalmente, la obtención de un agrandamiento únicamente en el disco que contiene ácido fenil borónico es característico de los aislamientos productores de carbapenemasas de tipo KPC con una sensibilidad del 95% y una especificidad del 99%<sup>60</sup>.



**Figura 9.** Test comercial donde se muestra el efecto sobre los discos de una metalo carbapenemasa (ver texto) MRP: meropenem, MRPDP: meropenem + ác. Dipicolínico, MRPCX: meropenem + cloxacilina, MRPBO: meropenem ácido borónico.

Una limitante que tiene el test diseñado para enterobacterias, es la carga estándar del disco de cloxacilina (750µg) que es insuficiente para objetivar inhibición de las AmpC de *Pseudomonas spp.*, por lo que el test presenta una muy baja especificidad (aproximadamente 40%). Para corregir esto se ha diseñado un set específico para BGN no fermentadores, que presenta una carga de cloxacilina de 3000 µg. exigiéndose un aumento de 3 milímetros o más para confirmar la presencia de AmpC<sup>61</sup>.

NUEVA  
EDICIÓN  
2018

# INTERPRETACIÓN DEL ANTIBIOGRAMA EN LA PRÁCTICA CLÍNICA DIARIA

CURSO  
ONLINE

18 DE ABRIL - 13 DE JUNIO 2018 - ATBgrama2018.evimed.net



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



## Test colorimétricos rápidos

Basados en el principio de que todos los  $\beta$ -lactámicos al ser hidrolizados generan como resultado la formación de un ácido, se han diseñado distintos métodos rápidos para la detección de carbapenemasas. Básicamente estos consisten en un marcador de pH como azul de bromotimol (blue carba) o rojo fenol (carba NP) disueltos en un buffer estabilizado a pH7-7,8 al cual se le agrega una dilución del carbapenem a utilizar. El agregado de una suspensión bacteriana equivalente a un *Mac Farland 2* genera en un máximo de dos horas, el cambio de color de azul o rojo al amarillo.

Protocolos para realizar de forma casera y a bajo costo estos test se encuentran en las direcciones web: <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2014/10/BUE-CARBA-IN-HOME-Version-2.pdf> y <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2015/12/CARBA-NP-DIRECT-v3-21.pdf> del servicio de antimicrobianos del Depto. de Bacteriología del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI) – ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”.

En el año 2017 tanto EUCAST como CLSI introducen como test diagnóstico el Método de Inactivación de los Carbapenemes (MIC) o CIM por su abreviatura en inglés. Brevemente este consiste en cargar un ansa del cultivo a analizar en 2 ml de TSB o caldo MH, al cual se le agrega un disco de meropenem. Luego de entre 2 y 4 horas de incubación a 35-37°C, el disco se coloca en una placa de agar MH previamente sembrada con una suspensión 0,5 Mc Farland de la *E. coli* ATCC 25922. Tras una incubación a 35°C durante toda la noche o 18 horas, se leen los resultados. La interpretación de los mismos varía de acuerdo a las guías, mientras que la no formación de un halo de inhibición es el resultado indicador de carbapenemasas para EUCAST, el criterio de CLSI es la observación de un halo de inhibición <16 mm o la aparición de colonias internas al halo hasta dentro de un diámetro de 18mm. Las indicaciones para realizar este test se encuentra en el manual de detección de mecanismos de resistencia de EUCAST [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Resistance\\_mechanisms/EUCAST\\_detection\\_of\\_resistance\\_mechanisms\\_170711.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_170711.pdf) o en la guía CLSI a partir de la 27ava edición (año 2017).

Finalmente se presenta un algoritmo para la detección de carbapenemasas, que se encuentra disponible en la página del Ministerio de Salud Pública de Uruguay.

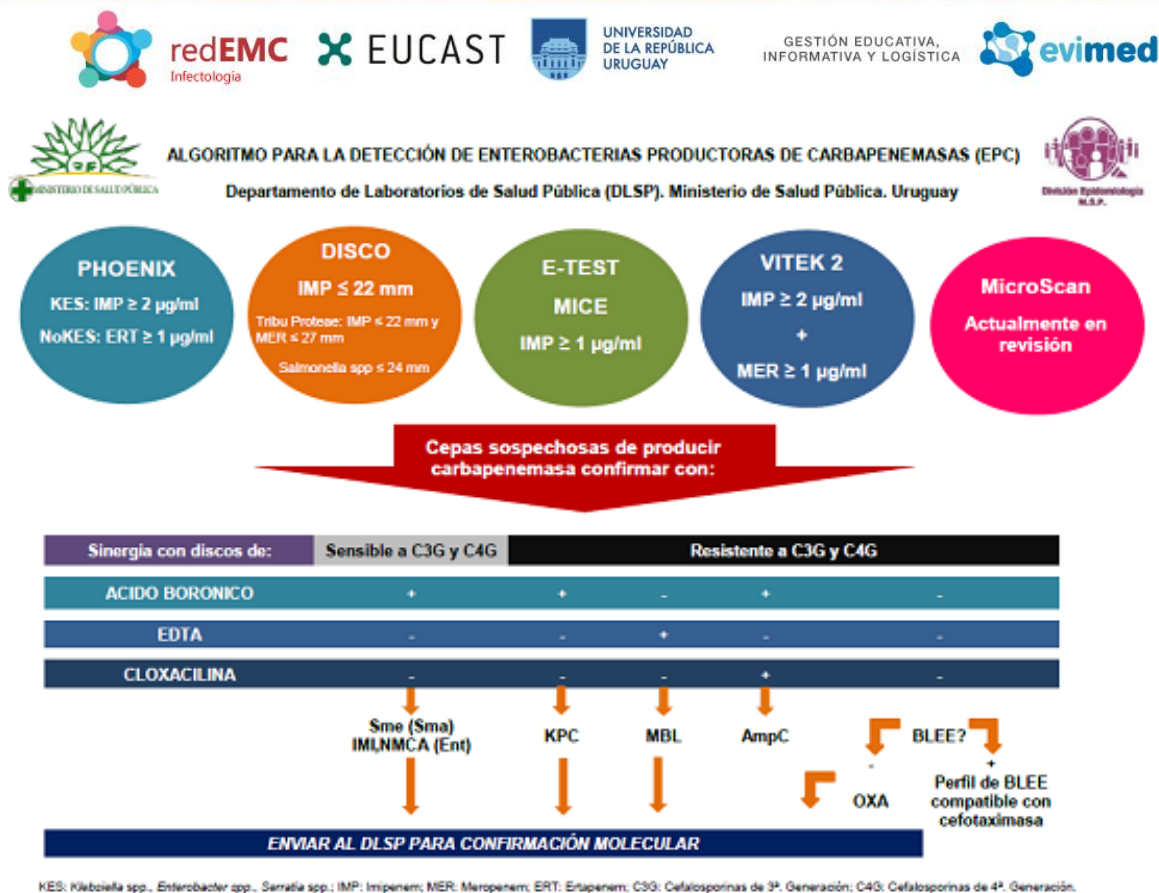


Figura 9: Algoritmo de identificación de carbapenemasas recomendado por el MSP de Uruguay.

### 3.6. Referencias

1. Fleming A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae. . Br J Exp Pathol1929;10:226-36.
2. Howie J. Penicillin: 1929-40. Br Med J (Clin Res Ed)1986 Jul 19;293(6540):158-9.
3. Abraham EP, Chain E, Fletcher CM, Gardner AD, Heatley NG, Jennings MA, et al. Further Observations on Penicillin. Lancet1941;238(6155):177-89.
4. Chain E, Florey HW, Gardner AD, Heatley NG, Jennings MA, Orr-Ewing J, et al. Penicillin as a chemotherapeutic agent. Lancet1940;236(6104):226-8.
5. Drawz SM, Papp-Wallace KM, Bonomo RA. New b-lactamase inhibitors: A therapeutic renaissance in an MDR world. Antimicrob Agents Chemother2014 December 30, 2013;54(4):1835-46.
6. Pucci MJ, Bush K. Investigational Antimicrobial Agents of 2013. Clin Microbiol Rev2013 October 1, 2013;26(4):792-821.
7. Chambers HF. Penicillins and b-lactam Inhibitors. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. seventh ed. Philadelphia: Churchill, Livingstone-ELSEVIER; 2009. p. 309-22.



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



8. Suárez C, Gudiol F. Antibióticos betalactámicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*2009;32(01):116-29.
9. Andes DR, Craig WA. Cephalosporins. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier; 2009. p. 323-39.
10. Chambers HF. Carbapenems and Monobactams. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. seventh ed. Philadelphia: Churchill, Livingstone-ELSEVIER; 2009. p. 341-5.
11. Barreteau H, Kovac A, Boniface A, Sova M, Gobec S, Blanot D. Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev*2008 Mar;32(2):168-207.
12. Bouhss A, Trunkfield AE, Bugg TD, Mengin-Lecreulx D. The biosynthesis of peptidoglycan lipid-linked intermediates. *FEMS Microbiol Rev*2008 Mar;32(2):208-33.
13. Mohammadi T, van Dam V, Sijbrandi R, Vernet T, Zapun A, Bouhss A, et al. Identification of FtsW as a transporter of lipid-linked cell wall precursors across the membrane. *EMBO J*2011 Apr 20;30(8):1425-32.
14. Sauvage E, Kerff F, Terrak M, Ayala JA, Charlier P. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev*2008 Mar;32(2):234-58.
15. Banzhaf M, van den Berg van Saparoea B, Terrak M, Fraipont C, Egan A, Philippe J, et al. Cooperativity of peptidoglycan synthases active in bacterial cell elongation. *Mol Microbiol*2012 Jul;85(1):179-94.
16. Typas A, Banzhaf M, Gross CA, Vollmer W. From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. *Nat Rev Microbiol*2012 Feb;10(2):123-36.
17. González-Leiza SM, de Pedro MA, Ayala JA. AmpH, a Bifunctional dd-Endopeptidase and dd-Carboxypeptidase of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*2011 December 15, 2011;193(24):6887-94.
18. Karlowsky JA, Adam HJ, DeCorby MR, Lagacé-Wiens PRS, Hoban DJ, Zhanel GG. In Vitro Activity of Ceftaroline against Gram-Positive and Gram-Negative Pathogens Isolated from Patients in Canadian Hospitals in 2009. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*2011 June 1, 2011;55(6):2837-46.
19. Santiago-Rodriguez TM, Fornaciari G, Luciani S, Dowd SE, Toranzos GA, Marota I, et al. Gut Microbiome of an 11th Century A.D. Pre-Columbian Andean Mummy. *PLoS One*;10(9):e0138135.
20. Peacock SJ, Paterson GK. Mechanisms of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annu Rev Biochem*2015;84:577-601.
21. Ubukata K, Chiba N, Hasegawa K, Kobayashi R, Iwata S, Sunakawa K. Antibiotic susceptibility in relation to penicillin-binding protein genes and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* strains responsible for meningitis in Japan, 1999 to 2002. *Antimicrob Agents Chemother*2004 May;48(5):1488-94.



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



22. Ropp PA, Hu M, Olesky M, Nicholas RA. Mutations in *ponA*, the gene encoding penicillin-binding protein 1, and a novel locus, *penC*, are required for high-level chromosomally mediated penicillin resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother*2002 Mar;46(3):769-77.
23. Skaare D, Lia A, Hannisdal A, Tveten Y, Matuschek E, Kahlmeter G, et al. Haemophilus influenzae with Non-Beta-Lactamase-Mediated Beta-Lactam Resistance: Easy To Find but Hard To Categorize. *Journal of Clinical Microbiology*2015 November 1, 2015;53(11):3589-95.
24. Moyá B, Beceiro A, Cabot G, Juan C, Zamorano L, Alberti S, et al. Pan-b-Lactam Resistance Development in *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Strains: Molecular Mechanisms, Penicillin-Binding Protein Profiles, and Binding Affinities. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*2012 September 1, 2012;56(9):4771-8.
25. Ba X, Harrison EM, Edwards GF, Holden MTG, Larsen AR, Petersen A, et al. Novel mutations in penicillin-binding protein genes in clinical *Staphylococcus aureus* isolates that are methicillin resistant on susceptibility testing, but lack the *mec* gene. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*2014 March 1, 2014;69(3):594-7.
26. Chan LC, Gilbert A, Basuino L, da Costa TM, Hamilton SM, dos Santos KR, et al. PBP4 mediates high-level resistance to new generation cephalosporins in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*2016 April 11, 2016.
27. Tängdén T, Adler M, Cars O, Sandegren L, Löwdin E. Frequent emergence of porin-deficient subpopulations with reduced carbapenem susceptibility in ESBL-producing *Escherichia coli* during exposure to ertapenem in an in vitro pharmacokinetic model. *J Antimicrob Chemother*2013 June 1, 2013;68(6):1319-26.
28. Tran Q-T, Mahendran KR, Hajjar E, Ceccarelli M, Davin-Regli A, Winterhalter M, et al. Implication of Porins in  $\beta^2$ -Lactam Resistance of *Providencia stuartii*. *Journal of Biological Chemistry* October 15, 2010;285(42):32273-81.
29. Rumbo C, Gato E, López M, Ruiz de Alegría C, Fernández-Cuenca F, Martínez-Martínez L, et al. Contribution of Efflux Pumps, Porins, and  $\beta$ -Lactamases to Multidrug Resistance in Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*2013 November 1, 2013;57(11):5247-57.
30. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*1980 May 16;289(1036):321-31.
31. Matagne A, Lamotte-Brasseur J, Frere JM. Catalytic properties of class A beta-lactamases: efficiency and diversity. *Biochem J*1998 Mar 1;330 ( Pt 2):581-98.
32. Poirel L, Naas T, Nordmann P. Diversity, Epidemiology, and Genetics of Class D  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*2010 January 1, 2010;54(1):24-38.
33. Palzkill T. Metallo-beta-lactamase structure and function. *Ann N Y Acad Sci* Jan;1277:91-104.
34. Bush K, Jacoby GA. Updated Functional Classification of  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*2010 March 1, 2010;54(3):969-76.
35. Jeon J, Lee J, Park K, Karim A, Lee C-R, et al. Structural Basis for Carbapenem-Hydrolyzing Mechanisms of Carbapenemases Conferring Antibiotic Resistance. *Int J Mol Sci*2015;16(5):9654.





redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



36. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*1995 Jun;**39**(6):1211-33.
37. Bush K. Characterization of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*1989 Mar;**33**(3):259-63.
38. Majiduddin FK, Palzkill T. An analysis of why highly similar enzymes evolve differently. *Genetics*2003 Feb;**163**(2):457-66.
39. Rodriguez MM, Power P, Radice M, Vay C, Famiglietti A, Galleni M, et al. Chromosome-encoded CTX-M-3 from *Kluyvera ascorbata*: a possible origin of plasmid-borne CTX-M-1-derived cefotaximases. *Antimicrob Agents Chemother*2004 Dec;**48**(12):4895-7.
40. Rodriguez MM, Power P, Sader H, Galleni M, Gutkind G. Novel chromosome-encoded CTX-M-78 b-lactamase from a *Kluyvera georgiana* clinical isolate as a putative origin of CTX-M-25 subgroup. *Antimicrob Agents Chemother*2010 April 26, 2010:3070-1.
41. Power P, Di Conza J, Rodríguez MM, Ghiglione B, Ayala JA, Casellas JM, et al. Biochemical Characterization of PER-2 and Genetic Environment of blaPER-2. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*2007 July 1, 2007;**51**(7):2359-65.
42. Canton R, Coque TM. The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol*2006 Oct;**9**(5):466-75.
43. Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini GM, Arlet G, et al. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother*2007 February 1, 2007;**59**(2):165-74.
44. Gutkind GO, Di Conza J, Power P, Radice M. beta-lactamase-mediated resistance: a biochemical, epidemiological and genetic overview. *Curr Pharm Des*2013;**19**(2):164-208.
45. D'Andrea MM, Arena F, Pallecchi L, Rossolini GM. CTX-M-type beta-lactamases: a successful story of antibiotic resistance. *Int J Med Microbiol* Aug;**303**(6-7):305-17.
46. Cordeiro NF, Nabón A, García-Fulgueiras V, Álvez M, Sirok A, Camou T, et al. Analysis of plasmid mediated quinolone and oxyimino-cephalosporin resistance mechanisms in Uruguayan *Salmonella enterica* isolates from 2011 to 2013. *J Glob Antimicrob Resist* 2016;**(6)**:165-171.
47. Robino L, García-Fulgueiras V, Araújo L, Algorta G, Pérez MC, Vignoli R. Urinary tract infection in Uruguayan children: aetiology, antimicrobial resistance and uropathogenic *Escherichia coli* virulotyping. *J Glob Antimicrob Resist*2014 2014/09/08;**2**(4):293-8.
48. García-Fulgueiras V, Seija V, Aguerreberre P, Cordeiro NF, Vignoli R. First report of a clinical isolate of *Leclercia adcarboxylata* harbouring multiple resistance genes in Uruguay and review of the literature. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*2014;**2**(2):77-81.
49. Cejas D, Vignoli R, Quinteros M, Marino R, Callejo R, Betancor L, et al. First detection of CMY-2 Plasmid Mediated  $\beta$ -lactamase in *Salmonella Heidelberg* in South America. *Rev Argent Microbiol*2014;**46**(1):30-3.
50. Famiglietti A, Quinteros M, Vazquez M, Marin M, Nicola F, Radice M, et al. [Consensus for antimicrobial susceptibility testing for Enterobacteriaceae. Subcommittee on Antimicrobials, SADEBAC (Argentinian Society of Clinical Bacteriology), Argentinian Association of Microbiology]. *Rev Argent Microbiol*2005 Jan-Mar;**37**(1):57-66.



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



51. Lee NY, Lee CC, Li CW, Li MC, Chen PL, Chang CM, et al. Cefepime Therapy for Monomicrobial *Enterobacter cloacae* Bacteremia: Unfavorable Outcomes in Patients Infected by Cefepime-Susceptible Dose-Dependent Isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2015 Dec;59(12):7558-63.
52. Lee NY, Lee CC, Huang WH, Tsui KC, Hsueh PR, Ko WC. Cefepime therapy for monomicrobial bacteremia caused by cefepime-susceptible extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: MIC matters. *Clin Infect Dis* 2013 Feb;56(4):488-95.
53. Sennati S, Santella G, Di Conza J, Pallecchi L, Pino M, Ghiglione B, et al. Changing epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases in Argentina: emergence of CTX-M-15. *Antimicrob Agents Chemother* 2012 Nov;56(11):6003-5.
54. Bartoloni A, Pallecchi L, Riccobono E, Mantella A, Magnelli D, Di Maggio T, et al. Relentless increase of resistance to fluoroquinolones and expanded-spectrum cephalosporins in *Escherichia coli*: 20 years of surveillance in resource-limited settings from Latin America. *Clin Microbiol Infect* 2012 Feb 9;19(4):356-61.
55. Garcia-Fulgueiras V, Bado I, Mota MI, Robino L, Cordeiro NF, Varela A, et al. Extended-spectrum b-lactamases and plasmid-mediated quinolone resistance in enterobacterial clinical isolates in the paediatric hospital of Uruguay. *J Antimicrob Chemother* 2011 Aug;66(8):1725-9.
56. Cruz GR, Radice M, Sennati S, Pallecchi L, Rossolini GM, Gutkind G, et al. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants among oxyiminocephalosporin-resistant *Enterobacteriaceae* in Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2013 Nov;108(7):924-7.
57. Tumbarello M, Viale P, Viscoli C, Treccarichi EM, Tumietto F, Marchese A, et al. Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: importance of combination therapy. *Clin Infect Dis* 2012 Oct;55(7):943-50.
58. Falagas ME, Lourida P, Poulidakos P, Rafailidis PI, Tansarli GS. Antibiotic Treatment of Infections Due to Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*: Systematic Evaluation of the Available Evidence. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* February 1, 2014;58(2):654-63.
59. Poirel L, Potron As, Nordmann P. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* July 1, 2012;67(7):1597-606.
60. van Dijk K, Voets GM, Scharringa J, Voskuil S, Fluit AC, Rottier WC, et al. A disc diffusion assay for detection of class A, B and OXA-48 carbapenemases in *Enterobacteriaceae* using phenyl boronic acid, dipicolinic acid and temocillin. *Clinical Microbiology and Infection* 2014 2015/09/21;20(4):345-9.
61. Pasteran F, Veliz O, Faccione D, Guerriero L, Rapoport M, Mendez T, et al. A simple test for the detection of KPC and metallo-b-lactamase carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. *Clinical Microbiology and Infection* 2011 2015/09/21;17(9):1438-41.
62. David Livermore, Mast Group. The Importance and Detection of AmpC and ESBL Enzymes. Disponible en <http://www.mastgrp.com/%5CIdentification%20strips%20discs%20and%20rings%5CReferences%5CLivermore%20poster%20v2.0.pdf>



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



## 4. Resistencia a Antibióticos $\beta$ -lactámicos en Cocos Gram positivos

Prof. Agdo. Dr. Rafael Vignoli<sup>1,2</sup>

Prof. Adj. Dra. Lorena Pardo<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bacteriología y Virología, Facultad de Medicina,  
Universidad de la República, Uruguay.

<sup>2</sup>Integrante del Sistema Nacional de Investigadores de Uruguay (Nivel I).

<sup>3</sup>Clínica Pediátrica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Uruguay.

### 4.1. Introducción

Desde el descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming (Premio Nobel en 1945), los betalactámicos son por lejos, los antibióticos más utilizados en la medicina tanto humana como animal y ambiental. Como ya se ha visto en el capítulo correspondiente a Bacilos Gram negativos, se han desarrollado diferentes tipos de  $\beta$ -lactámicos con el paso del tiempo.

Esta gran familia de antibióticos tiene como blanco molecular un grupo de enzimas encargadas del mantenimiento, remodelado, reciclado y síntesis del peptidoglicano. Estas proteínas que en general poseen actividad de transpeptidasas, endopeptidasas, carboxipeptidasas o transglicosilasas, reciben el nombre de PBP (por *Penicillin Binding Protein*) y se dividen en PBP de bajo y alto peso molecular, que también se corresponde con una diferenciación en la funcionalidad. Las proteínas de alto peso molecular son vitales para el microorganismo y se subclasifican a su vez en clase A y B, mientras que las de bajo peso son clase C (ver capítulo correspondiente a bacilos gram negativos por más detalles). Los betalactámicos actúan en las PBPs de alto peso molecular, que presentan dominio de transpeptidasa<sup>2</sup>.

Como ya fue dicho, el anillo de los betalactámicos mimetizan el sustrato de las PBP (D-ala D-ala) lo que genera que la unión del betalactámico a la PBP impida el paso de transpeptidación, como consecuencia de la acilación irreversible de una serina del sitio activo de la PBP por el antibiótico.

### 4.2. Mecanismos de resistencia

En las bacterias Gram positivas aisladas más frecuentemente de infecciones en el hombre (*Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. y *Enterococcus* spp.) los mecanismos de resistencia más



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



frecuentes son la aparición de nuevas PBP (ya sea mediante la adquisición de genes “nuevos” para estas enzimas o por modificación y expresión diferencial de las ya existentes). Adicionalmente, en aislamientos de *Staphylococcus aureus* provenientes de infecciones en humanos, la hidrólisis enzimática es tan frecuente, que la búsqueda rutinaria de este mecanismo de resistencia no se realiza de forma sistemática.

#### 4.2.1. Hidrólisis enzimática

En 1940, luego de la introducción de la penicilina, se observó el aumento progresivo y sostenido de la resistencia a este betalactámico y a las aminopenicilinas, por acción de penicilinasas codificadas por el gen *blaZ*.

Hasta el momento hay descritos 4 tipos de genes *blaZ*; los que codifican el tipo A, C, y D están ubicados en plásmidos, mientras que el tipo B lo hace en el cromosoma bacteriano.

Los diferentes tipos de penicilinasas presentan diferencias en la cinética de hidrólisis de los betalactámicos<sup>3</sup>. Si bien esto se traduce *in vitro* en diferencias en la producción del efecto inóculo frente a cefazolina (la de tipo A se asocia a efecto inóculo), hasta el momento estas diferencias no han podido ser asociadas a fallos clínicos<sup>4 5</sup>.

Estas betalactamasas rápidamente se extendieron, a expensas primero de aislamientos de procedencia hospitalaria, y luego de la comunidad.

Actualmente un porcentaje cercano al 90% de aislamientos humanos (a diferencia de veterinarios y ambientales) presentan este mecanismo de resistencia<sup>6</sup>.

El gen *blaZ* presenta un tamaño de 846 pb que está bajo el control de los genes reguladores, *blaR1* (con función anti-represor) y *blaI* (represor)<sup>1</sup>. El modelo de regulación de la expresión de *blaZ* se muestra en la **Figura 1**.

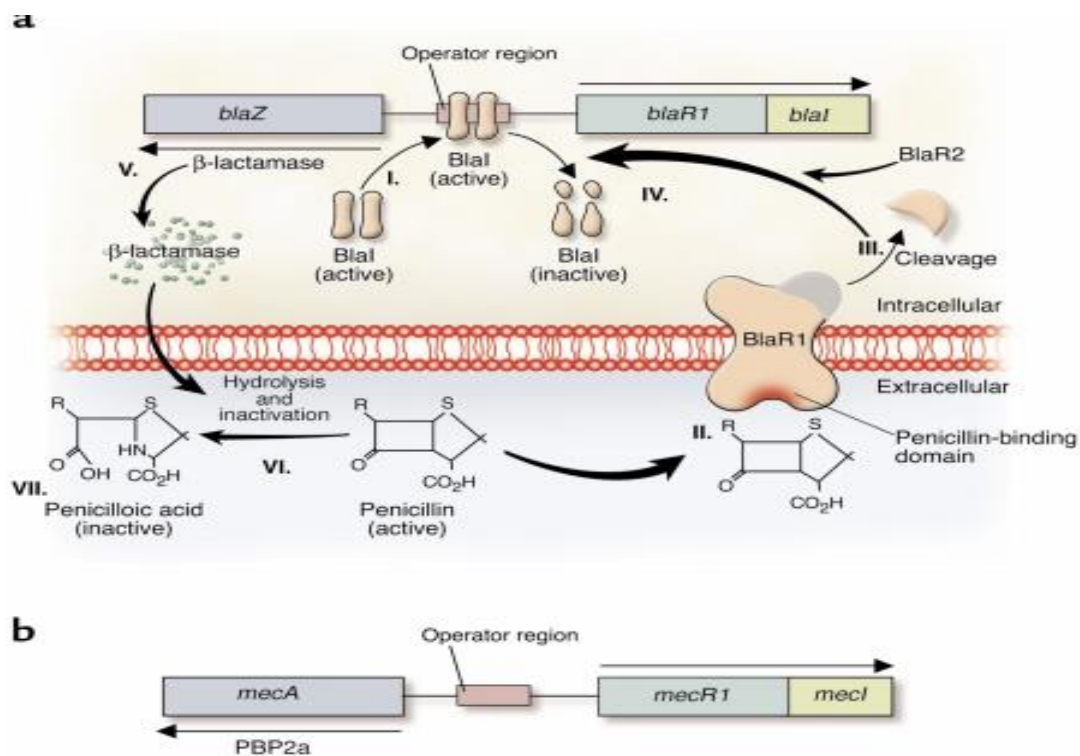


redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



**Figura 1.** Modelo de regulación de la expresión de la penicilinasa estafilocócica, tomado de Lowy et al.<sup>1</sup>

a) Inducción de la síntesis de la B-lactamasa estafilocócica en presencia de penicilina.

I. la proteína Blal se une a la región operadora lo que reprime la transcripción de *blaZ* y *blaR1-blaI*. En ausencia de penicilina, *blaZ* se expresa a bajo nivel.

II. La unión de penicilina al sensor-traductor de señales BlaR1 activa la auto catálisis de BlaR1.

III-IV. El producto de autocatálisis de BlaR1 directamente o su interacción con una segunda proteína (BlaR2) clivaría a Blal en proteína inactiva, permitiendo la transcripción de *blaZ* y *blaR1-blaI*. V-VII el producto de *blaZ* es exportado al espacio periplásmico donde hidroliza al B-lactámico.

b) se muestra la organización de *mecA* y los genes reguladores, que presentan un mecanismo de regulación similar a lo descrito para *blaZ*.

En los últimos años se ha demostrado un efecto cooperador entre el locus de B-lactamasa y la expresión de PBP2a dado por la formación de heterodímeros MecI::Blal los cuales tendrían menor afinidad por *mecA*<sup>7</sup>.

La hiperexpresión de beta lactamasas genera un patrón de resistencia *borderline* al disco de oxacilina y dio lugar a la sustitución del disco de oxacilina por uno de cefoxitina, por ser más estable a la acción de estas enzimas. En su momento esos aislamientos recibieron el nombre de BORSA (por *Borderline Oxacilina Resistente S. aureus* (BORSA)<sup>8</sup>.



## B-lactamasas en otros cocos Gram positivos:

Se reportan excepcionalmente cepas de *Enterococcus* que expresan constitutivamente y a bajo nivel una betalactamasa idéntica a la penicilinasas de tipo A codificada por blaZ en *Staphylococcus aureus*. Dado que el nivel de resistencia que confiere es bajo, el diagnóstico mediante test de nitrocefina debe realizarse en aislamientos obtenidos de bacteriemia y meningitis solamente<sup>9</sup>.

Hasta ahora no se había descrito betalactamasas en *S. pneumoniae*. Como hecho anecdótico, recientemente, Chang y col. han reportado genes que codifican para una metalo-betalactamasa en cepas de colección (no en aislamientos clínicos), que en condiciones experimentales inactivan el betalactámico, hidrolizando el extremo amino del anillo betalactámico. Los autores proponen que este mecanismo le permitiría a la bacteria sobrevivir en condiciones ambientales con ampicilina, desconociéndose la implicancia clínica de estos hallazgos<sup>10</sup>.

### 4.2.2. Alteración del sitio blanco

Debido al aumento creciente de aislamientos resistentes a penicilina, se introducen betalactámicos resistentes a las penicilinasas, como la metilicina y las cefalosporinas entre otros. Desde la introducción de la metilicina, cepas de MRSA han emergido, confiriendo resistencia a la mayoría de los betalactámicos. En una encuesta realizada entre los años 1960 y 1964, la resistencia a metilicina en *S. aureus* obtenido de infecciones hospitalarias, no superaba el 1%<sup>11</sup>. Luego de esta descripción de Jevons y Parker, estos aislamientos de MRSA se extendieron rápidamente a partir del uso generalizado de este antibiótico.

Estos aislamientos se describen en pacientes con enfermedades subyacentes y cierta vulnerabilidad para adquirir estas infecciones. Es así que se describen los factores de riesgo para tener una infección por MRSA, dentro de los cuales se destacan: hospitalización, cirugía previa, diálisis, vivir en un Centro de Cuidados, uso de catéteres, entre otros<sup>12</sup>.

### Mecanismo de resistencia

La resistencia por modificación de las PBP (sitio blanco de acción de los betalactámicos) es sin duda el mecanismo más relevante de resistencia a los betalactámicos en Cocos Gram positivos.

*S. aureus* es el microorganismo prototipo de este mecanismo de resistencia, y en general, los cambios en las PBP generan la llamada metilicina resistencia.



A los efectos de sistematizar esta resistencia, podemos dividirla en:

- Meticilino resistencia mediada por *mecA*: es sin duda el mecanismo más importante por frecuencia y distribución a lo largo del mundo; está dado por la adquisición de una nueva PBP que se describe como una proteína con baja afinidad por los betalactámicos<sup>13</sup>.
- Meticilino resistencia no mediada por *mecA*: estas resistencias representan un porcentaje menor de la resistencia a metilina y por sobretodo implican un desafío diagnóstico ya que son por definición *mecA*/PBP2a negativos. Se pueden incluir aquí aquellas que se explican por un mecanismo similar a *mecA*, o por mutaciones puntuales en las PBP.

#### 4.2.3. Meticilino resistencia mediada por *mecA*

El producto de este gen es PBP2a o PBP2'. Esta enzima (o complejo enzimático) se diferencia de otras PBP en que en presencia del betalactámico es capaz de seguir efectuando las reacciones de transpeptidación. La PBP2a es resistente a la acilación del betalactámico y continúa catalizando la reacción de transpeptidación. Sin embargo PBP2a carece de actividad transglicosilasa, por lo que para que el microorganismo sea viable es necesario que se siga expresando la PBP2 nativa<sup>14</sup>.

Los estudios iniciales acerca de por qué esta PBP es resistente a la acción de los betalactámicos, dan cuenta de una disminución de la afinidad de la PBP2a por los betalactámicos<sup>13</sup>.

Sin embargo, estudios recientes por cristalografía de PBP2a unida a ceftarolina, sugieren un modelo donde el mecanismo de resistencia no estaría dado por una baja afinidad a la molécula del betalactámico, sino por la unión del mismo a un sitio alostérico que facilitará la exposición del sitio activo. Los nuevos betalactámicos como el ceftaroline son mejores en unirse de forma no covalente a este sitio alostérico y así inhibir la transpeptidación. Estos nuevos betalactámicos activos frente a PBP2a tendrían un doble sitio de acción, por un lado en el sitio alostérico que produciría un cambio conformacional sobre el sitio activo, y por otro en el propio sitio activo, que con la nueva conformación es capaz de interactuar con el beta lactámico<sup>15</sup>.

La resistencia a ceftaroline estaría dada por mutaciones alejadas del sitio activo, pero que interrumpen la comunicación del sitio alostérico con el sitio activo<sup>15</sup>.



## Entorno genético de *mecA*: SCCmec

El SCCmec (cassette cromosómico estafilocócico), es un elemento genético móvil, que se transfiere de forma horizontal entre las distintas especies de *Staphylococcus* y que contiene el gen *mecA*.

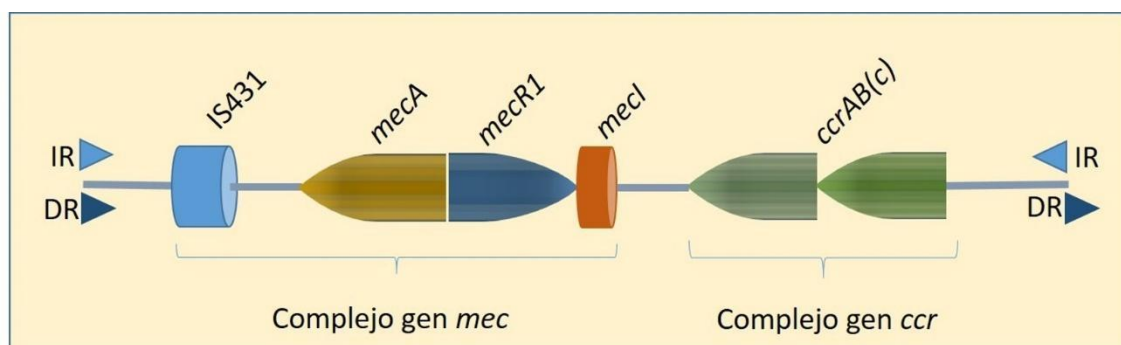
Este cassette está compuesto por el complejo *mec*, que contiene el gen *mecA* y los genes reguladores (*mecI*, *mecR*; cuyo funcionamiento es muy similar a lo previamente expuesto para el locus de beta lactamasa) y los genes que codifican los sitios de unión a las recombinasas (*ccr*, que median tanto la integración al genoma como la escisión del mismo).

Existen variantes de SCCmec, definidos entonces por el complejo *mec* y los *ccr*.

La complejidad en la descripción de las variantes de SCCmec ha dado lugar a la conformación de un grupo llamado *International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome (SCC) Elements (IWG-SCC)*, encargado de regular la nomenclatura de estas variantes. Su página web es [http://www.sccmec.org/Pages/SCC\\_HomeEN.html](http://www.sccmec.org/Pages/SCC_HomeEN.html).

El gen *mecA* está regulado por un operón. Este operón funciona de forma análoga al operón encontrado con el gen *bla<sub>Z</sub>*.

Esta estructura es similar a las islas de patogenicidad que se encuentran en bacterias Gram negativas, con la diferencia que el SCCmec codifica resistencia antibiótica en lugar de factores de virulencia. El mecanismo y las señales que determinan la movilización de los cassettes cromosómicos no son del todo conocidos.



**Figura 2.** Estructura del SCCmec. SCCmec está compuesta por dos complejos esenciales: el complejo gen *mec* que codifica los genes de la meticilino resistencia propiamente dichos (*mecA*, *mecI* y *mecR1*) y el complejo gen *ccr* que codifica los genes de movilización, tanto la integración como la escisión del cromosoma de todo el elemento SCC.

Abreviaturas: IR Repetido Invertido, DR: repetido directo.

Adaptado de Hiramatsu, K et al ADDIN EN.CITE ADDIN EN.CITE.DATA <sup>16</sup>.





redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



Asociados a este elemento genético se pueden insertar otros fragmentos de ADN, corriente abajo del marco abierto de lectura (orfX), dando lugar al sector denominado oriC. Esta región es extremadamente variable, en cuanto a longitud, genes que contiene (ya sean completos o pseudo genes). Pueden incluir genes que intervienen en rutas metabólicas (como los ACME), resistencia a otros grupos de antibióticos, desinfectantes, etc.

Los complejos *mec* pueden clasificarse en 5 clases de acuerdo a la diversidad estructural de *mecl* y *mecR1*<sup>17</sup>.

Así se reconocen:

- Complejo *mec* **Clase A**, compuesto por: IS431-*mecA*-*mecR1*-*mecl* (“complejo tipo”)
- Complejo *mec* **Clase B**, *mecR1* se encuentra truncado por la secuencia de inserción IS1272
- Complejo *mec* **Clase C1**, *mecR1* se encuentra truncado por IS431 insertada en la misma dirección que *mecA*
- Complejo *mec* **Clase C2**, *mecR1* se encuentra truncado por IS431 insertada en dirección opuesta a *mecA*
- Complejo *mec* **Clase D**, *mecR1* se encuentra truncado pero no por una IS
- Complejo *mec* **Clase E**, Presenta la estructura: blaZ-*mecA*<sub>LGA251</sub>- *mecR1*-*mecl*

### Complejo *ccr*

Como se mencionó, es un complejo de genes que codifica para la familia de resolvasa/invertasa, responsables tanto de la escisión del cassette de la hebra de ADN como de la integración del mismo.

Se clasifican de acuerdo a la combinación de los diferentes tipos de *ccrA* y *ccrB*:

Tipo 1: *ccrA1 ccrB1*  
 Tipo 2: *ccrA2 ccrB2*  
 Tipo 3: *ccrA3 ccrB3*  
 Tipo 4: *ccrA4 ccrB4*  
 Tipo 5: *ccrC1*  
 Tipo 6: *ccrA5 ccrB3* (no fue asignado a ningún SCC*mec*)  
 Tipo 7: *ccrA6 ccrB1*  
 Tipo 8: *ccrA1 ccrB3*

Tomado de [http://www.sccmec.org/Pages/SCC\\_HomeEN.html](http://www.sccmec.org/Pages/SCC_HomeEN.html)



SCCmec types	ccr gene complexes	mec gene complexes	strains
I	1 (A1B1)*	B	NCTC10442, COL
II	2 (A2B2)	A	N315, Mu50, Mu3, MRSA252, JH1, JH9
III	3 (A3B3)	A	85/2082
IV	2 (A2B2)	B	CA05, MW2, 8/6-3P, 81/108, 2314, cm11, JCSC4469, M03-68, E-MRSA-15, JCSC6668, JCSC6670
V	5 (C1)	C2	WIS(WBG8318), TSGH17, PM1,
VI	4 (A4B4)	B	HDE288
VII	5 (C1)	C1	JCSC6082
VIII	4 (A4B4)	A	C10682, BK20781
IX	1(A1B1)	C2	JCSC6943
X	7(A1B6)	C1	JCSC6945
XI	8(A1B3)	E	LGA251

**Tabla 1.** Tipos de SCCmec en cepas de *S. aureus* hasta la fecha.

Extraído de <http://www.sccmec.org/>

Estos cassettes, además de tener el complejo *mec* y complejo *ccr*, tiene regiones con importancia epidemiológica: la región J (de *junckjard*).

Hasta el momento los SCCmec IV, V, VI y VII poseen *mecA* y no portan resistencia a otros grupos de antibióticos (no multirresistentes).

Clásicamente han sido designados como MRSA portadores de SCCmec (y por lo tanto de un fenotipo de resistencia) típico de infecciones en pacientes con factores de riesgo asociados a los cuidados de salud. A estos MRSA se les denominó 'adquiridos en el hospital' o 'asociados a los cuidados de salud' (*hospital acquired*, HA-MRSA), en contraste con aquellos pacientes que no poseen estos factores de riesgo y adquieren las infecciones por MRSA no multirresistentes, denominados como 'adquiridos en la comunidad' (*community acquired*, CA-MRSA).

MRSA es una de las principales causas de las infecciones nosocomiales. Esta nomenclatura epidemiológica acerca de las cepas MRSA ha cambiado. Los aislamientos MRSA procedentes de la comunidad (no multirresistentes) han aumentado su prevalencia y han sustituido paulatinamente a las cepas HA-MRSA (multirresistentes). Esta clasificación epidemiológica que acompañaba el fenotipo de resistencia observado en el laboratorio (por ejemplo MRSA multirresistente asociado a factores de riesgo de adquirir la infección en vinculación con los cuidados en salud) paulatinamente ha perdido vigencia. Se observa frecuentemente infecciones de MRSA no multirresistente distribuidos en los hospitales de forma amplia y si bien la literatura sigue utilizando el término HA-MRSA y CA-MRSA es necesario revisar qué definición se utilizó para tal clasificación (si epidemiológica o por el antibiograma)<sup>18,19</sup>.



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



#### 4.2.4. Meticilino resistencia no mediada por *mecA*

Meticilino resistencia mediada por *mecC*: en el año 2007 se describen los primeros aislamientos de *S. aureus* meticilino resistentes *mecA* negativos, obtenidos de ganado, con lo que a la postre sería conocido como *mecC*<sup>20</sup>. El gen *mecB* había sido asignado a un gen similar *mecA* previamente detectado en *Micrococcus caseolyticus*, un microorganismo asociado a animales pero no patógeno para el hombre<sup>21</sup>.

En relación a *S. aureus* *mecC* positivo y su relación con infecciones en humanos, el reporte más numeroso de casos corresponde a una serie de Suiza que involucra a 45 pacientes infectados entre 2005 y 2014<sup>22</sup>.

La mayoría de los aislamientos en esta serie correspondieron a infecciones de piel y tejidos blandos, pero también estaban involucradas infecciones severas y profundas como lo son las ósteo-articulares y la sepsis. Los pacientes tenían una media de edad de casi el doble de aquellos pacientes infectados con SAMR *mecA* (60 vs 32 años), la mayoría presentaban enfermedades crónicas de base y heridas o infecciones de piel previas<sup>22</sup>.

Este tipo diferente de gen *mec* se encuentra dentro de un cassette cromosómico al que se lo denominó como tipo XI (ver más adelante).

El gen *mecC* codifica una transpeptidasa con una homología aminoacídica cercana al 68% con PBP2a codificada por *mecA*, sin embargo presenta diferencias importantes con respecto a ésta: desde el punto de vista funcional, es capaz de mantener la viabilidad del microorganismo que la porta aún en ausencia de la PBP2 nativa<sup>23</sup>.

En relación al perfil de resistencia que confiere, es mayor la resistencia a cefalosporinas que a ampicilinas y penicilinas, esto puede manifestarse como resultados discordantes entre la determinación de sensibilidad a oxacilina y cefoxitina, ya que puede dar resistencia a cefoxitin y sensibilidad a oxacilina<sup>23,24</sup>.

El efecto sobre penicilinas sería tan bajo que la resistencia a estos antibióticos estaría dada por la presencia de la penicilinasa codificada por *blaZ* por lo cual *S. aureus* *mecC*+ sería tratable con penicilina/ácido clavulánico, de acuerdo a un trabajo reciente de Ba y colaboradores<sup>25</sup>.



## Meticilino resistencia por mutaciones puntuales

Finalmente, la resistencia a meticilina e incluso a cefalosporinas de quinta generación se ha asociado también a mutaciones puntuales en las PBP nativas y otros genes, como ser PBP1, PBP2, PBP3, PBP4, GdpP, YjbH y AcrB<sup>26,27</sup>. Este tipo de aislamientos constituían los llamados MODSA (por *Modified*)<sup>8</sup>.

## Modificación de sitio blanco en otros microorganismos

### *Streptococcus pneumoniae*:

Si bien ya desde 1940 se obtenían cepas de laboratorio de *S. pneumoniae* resistentes a Penicilina, no es hasta 1967 cuando se reporta el primer aislamiento clínico con resistencia intermedia (0,6 mg/L)<sup>28</sup>. Desde esa época se han observado distintos niveles de resistencia en diferentes regiones. Entre 1980 y 1990 se había observado a nivel mundial una rápida expansión de la resistencia a penicilina, a expensas fundamentalmente de los serotipos 6B, 14, 15A, 19F, 19A y 23F,<sup>29-31</sup>. Incluso algunos estudios epidemiológicos mostraron un incremento de aislamientos resistentes a penicilina que asociaban resistencia a otros grupos de antibióticos<sup>32</sup>

De las 6 PBP que posee *Streptococcus pneumoniae*, son 3 las implicadas en la resistencia estudiadas en aislamientos clínicos (PBP1a, PBP2b y PBP2x) y menos frecuentemente PBP2a. Las PBP1b y la PBP3 mantienen su actividad y no intervienen en la generación de resistencia, seguramente debido a que estas PBP no son vitales para la bacteria<sup>33</sup>

PBP2b y PBP2x son consideradas esenciales para la síntesis del peptidoglicano y mientras que cambios en PBP2b se asocian a resistencia a penicilina, los cambios en PBP2x se relacionan con resistencia tanto a penicilinas como a cefalosporinas de tercera generación<sup>34</sup>.

Esta resistencia se describe en mosaico y es producto de la capacidad que tiene este microorganismo para cambiar su ADN producto de la recombinación con ADN que capta del medio, incluso de otras especies bacterianas<sup>33</sup>.

Los sitios en los cuales se generan estas recombinaciones no son al azar y se pueden ubicar sectores susceptibles en el ADN a sufrir este tipo de modificaciones. Los mosaicos además se describen en “bloques” dentro del genoma.

Las PBP nativas tienen cierta variabilidad en su secuencia genética, pero se limitan a presentar un fenotipo con variabilidad de unos pocos aminoácidos. Los genes de las PBP resistentes con genes



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



mosaicos, difieren en su secuencia en un porcentaje importante (cercano al 20%) con los genes de la PBP sin los genes mosaico.

Los bloques de secuencias mosaicos mejor estudiados son los de la PBP2x, donde se encontraron estas secuencias en *S. mitis* y *S. oralis*.

Se describen 3 conjuntos o familias de PBP2x resistentes; en el primero se asocia a sustitución de una Treonina por una Alanina en la posición 338, el segundo se conoce por la sustitución de Glutamina por ácido glutámico en la posición 552 y el tercer grupo importante se caracteriza por la sustitución de un Treonina por una Alanina en la posición 550, confiriéndole resistencia únicamente a las cefalosporinas.

La aparición de mutaciones en genes codificantes de enzimas distintas de PBPs pero relacionados a la síntesis del peptidoglicano, como MurM, han sido relacionadas con resistencia de alto nivel a penicilinas y cefalosporinas de tercera generación<sup>35,36</sup>.

Finalmente, algunas mutaciones lejanas al sitio activo de PBP2x podrían contribuir a generar resistencia a algunos beta lactámicos como cefuroxime, mediado por cambios en la interacción con una kinasa serina/treonina que interviene en los pasos de elongación de la cadena de peptidoglicano por un mecanismo no aclarado hasta el momento<sup>34</sup>.

### Enterococcus spp:

*Enterococcus* spp. presenta naturalmente un cierto grado de resistencia natural a beta lactámicos, debido a la presencia de Pbps con baja afinidad por los mismos.

Esto se observa particularmente en *Enterococcus faecium* y PBP5. Esta PBP de alto peso molecular, realiza la transpeptidación en presencia de beta lactámicos, cuando están inhibidas el resto de las PBP.

La PBP5 tiene muy baja afinidad por la penicilina, mutaciones subsecuentes en los genes que la codifican aumentan la CIM para ampicilina. No todas las mutaciones en esta PBP tienen la misma significancia en la generación de resistencia de este microorganismo, pero se propone que las que adicionan una Serina en la posición 466 en combinación con otras, aumentan significativamente la CIM a ampicilina<sup>37,38</sup>. Se observó además que en cepas resistentes la expresión de esta PBP es significativamente más elevada comparada con las PBP nativas de *Enterococcus* spp. Esta combinación de disminución de la afinidad por el betalactámico y sobre-expresión de la PBP le confiere a estos microorganismos alta resistencia a los betalactámicos, si bien no es posible



redEMC  
Infectología



EUCAST



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



establecer relaciones entre niveles de expresión y cambios en las PBP con los niveles de resistencia observados<sup>39,40</sup>.

La concentración inhibitoria mínima de *E. faecalis* y *E. faecium* a penicilina es sensiblemente más elevada que la mayoría de las especies del género *Streptococcus*. Si *E. faecium* es resistente a penicilina, se debe informar como resistente a todos los betalactámicos, incluido carbapenems.

Dentro de los betalactámicos, ampicilina es para el cual las PBP de estos microorganismos presentan mayor afinidad, por lo que es el betalactámico de elección para el tratamiento de estos microorganismos, mientras que las cefalosporinas deben considerarse resistentes y no realizar ensayos de sensibilidad a ninguna de ellas<sup>41</sup>.

## 4.3. Métodos de estudio en el laboratorio clínico

### 4.3.1. Penicilinasas

Dada la alta prevalencia de estas penicilinasas en los aislamientos clínicos, unido a la baja sensibilidad de las pruebas disponibles para detectar la presencia de las betalactamasas, en general esta detección no se realiza.

En caso de realizarse, se puede ensayar un antibiograma por disco difusión de Kirby-Bauer y la detección de esta enzima con test de nitrocefina cromogénico. La CLSI sugiere la realización del test cromogénico y, si éste arroja un resultado negativo dada su baja sensibilidad, aconseja realizar el test por disco difusión en agar con disco de penicilina de 10 U. Estos ensayos tienen una sensibilidad cercana al 34% y 71%, respectivamente.

Los resultados negativos son aquellos donde se muestra un halo de inhibición homogéneo o “esfumado”, mientras que se considera como productora de betalactamasas cuando se forma un halo de inhibición como trazado a lápiz<sup>42</sup>.

### 4.3.2. Alteración del sitio blanco

Método disco difusión de Kirby Bauer:

La prueba con discos cefamicina (cefoxitina o moxalactama) está ampliamente difundida para la detección de meticilino resistencia (presencia del gen *mecA*), en lugar de la utilización del disco de oxacilina. El disco de cefoxitina 30 ug tiene mejor rendimiento en comparación con el disco de



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



oxacilina 1 ug para el *screening* de la meticilino resistencia conferida por el gen *mecA*<sup>43</sup>. Sin embargo, para la detección de *mecA* en *S. pseudointermedius* se recomienda todavía el disco de oxacilina<sup>44</sup>.

Los puntos de corte para *S. aureus* y *S. lugdunensis* son diferentes que para *Staphylococcus coagulasa* negativos. La resistencia puede expresarse de forma homogénea (con halos de inhibición cercanos a 6 mm) o heterogénea, reconociéndose colonias dentro del halo de inhibición (con CIM algo más bajas) que en general corresponden a valores de CIM elevados. Las poblaciones bacterianas con sensibilidad homogénea presentan CIM elevadas respecto a las que expresan un fenotipo de héterorresistencia.

Los aislamientos héterorresistentes poseen subpoblaciones con microorganismos resistentes y suelen asociarse a SCCmec no multirresistentes (CA-MRSA). Los aislamientos típicamente HA-MRSA, por otro lado, tienen un fenotipo de resistencia llamada 'resistencia homogénea a meticilina'<sup>45</sup>.

CLSI en su versión del 2017 recomienda la detección de *mecA* en *Staphylococcus* sp. diferentes de *S. aureus* y *S. epidermidis* aún con CIM de 0.5-2 µg/mL, mientras que para *S. epidermidis* CIM de 0.5 µg/mL deben informarse como resistentes a meticilina. EUCAST considera meticilino resistente a todos los *Staphylococcus* sp con CIM de 0.5 µg/mL o mayores a excepción de *S. lugdunensis* y *S. saprophyticus*.

Como ya fue mencionado, la detección de un perfil de resistencia a cefoxitin y sensibilidad a oxacilina se asocia altamente a la presencia de *mecC*<sup>24</sup> y esto se relaciona a diferencias en la afinidad de la PBP<sub>mecC</sub> con diferentes beta lactámicos<sup>25</sup>.

Finalmente, hay que recordar que la sensibilidad a cefalosporinas de 5ta generación como ceftaroline y ceftobiprole, en caso de aislamientos meticilino resistentes, debe realizarse por separado.

### Otros test de utilidad en el laboratorio clínico

La utilización de métodos moleculares como la PCR para detectar el gen *mecA* se considera el ensayo *gold standard* para la detección de MRSA<sup>46-48</sup>, sin embargo sigue siendo caro para ser utilizado en el laboratorio de microbiología clínica de forma rutinaria. Hay que tener en cuenta también que, como ya fue mencionado, la meticilino resistencia no se explica sólo por la presencia de *mecA*, por lo que la búsqueda exclusiva por este método tampoco debe realizarse.

La prueba de aglutinación con partículas de látex detecta cepas meticilino resistentes mediante la incorporación de la PBP2a. Esta prueba es fácil de realizar y da resultados en alrededor de 20



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



minutos. Es comparable con la especificidad de detectar el gen *mecA* mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Es de utilidad para laboratorios que manejan un número importante de muestras, en pacientes de manejo complejo y en los que un resultado rápido cambia la decisión terapéutica. Contribuye en este sentido al uso racional de medicamentos, colaborando por ejemplo en la suspensión de vancomicina.

Tiene una sensibilidad (93-100%) y especificidad (96-99,1%)<sup>46-50</sup>.

Con respecto a los Estafilococos coagulasa negativos, la PCR para *mecA* identificó resistencia en una proporción significativamente mayor comparada con el test de oxacilina y/o cefoxitina por Vitek II<sup>51</sup>.

En *Streptococcus pneumoniae* se puede utilizar el disco de oxacilina de 1 ug para realizar un *screening* de la resistencia a los betalactámicos. Este disco es capaz de diferenciar los microorganismos susceptibles de los resistentes, considerando los puntos de corte meníngeos de CIM <0.06 mg/L, pero para el uso en aislamientos no provenientes de meningitis no discrimina el grado de sensibilidad que presenta el microorganismo. Por esto, la obtención de un halo de sensibilidad a oxacilina habilita el tratamiento de los cuadros no meníngeos, pero dado un valor de resistencia es necesario determinar la CIM tanto de penicilina como de ceftriaxona. Dado que *S. pneumoniae* es un microorganismo exigente desde el punto de vista nutricional, los ensayos de resistencia antibiótica se deben realizar en Mueller-Hinton con el agregado de sangre ovina al 5%.

#### Screening con disco oxacilina:

En infecciones severas (como aquellas donde se aíslan a partir del líquido cefalorraquídeo) se recomienda realizar el estudio con la CIM para los diferentes betalactámicos; la recomendación es más precisamente para penicilina, cefotaxime, ceftriaxona e imipenem. Debido a características farmacocinéticas de los betalactámicos y los mecanismos de resistencia de este microorganismo a los antibióticos, en el 2008 se cambiaron los puntos de corte para la penicilina, dependiendo si el aislamiento es de una muestra de Sistema Nervioso Central o no.

Los puntos de corte actuales para aislamientos no meníngeos son: CIM ≤ 2 mg/L susceptibles, CIM de 4 mg/L resistencia intermedia, y mayores o iguales a 8 ug/ml resistentes, mientras que para infecciones meníngeas CIM ≥ 0,12 mg/L se consideran resistentes.





Penicilina	EUCAST		CLSI		
	MIC (mg/L)	breakpoint	MIC breakpoint (mg/L)		
	S ≤	R >	S ≤	I	R ≥
Benzylpenicilina (no meningitis)	0.06	2	2	4	8
Benzylpenicilina (meningitis)	0.06	0.06	0.06	-	0.12

**Tabla 2.** Criterios CLSI y EUCAST para la interpretación de la sensibilidad a penicilina de *S. pneumoniae*. En el caso de CLSI se marca que para casos de neumonía con CIM=2mg/L se puede considerar sensible si se administran tratamientos de 2,4g cada 4 horas. Mientras que en el caso de CLSI la recomendación es con CIM=4 siempre que se administren dosis de 18 a 24 millones de U/día.

Para el tratamiento de las infecciones por *S. pneumoniae* se puede utilizar amoxicilina, ampicilina, cefepime, cefotaxime, ceftriaxona, cefuroxime, ertapenem e imipenem pero no se han establecido de forma adecuada puntos de corte por los métodos de disco difusión. Para este grupo de antibióticos se recomienda la determinación de la CIM.

Si el aislamiento no procede del líquido cefalorraquídeo y la CIM es susceptible o de resistencia intermedia, se recomienda aumentar la dosis y acortar el intervalo interdosis, siempre monitorizando la evolución clínica del paciente. Los betalactámicos son antibióticos tiempo dependientes que tienen la característica de concentrarse muy bien en tejidos como el pulmonar<sup>52</sup>.

La determinación por el antibiotipo de las modificaciones en las PBPs que puede presentar el aislamiento no está del todo esclarecido.

Para los estreptococos β-hemolíticos la CIM ≥ 0,12 ug/ml son extremadamente raras y no se han reportado nunca para *S. pyogenes*.

Para *Streptococcus* spp. del grupo *viridans* provenientes de sitios estériles, se debe ensayar la CIM para penicilina o ampicilina.



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



## 4.4. Referencias

1. Lowy FD. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest* 2003; 111: 1265-73.
2. Sauvage E, Terrak M. Glycosyltransferases and Transpeptidases/Penicillin-Binding Proteins: Valuable Targets for New Antibacterials. *Antibiotics (Basel)* 2016; 5.
3. Voladri RK, Kernodle DS. Characterization of a chromosomal gene encoding type B beta-lactamase in phage group II isolates of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 3163-8.
4. Chong YP, Park SâJ, Kim ES et al. Prevalence of blaZ gene types and the cefazolin inoculum effect among methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* blood isolates and their association with multilocus sequence types and clinical outcome. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 2014; 34: 349-55.
5. Livorsi DJ, Crispell E, Satola SW et al. Prevalence of blaZ Gene Types and the Inoculum Effect with Cefazolin among Bloodstream Isolates of Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2012; 56: 4474-7.
6. Chambers HF, Deleo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol* 2009; 7: 629-41.
7. Arede P, Ministro J, Oliveira DC. Redefining the Role of the b-Lactamase Locus in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: b-Lactamase Regulators Disrupt the MecI-Mediated Strong Repression on mecA and Optimize the Phenotypic Expression of Resistance in Strains with Constitutive mecA Expression. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2013; 57: 3037-45.
8. Jorgensen JH. Mechanisms of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and methods for laboratory detection. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1991; 12: 14-9.
9. Cercenado E. Enterococcus: resistencias fenotípicas y genotípicas y epidemiología en España. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 2011; 29, Supplement 5: 59-65.
10. Chang CY, Lin HJ, Li BR et al. A Novel Metallo-beta-Lactamase Involved in the Ampicillin Resistance of *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49136 Strain. *PLoS One* 2016; 11: e0155905.
11. Parker MT, Jevons MP. A Survey of Methicillin Resistance in *Staphylococcus Aureus*. *Postgrad Med J* 1964; 40: SUPPL:170-8.
12. Thompson RL, Cabezudo I, Wenzel RP. Epidemiology of nosocomial infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Ann Intern Med* 1982; 97: 309-17.
13. Zapun A, Contreras-Martel C, Vernet T. Penicillin-binding proteins and beta-lactam resistance. *FEMS Microbiol Rev* 2008; 32: 361-85.
14. Otero LH, Rojas-Altuve A, Llarrull LI et al. How allosteric control of *Staphylococcus aureus* penicillin binding protein 2a enables methicillin resistance and physiological function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110: 16808-13.



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



15. Acebron I, Chang M, Mobashery S et al. The Allosteric Site for the Nascent Cell Wall in Penicillin-Binding Protein 2a: An Achilles' Heel of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Curr Med Chem* 2015; 22: 1678-86.
16. Hiramatsu K, Katayama Y, Matsuo M et al. Multi-drug-resistant *Staphylococcus aureus* and future chemotherapy. *J Infect Chemother* 2014; 20: 593-601.
17. Turlej A, Hryniewicz W, Empel J. Staphylococcal cassette chromosome mec (Sccmec) classification and typing methods: an overview. *Pol J Microbiol* 2011; 60: 95-103.
18. Benoit SR, Estivariz C, Mogdasy C et al. Community strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as potential cause of healthcare-associated infections, Uruguay, 2002-2004. *Emerg Infect Dis* 2008; 14: 1216-23.
19. Miller LG, Kaplan SL. *Staphylococcus aureus*: a community pathogen. *Infect Dis Clin North Am* 2009; 23: 35-52.
20. Garcia-Alvarez L, Holden MT, Lindsay H et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel mecA homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *Lancet Infect Dis* 2011; 11: 595-603.
21. Tsubakishita S, Kuwahara-Arai K, Baba T et al. Staphylococcal Cassette Chromosome mec-Like Element in *Macroccoccus caseolyticus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2010; 54: 1469-75.
22. Lindgren AK, Gustafsson E, Petersson AC et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with mecC: a description of 45 human cases in southern Sweden. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2016; 35: 971-5.
23. Paterson GK, Harrison EM, Holmes MA. The emergence of mecC methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 2014; 22: 42-7.
24. Cartwright EJ, Paterson GK, Raven KE et al. Use of Vitek 2 antimicrobial susceptibility profile to identify mecC in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 2732-4.
25. Ba X, Harrison EM, Lovering AL et al. Old Drugs To Treat Resistant Bugs: Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates with mecC Are Susceptible to a Combination of Penicillin and Clavulanic Acid. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2015; 59: 7396-404.
26. Ba X, Harrison EM, Edwards GF et al. Novel mutations in penicillin-binding protein genes in clinical *Staphylococcus aureus* isolates that are methicillin resistant on susceptibility testing, but lack the mec gene. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2014; 69: 594-7.
27. Chan LC, Gilbert A, Basuino L et al. PBP4 mediates high-level resistance to new generation cephalosporins in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2016.
28. Klugman KP. Pneumococcal resistance to antibiotics. *Clin Microbiol Rev* 1990; 3: 171-96.
29. Michel N, Watson M, Baumann F et al. Distribution of *Streptococcus pneumoniae* Serotypes Responsible for Penicillin Resistance and the Potential Role of New Conjugate Vaccines in New Caledonia. *Journal of Clinical Microbiology* 2005; 43: 6060-3.
30. dos Santos MS, Azevedo J, Menezes AP et al. Temporal trends and clonal diversity of penicillin non-susceptible pneumococci from meningitis cases from 1996 to 2012, in Salvador, Brazil. *BMC Infect Dis* 2015; 15: 302.



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



31. Hortal M, Lovgren M, de la Hoz F et al. Antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae* in six Latin American countries: 1993-1999 surveillance. *Microb Drug Resist* 2001; 7: 391-401.
32. Whitney CG, Farley MM, Hadler J et al. Increasing prevalence of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States. *N Engl J Med* 2000; 343: 1917-24.
33. Hakenbeck R, Grebe T, Zahner D et al. beta-lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae*: penicillin-binding proteins and non-penicillin-binding proteins. *Mol Microbiol* 1999; 33: 673-8.
34. Maurer P, Todorova K, Sauerbier J et al. Mutations in *Streptococcus pneumoniae* penicillin-binding protein 2x: importance of the C-terminal penicillin-binding protein and serine/threonine kinase-associated domains for beta-lactam binding. *Microb Drug Resist* 2012; 18: 314-21.
35. Soriano F, Cafini F, Aguilar L et al. Breakthrough in penicillin resistance? *Streptococcus pneumoniae* isolates with penicillin/cefotaxime MICs of 16 mg/L and their genotypic and geographical relatedness. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2008; 62: 1234-40.
36. del Campo R, Cafini F, Morosini MI et al. Combinations of PBPs and MurM protein variants in early and contemporary high-level penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates in Spain. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57: 983-6.
37. Klibi N, Saenz Y, Zarazaga M et al. Polymorphism in *pbp5* gene detected in clinical *Enterococcus faecium* strains with different ampicillin MICs from a Tunisian hospital. *J Chemother* 2008; 20: 436-40.
38. Rice LB, Bellais S, Carias LL et al. Impact of specific *pbp5* mutations on expression of beta-lactam resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 3028-32.
39. Rice LB, Carias LL, Rudin S et al. *Enterococcus faecium* low-affinity *pbp5* is a transferable determinant. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 5007-12.
40. Belhaj M, Boutiba-Ben Boubaker I, Slim A. Penicillin-Binding Protein 5 Sequence Alteration and Levels of *plp5* mRNA Expression in Clinical Isolates of *Enterococcus faecium* with Different Levels of Ampicillin Resistance. *Microb Drug Resist* 2016; 22: 202-10.
41. Rice LB. Mechanisms of resistance and clinical relevance of resistance to beta-lactams, glycopeptides, and fluoroquinolones. *Mayo Clin Proc* 2012; 87: 198-208.
42. Kaase M, Lenga S, Friedrich S et al. Comparison of phenotypic methods for penicillinase detection in *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 614-6.
43. Zeeshan M, Jabeen K, Khan E et al. Comparison of different phenotypic methods of detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* with the molecular detection of *mec-A* gene. *J Coll Physicians Surg Pak* 2007; 17: 666-70.
44. Vigo GB, Giacoboni GI, Gagetti PS et al. [Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of *Staphylococcus pseudintermedius* strains isolated from dog clinical samples]. *Rev Argent Microbiol* 2015; 47: 206-11.
45. Okuma K, Iwakawa K, Turnidge JD et al. Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 4289-94.
46. Datta P, Gulati N, Singla N et al. Evaluation of various methods for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains and susceptibility patterns. *J Med Microbiol* 2011; 60: 1613-6.

NUEVA  
EDICIÓN  
2018

# INTERPRETACIÓN DEL ANTIBIOGRAMA EN LA PRÁCTICA CLÍNICA DIARIA

CURSO  
ONLINE

18 DE ABRIL - 13 DE JUNIO 2018 - ATBgrama2018.evimed.net



redEMC  
Infectología

EUCAST



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



47. Alipour F, Ahmadi M, Javadi S. Evaluation of different methods to detect methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J Infect Public Health* 2014; 7: 186-91.
48. Acosta-Perez G, Rodriguez-Abrego G, Longoria-Revilla E et al. [Evaluation of four methods for detecting methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from clinical specimens at a regional hospital in Mexico]. *Salud Publica Mex* 2012; 54: 1-6.
49. Cavassini M, Wenger A, Jaton K et al. Evaluation of MRSA-Screen, a simple anti-PBP 2a slide latex agglutination kit, for rapid detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1591-4.
50. Sakoulas G, Gold HS, Venkataraman L et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: comparison of susceptibility testing methods and analysis of mecA-positive susceptible strains. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3946-51.
51. Johnson KN, Andreacchio K, Edelstein PH. Detection of Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci by the Vitek 2 System. *Journal of Clinical Microbiology* 2014; 52:3196-9.
52. Giachetto G, Pirez MC, Nanni L et al. Ampicillin and penicillin concentration in serum and pleural fluid of hospitalized children with community-acquired pneumonia. *Pediatr Infect Dis J* 2004; 23: 625-9.



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



## 5. Resistencia a los glicopéptidos

### Ana Cristina Gales

Profesora Adjunta de Infectología del Departamento de Medicina de la Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo.  
Investigadora 1A del Consejo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (CNPq)  
Miembro de la Cámara Técnica de Resistencia Microbiana (CATREM),  
Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria (ANVISA)  
Coordinadora clínica del Consejo Brasileiro de Susceptibilidad Antimicrobiana (BrCAST)  
Brasil

La vancomicina y la teicoplanina son compuestos pertenecientes a la clase de los glicopéptidos. Pero únicamente la vancomicina está aprobada para su uso clínico en Estados Unidos (EEUU). Recientemente, nuevos glicopéptidos/lipoglicopéptidos, como la dalbavancina, la telavancina y la oritavancina, fueron probados para uso clínico en EEUU<sup>1</sup>.

Los glicopéptidos no poseen actividad contra bacterias Gram negativas y frecuentemente se utilizan en el tratamiento de las infecciones causadas por cocos Gram positivos, como *Staphylococcus aureus* o *Staphylococcus coagulasa-negativos* resistentes a la oxacilina y *Enterococcus* spp. resistentes a la ampicilina. Sin embargo, la resistencia intrínseca a los glicopéptidos también ha sido descrita en muchas especies de Gram positivos, como *Erysipelothrix rhusopathiae*, *Lactococcus*, *Pediococcus* y *Lactobacillus*<sup>2</sup>.

### 5.1. Mecanismo de acción de los glicopéptidos

Los glicopéptidos actúan sobre las bacterias Gram positivas inhibiendo la síntesis del peptidoglicano, que es uno de los principales componentes de la pared celular bacteriana. La síntesis del peptidoglicano ocurre en sucesivas etapas. En el interior de la célula bacteriana, una racemasa convierte a L-alanina en D-alanina (D-Ala) y luego dos moléculas de D-Ala se unen por una ligasa, creando el dipéptido D-alanila-D-alanina (D-Ala-D-Ala). Este dipéptido es incorporado al tripéptido de difosfato uracilo N-acetilmurámico mediante la reacción catalizada por MurF, una proteína sintetasa, y se forma así el pentapéptido difosfato uracilo N-acetilmurámico.

Este pentapéptido se une al transportador lipídico decaprenol, que luego del agregado de N-acetilglucosamina derivada de uracilo difosfato de N-acetilglucosamina, permite la traslocación de los precursores de peptidoglicano hacia la superficie externa de la membrana celular citoplasmática. Las moléculas del pentapéptido del ácido N-acetil murámico se unen a las moléculas de N-acetil-



redEMC  
Infectología



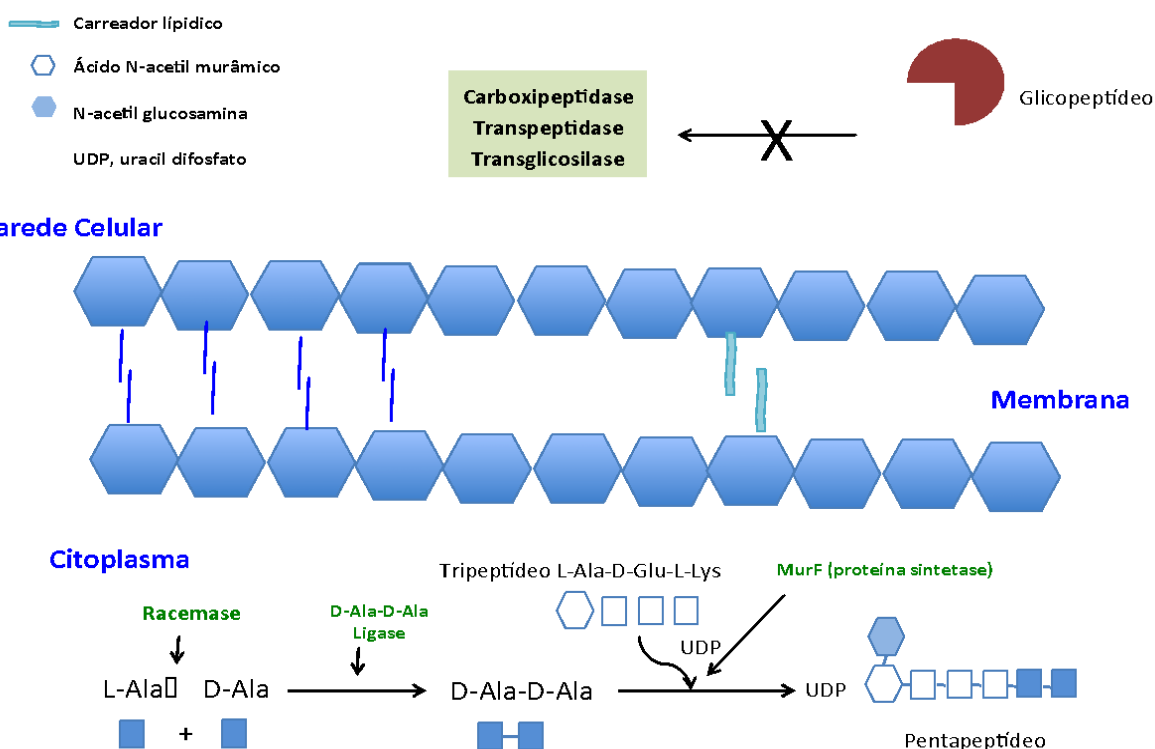
UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



glucosamina mediante la reacción de transglicosilación. También se forman enlaces entre las D-Ala-D-Ala terminales de una cadena de precursores del peptidoglicano con las D-Ala-D-Ala terminales de otra cadena permitiendo la formación de enlaces cruzados. Esta etapa se conoce como reacción de transpeptidación y son catalizadas por las enzimas denominadas PBP (*Penicillin Binding Proteins*, proteínas de unión a penicilina).

Los glicopéptidos inhiben las fases tardías de la síntesis de peptidoglicano al unirse a los terminales D-Ala-D-Ala, precursores de los terminales pentapeptídicos del peptidoglicano ubicados en la superficie exterior de la membrana citoplasmática. Este enlace es de alta afinidad e impide la actividad de las transglicosilasas (responsables del enlace de una nueva subunidad de disacárido-pentapeptido a la molécula de peptidoglicano que se está formando); de las transpeptidasas, y como consecuencia, la formación de una nueva cadena de peptidoglicano como se puede observar en la **Imagen 1**<sup>3,4</sup>.



**Imagen 1.** Biosíntesis de peptidoglicano y mecanismos de acción de los glicopéptidos. Al unirse al C-terminal D-Ala-D-Ala del precursor de peptidoglicano, los glicopéptidos impiden que las reacciones catalizadas por las transglicosilasas, transpeptidasas y D,D-carboxipeptidasas se produzcan. Imagen adaptada Courvalin P. Clin Infect Dis 2006;42(Suppl 1): S25-S34.



## 5.2. Mecanismo de resistencia a los glicopéptidos

### 5.2.1. Mecanismo de Resistencia en *Enterococcus* spp.

El primer aislamiento de *Enterococcus faecium* reportado como resistente a los glicopéptidos fue registrado en Reino Unido, en 1988<sup>5</sup>. Luego, fueron reportados los primeros casos de *E. faecium* resistentes a vancomicina en la ciudad de Nueva York<sup>6</sup>. Actualmente, cepas de *Enterococcus* resistentes a la vancomicina (VRE) son reportadas en varias partes del mundo<sup>4,8</sup>.

La resistencia a los glicopéptidos en enterococos es originada por la síntesis de precursores modificados del peptidoglican. El precursor D-Ala-D-Ala es sustituido por un terminal D-Lactato (D-Ala-D-Lac) o D-Serina (D-Ala-D-Ser), que presenta baja afinidad de enlace con los glicopéptidos. Varios fenotipos/genotipos de resistencia a los glicopéptidos fueron descritos en *Enterococcus* spp. tal como se puede observar en la **Tabla 1**<sup>3,4,7-18</sup>. La clasificación de estos genotipos está basada en la secuencia de los genes estructurales que codifican las ligasas, ya que los niveles de resistencia a vancomicina y teicoplanina no son capaces de discriminarlos<sup>3,4</sup>. La sustitución del terminal D-Ala-D-Ala está determinada por un conjunto de genes llamados operones, que pueden residir en el cromosoma bacteriano, o pueden ser adquiridos mediante plásmidos<sup>3,4</sup>. El operón es una unidad genética de expresión coordinada, que comprende un segmento promotor, un segmento operador y, en la secuencia, el gen o genes cuya expresión es controlada por ellos. La estructura y composición de los operones *vanA*, *vanB* y *vanC* que confieren resistencia a la vancomicina pueden ser observadas en la **Imagen 2** presentada a continuación<sup>9-12</sup>.

Fenotipo/Modificación	Genotipo (Operón)	Especie	Resistencia a la vancomicina	Resistencia a la teicoplanina	Expresión
VanA <sup>9</sup> D-Ala-D-Lac	<i>vanA</i>	<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i>	Alto grado de resistencia CIM, 64 -1000 µg/mL	Alto grado de resistencia CIM, 16-512 µg/mL	Resistencia Inducible (alto grado)
VanB <sup>12,13</sup> D-Ala-D-Lac	<i>vanB</i>	<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i>	Alto grado de resistencia CIM, 4-512 µg/mL	Sensible CIM, ≤0.5 µg/mL	Resistencia Inducible (alto grado)
VanC <sup>3,8,14</sup> D-Ala-D-Ser	<i>vanC1</i> , <i>vanC2</i> y <i>vanC3</i>	<i>E. gallinarum</i> , <i>E. casseliflavus</i> , <i>E. flavescens</i>	Bajo grado de resistencia CIM, 2-32 µg/mL	Sensible CIM, ≤0.5 µg/mL	Resistencia constitutiva (bajo grado)
VanD <sup>15</sup> D-Ala-D-Lac	<i>vanD</i>	<i>E. faecium</i>	Moderado a alto grado de resistencia CIM, 64-256 µg/mL	Bajo grado de resistencia CIM, 4-32 µg/mL	Resistencia Inducible
VanE <sup>16</sup> D-Ala-D-Ser	<i>vanE</i>	<i>E. faecalis</i>	Bajo grado de resistencia CIM, 16 µg/mL	Sensible CIM, ≤0.5 µg/mL	Resistencia Inducible
VanG <sup>17</sup> D-Ala-D-Ser	<i>vanG</i>	<i>E. faecalis</i>	Bajo grado de resistencia CIM, ≤ 16 µg/mL	Sensible CIM, ≤0.5 µg/mL	Resistencia Inducible
VanL <sup>18</sup> D-Ala-D-Ser	<i>vanL</i>	<i>E. faecalis</i>	Bajo grado de resistencia CIM, 8 µg/mL	Sensible	Resistencia Inducible
VanM <sup>19</sup> D-Ala-D-Lac	<i>vanM</i>	<i>E. faecium</i>	Alto grado de resistencia CIM, >256 µg/mL	Alto grado de resistencia	Resistencia Inducible
VanN <sup>20</sup> D-Ala-D-Ser	<i>vanN</i>	<i>E. faecium</i>	Bajo grado de resistencia CIM, 16 µg/mL	Sensible CIM, ≤0.5 µg/mL	Resistencia constitutiva

Tabla 1 Principales características de los genotipos/fenotipos Van.





redEMC  
Infectología



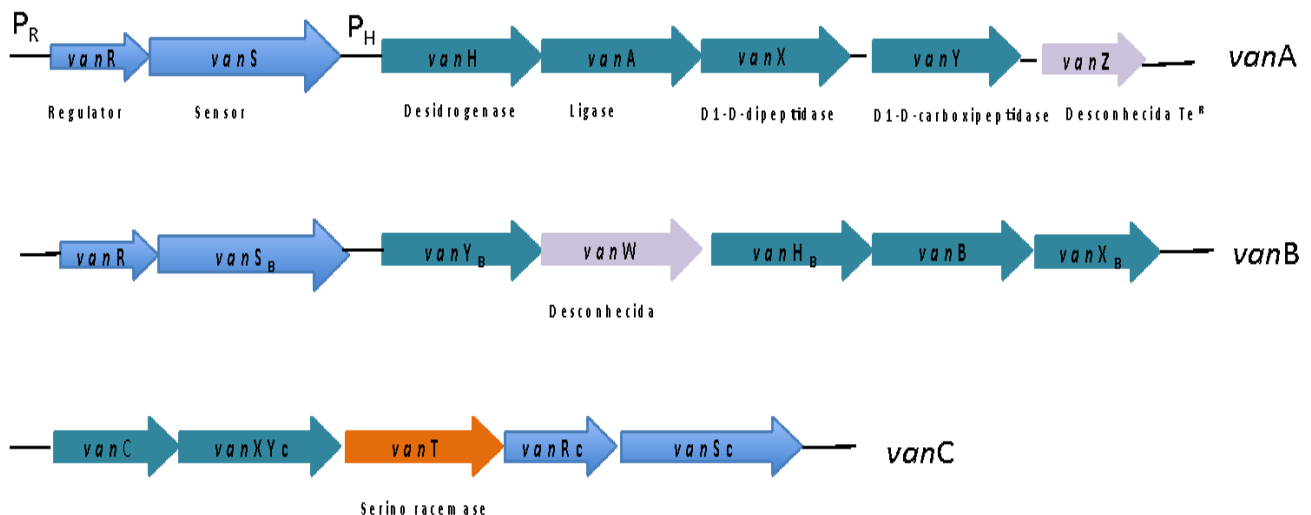
UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



Los fenotipos de resistencia a la vancomicina más frecuentes son: *VanA* (alto grado de resistencia a la vancomicina y teicoplanina), *VanB* (moderado grado de resistencia a la vancomicina y sensibilidad a teicoplanina) y *VanC* (resistencia moderada o intermedia a vancomicina y sensibilidad a teicoplanina)<sup>9-12</sup>. Tanto el fenotipo *VanA* como el *VanB* pueden ser inducidos por concentraciones sub-inhedoras de vancomicina. Sin embargo, los fenotipos *VanC* y *VanN* no son inducibles, pero sí constitutivos<sup>12,18</sup>. La mayoría de los VRE presentan el fenotipo *VanA*. Este fenotipo es encontrado con mayor frecuencia en aislamientos de *E. faecium* y *E. faecalis*, pero otras especies de *Enterococcus* spp. pueden adquirir el transposón que carga el gen *vanA* y pasar a expresar este fenotipo de resistencia<sup>3,4,7-9</sup>.

El genotipo de resistencia *vanA* es el que se encuentra con mayor frecuencia en aislamientos de VRE y ha sido el más estudiado, principalmente, en la cepa *E. faecium* BM4147<sup>9</sup>. El operón *vanA* es transportado por el transposón Tn1546, el cual originalmente fue detectado en un plásmido de un aislamiento clínico de *E. faecium*<sup>5,9</sup>. La diseminación de este transposón parece ser responsable de la propagación del alto grado de resistencia a los glicopéptidos entre *Enterococcus* spp.<sup>4</sup> Este operón codifica nueve polipéptidos que actúan en conjunto para conferir resistencia a la vancomicina: dos marcos de lectura abiertos relacionados a la transposición, dos polipéptidos (*VanR* y *VanS*) que son responsables de la regulación de la expresión del gen de resistencia, dos péptidos (*VanH*, *VanA*) responsables de la síntesis de D-Ala-D-Lac y dos proteínas esenciales (*VanX* y *VanY*) para la hidrólisis de los precursores del peptidoglicano. La función de la proteína Z es desconocida (**Figura 2**)<sup>3,7,9</sup>.



**Imagen 2.** Estructura y composición de los operones *vanA*, *vanB* y *vanC* que confieren resistencia a la vancomicina. Las flechas indican los genes y las puntas de las flechas indican la dirección de transcripción. Los largos de las flechas varían de acuerdo al tamaño de los genes, pero no están en escala.



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



PR e PH: Promotores que preceden a los genes *vanR* y *vanH*, respectivamente  
TeR: asociada a la disminución de la sensibilidad a la teicoplanina.

La organización del operón *vanB* es similar a la del operón *vanA*, pero difiere en su regulación, porque la vancomicina, pero no la teicoplanina, es inductora del operón *VanB*<sup>3,8,10,11</sup>. Cepas con fenotipo *VanB* demostraron varios niveles de resistencia a la vancomicina y generalmente permanecen sensibles a la teicoplanina. Sin embargo, la vancomicina puede inducir resistencia a la teicoplanina, y fue descrito el desarrollo de resistencia a la teicoplanina *in vivo* en una cepa de *E. faecium* con fenotipo *VanB*<sup>19</sup>.

Las cepas *VanC* son intrínsecamente resistentes a la vancomicina (CIMs 8-32 g/mL), pero permanecen sensibles a la teicoplanina (CIMs 0,25-1 g/mL). Tres genes fueron identificados en este fenotipo de resistencia: *vanC-1* (de *E. gallinarum*), *vanC-2* (de *E. casseliflavus*) y *vanC-3* (de *E. flavescens*). La ubicación de los genes de resistencia responsables del fenotipo *VanC* es cromosómica, y este fenotipo parece ser intrínseco a esas especies de *Enterococcus* spp.<sup>3,8,12</sup>.

Curiosamente, el crecimiento de algunas cepas de *Enterococcus* spp. depende de la vancomicina. Estas cepas son reconocidas en presencia de vancomicina en el medio de cultivo, o cuando los pacientes están recibiendo terapia con vancomicina. Los enterococos dependientes de vancomicina pueden no sintetizar una ligasa D-Ala-D-Ala funcional y, probablemente, son capaces de sintetizar paredes celulares únicamente a partir de precursores de D-Ala-D-Lac que solo son formadas en presencia de vancomicina<sup>20</sup>.

## 5.2.2. Mecanismo de Resistencia en *Staphylococcus*

La resistencia a glicopéptidos en *S. aureus* se puede expresar a través de dos fenotipos distintos, GISA (*glycopeptide intermediate S. aureus*) y GRSA (*glycopeptide resistant S. aureus*)<sup>21-23</sup>. Con frecuencia, estos fenotipos son denominados VISA (*vancomycin intermediate S. aureus*) o VRSA (*glycopeptide intermediate S. aureus*), haciendo referencia únicamente a la resistencia a la vancomicina. Sin embargo, el uso de esta denominación se debe evitar porque también se produce una reducción de la sensibilidad o resistencia a la teicoplanina.

De acuerdo con las recomendaciones del *European Committee on Antimicrobial Susceptibility* (EUCAST), los aislamientos de *S. aureus* con un alto nivel de resistencia a la vancomicina (CIM > 8 mg/L) son denominados GRSA, mientras que los aislamientos de *S. aureus* que presentan MIC entre 4 y 8 mg/L son considerados GISA. Las cepas de *S. aureus* sensibles a la vancomicina (CIMs ≤2 mg/L), pero con poblaciones minoritarias (1 por cada 10<sup>6</sup> células) con CIM de vancomicina > 2 mg/L, presentan heterorresistencia a los glicopéptidos y se clasifican como hGISA. Ocasionalmente, también se llaman hVISA<sup>24</sup>. El mecanismo de hGISA es complejo y la detección depende del análisis poblacional, el cual se realiza solamente en laboratorios de referencia o de investigación porque el



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



test es laborioso y requiere *expertise* técnica<sup>25</sup>. De esta manera, ha sido difícil establecer el significado clínico del fenotipo hGISA ya que aún no ha sido realizado ningún estudio prospectivo bien controlado. Sin embargo, se cree que la presencia del fenotipo hGISA pueda estar asociada a una peor respuesta clínica en infecciones graves<sup>21-23,25</sup>. De esta manera, se sugiere que se investigue el fenotipo hGISA en los casos de infecciones graves, como, por ejemplo, infecciones del torrente sanguíneo que no responden a la terapia inicial con glicopéptidos<sup>26</sup>.

Hiramatsu y colaboradores fueron los primeros en reportar un aislamiento clínico de *S. aureus* resistente a la metilicina con sensibilidad reducida a la vancomicina, en 1996. Esta cepa fue aislada de la herida quirúrgica de un niño de cuatro meses que había sido sometido a una cirugía para corrección de atresia pulmonar, y fue denominada MU50<sup>27</sup>. Cepas GISA han sido reportadas por varios países<sup>4</sup>. El mecanismo de resistencia que lleva al fenotipo VISA no está totalmente elucidado, se cree que varios eventos involucrados en la síntesis de peptidoglican ocurren simultáneamente<sup>4</sup>. Cepas VISA presentan engrosamiento de la pared celular y aumento de la producción de residuos libres de D-Ala-D-Ala. De esta manera, parte de las moléculas de vancomicina quedarían retenidas en la pared bacteriana, disminuyendo el número de moléculas disponibles para alcanzar el sitio de acción que se encuentra yuxtapuesto a la membrana citoplasmática bacteriana<sup>3,4,20-23,26,28</sup>. El engrosamiento de la pared bacteriana también puede afectar la actividad de la daptomicina<sup>29</sup>. Sin embargo, no todas las cepas que presentan aumento de la CIM para vancomicina presentaron CIM elevadas para daptomicina.

A diferencia de los aislamientos VISA, la resistencia a la vancomicina en VRSA no está relacionada a alteraciones en la pared bacteriana sino a la adquisición del operón *vanA*. Estos aislamientos presentan alto grado de resistencia a la vancomicina originados por la sustitución del péptido final de D-Ala-D-Ala terminal<sup>3,4,20-23,26,28</sup>. La transferencia *in vitro* del gen *vanA* de una cepa de *E. faecalis* hacia *S. aureus* fue reportada en 1992, pero recién en 2002 se reportó la aparición de la primera cepa de VRSA, en EEUU<sup>30,31</sup>. Este fenotipo es raro y durante mucho tiempo estuvo restringido a los Estados Unidos, cerca de la zona de la ciudad de Detroit. Hasta ahora, solamente pocos casos de VRSA fueron reportados en India, Irán, Paquistán, Portugal y Brasil<sup>32-36</sup>. Las cepas VRSA han sido recuperadas de pacientes con infecciones de piel y tejidos blandos causadas por MRSA y que estaban recibiendo terapia con vancomicina. Trece de los 14 VRSA aislados en EEUU pertenecían al complejo clonal 5 (incluyendo ST5, ST85, ST231 y ST371), el cual es el más ampliamente diseminado entre muestras de MRSA hospitalarias en los EEUU<sup>36,37</sup>. Por otro lado, la cepa de VRSA aislada en Brasil pertenecía al ST8, la cual se asocia al cassette cromosómico estafilocócico *mec* (*SCCmec*) del tipo IVa y spa tipo t292, presentes en muestras comunitarias<sup>36</sup>. Esta cepa está filogenéticamente relacionada al clon de MRSA USA300 que se ha diseminado rápidamente por EEUU y la región norte de América Latina (variante latino-americana-USA300-LV)<sup>36,38</sup>. A pesar de considerarse que tenían un riesgo aumentado para la adquisición de VRSA, ninguno de los profesionales de la salud o pacientes que compartían el mismo turno de diálisis de los pacientes con VRSA fueron colonizados por estas cepas<sup>37,39</sup>. No hay datos recientes sobre la prevalencia de aislamientos con sensibilidad reducida a los glicopéptidos en



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



Europa. En base a un informe de instituciones individuales, se estima que la prevalencia de hGISA es  $\leq 2\%$  da la de los MRSA en Europa, y GISA por debajo de  $0,1\%$ <sup>26</sup>.

### 5.3. Detección en el laboratorio del fenotipo de resistencia a los glicopéptidos de acuerdo con las recomendaciones de EUCAST

Los puntos de corte recomendados por EUCAST y CLSI para la clasificación de la categoría de sensibilidad a los glicopéptidos están detallados en la **Tabla 2**<sup>22,24</sup>.

Microorganismo/ Antimicrobiano	CIM <sup>a</sup> (mg/L)		Potencia del disco	Disco-Difusión (mm)
	Sensibilidad	Resistencia		Sensibilidad
<b>Enterococcus spp.</b>				
Vancomicina	$\leq 4$	$\geq 8$	5 $\mu\text{g}$	$\geq 12$
Teicoplanina	$\leq 2$	$\geq 4$	30 $\mu\text{g}$	$\geq 16$
<b>Staphylococcus spp.</b>				
Dalbavancina	$\leq 0,125$	$\geq 0,25$		
<b>S. aureus</b>				
Vancomicina	$\leq 2$	$\geq 8$		NR <sup>b</sup>
Teicoplanina	$\leq 2$	$\geq 8$		NR <sup>b</sup>
Telavancina (MRSA)	$\leq 0,125$	$\geq 0,25$		NR <sup>b</sup>
Oritavancina	$\leq 0,125$	$\geq 0,25$		NR <sup>b</sup>
<b>SCON<sup>c</sup></b>				
Vancomicina	$\leq 4$	$\geq 8$		NR <sup>b</sup>
Teicoplanina	$\leq 4$	$\geq 8$		NR <sup>b</sup>

**Tabla 2.** Puntos de corte de los glicopéptidos y lipopoliglicopéptidos para las muestras de *Staphylococcus* spp. y *Enterococcus* spp. de acuerdo con las recomendaciones de EUCAST<sup>22</sup>.

- A. CIM, concentración inhibitoria mínima.
- A. NR, técnica no recomendada.
- B. SCON, *Staphylococcus coagulasa* negativo.



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



### 5.3.1. Detección de *Enterococcus* spp. resistente a los glicopéptidos

Los aislamientos de *E. faecium* o *E. faecalis* con una CIM de vancomicina > 4 mg/L son catalogados como resistentes a la vancomicina (VRE). Las cepas que expresan el fenotipo *VanB* generalmente son fenotípicamente sensibles a la teicoplanina. Hay reportes de casos de aparición de resistencia a la teicoplanina durante el tratamiento de infecciones por enterococos que expresaban el fenotipo *VanB*. Los relatos de fallas clínicas son escasos por lo que la recomendación actual de EUCAST es reportar el resultado para teicoplanina tal como es obtenido<sup>19,22,24</sup>.

La resistencia a la vancomicina puede ser detectada por los métodos de determinación de la CIM, disco-difusión y *screening* en agar. Para los tres métodos, es esencial que las placas sean incubadas por 24 horas, a fin de que los aislamientos con resistencia inducible puedan ser detectados. Los tres métodos detectan la resistencia mediada por *vanA*. A veces, la detección de resistencia mediada por *vanB* puede ser más difícil. La determinación de la CIM por dilución en agar o microdilución en caldo es precisa, pero menos utilizada por laboratorios en forma rutinaria. Reportes más antiguos muestran que la detección de resistencia mediada por *vanB* es problemática por métodos automatizados<sup>40</sup>. Desde entonces, se han realizado actualizaciones para los métodos automatizados, pero aún faltan estudios recientes sobre el desempeño de esos métodos para la detección de resistencia mediada por *vanB*<sup>26</sup>.

Independientemente del test empleado para la detección de los aislamientos VRE, es importante que la identificación bacteriana sea confirmada. Las cepas de *E. gallinarum* o *E. casseliflavus* presentan bajo grado de resistencia a la vancomicina y pueden ser erróneamente identificados como *E. faecium*, debido a un test de arabinosa positivo. El MGP (alfa-metil-D-glucopiranosido) o un ensayo de test de motilidad se puede usar para distinguir *E. gallinarum*/*E. casseliflavus* de *E. faecium* (MGP negativo, inmóvil).

El test de disco-difusión emplea el disco de vancomicina de 5 µg y se ha mostrado adecuado para la detección de cepas VRE, siempre que se sigan rigurosamente las pautas recomendadas por EUCAST<sup>22,24</sup>. Los halos de inhibición del disco de vancomicina de 5 µg se deben inspeccionar para detectar la presencia de bordes irregulares y/o micro-colonias, utilizando luz transmitida. Los bordes del halo bien delimitados indican que el aislamiento es sensible y el diámetro de los halos de inhibición por arriba del punto de corte (≥12 mm) puede ser reportado sensible a la vancomicina. Los aislamientos con bordes del halo de inhibición difusos o colonias dentro del mismo pueden ser resistentes, independientemente del tamaño del halo de inhibición y no deben ser reportados como sensibles a la vancomicina sin confirmación por determinación de la CIM.

La determinación de la CIM se puede realizar por dilución en agar, microdilución en caldo o mediante el método de gradiente en agar. La microdilución en caldo se debe realizar de acuerdo con las recomendaciones de EUCAST, mientras que la determinación de la CIM con tiras de gradiente de antibiótico se debe realizar de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes. Observar, que



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



cuando se utilizan estas tiras para determinar la CIM con un inóculo mayor (estándar 2,0 de la escala de McFarland) en un medio rico (BHI, Infusión de cerebro y corazón) para detección de aislamientos VRE, este resultado no proporciona un valor de CIM.

La pesquisa de VRE se puede realizar mediante el test en agar BHI con 6 mg/L de vancomicina. Estos tests son confiables para la detección de aislamientos *vanA* y *vanB*. Las placas de *screening* están disponibles comercialmente o se pueden preparar en cada laboratorio. En la placa, se debe inocular 10 µL de una suspensión McFarland 0,5, o sea: el inóculo final en la placa debe ser  $1 \times 10^5$  -  $1 \times 10^6$  UFC/mL. Las placas deben ser incubadas por 24 horas a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  en atmósfera ambiente. El crecimiento de más de una colonia se debe interpretar como positivo, o sea, el aislamiento presenta el fenotipo VRE.

La detección de resistencia a la vancomicina mediante PCR para *vanA* y *vanB* también se puede realizar utilizando metodologías comerciales o desarrolladas.

### 5.3.2. Detección de *Staphylococcus* spp. resistente a glicopéptidos

El test de disco-difusión no debe ser utilizado para predecir el fenotipo hGISA o GISA, porque estas cepas pueden ser categorizadas equivocadamente como sensibles a los glicopéptidos por este test. Sin embargo, la técnica de disco-difusión tiene una buena precisión para detectar las cepas GRSA. Independientemente del test seleccionado, las cepas de control de calidad para la detección de cepas de *S. aureus* con resistencia a los glicopéptidos deben ser testeadas. EUCAST sugiere que las cepas de *S. aureus* ATCC 29213 sensibles a los glicopéptidos, *S. aureus* ATCC 700698 hGISA (Mu3) y *S. aureus* ATCC 700699 GISA (Mu50) sean utilizadas como control de calidad<sup>26</sup>.

Según las recomendaciones de EUCAST, la metodología de microdilución en caldo es la técnica *gold standard* para predecir la sensibilidad a la vancomicina<sup>24</sup>. Sin embargo, otras técnicas como la dilución en agar o métodos de gradiente de difusión (Etest, M.I.C.E.) pueden emplearse para la determinación de la CIM<sup>24,26</sup>. Los valores de CIM obtenidos por los métodos de gradiente de difusión pueden ser 0,5-1 diluciones logarítmicas superiores a aquellas obtenidas por microdilución en caldo<sup>41</sup>. Los aislamientos con CIM confirmadas como  $> 2$  mg/L por microdilución deben ser enviados a un laboratorio de referencia. Las técnicas que determinan la CIM no son capaces de detectar las cepas que expresan el fenotipo hGISA. Para casos seleccionados, esta confirmación se debe hacer mediante análisis poblacional en agar que contenga diferentes concentraciones de vancomicina (PAP-AUC)<sup>25</sup>. Este método es trabajoso y requiere *expertise* técnica, por lo tanto es realizado solamente por laboratorios de referencia y/o investigación.

La detección de la resistencia a los glicopéptidos por el test de gradiente (GRD) debe ser realizada de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El test se considera positivo si el resultado con tira GRD de vancomicina o teicoplanina es  $\geq 8$  mg/L.



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



El test de macro gradiente indica si hay una reducción de la sensibilidad a la vancomicina, pero no proporciona la CIM, ni diferencia si el aislamiento testeado es hGISA, GISA o GRSA. El test utiliza un inóculo superior (McFarland 2,0) al utilizado por las técnicas de sensibilidad a antimicrobianos. El resultado se basa en el resultado de la teicoplanina, pudiendo ser necesario ensayar también la vancomicina.

El algoritmo para la interpretación de los resultados sería:

Lectura da teicoplanina:	Interpretación
< 8 mg/L	No es GRSA, GISA o hGISA
8 mg/L	Testar la vancomicina Vancomicina ≥ 8 mg/L ↓ GRSA, GISA o hGISA
≥ 12 mg/L	GRSA, GISA o hGISA

El test de *screening* en agar con teicoplanina debe utilizar una placa de Mueller-Hinton que contenga teicoplanina 5 mg/L. La suspensión bacteriana inicial se debe realizar en solución salina al 0,9% para obtener un inóculo con turbidez equivalente al estándar 2,0 de la escala de McFarland. Se inoculan 10 µL del inóculo como un spot sobre la superficie del agar. La placa debe ser incubada a 35°C en atmósfera ambiente por 24 a 48 horas. El crecimiento de más de dos colonias en hasta 48h indica la sospecha de sensibilidad reducida a los glicopéptidos.

## 5.4. Referencias

1. Theuretzbacher U. Recent FDA Antibiotic Approvals: Good News and Bad News Mar 2015. Disponible en: [http://cddep.org/blog/posts/recent\\_fda\\_antibiotic\\_approvals\\_good\\_news\\_and\\_bad\\_news](http://cddep.org/blog/posts/recent_fda_antibiotic_approvals_good_news_and_bad_news)
2. Nelson RR. Intrinsically vancomycin-resistant gram-positive organisms: clinical relevance and implications for infection control. J Hosp Infect. 1999 Aug;42(4):275-82.
3. Courvalin P. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. Clin Infect Dis. 2006 Jan 1;42 Suppl 1:S25-34.
4. Sujatha S, Praharaj I. Glycopeptide Resistance in Gram-Positive Cocci: A Review. Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases. Volume 2012 (2012), Article ID 781679. doi: 10.1155/2012/781679



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



5. Leclercq R, Derlot E, Duval J, Courvalin P. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N Engl J Med*. 1988 Jul 21;319(3):157-61.
6. Frieden TR, Munsiff SS, Low DE, Willey BM, Williams G, Faur Y, Eisner W, Warren S, Kreiswirth B. Emergence of vancomycin-resistant enterococci in New York City. *Lancet*. 1993 Jul 10;342(8863):76-9.
7. Arthur M, Reynolds PE, Depardieu F, Evers S, Dutka-Malen S, Quintiliani R Jr, Courvalin P. Mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. *J Infect*. 1996 Jan;32(1):11-6
8. Cetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG. Vancomycin-resistant enterococci. *Clin Microbiol Rev*. 2000 Oct;13(4):686-707.
9. Brisson-Noël A, Dutka-Malen S, Molinas C, Leclercq R, Courvalin P. Cloning and heterospecific expression of the resistance determinant vanA encoding high-level resistance to glycopeptides in *Enterococcus faecium* BM4147. *Antimicrob Agents Chemother*. 1990 May;34(5):924-7.
10. Evers S, Sahm DF, Courvalin P. The vanB gene of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* V583 is structurally related to genes encoding D-Ala:D-Ala ligases and glycopeptide-resistance proteins VanA and VanC. *Gene*. 1993 Feb14;124(1):143-4.
11. Quintiliani R Jr, Courvalin P. Characterization of Tn1547, a composite transposon flanked by the IS16 and IS256-like elements, that confers vancomycin resistance in *Enterococcus faecalis* BM4281. *Gene*. 1996 Jun 12;172(1):1-8.
12. Dutka-Malen S, Molinas C, Arthur M, Courvalin P. Sequence of the vanC gene of *Enterococcus gallinarum* BM4174 encoding a D-alanine:D-alanine ligase-related protein necessary for vancomycin resistance. *Gene*. 1992 Mar 1;112(1):53-8.
13. Casadewall B, Courvalin P. Characterization of the vanD glycopeptide resistance gene cluster from *Enterococcus faecium* BM4339. *J Bacteriol*. 1999 Jun;181(12):3644-8.
14. Fines M, Perichon B, Reynolds P, Sahm DF, Courvalin P. VanE, a new type of acquired glycopeptide resistance in *Enterococcus faecalis* BM4405. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999 Sep;43(9):2161-4.
15. McKessar SJ, Berry AM, Bell JM, Turnidge JD, Paton JC. Genetic characterization of vanG, a novel vancomycin resistance locus of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000 Nov;44(11):3224-8.
16. Boyd DA, Willey BM, Fawcett D, Gillani N, Mulvey MR. Molecular characterization of *Enterococcus faecalis* N06-0364 with low-level vancomycin resistance harboring a novel D-Ala-D-Ser gene cluster, vanL. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Jul;52(7):2667-72.
17. Xu X, Lin D, Yan G, Ye X, Wu S, Guo Y, Zhu D, Hu F, Zhang Y, Wang F, Jacoby GA, Wang M. vanM, a new glycopeptide resistance gene cluster found in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Nov;54(11):4643-7.
18. Lebreton F, Depardieu F, Bourdon N, Fines-Guyon M, Berger P, Camiade S, Leclercq R, Courvalin P, Cattoir V. D-Ala-d-Ser VanN-type transferable vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Oct;55(10):4606-12.





redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



19. Hayden MK, Trenholme GM, Schultz JE, Sahn DF. In vivo development of teicoplanin resistance in a VanB Enterococcus faecium isolate. *J Infect Dis.* 1993 May;167(5):1224-7.
20. Dever LL, Smith SM, Handwerker S, Eng RH. Vancomycin-dependent Enterococcus faecium isolated from stool following oral vancomycin therapy. *J Clin Microbiol.* 1995 Oct;33(10):2770-3.
21. Van Hal SJ, Lodise TP, Paterson DL. The clinical significance of vancomycin minimum inhibitory concentration in Staphylococcus aureus infections: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis.* 2012 Mar;54(6):755-71.
22. Howden BP, Davies JK, Johnson PD, Stinear TP, Grayson ML. Reduced vancomycin susceptibility in Staphylococcus aureus, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. *Clin Microbiol Rev.* 2010 Jan;23(1):99-139.
23. Lee JY, Howden BP. Vancomycin in the treatment of methicillin-resistant Staphylococcus aureus - a clinician's guide to the science informing current practice. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2015 Jul;13(7):855-69.
24. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Disponible en:  
[http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v\\_6.0\\_Breakpoint\\_table.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_6.0_Breakpoint_table.pdf)
25. 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 Apr;47(4):399-403.
26. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Version 1.0 December 2013. Disponible en:  
[http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Resistance\\_mechanisms/EUCAST\\_detection\\_of\\_resistance\\_mechanisms\\_v1.0\\_20131211.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_v1.0_20131211.pdf)
27. Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother.* 1997 Jul;40(1):135-6.
28. Gardete S, Tomasz A. Mechanisms of vancomycin resistance in Staphylococcus aureus. *J Clin Invest.* 2014 Jul;124(7):2836-40.
29. Cui L, Tominaga E, Neoh HM, Hiramatsu K. Correlation between Reduced Daptomycin Susceptibility and Vancomycin Resistance in Vancomycin-Intermediate Staphylococcus aureus. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006 Mar;50(3):1079-82.
30. Noble WC, Virani Z, Cree RG. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from Enterococcus faecalis NCTC 12201 to Staphylococcus aureus. *FEMS Microbiol Lett.* 1992 Jun 1;72(2):195-8.
31. Chang S, Sievert DM, Hageman JC, Boulton ML, Tenover FC, Downes FP, Shah S, Rudrik JT, Pupp GR, Brown WJ, Cardo D, Fridkin SK; Vancomycin-Resistant Staphylococcus aureus Investigative Team. Infection with vancomycin-resistant Staphylococcus aureus containing the vanA resistance gene. *N Engl J Med.* 2003 Apr.



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



32. Tiwari HK, Sen MR. Emergence of vancomycin resistant Staphylococcus aureus (VRSA) from a tertiary care hospital from northern part of India. BMC Infect Dis. 2006 Oct 26;6:156.
33. Aligholi M, Emaneini M, Jabalameli F, Shahsavan S, Dabiri H, Sedaght H. Emergence of high-level vancomycin-resistant Staphylococcus aureus in the Imam Khomeini Hospital in Tehran. Med Princ Pract. 2008;17(5):432-4.
34. Mirani ZA, Jamil N. Genomic organization of a vancomycin-resistant Staphylococcus aureus. J Coll Physicians Surg Pak. 2013 Feb;23(2):107-11.
35. Melo-Cristino J, Resina C, Manuel V, Lito L, Ramirez M. First case of infection with vancomycin-resistant Staphylococcus aureus in Europe. Lancet. 2013 Jul 20;382(9888):205.
36. Rossi F, Diaz L, Wollam A, Panesso D, Zhou Y, Rincon S, Narechania A, Xing G, Di Gioia TS, Doi A, Tran TT, Reyes J, Munita JM, Carvajal LP, Hernandez-Roldan A, Brandão D, van der Heijden IM, Murray BE, Planet PJ, Weinstock GM, Arias CA. Transferable vancomycin resistance in a community-associated MRSA lineage. N Engl J Med. 2014 Apr 17;370(16):1524-31.
37. Walters MS, Eggers P, Albrecht V, Travis T, Lonsway D, Hovan G, Taylor D, Rasheed K, Limbago B, Kallen A. Vancomycin-Resistant Staphylococcus aureus - Delaware, 2015. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2015 Sep 25;64(37):1056.
38. Planet PJ, Diaz L, Kolokotronis SO, Narechania A, Reyes J, Xing G, Rincon S, Smith H, Panesso D, Ryan C, Smith DP, Guzman M, Zurita J, Sebra R, Deikus G, Nolan RL, Tenover FC, Weinstock GM, Robinson DA, Arias CA. Parallel Epidemics of Community-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus USA300 Infection in North and South America. J Infect Dis. 2015 Dec 15;212(12):1874-82.
39. Friães A, Resina C, Manuel V, Lito L, Ramirez M, Melo-Cristino J. Epidemiological survey of the first case of vancomycin-resistant Staphylococcus aureus infection in Europe. Epidemiol Infect. 2015 Mar;143(4):745-8.
40. Endtz HP, Van Den Braak N, Van Belkum A, Goessens WH, Kreft D, Stroebel AB, Verbrugh HA. Comparison of eight methods to detect vancomycin resistance in enterococci. J Clin Microbiol. 1998 Feb;36(2):592-4.
41. Sader HS, Jones RN, Rossi KL, Rybak MJ. Occurrence of vancomycin tolerant and heterogeneous vancomycin resistant strains (hVISA) among Staphylococcus aureus causing bloodstream infections in nine USA hospitals. Antimicrob Agents Chemother. 2009 Nov;64(5):1024-8.



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



## 6. Lipopéptidos

### Rodrigo Cayô da Silva

Biólogo Microbiólogo y PostDoctor en Ciencias Básicas,  
Supervisor del Laboratorio ALERTA e Investigador Asociado de la Disciplina de Infectología,  
Departamento de Medicina, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)  
Brasil

### Ana Cristina Gales

Profesora Adjunta de Infectología del Departamento de Medicina de la  
Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo.  
Investigadora 1A del Consejo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (CNPq)  
Miembro de la Cámara Técnica de Resistencia Microbiana (CATREM),  
Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria (ANVISA)  
Coordinadora clínica del Consejo Brasileiro de Susceptibilidad Antimicrobiana (BrCAST)  
Brasil

La daptomicina es un antimicrobiano lipopéptido cíclico formado por 13 aminoácidos (**Imagen 1A**) y producido mediante fermentación por el *Streptomyces roseosporus*<sup>20,32,46</sup>. Este antimicrobiano fue descubierto en 1985 durante un programa de evaluación de potenciales blancos terapéuticos en microorganismos del suelo, y durante la fase I del estudio clínico, su desarrollo fue interrumpido debido a casos de miopatía<sup>24,32,47</sup>. Posteriormente, debido al mejor conocimiento de la inducción de la miopatía causada por la daptomicina y a la necesidad de nuevas drogas anti-estafilocócicas, se retomó el desarrollo clínico de este antimicrobiano<sup>24,32,47</sup>. La daptomicina presenta una potente actividad bactericida *in vitro* contra la mayoría de las bacterias Gram positivas. Inicialmente fue aprobada para uso clínico en el año 2004, por el *Food and Drug Administration* (FDA) de Estados Unidos (EEUU) y, en el año 2006, por el *European Medicines Agency* (EMA)<sup>47</sup>.

Actualmente está indicado el uso de la daptomicina para el tratamiento de infecciones no complicadas de piel y partes blandas causadas por *Staphylococcus aureus* (cepas sensibles/MSSA o resistentes a la meticilina/MRSA), *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* y *Enterococcus faecalis* sensible a la vancomicina<sup>48</sup>, así como para el tratamiento de bacteriemia y endocarditis de válvulas derechas causadas por cepas de *S. aureus*<sup>17,20,35</sup>. Incluso, estudios recientes demostraron que la daptomicina es más eficaz que la vancomicina, como monoterapia, para el tratamiento de bacteriemia persistente causada por *S. aureus*, especialmente cuando la concentración inhibitoria mínima (CIM) para vancomicina es 2

redEMC  
InfectologíaUNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAYGESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA

$\mu\text{g/mL}$ <sup>35,36,41</sup>. Además, la daptomicina también ha sido utilizada para el tratamiento de infecciones causadas por enterococos resistentes a la vancomicina (VRE), aunque los datos clínicos disponibles son escasos<sup>6,20</sup>.

## 6.1. Mecanismo de acción de los lipopéptidos

El verdadero mecanismo de acción de la daptomicina aún no fue bien definido, pero hay evidencias que demuestran que el mismo se produce a través de la interacción con el fosfolípido de la membrana citoplasmática bacteriana<sup>20</sup>. La cola hidrofílica (**Figura 1A**, ) de la daptomicina se enlaza irreversiblemente a la membrana citoplasmática de las bacterias Gram positivas<sup>20,39</sup>. Además, la actividad de la daptomicina es estrictamente dependiente de la presencia de niveles fisiológicos de  $\text{Ca}^{2+}$ , que inducen alteraciones conformacionales en la molécula de daptomicina (**Figura 1B**)<sup>18,20,46</sup>. Tales modificaciones en la estructura facilitarían su oligomerización y consecuente inserción en la membrana bacteriana (**Figura 1C - Paso 1**)<sup>40</sup>, posiblemente por el aumento de la hidrofobicidad de este compuesto<sup>39,46,53</sup>. Como la daptomicina es una molécula aniónica, se cree que además de la modificación en la estructura de la molécula, los iones  $\text{Ca}^{2+}$  permitirían que este compuesto fármaco supere la repulsión natural entre las cargas negativas de la daptomicina y los fosfolípidos de la membrana bacteriana (**Figura 1C - Paso 2**)<sup>20,46</sup>.

Aunque puede haber excepciones, las membranas citoplasmáticas de bacterias Gram negativas contienen una baja proporción de fosfolípidos aniónicos, debido a que una mayor cantidad de fosfatidiletanolamina (Pe), en comparación con las membranas de bacterias Gram positivas<sup>20,45</sup>. De esa forma, se justifica la ausencia de actividad antimicrobiana de la daptomicina frente a bacterias Gram negativas, porque estas poseen baja superficie aniónica<sup>45</sup>. Por el contrario, el bacilo Gram positivo *Bacillus cereus* presenta una alta concentración de PE en su membrana citoplasmática y, sorprendentemente, a pesar de esto, la daptomicina mantiene su actividad frente a ese patógeno<sup>7</sup>.



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



A

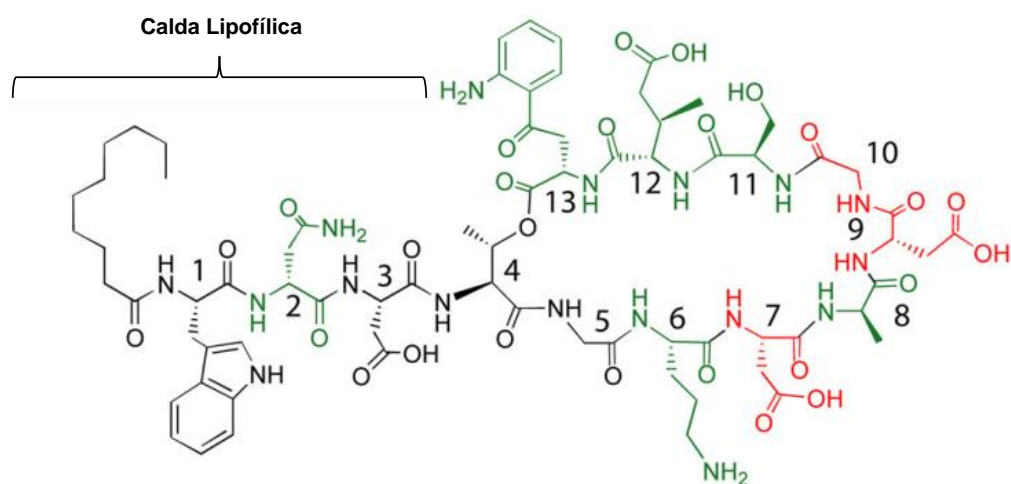


Figura 1A. Estructura química de la daptomicina.

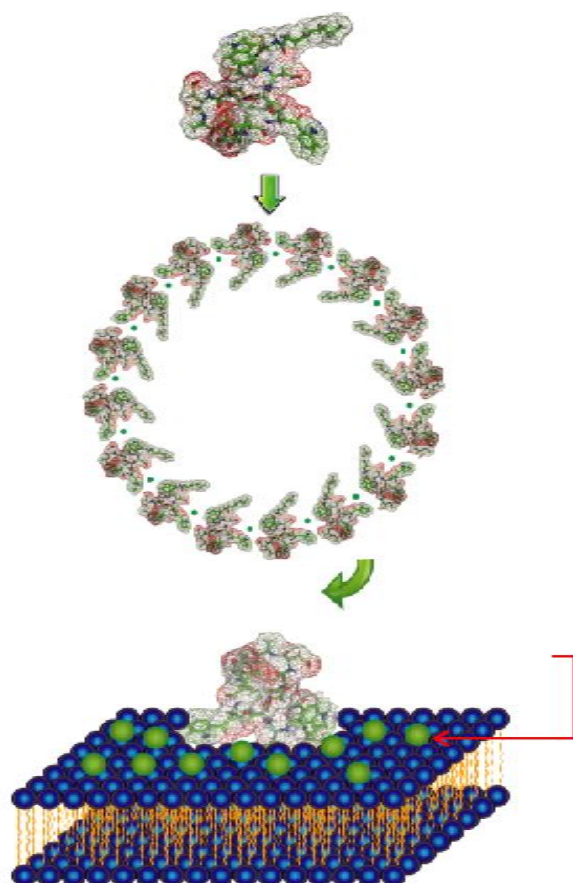


Figura 1B. Interacción de la molécula de daptomicina con la membrana citoplasmática bacteriana.

Paso 1: la molécula de daptomicina se une a la membrana citoplasmática de una forma dependiente de calcio;



redEMC  
Infectología

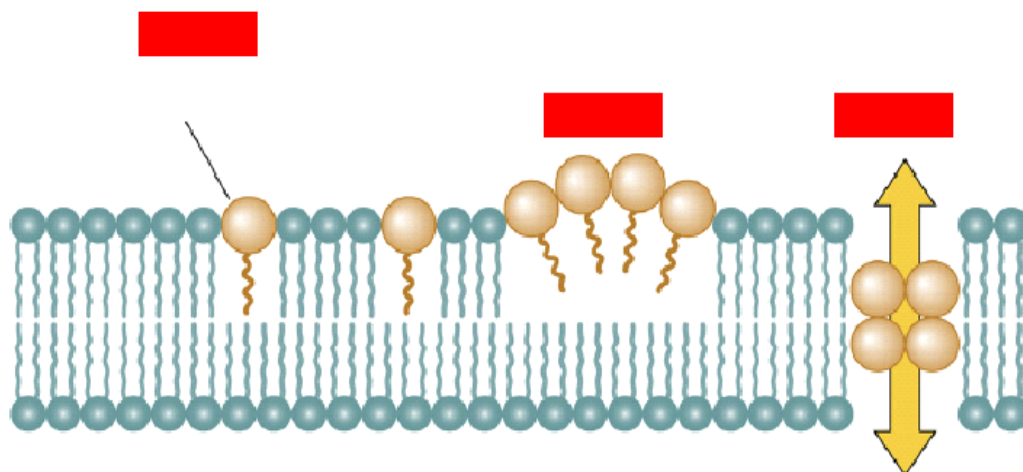


UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



**Paso 2:** el oligómero de daptomicina desestabiliza la parte externa de la membrana bacteriana;  
**Paso 3:** formación del canal iónico y liberación de los iones de potasio y muerte celular rápida.  
Se estima que durante la inserción de los oligómeros de daptomicina en la membrana citoplasmática de bacterias Gram positivas se produce la formación de una estructura de conducción iónica formando canales en forma de anillo, un proceso semejante al de las toxinas formadoras de poros (**Figura 1C - Paso 3**)<sup>20,53</sup>. Teóricamente, ese canal de conducción iónica sería capaz de perturbar la integridad funcional de la membrana citoplasmática en bacterias Gram positivas, resultando en la liberación intracelular de iones de potasio, despolarización de la membrana citoplasmática y la consecuente muerte celular<sup>20,46</sup>. Sin embargo, en todas las células tratadas *in vitro* con daptomicina, se verifica la preservación de la integridad inicial de la célula bacteriana, incluso después de su muerte<sup>20</sup>. Esto demuestra que aún faltan evidencias directas de que el oligómero de daptomicina esté involucrado en la permeabilización de la membrana citoplasmática<sup>20,53</sup>.



**Figura 1C.** Con el agregado de  $\text{Ca}^{2+}$  en una proporción de 1:1, las moléculas de daptomicina se agrupan en 14-16 unidades, formando un micelio. Al aproximarse a la bicapa lipídica de la membrana el complejo se disocia, permitiendo su inserción.

Figuras adaptadas de **(A y C)** Robbel & Marahiel MA. J Biol Chem. 2010;285(36):27501-8<sup>46</sup> y **(B)** Humphries *et al.* Clin Microbiol Rev 2013, 26(4):759-80<sup>20</sup>.

Además, debido a estudios que muestran la ausencia de lisis celular en aislados de *S. aureus* después del tratamiento con daptomicina, se sugiere que la formación de los poros en la membrana citoplasmática no ocurra de la forma que conocemos. Otras evidencias demuestran también que los oligómeros de daptomicina se enlazan, preferentemente, en regiones de la membrana citoplasmática donde esté ocurriendo síntesis activa de peptidoglicano y de curvatura de la

redEMC  
InfectologíaUNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAYGESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA

membrana durante la división binaria o esporulación<sup>20</sup>. De esa forma, locales de estrés en la membrana citoplasmática facilitarían la inserción de la daptomicina.

## 6.2. Mecanismo de resistencia a los lipopéptidos

Aunque la resistencia causada por la hidrólisis de la daptomicina ya haya sido descrita en bacterias ambientales, la misma aún no fue reportada en aislados clínicos<sup>20</sup>. Además de la capacidad de los actinomicetos de inactivar a la daptomicina mediante la apertura del anillo o por el desacilación de su parte lipídica (**Figura 1A**)<sup>20</sup>, también fue descrito que *Paenibacillus laulus*, una bacteria encontrada en una caverna aislada por más de 4 millones de años en el estado del Nuevo México en EEUU, era capaz de producir una esterase sensible al EDTA capaz de quebrar el anillo de la daptomicina<sup>4</sup>. Se cree que la selección de la resistencia ocurra naturalmente en el ambiente y tales microorganismos podrían funcionar como vectores y, eventualmente, movilizar tales determinantes de resistencia para bacterias patógenas<sup>20</sup>. Sin embargo, experimentos *in vitro* han demostrado que la inducción de la resistencia a la daptomicina es un fenómeno difícil de alcanzar. Incluso durante las fases II y III del estudio clínico, involucrando a más de 1.000 pacientes, la frecuencia del surgimiento de resistencia a ese antimicrobiano fue baja (<0,2%)<sup>20</sup>. Al parecer, la disminución de la sensibilidad a la daptomicina en aislados clínicos es consecuente a un mecanismo adaptativo, formado por alteraciones complejas de la pared celular y en el metabolismo del fosfolípido. Tales mecanismos adaptativos serán abordados a continuación.

### 6.2.1. Mecanismos de resistencia en *S. aureus*

Cepas de *S. aureus* no sensibles a la daptomicina han sido descritas después del uso prolongado de ese antimicrobiano, principalmente en los casos de infecciones graves recalcitrantes (endocarditis o bacteremia relacionada a catéter)<sup>23,29</sup>, o en aquellas asociadas a una elevada carga bacteriana (absceso)<sup>13</sup>. En la mayoría de los casos, la disminución de la sensibilidad a la daptomicina ocurrió cuando la droga fue utilizada como monoterapia en casos donde el foco infeccioso no fue drenado<sup>13,20</sup>.

Hasta ahora, se sabe que la resistencia a la daptomicina en *S. aureus* es multifactorial, involucra una cadena compleja de eventos que incluyen tanto alteraciones en la membrana celular como en la pared celular debido a las adaptaciones en las funciones metabólicas y estrés en respuesta a las vías reguladoras<sup>12</sup>. Un estudio basado en el secuenciación del genoma completo de cepas de *S. aureus* no sensibles a la daptomicina, aisladas de pacientes que utilizaron ese antimicrobiano, así como de



redEMC  
Infectología

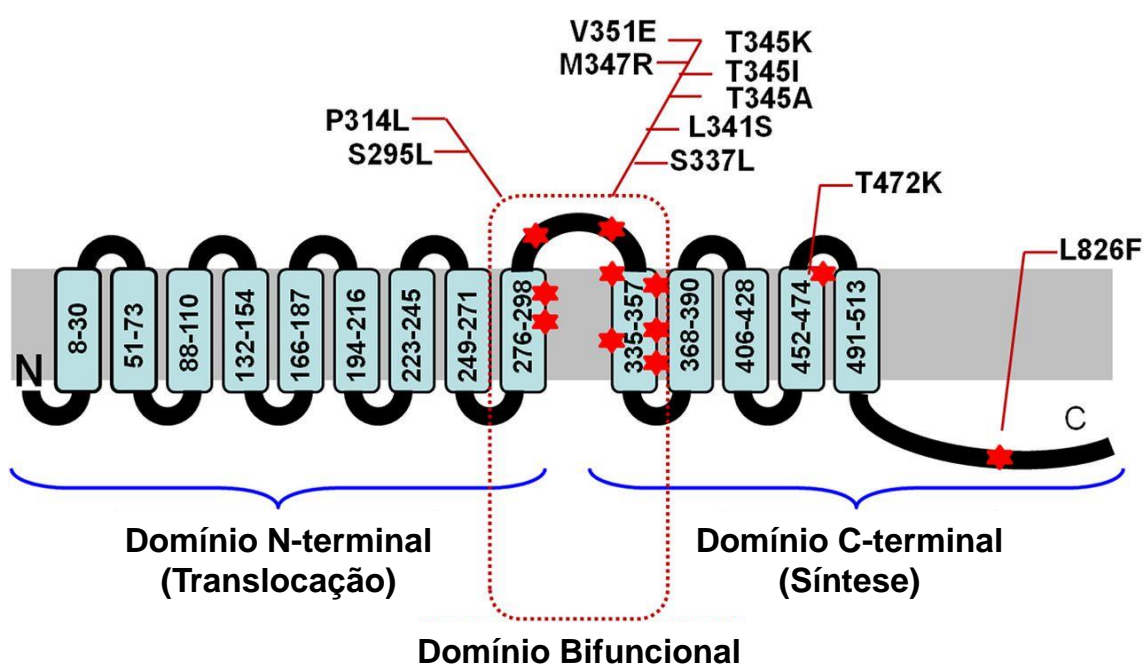


UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



cepas de laboratorio inducidas, mostraron mutaciones en uno de los tres genes, *mprF*, *cls2* y *pgsA*, involucrados en la síntesis de fosfolípido<sup>2,44</sup>. También se observó que todas las cepas clínicas presentaban mutaciones en el gen *mprF*, mientras que solo una única cepa de laboratorio presentaba mutación en este gen<sup>2,44</sup>. Los motivos que llevaron a esas diferencias en las mutaciones encontradas entre las cepas clínicas y las de laboratorio aún no fueron completamente dilucidados.



**Imagen 2.** Mutaciones descritas en *MprF* en cepas de *S. aureus* no sensibles a la daptomicina. Imagen adaptada de Bayer *et al.* Antimicrob Agents Chemother. 2015;59(8):4930-7<sup>2</sup>.

La gran mayoría de las cepas con CIM >1 µg/mL para daptomicina reportadas hasta el momento presentaban mutaciones puntuales únicas en *mprF*, lo que demuestra que este gen presenta un papel importante en ese fenotipo<sup>14</sup>. El gen *mprF* codifica una proteína de membrana (*MprF*) compuesta de un dominio N-terminal de función de flipasa (dominio de translocación) y un dominio C-terminal con función de lisinilación (dominio de síntesis) del fosfatidilglicerol (PG)<sup>2,11</sup>. De esa forma, la *MprF* cataliza la lisinilación de PG para formar el fosfolípido de membrana lisil-fosfatidilglicerol (L-PG) cargado positivamente en el extremo interno de la membrana<sup>10,11</sup>. Posteriormente, *MprF* transporta al L-PG hacia el extremo exterior de la membrana a través de su actividad de flipasa<sup>11</sup>. Por





redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



lo tanto, MprF lleva a una neutralización parcial de la, normalmente aniónica, superficie celular bacteriana<sup>10</sup>. Mutaciones en ambos dominios de *mprF* han sido documentadas<sup>20,31</sup> y, dependiendo del dominio que sea afectado (translocación o síntesis) el resultado puede ser una mayor inversión de L-PG en el extremo exterior de la membrana o un exceso de la producción de L-PG en el extremo interno de la membrana, respectivamente<sup>33,44,52</sup>. Otros dos genes, *dlt* y *cls2*, ya fueron relatados como responsables por el aumento de la carga positiva de la membrana bacteriana en cepas de *S. aureus* no sensibles a la daptomicina<sup>28,51</sup>. El gen *dlt* codifica una proteína responsable de la alanilación del ácido teicóico de la pared celular en *S. aureus*<sup>51</sup>, mientras el gen *cls* codifica la cardiolipina sintasa responsable de la modificación del PG, condensando dos moléculas de PG en cardiolipina y glicerol<sup>28</sup>. Aunque la repulsión de cargas sea uno de los factores que puedan llevar a la resistencia a la daptomicina, cepas de *S. aureus* no sensibles a ese antimicrobiano no siempre presentan una carga de membrana muy diferente de las verificadas en cepas sensibles a la daptomicina<sup>20</sup>. Como justificación de tal observación, se cree que quizá el aumento en la lisinilación de PG causada por MprF lleve a una disminución de la membrana de PG, que en parte podría estar relacionado a una mutación en un segundo gen involucrado en la síntesis de PG, el *pgsA*<sup>20,44</sup>. Visto que PG está relacionado a la oligomerización de la molécula de daptomicina, permitiendo su interacción con la membrana bacteriana, la disminución de PG en la membrana llevaría a una disminución de la actividad de ese antimicrobiano<sup>20,44</sup>.

### 6.2.2. Mecanismos de resistencia en *Enterococcus* spp.

Se han reportado aislados de VRE con disminución de la sensibilidad a la daptomicina, tanto en los casos en los que el paciente estaba recibiendo terapia prolongada con ese antimicrobiano, como en aquellos pacientes que no habían tenido terapia previa<sup>19,25,26</sup>. Sin embargo, se verifica que las CIMs de las cepas aisladas en pacientes que no utilizaron terapia previa a la daptomicina son muy inferiores a las aisladas de pacientes que hicieron uso de terapia prolongada con daptomicina<sup>25,26</sup>. Hasta el momento, los datos disponibles en la literatura sobre la resistencia a la daptomicina en *Enterococcus* spp. son escasos en comparación a los datos de *S. aureus*<sup>20</sup>. Un análisis comparativo de los genomas de cepas isogénicas de *E. faecium* y *E. faecalis* sensibles y no sensibles a la daptomicina demostró que pocas mutaciones son suficientes para elevar a la CIM por arriba de los puntos de corte de resistencia<sup>43,49</sup>. Se demostró que deleciones en los genes *liaF* (proteína de membrana de función desconocida y perteneciente al sistema LiaFSR), *gdpD* (glicerofosforil diéster fosfodiesterase)



redEMC  
Infectología

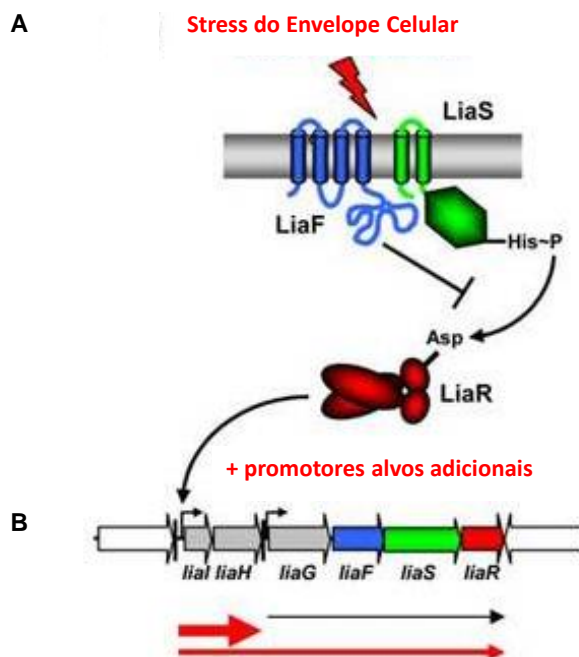


UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



y cls (cardiolipina sintase)<sup>22</sup>, estando los dos últimos genes involucrados en el metabolismo de fosfolípido<sup>20</sup>, elevaron *in vivo* a la CIM de daptomicina a 12 µg/mL en un aislado de *E. faecalis* durante la terapia con ese antimicrobiano<sup>1,20</sup>. Además, se demostró que la delección de una isoleucina en la posición 177 de LiaF, un miembro del sistema de tres componentes LiaFSR, está directamente relacionada con la tolerancia a la daptomicina en *E. faecalis*<sup>1,20</sup>. Esa mutación fue capaz de aumentar la CIM de 1 a 4 µg/mL, perjudicando la terapia con daptomicina<sup>1,20</sup>. El sistema LiaFSR es responsable de la respuesta de la pared celular frente al estrés causado por la acción de los antimicrobianos, así como resistencia a los péptidos de defensa del huésped (**Imagen 3A**)<sup>22,30</sup>. Además, en otro estudio, fue demostrado que mutaciones en todos los tres genes (*liaF*, *liaS* y *liaR*) que compone el sistema LiaFSR (**Imagen 3B**), estaban presente en la gran mayoría de los aislados de *E. faecium* con CIMs entre 3-4 µg/mL, así como en los aislados con CIM >4 µg/mL<sup>34</sup>. En el mismo estudio también fue observado que tales mutaciones no fueron encontradas en ninguno aislado de *E. faecium* con CIM = 2 µg/mL<sup>34</sup>. Además, estudios de microscopía electrónica demostraron alteraciones en la superficie celular de una cepa clínica de *E. faecalis* resistente a la vancomicina, en la cual la resistencia a la daptomicina fue inducida laboratorialmente (R712), en comparación con la cepa salvaje sensible (S613) a ese antimicrobiano (**Imagen 3C**)<sup>1</sup>.



**Imagen 3. (A)** Mecanismo de respuesta de la envoltura celular asociado al sistema LiaFSR frente al estrés causado por diferentes agentes. **(B)** Operón del sistema de tres componentes LiaFSR. Transcripciones con y sin



redEMC  
Infectología

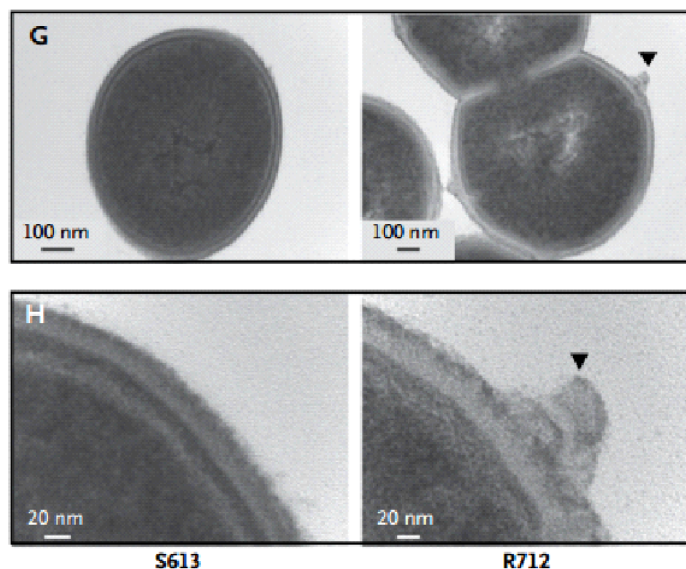


UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



condiciones de inducción se indican con las flechas rojas y negras, respectivamente.  
Imágenes adaptadas de Jordan *et al.* FEMS Microbiol Rev. 2008 Jan; 32(1):107-46<sup>22</sup>.



**Imagen 3. (C)** Microscopía de transmisión electrónica de cepas sensibles (S613) y resistentes (R712) a la daptomicina.

Imágenes tomadas de Arias *et al.* N Engl J Med. 2011;365(10):892-900<sup>1</sup>.

A pesar de que el sistema LiaFSR presenta un papel importante en la resistencia a la daptomicina en *Enterococcus* spp.<sup>38</sup>, las mutaciones en los genes que componen ese sistema no son los únicos mecanismos de resistencia descritos<sup>1,20,43,49</sup>. Recientemente, mutaciones en el gen *yycG* (**Imagen 4A**)<sup>50</sup>, que codifica una histidina quinasa perteneciente al sistema YycFG (**Imagen 4B**), involucrada en la homeostasis de la envoltura celular<sup>9</sup>, fue identificado en una cepa de *E. faecium*<sup>49</sup>. Así como se han descrito diferentes mutaciones en el gen *cls* en *S. aureus*, también se han descrito relacionadas a la resistencia en aislados de *Enterococcus* spp.<sup>43</sup>. Incluso, las mutaciones R218Q y H215R en Cls están relacionadas a un aumento de la producción de cardiolipina en aislados de *Enterococcus* spp.<sup>20,43</sup>. Aunque la hiperproducción de Cls como consecuencia de la mutación R218Q inducida en una cepa sensible de *E. faecalis* haya elevado la CIM de 4 a 64 µg/mL<sup>43</sup>, lo mismo no fue verificado para *E. faecium*<sup>49</sup>. Además, esa mutación ya fue descrita en aislados clínicos de *E. faecium* que eran sensibles a la daptomicina<sup>20</sup>.



redEMC  
Infectología

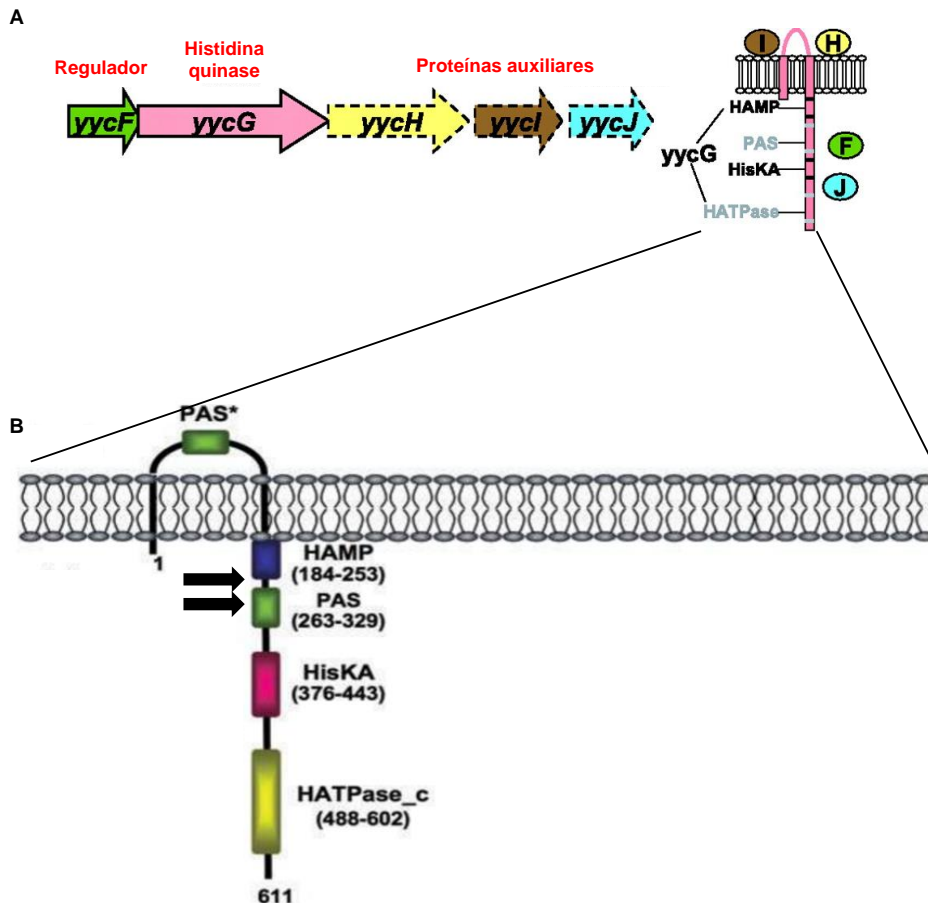


EUCAST



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



**Imagen 4. (A)** Estructura del operón codificador del sistema de dos componentes YycFG. **(B)** Arquitectura del dominio de la histidina quinasa putativa YycG con la ubicación de las mutaciones (flechas negras) encontradas en cepas de *E. faecium* resistentes a la daptomicina. Los números indican los aminoácidos correspondientes a cada uno de los cuatro dominios. El dominio **HAMP** promueve la comunicación entre los dominios de entrada y de salida; el dominio sensor **PAS** fue nombrado de acuerdo con su homología con las proteínas PER-ARNT-SIM de *D. melanogaster*; dominio **HisKA** correspondiente al fosfoaceptor de histidina quinase; dominio **HATPase\_c** es una histidina quinasa-tipo ATPase.

Imágenes adaptadas de **(A)** Winkler *et al.* J Bacteriol. 2008;190:2645-2648<sup>50</sup> y **(B)** Tran *et al.* Antimicrob Agents Chemother. 2013;57(1):261-268<sup>49</sup> y Dubrac *et al.* Mol Microbiol. 2008;70(6):1307-22<sup>9</sup>.

Por lo menos otros dos genes, *cfa* y *ezaA*, ya fueron descritos como relacionados con la resistencia a la daptomicina en *Enterococcus* spp.<sup>19,49</sup>. *Cfa* es una enzima involucrada en la síntesis de ácidos grasos cíclicos, componentes importantes de los fosfolípidos de membrana<sup>20</sup>. Hasta el momento, fue descrita una mutación en el gen *cfa* en aislado clínico de *E. faecium* no sensible a la daptomicina. Tal mutación afectaría la fluidez y estabilidad de la membrana celular en ese patógeno, dificultando la inserción de la daptomicina en la membrana<sup>49</sup>. Se cree que esa mutación ocurra como respuesta compensatoria durante el tratamiento con daptomicina<sup>20,49</sup>. Ya, el gen *ezaA* codifica una proteína

© Curso online "Interpretación del Antibiograma en la práctica clínica diaria"



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



transmembrana que actúa como un regulador negativo de *ftsZ*, responsable de la formación del septo durante la división celular en *E. faecium* no sensible a la daptomicina<sup>19,20</sup>.

### 6.3. Detección laboratorial del fenotipo de resistencia a los lipopéptidos

Así como sucede con otros antimicrobianos, como las polimixinas y la tigeciclina, la prueba de sensibilidad para daptomicina es compleja, sufre la influencia tanto de la concentración del inóculo como del contenido de calcio presente en medio Müeller-Hinton (MH) utilizado<sup>3,20,21</sup>. Ya se ha reportado que cuando se utiliza un inóculo de  $10^7$  UFC/mL, al contrario del preconizado  $10^5$  UFC/mL, una aumento de hasta tres diluciones en las CIMs para daptomicina es observada tanto para aislados de *Enterococcus* spp. como para *S. aureus*<sup>3,21</sup>.

Por otro lado, el contenido de calcio en medio MH es inversamente proporcional a la actividad de la daptomicina<sup>15,20</sup>. Bajas concentraciones de  $Ca^{2+}$  en el medio MH aumentan considerablemente las CIMs para ese antimicrobiano<sup>15</sup>. Por eso, en la técnica de microdilución en caldo, considerada la técnica *gold standard* para la prueba de sensibilidad para daptomicina, se recomienda el agregado de cloruro de calcio al medio MH caldo a una concentración final de 50 mg/L de  $Ca^{2+}$ <sup>(15,20)</sup>. Pero, para la realización del ajuste de la concentración de  $Ca^{2+}$  en el medio, el fabricante debe informar la concentración de  $Ca^{2+}$  en el prospecto. En caso de que eso no ocurra, el microbiólogo deberá realizar un análisis preliminar a fin de cuantificar la concentración de  $Ca^{2+}$  presente en cada lote de MH caldo y, entonces, hacer el ajuste<sup>15,20</sup>. Ya la prueba de sensibilidad con daptomicina para bacterias fastidiosas, el uso de suplementos parece no afectar la concentración de  $Ca^{2+}$  de medio o la CIM para daptomicina<sup>27</sup>.

De modo contrario, la prueba de sensibilidad en agar para daptomicina es aún más problemática<sup>15,20</sup>, ya que los agares MH provenientes de diferentes fabricantes, así como diferentes lotes de un mismo fabricante, pueden presentar grandes variaciones en sus concentraciones de calcio<sup>16,20</sup>. Tales variaciones favorecen la baja correlación con los resultados logrados por la microdilución en caldo, no siendo, por lo tanto, recomendado el uso de la técnica de dilución en agar para daptomicina<sup>15,16,20</sup>. De modo similar, la técnica de disco difusión tampoco es recomendada para la prueba de ese antimicrobiano.



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



Así como ocurre con las polimixinas, la molécula de daptomicina es muy grande, dificultando su difusión por el agar MH<sup>15,20</sup>. Ya el Etest<sup>®</sup>, aunque sea una técnica basada en la difusión en agar, presenta en la cinta de gradiente la adición de 40 mg/L de calcio<sup>20</sup>.

Además, una correlación entre mutaciones en los genes *liaFSR* y la CIM para daptomicina solamente es verificada cuando la prueba de sensibilidad se realiza por esta metodología<sup>20,37</sup>. Sin embargo, demostraron que dependiendo de la concentración de calcio en medio MH, = 20 mg/L o > 40 mg/L, los resultados de las CIMs para daptomicina podrán ser 2-4 log<sub>2</sub> diluciones por arriba o 1-2 log<sub>2</sub> diluciones por debajo de las CIMs obtenidas por la microdilución en caldo, respectivamente<sup>16,42</sup>. Un forma de superar ese problema, sería testear tiras de Etest<sup>®</sup> en agar MH conteniendo entre 25 a 40 mg/L de calcio<sup>20</sup>. Otro problema es el bajo crecimiento verificado para aislados de *Enterococcus* spp. en agar MH, lo que puede dificultar la lectura de las elipsis para daptomicina en el Etest<sup>®</sup>. Siendo así, se recomienda usar tiras de gradiente, cuya concentración de calcio del agar MH utilizado sea conocida<sup>20</sup>.

Con relación a los sistemas automatizados, la literatura disponible aún es escasa y los pocos trabajos evaluaron tales metodologías para la prueba de daptomicina, donde un número pequeño de aislados no sensibles a la daptomicina fueron evaluados<sup>20</sup>. Algunos de esos estudios demostraron que el Vitek 2 (bioMérieux) y el MicroScan-WalkAway (Siemens) sobrestimaban las CIMs para daptomicina en comparación al método referencia, mientras otros estudios demostraron una buena correlación de ambos sistemas con la microdilución en caldo<sup>5,20</sup>. Siendo así, la literatura es controversial sobre esa temática, demostrando que la real precisión de los sistemas automatizados para la prueba de sensibilidad para daptomicina aún requiere ser mejor evaluada.

De acuerdo con las recomendaciones del *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), las CIMs para daptomicina deben ser determinadas en la presencia de Ca<sup>2+</sup> (50 mg/L) en MH caldo. El método de agar dilución no es recomendado para la prueba de sensibilidad a la daptomicina por este comité ya que esta metodología aún no fue validada.

## 6.4. Referencias

1. Arias CA, Panesso D, McGrath DM, Qin X, Mojica MF, Miller C, Diaz L, Tran TT, Rincon S, Barbu EM, Reyes J, Roh JH, Lobos E, Sodergren E, Pasqualini R, Arap W, Quinn JP, Shamooy Y, Murray BE,



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



Weinstock GM. Genetic basis for in vivo daptomycin resistance in enterococci. *N Engl J Med*. 2011 Sep 8; 365(10):892-900.

2. Bayer AS, Mishra NN, Chen L, Kreiswirth BN, Rubio A, Yang SJ. Frequency and Distribution of Single-Nucleotide Polymorphisms within mprF in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates and Their Role in Cross-Resistance to Daptomycin and Host Defense Antimicrobial Peptides. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Aug; 59(8):4930-7.

3. Benson CA, Beaudette F, Trenholm G. Comparative in-vitro activity of LY146032 a new peptolide, with vancomycin and eight other agents against gram-positive organisms. *J Antimicrob Chemother*. 1987 Aug;20(2):191-6.

4. Bhullar K, Waglechner N, Pawlowski A, Koteva K, Banks ED, Johnston MD, Barton HA, Wright GD. Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. *PLoS One*. 2012;7(4):e34953.

5. Bobenchik AM, Hindler JA, Giltner CL, Saeki S, Humphries RM. Performance of Vitek 2 for antimicrobial susceptibility testing of *Staphylococcus* spp. and *Enterococcus* spp. *J Clin Microbiol*. 2014 Feb; 52(2):392-7.

6. Cantón R, Ruiz-Garbajosa P, Chaves RL, Johnson AP. A potential role for daptomycin in enterococcal infections: what is the evidence? *J Antimicrob Chemother*. 2010 Jun;65(6):1126-36.

7. Citron DM, Appleman MD. In vitro activities of daptomycin, ciprofloxacin, and other antimicrobial agents against the cells and spores of clinical isolates of *Bacillus* species. *J Clin Microbiol*. 2006 Oct;44(10):3814-8.

8. D'Costa VM, Mukhtar TA, Patel T, Koteva K, Waglechner N, Hughes DW, Wright GD, De Pascale G. Inactivation of the lipopeptide antibiotic daptomycin by hydrolytic mechanisms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Feb;56(2):757-64.

9. Dubrac S, Bisicchia P, Devine KM, Msadek T. A matter of life and death: cell wall homeostasis and the WalKR (YycGF) essential signal transduction pathway. *Mol Microbiol*. 2008 Dec; 70(6):1307-22.

10. Ernst CM, Peschel A. Broad-spectrum antimicrobial peptide resistance by MprF-mediated aminoacylation and flipping of phospholipids. *Mol Microbiol*. 2011 Apr;80(2):290-9.

11. Ernst CM, Staubitz P, Mishra NN, Yang SJ, Hornig G, Kalbacher H, Bayer AS, Kraus D, Peschel A. The bacterial defensin resistance protein MprF consists of separable domains for lipid lysinylation and antimicrobial peptide repulsion. *PLoS Pathog*. 2009 Nov;5(11):e1000660.

12. Fischer A, Yang SJ, Bayer AS, Vaezzadeh AR, Herzig S, Stenz L, Girard M, Sakoulas G, Scherl A, Yeaman MR, Proctor RA, Schrenzel J, François P. Daptomycin resistance mechanisms in clinically derived *Staphylococcus aureus* strains assessed by a combined transcriptomics and proteomics approach. *J Antimicrob Chemother*. 2011 Aug;66(8):1696-711.

13. Fowler VG Jr, Boucher HW, Corey GR, Abrutyn E, Karchmer AW, Rupp ME, Levine DP, Chambers HF, Tally FP, Vigiiani GA, Cabell CH, Link AS, DeMeyer I, Filler SG, Zervos M, Cook P, Parsonnet J, Bernstein JM, Price CS, Forrest GN, Fürtkenheuer G, Gareca M, Rehm SJ, Brodt HR, Tice A, Cosgrove SE; *S. aureus* Endocarditis and Bacteremia Study Group. Daptomycin versus standard therapy for bacteremia and endocarditis caused by *Staphylococcus aureus*. *N Engl J Med*. 2006 Aug 17;355(7):653-65.



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



14. Friedman L, Alder JD, Silverman JA. Genetic changes that correlate with reduced susceptibility to daptomycin in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 Jun;50(6):2137-45.
15. Fuchs PC, Barry AL, Brown SD. Daptomycin susceptibility tests: interpretive criteria, quality control, and effect of calcium on in vitro tests. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2000 Sep;38(1):51-8.
16. Fuchs PC, Barry AL, Brown SD. Evaluation of daptomycin susceptibility testing by Etest and the effect of different batches of media. *J Antimicrob Chemother*. 2001 Oct; 48(4):557-61.
17. Gonzalez-Ruiz A, Seaton RA, Hamed K. Daptomycin: an evidence-based review of its role in the treatment of Gram-positive infections. *Infect Drug Resist*. 2016 Apr 15; 9:47-58.
18. Ho SW, Jung D, Calhoun JR, Lear JD, Okon M, Scott WR, Hancock RE, Straus SK. Effect of divalent cations on the structure of the antibiotic daptomycin. *Eur Biophys J*. 2008 Apr; 37(4):421-33.
19. Humphries RM, Kelesidis T, Tewhey R, Rose WE, Schork N, Nizet V, Sakoulas G. Genotypic and phenotypic evaluation of the evolution of high-level daptomycin nonsusceptibility in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Nov; 56(11):6051-3.
20. Humphries RM, Pollett S, Sakoulas G. A current perspective on daptomycin for the clinical microbiologist. *Clin Microbiol Rev*. 2013 Oct;26(4):759-80.
21. Jones RN, Barry AL. Antimicrobial activity and spectrum of LY146032, a lipopeptide antibiotic, including susceptibility testing recommendations. *Antimicrob Agents Chemother*. 1987 Apr;31(4):625-9.
22. Jordan S, Hutchings MI, Mascher T. Cell envelope stress response in Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Rev*. 2008 Jan; 32(1):107-46.
23. Julian K, Kosowska-Shick K, Whitener C, Roos M, Labischinski H, Rubio A, Parent L, Ednie L, Koeth L, Bogdanovich T, Appelbaum PC. Characterization of a daptomycin-nonsusceptible vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* strain in a patient with endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Sep;51(9):3445-8.
24. Kanafani ZA, Corey GR. Daptomycin: a rapidly bactericidal lipopeptide for the treatment of Gram-positive infections. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2007 Apr; 5(2):177-84.
25. Kelesidis T, Chow AL, Humphries R, Uslan DZ, Pegues D. Case-control study comparing de novo and daptomycin-exposed daptomycin-nonsusceptible *Enterococcus* infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Apr;56(4):2150-2.
26. Kelesidis T, Humphries R, Uslan DZ, Pegues DA. Daptomycin nonsusceptible enterococci: an emerging challenge for clinicians. *Clin Infect Dis*. 2011 Jan 15;52(2):228-34.
27. Koeth L. Daptomycin in vitro susceptibility methodology: a review of methods, including determination of calcium in testing media. *Clin Microbiol Newsl*. 2010; 32:161-169.
28. Koprivnjak T, Zhang D, Ernst CM, Peschel A, Nauseef WM, Weiss JP. Characterization of *Staphylococcus aureus* cardiolipin synthases 1 and 2 and their contribution to accumulation of cardiolipin in stationary phase and within phagocytes. *J Bacteriol*. 2011 Aug;193(16):4134-42.
29. Levy DT, Steed ME, Rybak MJ, Guo Y, Gialanella P, Hanau L, Muggia V, Ostrowsky B. Successful treatment of a left ventricular assist device infection with daptomycin non-susceptible methicillin-





redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



resistant *Staphylococcus aureus*: case report and review of the literature. *Transpl Infect Dis*. 2012 Oct;14(5):E89-96.

30. Mascher T, Zimmer SL, Smith TA, Helmann JD. Antibiotic-inducible promoter regulated by the cell envelope stress-sensing two-component system LiaRS of *Bacillus subtilis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Aug;48(8):2888-96.

31. Mehta S, Cuirolo AX, Plata KB, Riosa S, Silverman JA, Rubio A, Rosato RR, Rosato AE. VraSR two-component regulatory system contributes to mprF-mediated decreased susceptibility to daptomycin in in vivo-selected clinical strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Jan;56(1):92-102.

32. Miao V, Coëffet-Legal MF, Brian P, Brost R, Penn J, Whiting A, Martin S, Ford R, Parr I, Bouchard M, Silva CJ, Wrigley SK, Baltz RH. Daptomycin biosynthesis in *Streptomyces roseosporus*: cloning and analysis of the gene cluster and revision of peptide stereochemistry. *Microbiology*. 2005 May; 151(Pt 5):1507-23.

33. Mishra NN, Bayer AS. Correlation of cell membrane lipid profiles with daptomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Feb;57(2):1082-5.

34. Mishra NN, Bayer AS, Tran TT, Shamooy Y, Mileykovskaya E, Dowhan W, Guan Z, Arias CA. Daptomycin resistance in enterococci is associated with distinct alterations of cell membrane phospholipid content. *PLoS One*. 2012; 7(8):e43958.

35. Moise PA, North D, Steenbergen JN, Sakoulas G. Susceptibility relationship between vancomycin and daptomycin in *Staphylococcus aureus*: facts and assumptions. *Lancet Infect Dis*. 2009 Oct;9(10):617-24.

36. Moore CL, Osaki-Kiyan P, Haque NZ, Perri MB, Donabedian S, Zervos MJ. Daptomycin versus vancomycin for bloodstream infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a high vancomycin minimum inhibitory concentration: a case-control study. *Clin Infect Dis*. 2012 Jan 1;54(1):51-8.

37. Munita JM, Panesso D, Diaz L, Tran TT, Reyes J, Wanger A, Murray BE, Arias CA. Correlation between mutations in liaFSR of *Enterococcus faecium* and MIC of daptomycin: revisiting daptomycin breakpoints. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Aug; 56(8):4354-9.

38. Munita JM, Tran TT, Diaz L, Panesso D, Reyes J, Murray BE, Arias CA. A liaF codon deletion abolishes daptomycin bactericidal activity against vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Jun; 57(6):2831-3.

39. Muraih JK, Harris J, Taylor SD, Palmer M. Characterization of daptomycin oligomerization with perylene excimer fluorescence: stoichiometric binding of phosphatidylglycerol triggers oligomer formation. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Mar; 1818(3):673-8.

40. Muraih JK, Pearson A, Silverman J, Palmer M. Oligomerization of daptomycin on membranes. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Apr; 1808(4):1154-60.

41. Murray KP, Zhao JJ, Davis SL, Kullar R, Kaye KS, Lephart P, Rybak MJ. Early use of daptomycin versus vancomycin for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia with vancomycin minimum inhibitory concentration >1 mg/L: a matched cohort study. *Clin Infect Dis*. 2013 Jun;56(11):1562-9.



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



42. Nakashima H, Takahashi H, Kameko M, Saito H. Daptomycin Etest MICs for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* vary among different media. *J Infect Chemother*. 2012 Dec; 18(6):970-2.
43. Palmer KL, Daniel A, Hardy C, Silverman J, Gilmore MS. Genetic basis for daptomycin resistance in enterococci. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Jul; 55(7):3345-56.
44. Peleg AY, Miyakis S, Ward DV, Earl AM, Rubio A, Cameron DR, Pillai S, Moellering RC Jr, Eliopoulos GM. Whole genome characterization of the mechanisms of daptomycin resistance in clinical and laboratory derived isolates of *Staphylococcus aureus*. *PLoS One*. 2012;7(1):e28316.
45. Randall CP, Mariner KR, Chopra I, O'Neill AJ. The target of daptomycin is absent from *Escherichia coli* and other gram-negative pathogens. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Jan; 57(1):637-9.
46. Robbel L, Marahiel MA. Daptomycin, a bacterial lipopeptide synthesized by a nonribosomal machinery. *J Biol Chem*. 2010 Sep 3; 285(36):27501-8.
47. Rybak MJ. The efficacy and safety of daptomycin: first in a new class of antibiotics for Gram-positive bacteria. *Clin Microbiol Infect*. 2006 Mar; 12 Suppl 1:24-32.
48. Steenbergen JN, Alder J, Thorne GM, Tally FP. Daptomycin: a lipopeptide antibiotic for the treatment of serious Gram-positive infections. *J Antimicrob Chemother*. 2005 Mar; 55(3):283-8.
49. Tran TT, Panesso D, Gao H, Roh JH, Munita JM, Reyes J, Diaz L, Lobos EA, Shamooy Y, Mishra NN, Bayer AS, Murray BE, Weinstock GM, Arias CA. Whole-genome analysis of a daptomycin-susceptible *Enterococcus faecium* strain and its daptomycin-resistant variant arising during therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Jan; 57(1):261-8.
50. Winkler ME, Hoch JA. Essentiality, bypass, and targeting of the YycFG (VicRK) two-component regulatory system in gram-positive bacteria. *J Bacteriol*. 2008 Apr; 190(8):2645-8.
51. Yang SJ, Kreiswirth BN, Sakoulas G, Yeaman MR, Xiong YQ, Sawa A, Bayer AS. Enhanced expression of *dltABCD* is associated with the development of daptomycin nonsusceptibility in a clinical endocarditis isolate of *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis*. 2009 Dec 15;200(12):1916-20.
52. Yang SJ, Nast CC, Mishra NN, Yeaman MR, Fey PD, Bayer AS. Cell wall thickening is not a universal accompaniment of the daptomycin nonsusceptibility phenotype in *Staphylococcus aureus*: evidence for multiple resistance mechanisms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Aug;54(8):3079-85.
53. Zhang T, Muraih JK, Mintzer E, Tishbi N, Desert C, Silverman J, Taylor S, Palmer M. Mutual inhibition through hybrid oligomer formation of daptomycin and the semisynthetic lipopeptide antibiotic CB-182,462. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Feb; 1828(2):302-8.



## Sección II: Principales antibióticos que actúan en la síntesis proteica

### 7. Resistencia a Aminoglucósidos

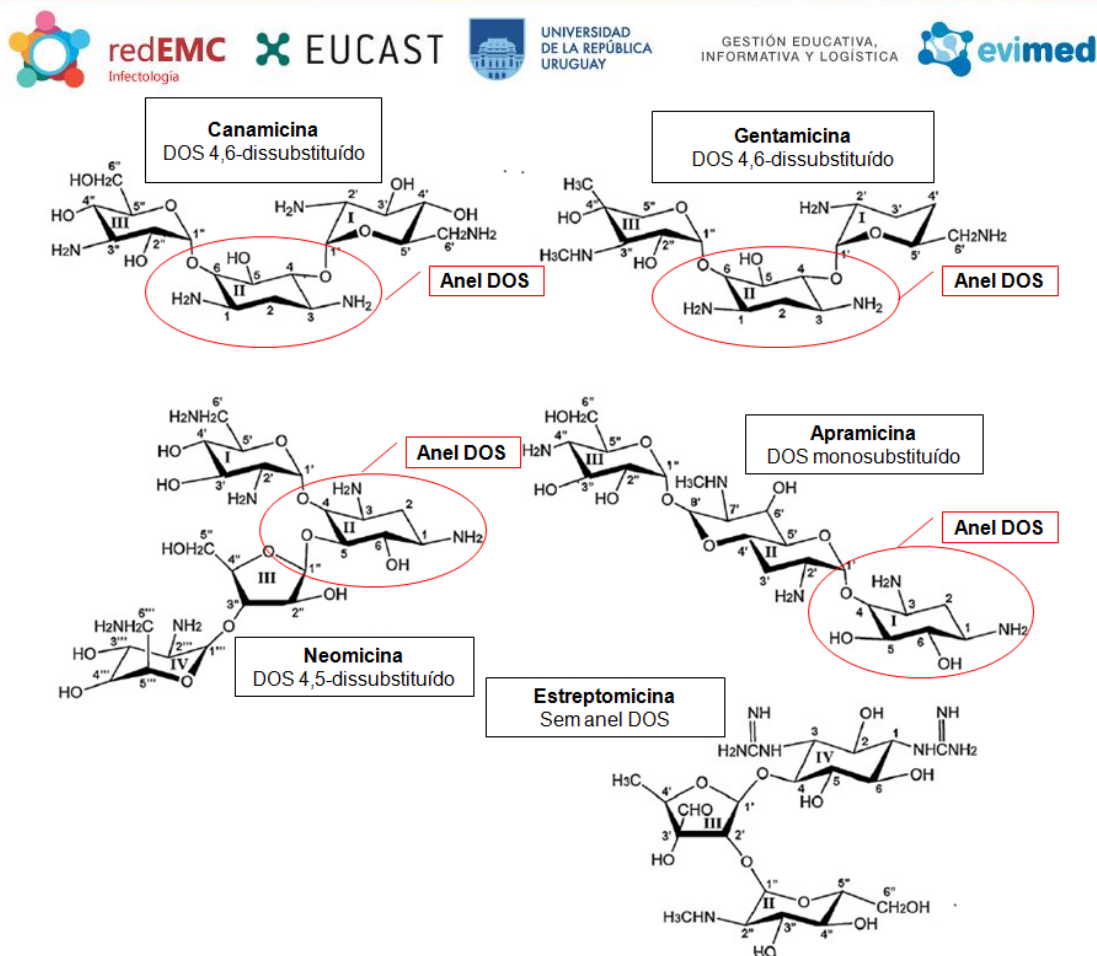
#### **Dandara Cassu Corsi**

Biomédica con especialización en Microbiología y Bacteriología,  
Maestranda en Ciencias Básicas en Infectología, Universidade Federal de São Paulo  
(UNIFESP)  
Brasil.

#### **Ana Cristina Gales**

Profesora Adjunta de Infectología del Departamento de Medicina de la  
Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)  
Investigadora 1A del Consejo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (CNPq)  
Miembro de la Cámara Técnica de Resistencia Microbiana (CATREM),  
Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria (ANVISA)  
Coordinadora clínica del Consejo Brasileiro de Susceptibilidad Antimicrobiana (BrCAST).  
Brasil.

Los antimicrobianos de la clase de los aminoglucósidos están compuestos por sustancias hidrofílicas formadas por dos o más amino azúcares que se enlazan mediante un puente glucosídico al núcleo aminociclitol de la molécula. Se clasifican de acuerdo a sus propiedades químicas, dividiéndose en algunos grupos: 2-desoxiestreptamina (DOS) 4,6-disustituido; DOS 4,5-disustituido, DOS monosustituido y sin anillo DOS<sup>1</sup>. A diferencia de los otros aminoglucósidos que poseen el anillo DOS, la estreptomina posee el anillo de estreptidina en su composición química<sup>4</sup>. Los antimicrobianos más utilizados en la práctica clínica y sus respectivas clasificaciones se encuentran ilustrados en la **Figura 1**.



**Figura 1.** Estructura química de algunos aminoglucósidos utilizados en la práctica clínica. Adaptada de Washino y Arakawa, 2012<sup>1</sup>.

Después del hallazgo de la penicilina, la estreptomicina fue aislada del cultivo de un actinomiceto, *Streptomyces griseus*. Este compuesto fue el primer representante de los aminoglucósidos, con actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*<sup>2</sup>. Sin embargo, se observó el desarrollo de resistencia a este agente en un corto período de tiempo luego de su introducción en la práctica clínica. Desde entonces, otros antimicrobianos de la clase aminoglucósidos fueron aislados de los géneros de los Actinomicetos y Micromonospora, como la kanamicina y la gentamicina<sup>3</sup>. Posteriormente, con el objetivo de ampliar el espectro de actividad antibacteriana, y también disminuir los efectos adversos importantes, como la nefrotoxicidad y ototoxicidad, nuevas moléculas fueron sintetizadas (**Tabla 1**). La amicacina, la netilmicina y la paromomicina son fármacos semisintéticos provenientes de la modificación natural de los compuestos<sup>4</sup>. Los aminoglucósidos gentamicina, netilmicina, isepamicina, dibecacina y arbecacina poseen mayor potencia en comparación con los aminoglucósidos antecesores, como por ejemplo, la estreptomicina y la kanamicina.



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



Familia/Año	Representantes	Año de descripción
Estreptomicina (1944)	-	1944
Neomicina (1949)	Neomicina	1949
	Paromomicina	1959
Kanamicina (1957)	Amicacina	1957
	Arbecacina	1990
	Tobramicina	1967
	Dibecacina	1971
Espectinomicina (1961)	-	1961
Gentamicina (1963)	Sisomicina	1970
	Netilmicina	1975
	Isepamicina	1978

**Tabla 1.** Familia de los aminoglucósidos junto a algunos de sus representantes y los años de sus respectivas descripciones.

Adaptada de Gilbert y Legget, 2010<sup>4</sup>.

Los aminoglucósidos permanecen como una clase de agentes antimicrobianos eficaces y frecuentemente utilizadas en la práctica clínica<sup>4</sup>. A pesar de la existencia de varios mecanismos de resistencia, ellos continúan siendo activos contra la mayoría de los bacilos aerobios Gram negativos<sup>5</sup>. Actualmente, a pesar de que estos compuestos pueden ser utilizados como monoterapia en el tratamiento de las infecciones del tracto urinario, son utilizados principalmente en combinación con antibióticos  $\beta$ -lactámicos en el tratamiento de las infecciones graves causadas por bacilos Gram-negativos. También han sido utilizados en asociación con  $\beta$ -lactámicos o glicopéptidos en el tratamiento de las endocarditis causadas por cocos Gram positivos, principalmente *Enterococcus* spp.<sup>4-6</sup>. La estreptomicina aún es utilizada en el tratamiento combinado de las infecciones por *M. tuberculosis*, cuando se produce resistencia o intolerancia a la rifampicina y/o a la isoniazida<sup>4-6</sup>. Estos compuestos también son utilizados en el tratamiento de *Yersinia pestis*, *Franciscella tularensis* y *Brucella* spp, agentes etiológicos de la plaga, tularemia y brucelosis, respectivamente<sup>7-9</sup>. Además, la



redEMC  
Infectología

EUCAST



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

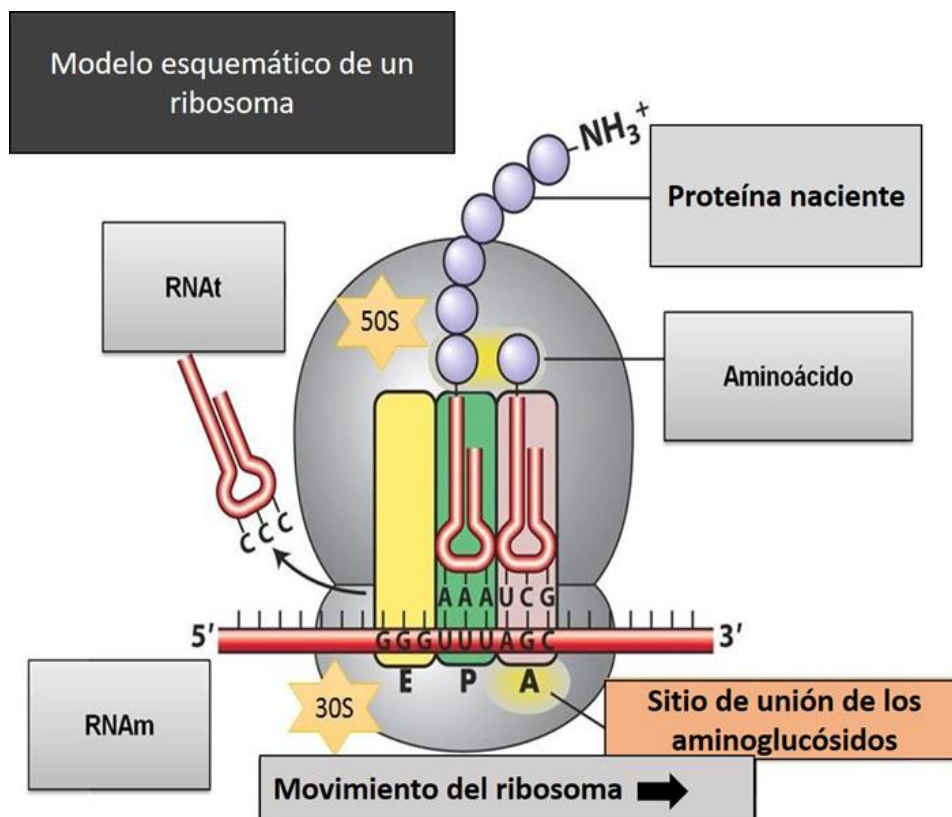
GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



terapia inhalatoria con aminoglucósidos ha sido utilizada en pacientes fibroquísticos colonizados por *Pseudomonas aeruginosa*<sup>10</sup>.

## 7.1. Mecanismo de acción de los aminoglucósidos

El efecto bactericida de los aminoglucósidos se produce luego de su enlace al ribosoma bacteriano, inhibiendo la síntesis proteica como consecuencia. El ribosoma es un complejo estructural compuesto por proteínas y ARN, dividido en dos subunidades denominadas 50S y 30S (**Imagen 2**). Estas subunidades están compuestas por diferentes moléculas de ARN y proteínas. La porción 50S comprende 33 proteínas y dos moléculas de ARN denominadas 5S y 23S, y la subunidad 30S comprende 21 proteínas y una única molécula de ARN denominada 16S<sup>11</sup>. Además, el ribosoma posee tres importantes sitios de enlace del ARN transportador: el sitio de enlace A (aminoacil), P (peptidil) y E (salida, del inglés “exit”)<sup>12</sup>. El sitio de enlace A es el principal objetivo de los aminoglucósidos<sup>13</sup>.



**Imagen 2.** Modelo esquemático de un ribosoma, principal blanco de los aminoglucósidos. Adaptada de [www.proteinsyntheses.org](http://www.proteinsyntheses.org)



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



A pesar de su naturaleza altamente polar, que podría impedir su difusión por las membranas, los aminoglucósidos atraviesan la membrana externa de bacterias Gram negativas por la ruptura de los enlaces de  $Mg^{2+}$  entre las moléculas de lipopolisacáridos. En bacterias Gram positivas, la ruptura ocurre entre los fosfolípidos y el ácido teicoico<sup>14</sup>. El enlace de los aminoglucósidos resulta en un desplazamiento de iones de  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$ , los cuales se unen a las moléculas liposacáridas adyacentes, dañificando la membrana celular externa, formando poros transitorios, con un consecuente aumento de la permeabilidad de la membrana celular externa<sup>15</sup>.

Mientras este pasaje no depende de energía, el transporte de la molécula de aminoglucósido a través de la membrana citoplasmática para el interior de la célula bacteriana depende del transporte de electrón<sup>14</sup>. Este transporte se perjudica en condiciones anaeróbicas, con pH bajo o en medios de cultivo con alta osmolaridad, lo que justifica la reducción de la actividad bacteriana de los aminoglucósidos<sup>14</sup>. Después de ese enlace inicial, los aminoglucósidos son transportados hacia adentro de la membrana citoplasmática por mecanismos dependiente de energía, los cuales son divididos en dos fases: la Fase 1 se caracteriza por necesitar, también, oxígeno para la realización del transporte del antimicrobiano en el citosol. La dependencia de oxígeno es uno de los motivos por el cual microorganismos anaerobios son considerados intrínsecamente resistentes a los aminoglucósidos<sup>16,17</sup>. En la Fase 2 se produce el enlace del antimicrobiano con el ribosoma. Los aminoglucósidos se enlazan en gran parte al sitio aminoacil de la subunidad ribosomal 30S y, en menor grado, en locales específicos de la subunidad 50S, dificultando la elongación de la cadena de peptidoglicano. El mecanismo de acción de los aminoglucósidos es complejo, involucra la inhibición de la transferencia del péptido del ARNt del sitio A al sitio P y el compromiso del proceso de revisión que controla la precisión del proceso de traducción<sup>18</sup>.

## 7.2. Mecanismos de resistencia a los aminoglucósidos

La resistencia a los aminoglucósidos puede estar mediada por diferentes mecanismos, incluyendo la modificación de la membrana celular bacteriana, aumento del eflujo del fármaco; modificación o inactivación enzimática a través de las enzimas modificadoras de aminoglucósidos (AMEs), tales como las acetiltransferasas (ACCs), las nucleotide-transferasas o adeniltransferasas (ADHs) y las fosfotransferasas (APHs), y por modificaciones en el sitio de enlace de los antimicrobianos, a través



redEMC  
Infectología

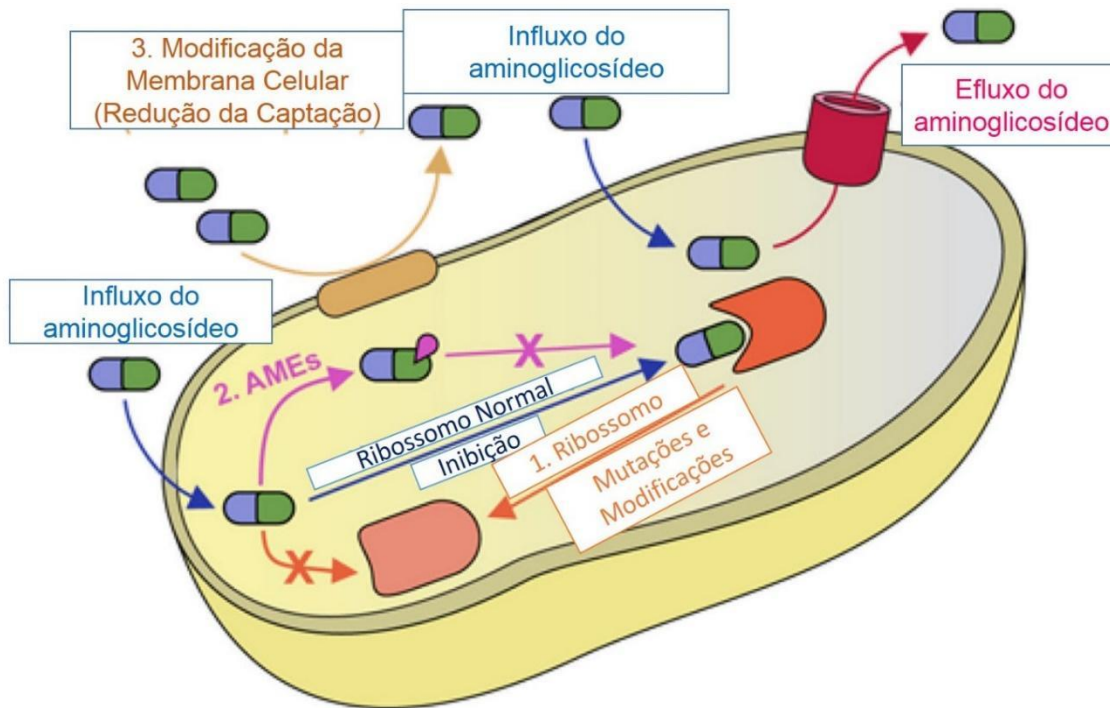


UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



de la producción de 16S rARN metiltransferasas como puede ser observado en la **Imagen 3**. Estos mecanismos no son mutuamente excluyentes y pueden coexistir en las mismas cepas bacterianas<sup>5,19</sup>.



**Imagen 3.** Posibles mecanismos de resistencia a los aminoglucósidos encontrados en bacterias Gram negativas. Adaptada de Garneau-Tsodikiva y Labby, 2016<sup>20</sup>.

### 7.2.1. Inactivación enzimática por producción de enzimas modificadoras de aminoglucósidos (AMEs)

La producción de Enzimas Modificadoras de Aminoglucósidos (EMAs) es considerada como el principal mecanismo de resistencia a los aminoglucósidos. Las EMAs poseen la capacidad de modificar las moléculas de los aminoglucósidos por medio de una reacción catalítica de los grupos -OH o -NH<sub>2</sub> en el núcleo de la molécula de 2-deoxiestreptamina (DOS) o de la molécula de azúcar. Las EMAs son divididas en tres grandes familias: acetiltransferasas, nucleotídeotransferasas o adeniltransferasas y fosfotransferasas<sup>5,13,19</sup>. Los genes que codifican las EMAs con frecuencia son encontrados en integrones, transposones, los cuales pueden estar insertados en plásmidos o en el cromosoma bacteriano.





redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

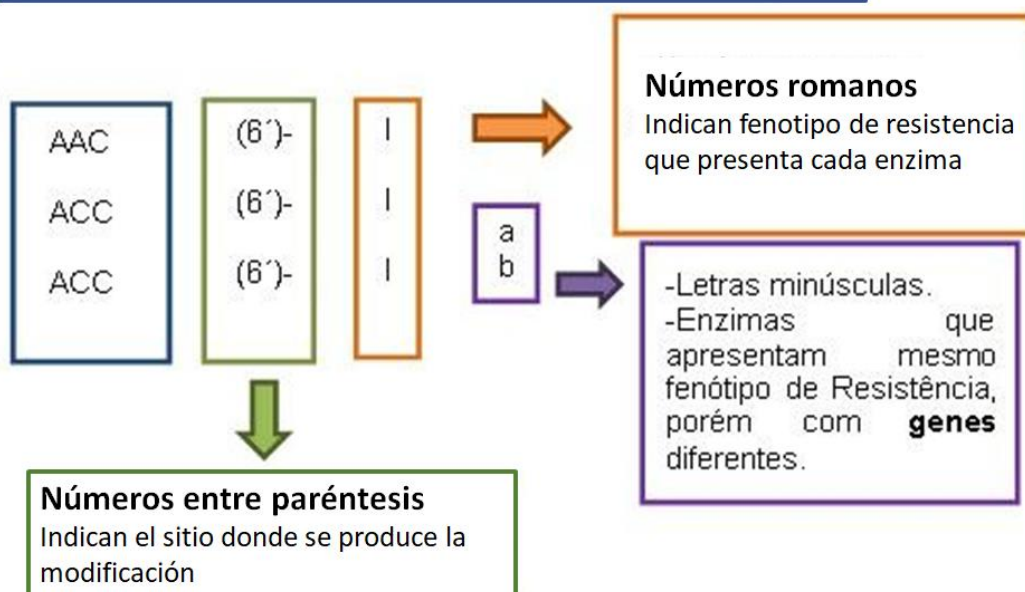
GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



Hay dos tipos principales de nomenclatura utilizados en la clasificación de las EMAs<sup>21,22</sup>. La nomenclatura elaborada por Shaw y colaboradores, en el año de 1993, es la más utilizada en la literatura<sup>21</sup>. Esta nomenclatura consiste en la división de tres letras correspondientes al tipo de reacción (clase), seguida de una numeración indicando el sitio de modificación enzimática, números romanos indicando el fenotipo de resistencia (subclase) y letras minúsculas correspondientes a las enzimas que presentan el mismo fenotipo de resistencia, pero codificados por genes diferentes (**Imagen 4**). La nomenclatura sugerida por Oteo y colaboradores se caracteriza por la no utilización de guiones y paréntesis en la designación de la clasificación de las EMAs<sup>22</sup>. Como no hay una recomendación consensuada entre los diversos autores, la nomenclatura que reciben las nuevas variantes de EMAs es confusa<sup>5,19</sup>.

**Letras mayúsculas:**

**Tipo de reacción (acetilación, adenilación, fosforilación)**



**Imagen 4.** Esquema da nomenclatura de las EMAs<sup>21</sup>.

Las aminoglucósido N-acetiltransferasas (AAC) constituyen el mayor grupo de las EMAs. Utilizando a acetil coenzima-A (acetilCoa) como sustrato donante, estas enzimas catalizan la acetilación del grupo -NH<sub>2</sub> de la molécula del aminoglucósido en las posiciones 1 [AAC (1)], 3, [AAC (3)]; 2' [AAC (2')] o 6' [AAC (6')]. La primera acetiltransferasa identificada (6'N-acetiltransferase IV) fue relatada en un aislamiento de *E. coli*, en 1965<sup>23</sup>. La ACC (1) puede ser encontrada en apenas algunas especies



bacterianas, tales como *E. coli*, *Campylobacter* spp. y en una especie de actinomiceto<sup>19,24</sup>. Ya entre la AAC (3) es posible encontrar 9 subclases diseminadas en bacterias Gram negativas. La ACC (6') y sus respectivas subclases representan las acetiltransferasas más frecuentemente depositadas en el *GenBank*, siendo AAC (6')-I la más frecuentemente reportada<sup>25</sup>. En 2006, Park y colaboradores observaron que la enzima AAC (6')-Ib-cr, variante de la AAC (6')-Ib por la modificación de dos aminoácidos, Trp102Arg y Asp179Tyr, reconocía a ciprofloxacina como sustrato, además de la amicacina y tobramicina<sup>26</sup>.

Las nucleotídeotransferasas o adeniltransferasas (ANTs/ADDs) inactivan las moléculas de los aminoglucósidos por la catalización de la transferencia de un grupo AMP, proveniente de un sustrato ATP donador, para un grupo hidroxilo en la molécula del fármaco. Existen cinco clases de ANTs que catalizan la adenilación en las posiciones 6 [ANT (6)]; 9 [ANT (9)]; 4', [ANT (4')]; 2 [ANT (2')]; y 3 [ANT (3')], siendo ANT (3') la enzima más prevalente<sup>5,19</sup>.

Las O-fosfotransferasas (APHs) catalizan la transferencia del grupo fosfato a la molécula del aminoglucósido. Se dividen en APH (4), APH (6), APH (3'), APH (2'), APH (3''), APH (7'')<sup>5,19</sup>.

La falta de acuerdo en la nomenclatura que estas enzimas reciben dificulta el establecimiento de cuántas variantes de cada tipo fueron descritas hasta el momento. Aunque ninguna de las EMAs descritas hasta el momento sea capaz de modificar todos los antimicrobianos pertenecientes a la clase de los aminoglucósidos, todos los aminoglucósidos son modificados por una o más EMAs. Con excepción de la enzimas AAC (2')-Ia-c, generalmente producida por *Providencia stuartii* a la molécula de plazomicina, un nuevo aminoglucósido que se encuentra en fase 3 de estudio, no es modificada por la mayoría de las EMAs reportadas en aislamientos clínicos hasta este momento<sup>5</sup>. En la **Tabla 2** se encuentran descritas las EMAs reportadas con mayor frecuencia entre bacterias patógenas humanas.

Enzima	Sustrato	Especie
<b>Acetiltransferasas</b>		
AAC (2') - Ia-c	Gentamicina, tobramicina y plazomicina	<i>Providencia stuartii</i>
AAC (3,3'')-x	Amicacina	
AAC (3')- Ia-e IIa,e IIIa,b,c IVa	Gentamicina y tobramicina	Comúnmente encontrada en <i>Pseudomonas</i> spp. y <i>Samonella</i> spp.
AAC (4,4'')-Ia	Amicacina y tobramicina	
AAC (6')- Ia-f	Amicacina, tobramicina	



redEMC  
Infectología

EUCAST



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



le,f		
Ila,b		
AAC (6')-Ib-cr	Amicacina, tobramicina y ciprofloxacina	Enterobacterias
<b>Adeniltransferasas</b>		
ANT(4,4'')-Ia	Amicacina y tobramicina	
Ila		
ANT(2'')-Ia-c	Kanamicina, gentamicina y tobramicina	Diseminada en bacterias Gram-negativas
ANT(3'')-Ia	Estreptomicina	
ANT(6)-Ia	Estreptomicina	Encontrada solamente en bacterias Gram-positivas
<b>Fosfotransferasas</b>		
APH (3')-Ia-c	Amicacina	Encontrada en <i>S. aureus</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>Acinetobacter</i> spp.
Ila,b		
Ila		
VIa		
VIIa		
APH (2'')-Ia,c,d	Gentamicina y tobramicina	
Ib		

**Tabla 2.** Principales enzimas modificadoras de aminoglucósidos reportadas en bacterias patógenas humanas.

### 7.2.2. Modificación del sitio ribosomal

La modificación del ribosoma confiere resistencia a los aminoglucósidos, pues disminuye la afinidad de enlace del aminoglucósido a su sitio de acción. El ejemplo más común de este tipo de resistencia es la que se encuentra en cepas de *Mycobacterium tuberculosis* que sufrieron mutación en la proteína ribosomal S12 y se volvieron resistentes a la estreptomina<sup>27</sup>. Las alteraciones en el sitio de acción en el ribosoma de los aminoglucósidos también pueden ocurrir por la acción de enzimas bacterianas denominadas metiltransferasas<sup>28</sup>. Los actinomicetos son naturalmente resistentes a los aminoglucósidos, pues abrigan en su genoma los genes de las metiltransferasas, que les suministra la protección del 16S rARN a través de su metilación. Hasta el año 2003 se creía que este mecanismo de resistencia era clínicamente menos significativo ya que hasta ese momento no había sido descrito en muestras clínicamente significativas<sup>28</sup>.

Las metiltransferasas responsables de la resistencia intrínseca a los aminoglucósidos, son básicamente clasificadas en dos grupos: N7-G1405 y N1-A1408, basada en la posición del nucleótido en el sitio A del 16S ARNr, perteneciente a la subunidad 30S<sup>29</sup>. De esta manera, los genes de



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



resistencia clasificados como N7-G1405, como *kmr*, *fmrO* y *sgm*, modifican la posición N7 del nucleótido G1405 del 16S ARNr, confiriendo resistencia exclusivamente a los aminoglucósidos clasificados como DOS 4,6-disustituido, así como a la amicacina y a la gentamicina<sup>30-32</sup>. Ya Los genes clasificados como N1-A1408, como el *kamA*, modifica la posición N1 del nucleótido A1408 del 16S rARN, confiriendo resistencia a diverso aminoglucósidos clasificados como DOS 4,6 y 4,5-disustituido y DOS monosustituido (Apramicina)<sup>31</sup>.

Diez tipos de metiltransferasas adquiridas fueron descritas hasta el momento, como se puede observar en la **Tabla 3**: NpmA, Arma (*aminoglycoside resistance methyltransferase*), las variantes pertenecientes a la familia Rmt (*ribosomal methyltransferases*), RmtA, RmtB, RmtC, RmtD, RmtE, RmtF, RmtG, y RmtH. Del mismo modo que las 16S rRNA metiltransferasas intrínsecas, las adquiridas también son clasificadas de acuerdo con la modificación en las posiciones N7 y N1 de las bases G1405 y A1408, respectivamente<sup>33</sup>. Las metiltransferasas insertan el radical metil, alterando la formación de enlaces de hidrógeno entre cada anillo de azúcar de la droga con los nucleótidos, reduciendo la afinidad del antimicrobiano al sitio principal de enlace y, consecuentemente perjudicando la síntesis proteica<sup>33</sup>. Las enzimas Arma, RmtA a RmtH pertenecen al grupo N7-1405 y confieren resistencia exclusivamente a los aminoglucósidos pertenecientes al grupo DOS 4,6-disustituido, como la amicacina, gentamicina y tobramicina. En oposición, solo la enzima NpmA se clasifica como N1-A1408, y confiere resistencia a los aminoglucósidos clasificados como DOS 4,6 y 4,5-disustituido y DOS monosustituido (Apramicina)<sup>33</sup>. Los genes codificadores de estas metiltransferasas normalmente están insertos en elementos genéticos móviles<sup>33</sup>. Las 16S rRNA metiltransferasas se encuentran ampliamente distribuidas en todos los continentes. De acuerdo con la **Figura 5** es posible observar que incluso después de diverso relatos, algunas enzimas continúan restringidas a algunas localidades.

Año de aislamiento	Metiltransferasas	Especie bacteriana	País	Sitio de aislamiento	Referencias
1996	ArmA	<i>C. freundii</i>	Polonia	Aislado clínico	34
1997	RmtA	<i>P. aeruginosa</i>	Japón	Espuito	35
2002	RmtB	<i>S. marcescens</i>	Japón	Espuito	36
2003	RmtC	<i>P. mirabilis</i>	Japón	Hisopado garganta	37
2003	NpmA	<i>E. coli</i>	Japón	Orina	38
2005	RmtD	<i>P. aeruginosa</i>	Brasil	Orina	39
Desconocido	RmtE	<i>E. coli</i>	Estados Unidos	Ganado	40



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

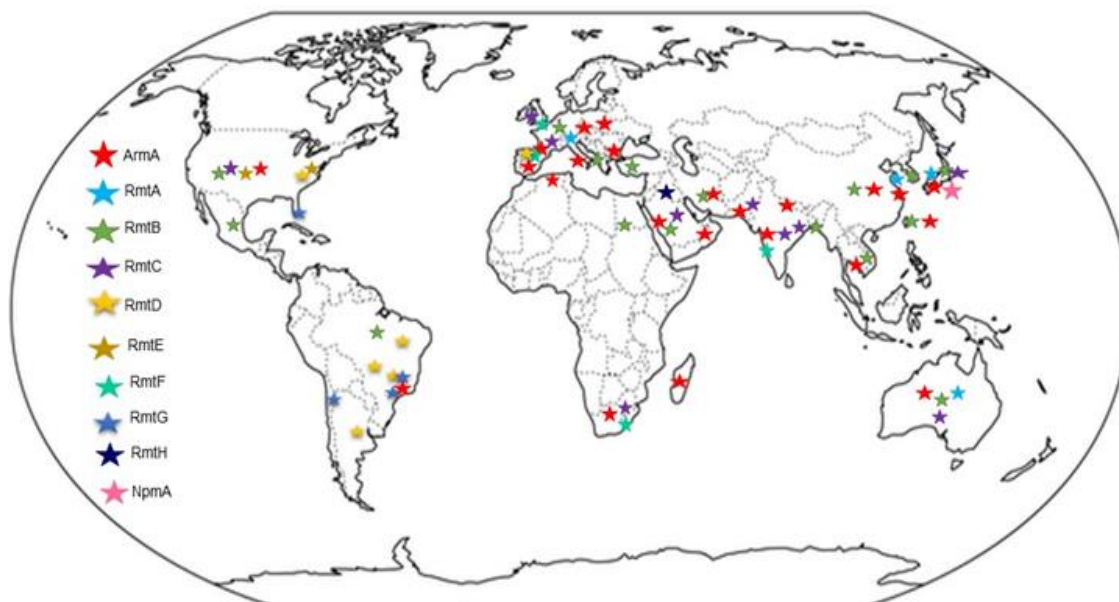
GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



Unidos

2011	<b>RmtF</b>	<i>K. pneumoniae</i>	Francia	No descrito	41
2010/2011	<b>RmtG</b>	<i>K. pneumoniae</i>	Brasil	Diferentes sitios corporales	42
2006	<b>RmtH</b>	<i>K. pneumoniae</i>	Irak	Fractura de Tibia	43

**Tabla 3.** Primeras descripciones de aislados productores de metiltransferasas alrededor del mundo.



**Imagen 5.** Distribución mundial de las 16 rRNA metiltransferasas hasta el año de las últimas publicaciones (2015)<sup>34-42</sup>.

Adaptada de Washino y Arakawa, 2012<sup>33</sup>.

La primera metiltransferasa descrita, la ArmA, fue primeramente identificada en un plásmido perteneciente a un *Citrobacter freundii* aislado en Polonia en 1996; pero solamente tres años después de su descripción fue caracterizada su función enzimática<sup>33</sup>. Luego de su primera descripción, la ArmA también fue observada en muestras de *A. baumannii* aisladas en el continente Norte Americano y en China en los años de 2007 y 2011, respectivamente<sup>39,44</sup>. Relatos más recientes reportan patógenos productores de esta enzima en Arabia Saudita, África, Vietnam, China e Italia<sup>45-48</sup>. En Brasil, el gen *armA* fue observado por Quiles y colaboradores en el año de 2014 en un aislamiento clínico de *Enterobacter cloacae* proveniente de la ciudad de Rio de Janeiro<sup>49</sup>. El gen *armA* con frecuencia es portado por el transposón Tn1548, el cual a su vez se encuentra inserto en un plásmido



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



conjugativo pIP1204, que también contiene otros genes de resistencia como los  $\beta$ -lactámicos y las fluoroquinolonas, por ejemplo<sup>50,51</sup>. Este hecho puede en parte justificar porque la enzima ArmA es la metiltransferasa más ampliamente diseminada en el mundo<sup>33</sup>.

La primera descripción de la enzima NpmA ocurrió en Japón en 2007, sin embargo al contrario de la ArmA, que se diseminó por los más diversos países, no hubo ninguna otra descripción de producción de la NpmA por microorganismos en otras localidades geográficas. A pesar de estar localizado en un plasmidio, la diseminación del gen *npmA* puede no haber sucedido porque el plásmido que lo transporta, no carga otros genes de resistencia<sup>52</sup>.

En el año 1997, en Japón, fue aislada *Pseudomonas aeruginosa* que presentaba alto nivel de resistencia a varios aminoglucósidos. Un nuevo gen de metiltransferasa, el *rmtA*, fue entonces identificado en el plásmido de esa cepa. Desde entonces, sus variantes fueron identificadas en diversos patógenos Gram negativos. En los años 2002 y 2003 nuevas variantes fueron identificadas en Japón, las *rmtB* y *rmtC*, seguidas por las descripciones de la *rmtD*, *rmtG*, *rmtE*, *rmtF* y *rmtH* en Brasil, Estados Unidos, Francia e Irak, respectivamente (Tabla 3)<sup>36-43</sup>.

La producción de RmtB ha sido reportada en enterobacterias y en bacilos Gram-negativos no-fermentadores, como *A. baumannii* aislados en Europa, en América y, principalmente, en el continente Asiático<sup>33,47,53,54</sup>. Los reportes de patógenos productores de las enzimas RmtC y RmtF son menos frecuentes. RmtC fue identificada en una muestra de *Salmonella enterica* serovar Virchow en el Reino Unido por Hopkins y colaboradores en 2010<sup>55</sup>. Posteriormente, aislamientos clínicos de *K. pneumoniae* transportadores del gen *rmtC*, que también coproducían *armA* y *rmtF* fueron reportados en Nepal<sup>47</sup>. La producción de RmtF fue identificada en un aislamiento clínico de *K. pneumoniae*, la cual coproducía NDM-7, en EUA<sup>56</sup>.

En América del Sur las metiltransferasas ya fueron descritas en cepas provenientes de Argentina, Brasil y Chile<sup>57-59</sup>. A diferencia de la epidemiología observada en el resto del mundo, en América Latina la metiltransferasa más frecuente es RmtD, seguida por RmtG. En Brasil, hasta el momento fueron descritos los genes *rmtB*, *rmtD* y *rmtG*. La RmtD fue reportada por primera vez en una muestra de *P. aeruginosa* que también era coproductora de SPM-1, una metalo-betalactamsa, aislada en el interior de San Pablo, en 2007, por Doi y colaboradores<sup>39</sup>. El gen *rmtD* también fue encontrado en una muestra de *K. pneumoniae*<sup>59</sup>. Además, la variante de este gen, a *rmtD2*, fue



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



identificada en aislamientos clínicos de *Enterobacter spp* y *C. freundii*, en 2011, provenientes de hospitales de la Argentina<sup>59</sup>. RmtD también fue identificada en muestras de *E. coli* aisladas en infección extra-intestinal de un caballo<sup>61</sup>.

La variante RmtG fue descrita en aislados de *Klebsiella pneumoniae* provenientes de varios hospitales del estado de San Pablo. Esas muestras presentaban resistencia elevada para amicacina, gentamicina y tobramicina, además de cargar los genes bla<sub>KPC-2</sub> y bla<sub>CTX-M-242</sub>. Mientras, la presencia de este mismo gen fue observada en un estudio realizado con aislamientos de *K. pneumoniae*, denominada Kp13, proveniente de la ciudad de Londrina, localizada en el estado de Paraná, que también transportaba el gen bla<sub>KPC-2</sub><sup>62</sup>. Recientemente, muestras clínicas de *P. aeruginosa* transportadoras del gen *rmtG* aisladas de pacientes fibroquísticos fueron también encontradas en la ciudad de San Pablo<sup>63</sup>. A pesar de que la mayoría de los casos de infecciones causadas por patógenos transportadores de *rmtG* ocurrieron en Brasil, aislamientos de *K. pneumoniae* portadores de este gen ya fueron descritos en Chile y en Estados Unidos, las cuales también coproducían CTX-M-2 y CTX-M-15, respectivamente<sup>58-65</sup>.

### 7.2.3. Modificación de la membrana celular bacteriana y bombas de eflujo

Como fue dicho anteriormente, los aminoglucósidos son moléculas catiónicas que se unen al LPS de la membrana celular externa que está cargado negativamente. La modificación de la molécula del LPS se produce mediante el agregado de 4-amino-arabinosa o fosfoetanolamina en el lípido A del LPS. Como consecuencia disminuye la carga negativa del LPS, promoviendo la reducción de la afinidad del antimicrobiano a la membrana celular bacteriana<sup>65-68</sup>. La adición de 4-amino-arabinosa o fosfoetanolamina en el lípido A del LPS es mediada por los sistemas de dos componentes (PhoPQ, PmRAB, PaRSC, CprRS y ColRS), los cuales también son responsables por la regulación génica de diferentes factores de virulencia y de resistencia en diversas especies Gram negativas. Estos sistemas, normalmente son activados en presencia de metales catiónicos, antimicrobianos catiónicos y/o disminución del pH<sup>20,68,69</sup>.

La resistencia a los aminoglucósidos en enterococos presenta características peculiares. *Enterococcus spp.* normalmente presentan bajo grado de resistencia a los aminoglucósidos (resistencia intrínseca del género *Enterococcus*). Ese bajo grado de resistencia se debe a la pobre penetración de los aminoglucósidos por la pared celular. Cuando asociados a un antimicrobiano que interfiere en la síntesis de la pared celular, los aminoglucósidos penetran con facilidad y logran actuar, llevando a la muerte bacteriana. Sin embargo, si la bacteria presenta alto grado de resistencia al aminoglucósido,



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



habrá pérdida del efecto sinérgico. Gentamicina es el aminoglucósido más potente contra enterococos. Las enzimas producidas por bacterias Gram positivas que degradan dicho antibiótico también degradan los otros aminoglucósidos, excepto la estreptomina, que por ese motivo también debe ser testada<sup>70</sup>.

El transporte activo de los aminoglucósidos hacia afuera de la célula se debe a la hiper-expresión de bombas de eflujo. Sin embargo, debido a que su estructura policatiónica, solamente algunas bombas poseen la capacidad de expulsar esta clase de antimicrobiano<sup>20,68,70</sup>. Entre las superfamilias de bombas, de eflujo, las bombas pertenecientes a la familia RND, “*resistance nodulation división*”, son las más prevalentes en aislados de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* multirresistentes<sup>71-74</sup>. Los aminoglucósidos son sustratos de los sistemas de eflujo AdeABC y AdeDE en *A. baumannii* y *A. pittii* y *A. nosocomialis*, respectivamente<sup>73</sup>. En *A. baumannii*, los aminoglucósidos también son sustratos del sistema AbeM, perteneciente a la subfamilia MATE<sup>75</sup>. En *P. aeruginosa*, los aminoglucósidos constituyen sustratos de los sistema de eflujo MexXy-OprM<sup>71,73</sup>.

#### 7.2.4. Detección en el laboratorio de aislamientos clínicos resistentes a los aminoglucósidos

La resistencia a los aminoglucósidos es identificada rutinariamente por los laboratorios de microbiología durante la realización de los tests de sensibilidad a los antimicrobianos. Los tests moleculares son necesarios para la identificación de los mecanismos de resistencia. Un estudio reciente mostró que los resultados de los tests de sensibilidad a la arbecacina frente a las enterobacterias podrían ser útiles para diferenciar cepas bacterianas productoras de metiltransferasas de las productoras de EMAs. Las cepas que no producían metiltransferasas presentaron concentraciones inhibitorias mínimas (CIMs) más bajas, mientras que las cepas productoras de metiltransferasas se presentaban resistentes a la arbecacina<sup>76</sup>.

Test de tamizaje se utilizan también para la sospecha de la presencia de metilasas, sembrando los microorganismos resistentes en placas de Mueller Hinton Agar, LB agar o Mac Conkey Lactosa agar, suplementadas con 200 mg/L de gentamicina y 200 mg/L de amicacina. Aquellos microorganismos capaces de crecer en estas condiciones son sospechosos de presentar metilasas<sup>77</sup>.

### 7.3. Referencias

1. Washino J, Arakawa Y. Exogenously acquired 16S rRNA Methyltransferases found in Aminoglycoside-resistance Pathogenic Gram-negative bacteria: An update. Drug Resistance Update. 15:133-148, 2012.





redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



2. Schatz A & Waksman SA. Effect of Streptomycin and other antibiotic substances upon *Mycobacterium tuberculosis* and related organisms. Proc.Soc.Exp.Biol. Med. 57:244-248, 1944.
3. Magnet S, Blanchard JS. Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. Chem Rev. 105(2):477-98, 2005.
4. Gilbert DN, Leggett J. *In: Mendell D and Bennett's. Principles and practice of infectious diseases/ [edited by] Gerald L. Mendell, John E. Bennett, Raphael Dolin- 7ª edición, 2010.*
5. Zhanel GG, Lawson CD, Zelenitsky S, Findlay B, Schweizer F, Adam H, Walkty A, Rubinstein E, Gin A, Hoband, Lynch J, Karlowsky JA. Comparison of The Next-Generation Aminoglycoside Tobramycin and Amikacin. Expert Opin Anti Infect Ther. 10(4):459-473. 2012
6. Avent M, Rogers B, Cheng A, Paterson D. Current use of aminoglycosides; indications, pharmacokinetics and monitoring for toxicity. Intern Med J 41(6), 441-449, 2011.
7. Frean JA, Arntzen L, Capper T, Bryskier A, Klugman KP. In vitro activities of 14 antibiotics against 100 human isolates of *Yersinia pestis* from a southern African plague focus. Antimicrob Agents Chemother. 40(11):2646-7, 1996.
8. Baker CN, Hollis DG, Thornsberry C. Antimicrobial susceptibility testing of *Francisella tularensis* with a modified Mueller-Hinton broth. J Clin Microbiol. 22(2):212-215, 1985.
9. Akova M, Gür D, Livermore DM, Kocagöz T, Akalin HE. In vitro activities of antibiotics alone and in combination against *Brucella melitensis* at neutral and acidic pHs. Antimicrob Agents Chemother. 43(5):1298-300, 1999.
10. Shteinberg M, Elborn JS. Use of inhaled tobramycin in cystic fibrosis. Adv Ther.32(1):1-9, 2015.
11. Brodersen DE, Clemons WM Jr., Carter AP, Wimberly BT, Ramakrishnan V. Crystal structure of the 30 S ribosomal subunit from *Thermus thermophilus*: structure of the proteins and their interactions with 16 S RNA. J Mol Biol. 22; 316(3):725-68, 2002.
12. Green R, Noller HF. Ribosomes and translation. Annu Rev Biochem. 66:679-716, 1997.
13. Vakulenko SB, Mobashery S. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. Clin Microbiol Rev.16(3):430-50, 2003.
14. Taber HW, Mueller JP, Miller PF, Arrow AS. Bacterial uptake of aminoglycoside antibiotics. Microbiol Rev. 51(4):439-57, 1987.
15. Martin NL, Beveridge TJ. Gentamicin interaction with *Pseudomonas aeruginosa* cell envelope. Antimicrob Agents Chemother. 29(6):1079-87,1986.
16. Bryan LE, Van den Elzen HM. Effects of membrane-energy mutations and cations on streptomycin and gentamicin accumulation by bacteria: a model for entry of streptomycin and gentamicin in susceptible and resistant bacteria. Antimicrob Agents Chemother.12 (2):163-77, 1977.
17. Damper PD, Epstein W. Role of the membrane potential in bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. Antimicrob Agents Chemother. 20(6):803-8, 1981.
18. Davis BD. Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides. Microbiol Rev. 51(3):341-50,1987.
19. Ramirez MS, Tolmasky ME. Aminoglycoside modifying enzymes. Drug Resist Updat.13(6):151-71, 2010.
20. Garneau-Tsodikova S, Labby KJ. Mechanisms of Resistance to Aminoglycoside Antibiotics: Overview and Perspectives. Medchemcomm. 1;7 (1):11-27, 2016.
21. Shaw KJ, Rather PN, Hare RS, Miller GH. 1993. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. Microbiol Rev 57:138-163. 24, 1993.



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



22. Oteo J, Navarro C, Cercenado E, Delgado-Iribarren A, Wilhelmi I, Orden B, García C, Miguelañez S, Pérez-Vázquez M, García-Cobos S, Aracil B, Bautista V, Campos J. Spread of *Escherichia coli* strains with high-level cefotaxime and ceftazidime resistance between the community, long-term care facilities, and hospital institutions. *J Clin Microbiol.*44(7):2359-66, 2006.
23. Okamoto S, Suzuki Y. Chloramphenicol-, dihydrostreptomycin-, and kanamycin-inactivating enzymes from multiple drug-resistant *Escherichia coli* carrying episome 'R'. *Nature.* 1965 Dec 25;208(5017):1301-3.
24. Sunada A, Nakajima M, Ikeda Y, Kondo S, Hotta K. Enzymatic 1-N-acetylation of paromomycin by an actinomycete strain #8 with multiple aminoglycoside resistance and paromomycin sensitivity. *J Antibiot (Tokyo).* 52(9):809-14, 1999.
25. Kitao T, Miyoshi-Akiyama T, Kirikae T. AAC(6')-Iaf, a novel aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase from multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 53(6):2327-34, 2009.
26. Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macielag M, Abbanat D, Park CH, et al. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med* 2006;12:83-8.
27. Finken M, Kirschner P, Meier A, Wrede A, Bottger EC. Molecular basis of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: alterations of the ribosomal protein S12 gene and point mutations within a functional 16S ribosomal RNA pseudoknot. *Mol Microbiol.* 1993 Sep;9(6):1239-46.
28. Doi Y, Arakawa Y. 16S Ribosomal RNA Methylation: Emerging Resistance Mechanism against Aminoglycosides. *Clinical Infection Diseases.* 45; 88-94, 2007.
29. Beauclerk AA, Cundliffe E. Sites of action of two ribosomal RNA methylases responsible for resistance to aminoglycosides. *J Mol Biol.* 1987 Feb 20;193(4):661-71.
30. Kojic M, Topisirovic L, Vasiljevic B. Cloning and characterization of an aminoglycoside resistance determinant from *Micromonospora zionensis*. *J Bacteriol.* 174(23):7868-72,1992.
31. Ohta T, Hasegawa M. Analysis of the nucleotide sequence of *fmrT* encoding the self-defense gene of the istamycin producer, *Streptomyces tenjimariensis* ATCC 31602; comparison with the sequences of *kamB* of *Streptomyces tenebrarius* NCIB 11028 and *kamC* of *Saccharopolyspora hirsuta* CL102. *J Antibiot.*46(3):511-7,1993.
32. Demydchuk J, Oliynyk Z, Fedorenko V. Analysis of a kanamycin resistance gene (*kmr*) from *Streptomyces kanamyceticus* and a mutant with increased aminoglycoside resistance. *J Basic Microbiol.* 38(4):231-9, 1998
33. Washino J, Arakawa Y. Exogenously acquired 16S rRNA Methyltransferases found in Aminoglycoside-resistance Pathogenic Gram-negative bacteria: An update. *Drug Resistance Update.* 15:133-148, 2012.
34. Gołębiewski M, Kern-Zdanowicz I, Zienkiewicz M, Adamczyk M, Zylinska J, Baraniak A, Gniadkowski M, Bardowski J, Cegłowski P. Complete nucleotide sequence of the pCTX-M3 plasmid and its involvement in spread of the extended-spectrum beta-lactamase gene *blaCTX-M-3*. *Antimicrob Agents Chemother.* 51(11):3789-95, 2007.
35. Yokoyama K, Doi Y, Yamane K, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K, Yagi T, Kato H, Arakawa Y. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet.* 6;362(9399):1888-93,2003.
36. Doi Y, Yokoyama K, Yamane K, Wachino J, Shibata N, Yagi T, Shibayama K, Kato H, Arakawa Y. Plasmid-mediated 16S rRNA methylase in *Serratia marcescens* conferring high-level resistance to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother.* 48(2):491-6, 2004.



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



37. Wachino J, Yamane K, Shibayama K, Kurokawa H, Shibata N, Suzuki S, Doi Y, Kimura K, Ike Y, Arakawa Y. Novel plasmid-mediated 16S rRNA methylase, RmtC, found in a proteus mirabilis isolate demonstrating extraordinary high-level resistance against various aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother.* 50(1):178-84, 2006.
38. Wachino J, Shibayama K, Kurokawa H, Kimura K, Yamane K, Suzuki S, Shibata N, Ike Y, Arakawa Y. Novel plasmid-mediated 16S rRNA m1A1408 methyltransferase, NpmA, found in a clinically isolated Escherichia coli strain resistant to structurally diverse aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother.* 51(12):4401-9, 2007
39. Doi Y, De Oliveira García D, Adams J, Paterson DL. Coproduction of novel 16S rRNA methylase RmtD and metallo-beta-lactamase SPM-1 in a panresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 51(3):852-6, 2007.
40. Davis MA, Baker KN, Orfe LH, Shah DH, Besser TE, Call DR. Discovery of a gene conferring multiple-aminoglycoside resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 54(6):2666-9, 2010.
41. Galimand M, Courvalin P, Lambert T. RmtF, a new member of the aminoglycoside resistance 16S rRNA N7 G1405 methyltransferase family. *Antimicrob Agents Chemother.* 56(7):3960-2, 2012.
42. Bueno Mf, Francisco Gr, O'Hara Ja, De Oliveira García D, Doi Y. Coproduction of 16S rRNA methyltransferase RmtD or RmtG with KPC-2 and CTX-M group extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 57(5):2397-400, 2013.
43. O'Hara JA, McGann P, Snesrud EC, Clifford RJ, Waterman PE, Lesho EP, Doi Y. Novel 16S rRNA methyltransferase RmtH produced by *Klebsiella pneumoniae* associated with war-related trauma. *Antimicrob Agents Chemother.* 57(5):2413-6, 2013.
44. Zhao WS, Liu GY, Mi ZH, Zhang F. Coexistence of blaOXA-23 with armA and novel gyrA mutation in a pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolate from the blood of a patient with haematological disease in China. *J Hosp Infect.* 77(3):278-9, 2011.
45. Al Sheikh YA, Marie MA, John J, Krishnappa LG, Dabwab KH. Prevalence of 16S rRNA methylase genes among  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae clinical isolates in Saudi Arabia. *Libyan J Med.* 7; 9:24432, 2014.
46. Mezzatesta ML, Gona F, Caio C, Adembri C, Dell'Utri P, Santagati M, Stefani S. Emergence of an extensively drug-resistant ArmA- and KPC-2-producing ST101 *Klebsiella pneumoniae* clone in Italy. *J Antimicrob Chemother.* 68(8):1932-4, 2013.
47. Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Kato Y, Ohmagari N, Takeshita N, Hung NV, Phuong DM, Thu TA, Binh NG, Anh NQ, Nga TT, Truong PH, Xuan PT, Thu Le TA, Son NT, Kirikae T. Emergence of 16S rRNA methylase-producing *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in hospitals in Vietnam. *BMC Infect Dis.* 30;13: 251, 2013
48. Liou GF, Yoshizawa S, Courvalin P, Galimand M. Aminoglycoside resistance by ArmA-mediated ribosomal 16S methylation in human bacterial pathogens. *J Mol Biol.* 2;359(2):358-64, 2006.
49. Quiles MG, Rocchetti TT, Fehlberg LC, Kusano EJ, Chebabo A, Pereira RM, Gales AC, Pignatari AC. Unusual association of NDM-1 with KPC-2 and armA among Brazilian Enterobacteriaceae isolates. *Braz J Med Biol Res.* 48(2):174-7, 2015.
50. Galimand M, Sabtcheva S, Courvalin P, Lambert T. Worldwide disseminated armA aminoglycoside resistance methylase gene is borne by composite transposon Tn1548. *Antimicrob Agents Chemother.* 49(7):2949-53, 2005.



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



51. Périchon B, Bogaerts P, Lambert T, Frangeul L, Courvalin P, Galimand M. Sequence of conjugative plasmid pIP1206 mediating resistance to aminoglycosides by 16S rRNA methylation and to hydrophilic fluoroquinolones by efflux. *Antimicrob Agents Chemother.* 52(7):2581-92, 2008
52. Lioy VS, Goussard S, Guérineau V, Yoon EJ, Courvalin P, Galimand M, Grillot-Courvalin C. Aminoglycoside resistance 16S rRNA methyltransferases block endogenous methylation, affect translation efficiency and fitness of the host. *RNA.* 20(3):382-91, 2014.
53. Galani I, Souli M, Panagea T, Poulakou G, Kanellakopoulou K, Giamarellou H. Prevalence of 16S rRNA methylase genes in *Enterobacteriaceae* isolates from a Greek university hospital. *Clin Microbiol Infect.* 18(3):E52-4, 2012.
54. Zhou Y, Yu H, Guo Q, Xu X, Ye X, Wu S, Guo Y, Wang M. Distribution of 16S rRNA methylases among different species of Gram-negative bacilli with high-level resistance to aminoglycosides. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 29(11):1349-53, 2010.
55. Hopkins KL, Escudero JA, Hidalgo L, Gonzalez-Zorn B. 16S rRNA methyltransferase RmtC in *Salmonella enterica* serovar Virchow. *Emerg Infect.* 16(4):712-5, 2010.
56. Lee CS, Vasoo S, Hu F, Patel R, Doi Y. *Klebsiella pneumoniae* ST147 coproducing NDM-7 carbapenemase and RmtF 16S rRNA methyltransferase in Minnesota. *J Clin Microbiol.* 52(11):4109-10, 2014.
57. Fritsche TR, Castanheira M, Miller GH, Jones RN, Armstrong ES. Detection of methyltransferases conferring high-level resistance to aminoglycosides in enterobacteriaceae from Europe, North America, and Latin America. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 May;52(5):1843-5.
58. Poirel L, Labarca J, Bello H, Rioseco ML, Bernabeu S, Nordmann P. Emergence of the 16S rRNA methylase RmtG in an extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing and colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolate in Chile. *Antimicrob Agents Chemother.* 58(1):618-9, 2014.
59. Tijet N., Andres P., Chung C., Lucero C.; WHONET-ARGENTINA GROUP, Low DE, Galas M., Corso A., Petroni A., Melano R.G. rmtD2, a new allele of a 16S rRNA methylase gene, has been present in Enterobacteriaceae isolates from Argentina for more than a decade. *Antimicrob Agents Chemother.* 55(2):904-9, 2011.
60. Yamane K, Rossi F, Barberino MG, Adams-Haduch JM, Doi Y, Paterson DL. 16S ribosomal RNA methylase RmtD produced by *Klebsiella pneumoniae* in Brazil. *J Antimicrob Chemother.* 61(3):746-7, 2008.
61. Leigue L, Warth JF, Melo LC, Silva KC, Moura RA, Barbato L, Silva LC, Santos AC, Silva RM, Lincopan N. MDR ST2179-CTX-M-15 *Escherichia coli* co-producing RmtD and AAC(6')-Ib-cr in a horse with extraintestinal infection, Brazil. *J Antimicrob Chemother.* 70(4):1263-5, 2015.
62. Ramos PI, Picão RC, Almeida LG, Lima NC, Girardello R, Vivan AC, Xavier DE, Barcellos FG, Pelisson M, Vespero EC, Médigue C, Vasconcelos AT, Gales AC, Nicolás MF. Comparative analysis of the complete genome of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* Kp13 reveals remarkable genome plasticity and a wide repertoire of virulence and resistance mechanisms. *BMC Genomics.* 22;15:54, 2014.
63. Francisco GR, Nora ST, Bueno MF, Da Silva Filho LV, De Oliveira García D. Identification of aminoglycoside-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing RmtG 16S rRNA methyltransferase in a cystic fibrosis patient. *Antimicrob Agents Chemother.* 59(5):2967-8, 2015.
64. Hu F, Munoz-Price LS, Depascale D, Rivera JI, Doi Y. *Klebsiella pneumoniae* sequence type 11 isolate producing RmtG 16S rRNA methyltransferase from a patient in Miami, Florida. *Antimicrob Agents Chemother.* 58(8):4980-1, 2014



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



65. MacFarlane EL, Kwasnicka A, Hancock RE. Role of *Pseudomonas aeruginosa* PhoP-phoQ in resistance to antimicrobial cationic peptides and aminoglycosides. *Microbiology*.146 ( Pt 10):2543-54, 2000.
66. Kwon DH, Lu CD. *Polyamines induce resistance to cationic peptide, aminoglycoside, and quinolone antibiotics in Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Antimicrob Agents Chemother*. 50(5):1615-22, 2006.
67. Fernández L, Gooderham WJ, Bains M, McPhee JB, Wiegand I, Hancock RE. Adaptive resistance to the "last hope" antibiotics polymyxin B and colistin in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by the novel two-component regulatory system ParR-ParS. *Antimicrob Agents Chemother*. 54(8):3372-82, 2010.
68. Fernández L, Hancock RE. Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. *Clin Microbiol Rev*. 2012 Oct; 25 (4):661-81. Review. Erratum in: *Clin Microbiol Rev*. 2013.
69. Groisman EA, Kayser J, Soncini FC. Regulation of polymyxin resistance and adaptation to low-Mg<sup>2+</sup> environments. *J Bacteriol*. 179(22):7040-5, 1997.
70. Kristich CJ, Rice LB, Arias CA. Enterococcal Infection—Treatment and Antibiotic Resistance. 2014 Feb 6. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N, editors. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection* [Internet]. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary; 2014.
71. Poole K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother*. 56(1):20-51, 2005.
72. Nikaido H. Structure and mechanism of RND-type multidrug efflux pumps. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*. 77:1-60. 2011.
73. Lister PD, Wolter DJ, Hanson N. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev*. 22(4): 582-610, 2009.
74. Coyne S, Courvalin P, Périchon B. Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. *Antimicrob Agents Chemother*. 55(3):947-53, 2011.
75. Su Xz, Chen J, Mizushima T, Kuroda T, Tsuchiya T. AbeM, an H<sup>+</sup>-coupled *Acinetobacter baumannii* multidrug efflux pump belonging to the MATE family of Transporters. *Antimicrob Agents Chemother*. 49(10):4362-4, 2005.
76. McGann P, Chahine S, Okafor D, Ong AC, Maybank R, Kwak YI, Wilson K, Zapor M, Lesho E, Hinkle M. Detecting 16S rRNA Methyltransferases in Enterobacteriaceae by Use of Arbekacin. *J Clin Microbiol*. 54(1):208-11, 2016.
77. Hidalgo L, Hopkins KL, Gutierrez B, Ovejero CM, Shukla S, Douthwaite S, et al. Association of the novel aminoglycoside resistance determinant RmtF with NDM carbapenemase in Enterobacteriaceae isolated in India and the UK. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68:1543-50.



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



## 8. Glicilciclinas

**Rodrigo Cayô da Silva**

Biólogo Microbiólogo y PostDoctor en Ciencias Básicas,  
Supervisor del Laboratorio ALERTA e Investigador Asociado de la Disciplina de Infectología,  
Departamento de Medicina, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)  
Brasil

**Ana Cristina Gales**

Profesora Adjunta de Infectología del Departamento de Medicina de la  
Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo.  
Investigadora 1A del Consejo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (CNPq)  
Miembro de la Cámara Técnica de Resistencia Microbiana (CATREM),  
Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria (ANVISA)  
Coordinadora clínica del Consejo Brasileiro de Susceptibilidad Antimicrobiana (BrCAST)  
Brasil

### 8.1. Breve Historia y Surgimiento de las Glicilciclinas

Las tetraciclinas son antimicrobianos que presentan un amplio espectro de actividad antimicrobiana, además de un perfil farmacocinético favorable, aliado a eventos adversos mínimos<sup>5,19</sup>. La primera tetraciclina lanzada fue la clortetraciclina, en 1948 (**Figura 1A**); en las décadas siguientes fueron lanzadas la tetraciclina (1953; **Figura 1C**), la doxiciclina (1967; **Figura 1D**) y la minociclina (1971; **Figura 1E**)<sup>19</sup>. Sin embargo, se ha limitado drásticamente el uso de estos antimicrobianos debido al surgimiento de resistencia causada por sistemas de eflujo y protección del sitio blanco ribosómico<sup>11,19,20,22,35</sup>. Actualmente, su uso se restringe al tratamiento de infecciones causadas por bacterias que aún mantienen sensibilidad a estos compuestos, como: rickettsiosis, enfermedades sexualmente transmisibles y acné. No obstante, la prescripción de estos antimicrobianos se utiliza únicamente para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias Gram-negativas, mediante la sensibilidad comprobada por antibiograma, ya que es totalmente desaconsejado el uso de estos compuestos como terapia empírica.

A fines de la década del 80, se reabrió el programa de desarrollo de nuevas tetraciclinas, enfocado en análogos que presentaran modificaciones en las posiciones C-7 y C-9 (**núcleo naftalénico - Figura 1**), buscando compuestos que presentaran actividad frente a aislamientos resistentes a las tetraciclinas<sup>5,19</sup>. De esta forma, surgió el desarrollo de la clase de las glicilciclinas, en este escenario, como forma de ocupar el espacio dejado por sus antecesores. Dadas las grandes similitudes



redEMC  
Infectología



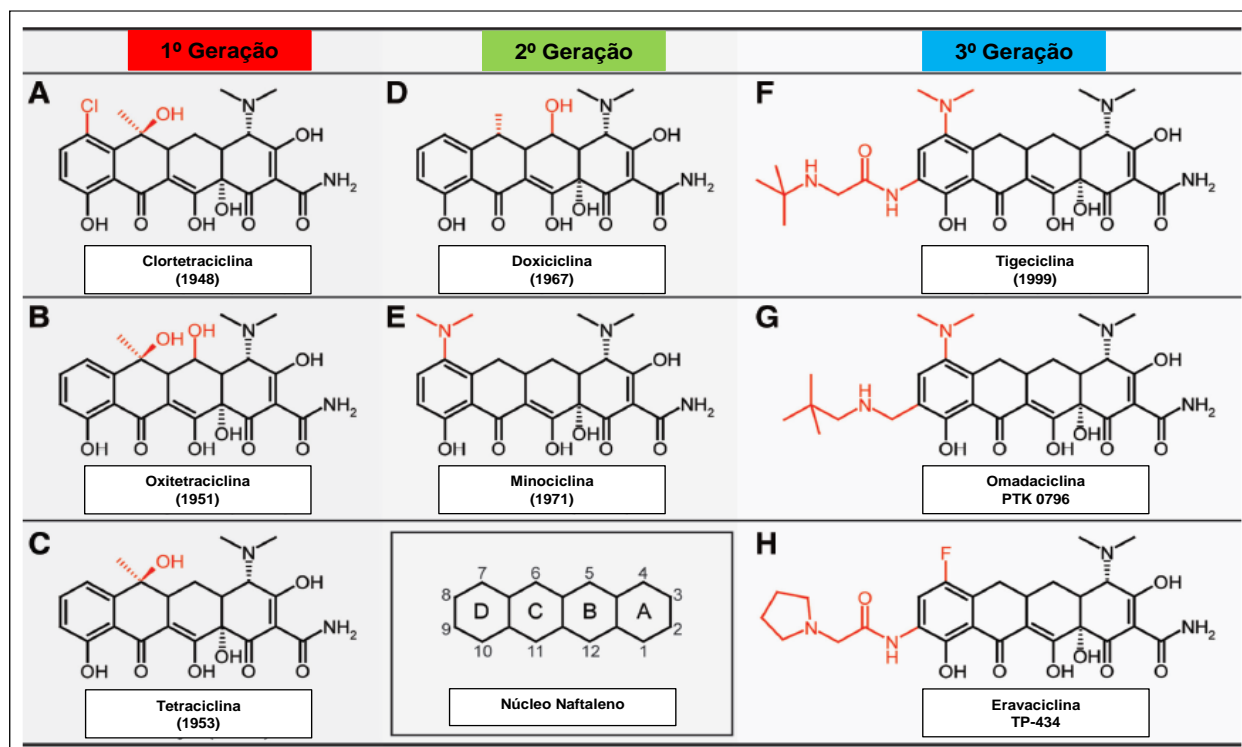
UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



estructurales entre las tetraciclinas (**Figura 1A-E**) y las glicilciclinas (**Figura 1F**)<sup>19,28,32,36</sup>, como más adelante se mostrará, se las puede clasificar como tetraciclinas de tercera generación, junto con otras dos nuevas clases de antimicrobianos análogos de las tetraciclinas: las aminometilciclinas y las fluorociclinas, cuyos respectivos representantes, la omadaciclina (**Figura 1G**) y la eravaciclina (**Figura 1H**) se encuentran aún en fase III de los estudios clínicos. Todos estos compuestos presentan la inclusión de diferentes grupos en la posición C-9 de la molécula de minociclina (**Figuras F-H**), específicamente un grupo t-butilglicilamida, en el caso de la tigeciclina (**Figura 1F**)<sup>21,36</sup>. Estas modificaciones le han conferido a estos nuevos agentes un espectro de actividad más amplio, permitiendo evadir los mecanismos de resistencia que afectaron drásticamente el uso de las tetraciclinas en la práctica clínica (ítem 1.3)<sup>5,19</sup>. Al mismo tiempo, como las glicilciclinas, las aminometilciclinas y las fluorociclinas presentan características farmacocinéticas y farmacodinámicas distintas de las tetraciclinas de primera y segunda generación<sup>20,26,28,37</sup>, son, por este motivo, consideradas apropiadamente como nuevas clases de antimicrobianos<sup>19</sup>.

En el presente capítulo, por cuestiones didácticas y por la similitud estructural, seguiremos el modelo de clasificación de las tetraciclinas propuesto por Nguyen y colaboradores (2014)<sup>19</sup>.



**Figura 1.** Comparación de las estructuras químicas y clasificación de las tetraciclinas. Los números entre paréntesis indican el año en que se descubrió o informó el antimicrobiano. Estos compuestos fueron aislados

© Curso online "Interpretación del Antibiograma en la práctica clínica diaria"



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



de las siguientes especies de *Streptomyces*: **(A)** *S. aureofaciens*, **(B)** *S. rimosus* y **(C)** *S. aureofaciens/S. rimosus*. Los demás antimicrobianos **(E, F, G y H)** son modificaciones estructurales de los compuestos anteriores. **(A-C)** Primera generación de tetraciclinas, **(D-E)** Segunda generación de tetraciclinas y **(F-H)** Tercera generación de tetraciclinas (glicilciclinas, aminometilciclinas y fluorociclinas). La inserción del núcleo naftalénico DCBA le proporciona el orden de numeración de los átomos de carbono a los cuatro anillos aromáticos nombrados **A a D**.

Figura modificada de Nguyen *et al.* Biol Chem. 2014;395(5):559-75<sup>19</sup>.

La tigeciclina es el primer miembro de las glicilciclinas aprobado para uso clínico por la *Food and Drug Administration* (FDA), en junio de 2005, y por la *European Medicines Agency* (EMA), en mayo de 2006<sup>12,27,29,32</sup>. Se indica su uso para el tratamiento de neumonía adquirida en la comunidad, infecciones de piel y partes blandas e infecciones intraabdominales complicadas en pacientes con más de 18 años de edad<sup>12,18,20,26,29,32,36</sup>. Además, puede constituir una buena opción terapéutica para aquellos pacientes alérgicos a la penicilina<sup>12,20,26,27,29</sup>. La tigeciclina ha demostrado potente actividad antibacteriana *in vitro* frente a una variedad de bacterias aerobias y anaerobias Gram-positivas y Gram-negativas de importancia clínica, como: *Staphylococcus aureus* (sensible o resistente a oxacilina), *Enterococcus* spp. (incluyendo aislamientos resistentes a vancomicina), *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Fusobacterium* spp., *Prevotella* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Bacteroides fragilis* y la mayoría de las especies de Enterobacteriaceae (incluyendo aislamientos productores de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido -  $\beta$ LEE)<sup>8,12,18,20,27,36</sup>. Pese a ello, la tigeciclina no posee actividad contra aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp. y *Morganella morganii*<sup>8,19,20,28,30,32,36</sup>.

## 8.2. Mecanismo de Acción de las Glicilciclinas

Las glicilciclinas son, en general, bacteriostáticas, y actúan inhibiendo la síntesis proteica bacteriana, así como las demás tetraciclinas<sup>8,12,19,36</sup>. El comienzo de la síntesis de proteínas supone la formación de un ribosoma 70S, compuesto por una subunidad 30S y una subunidad 50S, el ARNt iniciador (típicamente fMet-ARNt) y el codón de inicio (generalmente, AUG) del ARNm, debidamente ubicado en el sitio P<sup>35</sup>. El ciclo de elongación incluye la entrega por parte del factor de elongación Tu (EF-Tu) del aminoacil-ARN (aa-ARNt) al sitio A del ribosoma. De acuerdo con los codones presentes en el ARNm, se unen los respectivos ARNt, dando prosecución a la síntesis proteica. En el ribosoma ocurre la formación de la unión peptídica entre los ARNt ubicados en los sitios A y P y sucede la





redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



translocación del ARNt, catalizada por el factor EF-G, que permite la elongación de la cadena polipeptídica naciente<sup>35</sup>. Las etapas finales de terminación de la síntesis proteica y de reciclaje consisten en la liberación de la cadena polipeptídica recién formada y la subsiguiente disociación del ribosoma 70S, seguido del reciclaje de los componentes para el próximo ciclo de iniciación<sup>35</sup>.

Las gliciliclinas actúan uniéndose reversiblemente a la subunidad ribosómica 30S bacteriana de 10-100 veces más que la tetraciclina, bloqueando la entrada de moléculas de aminoacil-ARNt al sitio A ribosómico<sup>8,11,19</sup>. De esa forma, los residuos de aminoácidos se ven impedidos de incorporarse a la cadena peptídica en formación, inhibiendo la síntesis proteica bacteriana<sup>8,11,19</sup>. De igual forma que las tetraciclinas y las gliciliclinas, distintas clases de antimicrobianos actúan inhibiendo la síntesis proteica en las diferentes etapas de este proceso (iniciación, elongación, terminación y reciclaje) esencial del ciclo de vida bacteriano<sup>35</sup>. La gran mayoría de los antimicrobianos inhibe la fase de elongación, como los aminoglucósidos, el cloranfenicol, el ácido fusídico, las lincosamidas, los macrólidos, las oxazolidinonas, las estreptograminas, además de las gliciliclinas y tetraciclinas. Son pocos los antimicrobianos que actúan inhibiendo la etapa de iniciación, y esos compuestos presentan limitaciones de uso clínico debido a las especificidades de las drogas (edeína y pactamicina), toxicidad (evernimicina) y solubilidad (tiopéptidos y termorubin). Es raro que los compuestos, como el ácido fusídico y blastidina-S, actúen tanto en la etapa de terminación como en la etapa de reciclaje<sup>35</sup>.

### 8.3. Mecanismos de Resistencia a las Gliciliclinas

La mayoría de las veces, la tigeciclina no se ve afectada por los cuatro mecanismos de resistencia adquiridos descritos para las tetraciclinas de primera y segunda generación, codificados, principalmente, por los genes del tipo *tet* (**Tabla 1**)<sup>11,19,20,22,35</sup>. Sin embargo, algunos de esos mecanismos pueden afectar débilmente su actividad (genes/mutaciones en rojo - **Tabla 1**)<sup>19,35</sup>. Además, algunas bacterias pueden presentar resistencia intrínseca a las tetraciclinas más antiguas, asociado a impermeabilidad de membrana celular o a la presencia de transportadores de membrana, si bien estos mecanismos no comprometen la actividad de las gliciliclinas<sup>19</sup>.



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



Mecanismos de Resistencia	Genes/Mutaciones
Sistemas de eflujo	<i>tetA, tetB, tetC, tetD, tetE, tetG, tetH, tetJ, tetK, tetL, tetA(P), tetV, tetY, tetZ, tet30, tet31, tet33, tet35, tet38, tet39, tet40, tet41, tet42, tet45, tetAB(46), tcr3, otrB, otrC</i>
Protección del sitio blanco (ribosoma)	<i>tetM, tetO, tetQ, tetS, tetT, tetW, tetB(P), tet32, tet36, tet44, otrA, tet</i>
Degradación enzimática	<i>tetX</i> y <i>tet37</i>
Mutación del sitio blanco (16S ARNr)	G1058C, A926T, G928C, ΔG942

**Tabla 1.** Diferentes mecanismos de resistencia a las tetraciclinas que se han descrito hasta el momento. Tabla adaptada de Nguyen *et al.* Biol Chem. 2014;395(5):559-75<sup>19</sup>.

El principal mecanismo de resistencia adquirida a las tetraciclinas es el eflujo activo del antimicrobiano<sup>11,19,20,35</sup>. Dichos sistemas de eflujo específicos para la eyección de las tetraciclinas ya han sido descritos, tanto en bacterias Gram-positivas como en bacterias Gram-negativas (**Tabla 1**), y se los ha agrupado en siete grupos diferentes, de acuerdo con la homología entre sus secuencias<sup>14</sup>. Si bien la mayoría de estos sistemas puede conferir resistencia a la tetraciclina, estos son menos activos contra las tetraciclinas de segunda generación e, incluso, menos aún frente a las gliciliclinas<sup>19</sup>. Se cree que tales compuestos no sean reconocidos como sustrato por esos sistemas de eflujo, manteniendo así su actividad frente a aislamientos resistentes a las tetraciclinas<sup>11,19</sup>. No obstante ello, mutaciones *in vitro* en los genes *tetA* y *tetB* produjeron disminución de la sensibilidad a tigeciclina, aunque dichas mutaciones hayan causado resistencia a las demás tetraciclinas<sup>13</sup>.

El segundo mecanismo de resistencia a las tetraciclinas en importancia son las proteínas de protección del ribosoma, que se unen a este y remueven al antimicrobiano desde su lugar de unión; han sido informadas, hasta el momento, 12 clases diferentes, de ellas, la TetO y la TetM son las más importantes<sup>11,19,35</sup>. Se cree que las proteínas de protección del ribosoma se deriven de *otrA* (**Tabla 1**), que confiere resistencia a la tetraciclina en *S. rimosus*, productor natural de oxitetraciclina (**Figura 1B**)<sup>9</sup>. Las gliciliclinas, como la tigeciclina, no se ven afectadas por la acción de estas proteínas<sup>19,36</sup>.

Con la inclusión del grupo t-butilglicilamida en la posición C-9 de la molécula de minociclina,



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



probablemente se provoque algún impedimento de repulsión de la molécula de tigeciclina, previniendo, de esta forma, su sustitución por proteínas de protección del ribosoma<sup>11,19</sup>. Asimismo, dichas proteínas no afectan a la tigeciclina, porque se ligan al ribosoma cinco veces más que las tetraciclinas<sup>11,19</sup>.

Se han descrito también otros dos mecanismos, menos frecuentes. El primero consiste en la producción de monooxigenasas dependientes de FAD, codificadas por dos genes distintos (*tetX* y *tet37*) y que promueven la modificación de las tetraciclinas, disminuyendo su afinidad por el ribosoma, que produce la degradación posterior de estos antimicrobianos<sup>11,19,35</sup>.

Al actuar dichas enzimas únicamente en presencia de O<sub>2</sub>, se verifica su producción solo en bacterias aerobias<sup>19,35</sup>. Como las monooxigenasas modifican los anillos A y B del núcleo naftalénico (**Figura 1**), comunes a todas las tetraciclinas y sus análogos, dichas enzimas son también capaces de modificar las moléculas de las gliciliclinas<sup>19,35</sup>. Sin embargo, estudios *in vitro* demostraron que TetX fue capaz de aumentar las CIM de tigeciclina de 0,5 a 2 µg/ml, sugiriendo que, aunque la tigeciclina sea un sustrato para TetX, la reacción enzimática se ve severamente perjudicada frente a la tigeciclina, comparada con la tetraciclina<sup>15</sup>. El último mecanismo sería las mutaciones en el gen *16S ARNr*, fundamentalmente G1058C, que reducen la afinidad de ligación de la tetraciclina, minociclina y doxiciclina por el sitio ribosomal<sup>11,19,35</sup>. Si bien, *in vitro*, las mutaciones triples en el gen *16S ARNr* pueden determinar aumento de la CIM para tigeciclina y tetraciclina, la CIM<sub>90</sub> para tigeciclina es todavía 16 veces más baja, cuando se la compara con la CIM<sub>90</sub> para tetraciclina<sup>1</sup>.

Aunque los sistemas de eflujo codificados por los genes *tet*, pertenecientes a la superfamilia *Major Facilitator Superfamily* (MFS), tengan poco impacto sobre la resistencia a gliciliclinas<sup>11,19</sup>, no se verifica lo mismo en aquellos que pertenecen a la superfamilia *Resistance-Nodulation-Cell Division* (RND)<sup>7,11,16,20,25,34</sup>. La superfamilia RND está compuesta por sistemas tripartitos, formados por una proteína de membrana externa (porina), por una proteína transmembrana de fusión y por una bomba de eflujo<sup>7</sup>. Esos sistemas son exclusivos de bacterias Gram-negativas<sup>7</sup> y son un factor determinante en la resistencia a la tigeciclina de esos microorganismos<sup>7,11,16,20,25,34</sup>, como se verá a continuación.

Los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* son intrínsecamente resistentes a la tigeciclina, debido a que este antimicrobiano es eyectado por los sistemas de eflujo de la familia RND MexAB-OprM y



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



MexXY-OprMla<sup>11,12,23</sup>. De modo similar, la actividad de la tigeciclina se ve drásticamente comprometida en aislamientos clínicos de *P. mirabilis*, *Providencia* spp. y *Morganella morganii* debido a la hiperexpresión de AcrAB<sup>11,12,20,28,30</sup>, el principal sistema de eflujo de la superfamilia RND que se encuentra en las especies de Enterobacteriaceae<sup>23</sup>. Además de lo anterior, varios estudios informaron que la hiperexpresión de AcrAB en aislamientos clínicos de *Escherichia coli*<sup>25</sup>, *Klebsiella* spp.<sup>25</sup>, *Enterobacter* spp.<sup>34</sup> y *Salmonella* spp.<sup>16</sup>, asociado o no a mutaciones en los genes reguladores de este sistema (*ramA*, *ramR* y *marA*), está relacionada con la resistencia o disminución de la sensibilidad a la tigeciclina<sup>23</sup>. En aislamientos de *Acinetobacter baumannii*, se responsabilizó a los sistemas de eflujo AdeABC, AdeFGH y AdeIJK por la resistencia a la tigeciclina<sup>6,7</sup>. Asimismo, Chen y colaboradores (2014) observaron, en mutantes de la cepa ATCC19606 de *A. baumannii* resistentes a tigeciclina inducidos *in vitro*, la presencia de mutaciones en el gen *trm* (*Tigecycline Resistance Methyltransferase*)<sup>4</sup>. Luego de insertar plásmidos transportadores del gen *trm* “salvaje” en las cepas mutantes, los autores observaron la restitución de la sensibilidad a la tigeciclina, y concluyeron que las mutaciones en ese gen estarían relacionadas con la disminución de la sensibilidad a este antimicrobiano en aislamientos de *A. baumannii*<sup>4</sup>. Recientemente, Costello y colaboradores (2016) evaluaron los mecanismos de resistencia a la tigeciclina en 102 cepas clínicas de *A. baumannii*, aisladas en seis países de América Latina, que presentaban CIM >2 µg/ml<sup>6</sup>. En dicho estudio, los autores observaron que entre los aislamientos que presentaban altas CIM para tigeciclina (n=18), todos presentaron hiperproducción de AdeABC, y tres aislamientos hiperprodujeron AdeFGH. Se observaron, incluso, mutaciones en los genes *adeS* (n=11), *adeR* (n=5) y *trm* (n=8), habiéndose, incluso, verificado en este último (n=3) la presencia de secuencias de inserción que codificaron proteínas no funcionales<sup>6</sup>.

Si bien en la resistencia a la tigeciclina en bacilos Gram-negativos pueden estar involucrados diversos mecanismos de resistencia a esos antimicrobianos, el principal de ellos, dentro de ese grupo de microorganismos, es la hiperexpresión de sistemas de eflujo de la superfamilia RND<sup>20,23</sup>.

## 8.4. Detección en Laboratorio del Fenotipo de Resistencia a las Gliciliclinas

De manera similar a lo que ocurre con las polimixinas, la concentración de cationes en medio Müller-Hinton (MH) también puede interferir en los resultados que se obtienen en las pruebas de

redEMC  
InfectologíaUNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAYGESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA

sensibilidad a tigeciclina<sup>23</sup>, produciendo resultados discrepantes, cuando se los compara con las metodologías de difusión en disco y E-test® (tira de gradiente) con el método de referencia (microdilución en caldo)<sup>2,10,24,33</sup>. Además, la tigeciclina puede sufrir degradación por un proceso de oxidación que causa la pérdida de su potencia.<sup>3</sup> Por ello, se recomienda que el caldo o ágar MH que vaya a ser utilizado para la prueba de sensibilidad sea preparado en el momento en que se vaya a usar o con un máximo de 12 horas de antecedencia<sup>3,10</sup>.

Si bien inicialmente se mostró una excelente concordancia entre los resultados del E-test® a la tigeciclina, comparado con los de microdilución en caldo y dilución en ágar<sup>2</sup>, posteriormente se demostró que las altas concentraciones de manganeso ( $Mn^{2+}$ ) en el medio MH son capaces de aumentar las CIM para tigeciclina en hasta 12 veces<sup>10</sup>. El mismo estudio también verificó que las concentraciones de  $Mn^{2+}$  variaban considerablemente dependiendo del fabricante del medio MH utilizado<sup>10</sup>. Por tal motivo, sería necesario ajustar la concentración de  $Mn^{2+}$  en el medio antes de que este sea utilizado para la prueba de sensibilidad. Todavía según estos autores, aún se desconoce el mecanismo por el cual el  $Mn^{2+}$  interferiría, *in vitro*, en la actividad de la tigeciclina, si bien ellos han sugerido una posible relación con la formación de complejos entre la tigeciclina y el  $Mn^{2+}$ , y/o que el propio  $Mn^{2+}$  induciría un aumento de la expresión de los sistemas de eflujo de la familia RND involucrados en la resistencia a la tigeciclina<sup>10</sup>. Posteriormente, otro estudio demostró que para que hubiera un aumento de la CIM para tigeciclina en aislamientos de *A. baumannii* y *Enterobacteriaceae*, la concentración de  $Mn^{2+}$  debería exceder los 8 mg/l, en un medio MH<sup>33</sup>. No obstante lo cual, concluyen los autores que eso probablemente no interferiría en la actividad *in vivo* de la tigeciclina, dado que la concentración sérica del  $Mn^{2+}$  es muchísimo menor que aquella que se preconiza para los medios de cultivo utilizados en las pruebas de sensibilidad<sup>33</sup>. Pese a ello, Qu y colaboradores (2014) demostraron que aunque las CIM de tigeciclina en aislamientos de *A. baumannii* variaran de acuerdo con los diferentes medios MH estudiados, la concentración de  $Mn^{2+}$  parecía ser irrelevante, ya que no se observaron alteraciones en las CIM de tigeciclina cuando se efectuaron pruebas con concentraciones crecientes de  $Mn^{2+}$ , zinc y magnesio en el medio MHm<sup>24</sup>.

En relación con los sistemas automatizados, un estudio recientemente publicado evaluó 241 aislamientos de *Enterobacteriaceae*, categorizados previamente como no sensibles a tigeciclina, mediante el Vitek2, frente a diferentes pruebas de sensibilidad: BD Phoenix, MicroScan-WalkAway, E-test® y difusión en disco<sup>17</sup>. Se compararon todos los resultados con los del método de referencia



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



(microdilución en caldo). De los 241 aislamientos que el Vitek2 consideró como no sensibles a tigeciclina, 40,2% y 53,3% fueron sensibles vía el método de referencia, de acuerdo con los puntos de corte preconizados por EUCAST y por FDA, respectivamente<sup>17</sup>. La concordancia de categoría (CA) de sensibilidad entre la microdilución en caldo y las metodologías Vitek2, Phoenix, MicroScan-WalkAway, E-test® y difusión en disco fue del 41,5%, 58,9%, 72,2%, 34,4% y 59,3%, respectivamente. Asimismo, el E-test® presentó mejor CA comparado con el M.I.C.E.<sup>®17</sup>.

EUCAST recomienda la prueba de sensibilidad a tigeciclina solo para Enterobacteriaceae, mientras que para aislamientos de *Acinetobacter* spp. no existen puntos de corte de ese antimicrobiano, habiéndose incluido la observación de que no existe evidencia suficiente que permita inferir la actividad de la tigeciclina frente a aislamientos clínicos de *Acinetobacter* spp.<sup>31</sup>. Para las enterobacterias, la prueba de difusión en disco (puntos de corte - halo: S  $\geq$ 18 mm y R  $\leq$ 15 mm/discos con contenido de 15  $\mu$ g de tigeciclina) se recomienda solo para aislamientos de *Escherichia coli*<sup>31</sup>. Para las demás especies, a excepción de *Morganella* spp., *Proteus* spp. y *Providencia* spp., EUCAST recomienda únicamente la prueba de microdilución en caldo (puntos de corte - CIM: S  $\leq$ 1  $\mu$ g/ml, y R  $\geq$ 2  $\mu$ g/ml)<sup>31</sup>. Sin embargo, EUCAST resalta que para la prueba de microdilución en caldo se debe preparar el medio MH caldo el mismo día en que esta se realiza<sup>31</sup>.

## 8.5. Referencias

1. Bauer G, Berens C, Projan SJ, Hillen W. Comparison of tetracycline and tigecycline binding to ribosomes mapped by dimethylsulphate and drug-directed Fe<sup>2+</sup> cleavage of 16S rRNA. *J Antimicrob Chemother.* 2004 Apr;53(4):592-9.
2. Bolmström A, Karlsson A, Engelhardt A, Ho P, Petersen PJ, Bradford PA, Jones CH. Validation and reproducibility assessment of tigecycline MIC determinations by Etest. *J Clin Microbiol.* 2007 Aug;45(8):2474-9.
3. Bradford PA, Petersen PJ, Young M, Jones CH, Tischler M, O'Connell J. Tigecycline MIC testing by broth dilution requires use of fresh medium or addition of the biocatalytic oxygen-reducing reagent oxyrase to standardize the test method. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 Sep;49(9):3903-9.
4. Chen Q, Li X, Zhou H, Jiang Y, Chen Y, Hua X, Yu Y. Decreased susceptibility to tigecycline in *Acinetobacter baumannii* mediated by a mutation in *trm* encoding SAM-dependent methyltransferase. *J Antimicrob Chemother.* 2014 Jan;69(1):72-6.
5. Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2001 Jun;65(2):232-60.



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



6. Costello SE, Gales AC, Morfin-Otero R, Jones RN, Castanheira M. Mechanisms of Resistance, Clonal Expansion, and Increasing Prevalence of *Acinetobacter baumannii* Strains Displaying Elevated Tigecycline MIC Values in Latin America. *Microb Drug Resist*. 2016 Jun;22(4):253-8.
7. Coyne S, Courvalin P, Parichon B. Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Mar;55(3):947-53.
8. Doan TL, Fung HB, Mehta D, Riska PF. Tigecycline: a glycylycylcline antimicrobial agent. *Clin Ther*. 2006 Aug;28(8):1079-106.
9. Doyle D, McDowall KJ, Butler MJ, Hunter IS. Characterization of an oxytetracycline-resistance gene, *otrA*, of *Streptomyces rimosus*. *Mol Microbiol*. 1991 Dec;5(12):2923-33.
10. Fernández-Mazarrasa C, Mazarrasa O, Calvo J, del Arco A, Martínez-Martínez L. High concentrations of manganese in Mueller-Hinton agar increase MICs of tigecycline determined by Etest. *J Clin Microbiol*. 2009 Mar;47(3):827-9.
11. French GL. A review of tigecycline. *J Chemother*. 2008 Oct;20 Suppl 1:3-11.
12. Giamarellou H, Poulakou G. Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of tigecycline. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2011 Nov;7(11):1459-70.
13. Guay GG, Tuckman M, Rothstein DM. Mutations in the tetA(B) gene that cause a change in substrate specificity of the tetracycline efflux pump. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994 Apr;38(4):857-60.
14. Guillaume G, Ledent V, Moens W, Collard JM. Phylogeny of efflux-mediated tetracycline resistance genes and related proteins revisited. *Microb Drug Resist*. 2004 Spring;10(1):11-26.
15. Grossman TH, Starosta AL, Fyfe C, O'Brien W, Rothstein DM, Mikolajka A, Wilson DN, Sutcliffe JA. Target- and resistance-based mechanistic studies with TP-434, a novel fluorocycline antibiotic. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 May;56(5):2559-64.
16. Horiyama T, Nikaido E, Yamaguchi A, Nishino K. Roles of *Salmonella* multidrug efflux pumps in tigecycline resistance. *J Antimicrob Chemother*. 2011 Jan;66(1):105-10.
17. Idelevich EA, Büsing M, Mischnik A, Kaase M, Bekeredjian-Ding I, Becker K. False non-susceptible results of tigecycline susceptibility testing against Enterobacteriaceae by an automated system: a multicentre study. *J Med Microbiol*. 2016 May 17. doi: 10.1099/jmm.0.000281. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 27188162.
18. Kasbekar N. Tigecycline: a new glycylycylcline antimicrobial agent. *Am J Health Syst Pharm*. 2006 Jul 1;63(13):1235-43.
19. Nguyen F, Starosta AL, Arenz S, Sohmen D, Dönhöfer A, Wilson DN. Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms. *Biol Chem*. 2014 May;395(5):559-75.
20. Noskin GA. Tigecycline: a new glycylycylcline for treatment of serious infections. *Clin Infect Dis*. 2005 Sep 1;41 Suppl 5:S303-14.
21. Pereira-Maia EC, Silva PP, de Almeida WB, dos Santos HF, Marcial BL, Ruggiero R, Guerra W. Tetraciclina e Gliciliclinas: Uma visão Geral. *Quim Nova*. 2010;33(3):700-706.
22. Peterson LR. A review of tigecycline - the first glycylycylcline. *Int J Antimicrob Agents*. 2008 Dec;32 Suppl 4:S215-22.



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



23. Pournaras S, Koumaki V, Spanakis N, Gennimata V, Tsakris A. Current perspectives on tigecycline resistance in Enterobacteriaceae: susceptibility testing issues and mechanisms of resistance. *Int J Antimicrob Agents*. 2016 Jul;48(1):11-8.
24. Qu J, Zong Z, Yu R, Hu T, Ye H, Lü X. Impact of test methodology, media type and ion content on the susceptibility of *Acinetobacter* spp. to tigecycline. *J Antimicrob Chemother*. 2014 Jun;69(6):1710-1.
25. Roy S, Datta S, Viswanathan R, Singh AK, Basu S. Tigecycline susceptibility in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* causing neonatal septicaemia (2007-10) and role of an efflux pump in tigecycline non-susceptibility. *J Antimicrob Chemother*. 2013 May;68(5):1036-42.
26. Rubinstein E, Vaughan D. Tigecycline: a novel glycylycylcline. *Drugs*. 2005;65(10):1317-36.
27. Schafer JJ, Goff DA. Establishing the role of tigecycline in an era of antimicrobial resistance. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2008 Oct;6(5):557-67.
28. Scheinfeld N. Tigecycline: a review of a new glycylycylcline antibiotic. *J Dermatolog Treat*. 2005;16(4):207-12.
29. Shakil S, Akram M, Khan AU. Tigecycline: a critical update. *J Chemother*. 2008 Aug;20(4):411-9.
30. Slover CM, Rodvold KA, Danziger LH. Tigecycline: a novel broad-spectrum antimicrobial. *Ann Pharmacother*. 2007 Jun;41(6):965-72.
31. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Clinical Breakpoints. v 6.0, 2016. Available at: <http://www.eucast.org>.
32. Townsend ML, Pound MW, Drew RH. Tigecycline: a new glycylycylcline antimicrobial. *Int J Clin Pract*. 2006 Dec;60(12):1662-72.
33. Veenemans J, Mouton JW, Kluytmans JA, Donnelly R, Verhulst C, van Keulen PH. Effect of manganese in test media on in vitro susceptibility of Enterobacteriaceae and *Acinetobacter baumannii* to tigecycline. *J Clin Microbiol*. 2012 Sep;50(9):3077-9.
34. Veleba M, De Majumdar S, Hornsey M, Woodford N, Schneiders T. Genetic characterization of tigecycline resistance in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. *J Antimicrob Chemother*. 2013 May;68(5):1011-8.
35. Wilson DN. Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nat Rev Microbiol*. 2014 Jan;12(1):35-48.
36. Zhanel GG, Karlowsky JA, Rubinstein E, Hoban DJ. Tigecycline: a novel glycylycylcline antibiotic. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2006 Feb;4(1):9-25.
37. Zuckerman JM, Qamar F, Bono BR. Macrolides, ketolides, and glycylycylclines: azithromycin, clarithromycin, telithromycin, tigecycline. *Infect Dis Clin North Am*. 2009 Dec;23(4):997-1026.





redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



## 9. Macrólidos y Lincosaminas

Prof. Agdo. Dr. Rafael Vignoli<sup>1,2</sup>

Prof. Adj. Dra. Lorena Pardo<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bacteriología y Virología, Facultad de Medicina,  
Universidad de la República, Uruguay.

<sup>2</sup>Integrante del Sistema Nacional de Investigadores de Uruguay (Nivel I).

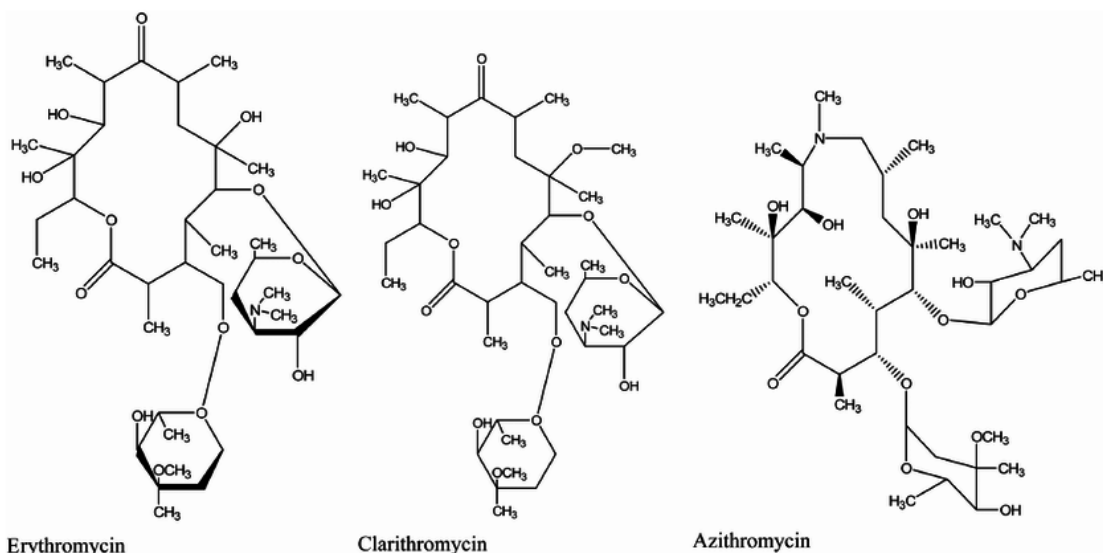
<sup>3</sup>Clínica Pediátrica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Uruguay.

### 9.1. Macrólidos

#### 9.1.1. Clasificación y estructura

Los macrólidos comprenden un conjunto de antibióticos, bacteriostáticos, compuestos por un anillo lactónico a los que se les une uno o varios azúcares mediante enlaces glucosídicos<sup>1</sup>.

Pueden ser clasificados de acuerdo a la cantidad de átomos que forman el anillo de lactona; 14 átomos eritromicina y claritromicina, 15 átomos azitromicina y 16 átomos espiramicina<sup>1</sup>. Ver **Figura 1** y **Tabla 1**.



**Figura 1.** Estructura química de los macrólidos donde se muestra el anillo lactónico y los dos aminoazúcares presentes en la eritromicina, claritromicina y azitromicina.



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



**Tabla 1**

Clasificación en relación con el número de átomos del anillo macrolactónico

14 átomos	15 átomos	16 átomos
Eritromicina Claritromicina Roxitromicina Telitromicina (cetólido)	Azitromicina (azólido)	Diacetilmidecamicina Espiramicina Josamicina

**Tabla 1.** Tomado de Cobos-Trigueros y cols <sup>1</sup>

Eritromicina, el primer macrólido utilizado cerca del año 1950 en la práctica clínica, procede de *Saccharopolyspora erythraea*. Son activos frente a bacterias Gram positivas como *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., Enterococos, algunas especies Gram negativas como *N. gonorrhoeae*, *B. pertussis* y *H. influenzae*; teniendo la ventaja adicional de actuar en microorganismos intracelulares como *Legionella* y *Chlamydia* así como con *M. pneumoniae*<sup>2</sup>.

Los derivados semisintéticos de eritromicina incluyen en una primera instancia azitromicina y claritromicina, constituyendo los macrólidos de segunda generación.

La tercera generación de este grupo de antibióticos está comprendido por los cetólidos.

Si bien los macrólidos son utilizados fundamentalmente para el tratamiento de infecciones por gram positivos; la azitromicina es dentro de estos, la que tienen mejor actividad sobre algunos gram negativos como ser *Haemophilus influenzae* y *Neisseria gonorrhoeae*. Adicionalmente se la ha propuesto como una opción terapéutica para el tratamiento de las diarreas con sangre.

### 9.1.2. Mecanismo de acción

Este grupo de antibióticos tiene como mecanismo de acción inhibir la elongación de la cadena proteica. Actúa en el ribosoma bacteriano, un complejo proteico, formado por dos subunidades nombradas de acuerdo a su coeficiente de sedimentación (30S y 50S).

La cadena proteica en formación se elonga en un dominio ubicado en la subunidad grande del ribosoma. Es en este “centro” donde se adicionan los aminoácidos que emergen del ribosoma a través de un sector llamado por algunos autores “túnel de salida”.

Los macrólidos se unen al ribosoma bacteriano en este sector, cerrando este túnel y bloqueando de esta forma la traducción de proteínas en la bacteria <sup>3,4</sup>. Ver **Figura 2**.

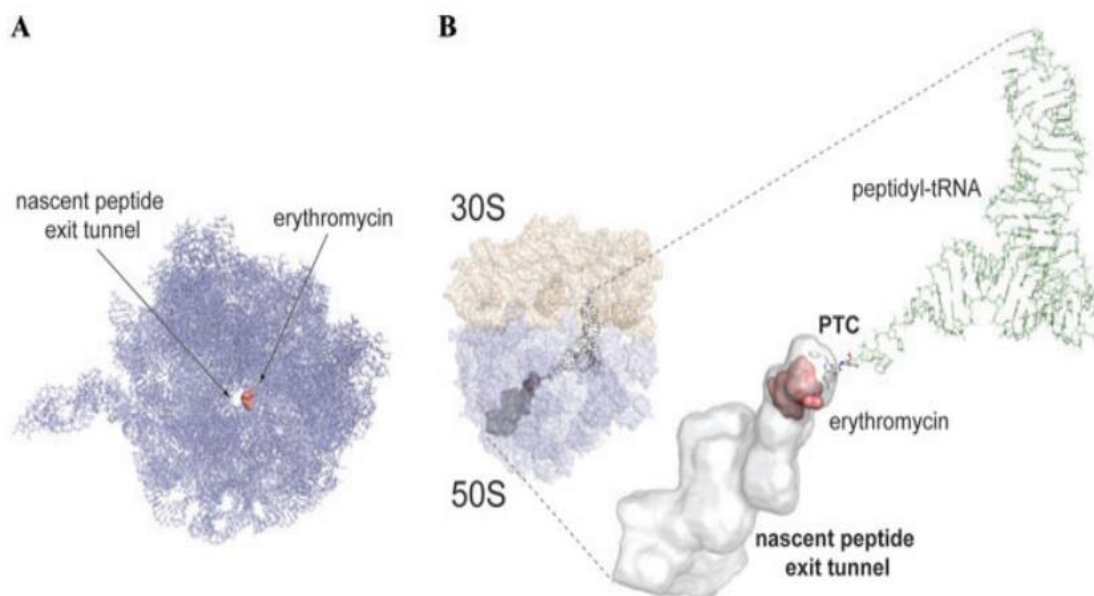


redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



**Figura 2.** Representación del mecanismo de acción de los macrólidos por obstrucción del túnel de salida. Tomada de Kannan y cols<sup>3</sup>.

Seguramente debido al gran tamaño de la subunidad 50S del ribosoma y la variabilidad inter-especie de este complejo proteico, a pesar de ser una estructura bastante conservada en los microorganismos; no todos los macrólidos se unen exactamente en el mismo sitio. Por ejemplo azitromicina también se ubica de manera estrecha al túnel de salida de la cadena polipeptídica pero más lejana al sitio activo de esta subunidad de lo que lo hace eritromicina<sup>5</sup>.

Estudios basados en metagenómica mostraron que la inhibición de la síntesis proteica se produce para determinadas proteínas, no el total de las mismas. Estos estudios apoyan la teoría que eritromicina actúa fundamentalmente en el sitio activo de esta subunidad (peptidil transferasa) y que inhibiría algunos motivos tanto de sustratos donadores como aceptores, más que la acción directa en la salida del túnel que se postuló en un inicio<sup>6</sup>.

Los macrólidos son compuestos básicos capaces de atravesar las membranas lipídicas, confiriéndole la particularidad de concentrarse adecuadamente dentro de las células eucariotas y atravesar la membrana externa de los bacilos Gram negativos.



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



Azitromicina se caracteriza por acumularse mejor que el resto de los macrólidos en las células fagocíticas, por lo tanto aumentaría su concentración en la localización de la infección<sup>7</sup>.

### 9.1.3. Mecanismos de resistencia

#### Bomba de eflujo

La expulsión del antibiótico de la bacteria en los Cocos Gram positivos puede estar relacionada a genes: *mefA*, *mefE* o *msrA* y *msrB*.

Las bombas de eflujo son transportadores transmembrana que funcionan acoplados a una ATPasa. Son activas frente a macrólidos de 14-15 átomos, mientras que no lo son frente a 16 macrólidos, lincosamidas y estreptogramidas b. Por esta razón se le llama fenotipo M a este tipo de resistencia. De cada gen que codifica para este conjunto de proteínas que expulsa en antibiótico fuera de la célula puede haber variantes (por ejemplo *mefA* y *mefE*, menos frecuentemente *mefI* y *mefO*) con una conservación de la secuencia entre ellas cercanas al 90%. Los genes *mef* están insertos en un transposón ubicado en un profago que le permite la transferencia a otras especies<sup>8</sup>.

Estos transportadores están relacionados con los sistemas ABC acoplados a hidrólisis de ATP con diversas funciones celulares que no solo incluyen el transporte transmembrana, función más que reconocida, sino que también podrían intervenir en procesos celulares como la elongación de proteínas en la traducción y reparación del ADN<sup>9</sup>.

#### Cambio del sitio blanco de acción

Los cambios en las secuencias que codifican la subunidad ribosomal pueden ser secundarios a mutaciones puntuales. Si bien este mecanismo se ha descrito (tanto en *S. pyogenes*, *S. pneumoniae* y *H. influenzae* es infrecuente), suele ser infrecuente en aislamientos clínicos. La mayoría de estas mutaciones ocurren en los dominios V del rARN y en las proteínas L4 y L22<sup>10,11</sup>.

Otro tipo de variabilidad en el sitio blanco de acción lo constituyen los cambios post-transcripcionales, en particular la metilación de esta subunidad, en la posición A2058, sin alterar la secuencia de la proteína.

Este tipo de cambios en el ribosoma, genera resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptogramidas tipo b, denominada MLSb.

El gen *erm* con sus diferentes variantes es el responsable de esta resistencia al codificar una metilasa que altera el sitio blanco de unión del antibiótico al ribosoma bacteriano. Dado que este grupo de



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



antibióticos comparten el mecanismo de acción: la unión al ribosoma bacteriano y la posterior inhibición de la síntesis proteica, el producto del gen *erm* determina resistencia a los tres grupos de antibióticos: macrólidos, lincosamidas y estreptograminas B<sup>12</sup>.

En *S. aureus* y *S. pneumoniae*, así como en otras especies, la metilasa está codificada por los genes *erm* (*erythromycin ribosome metylation*) y constituye el mecanismo más relevante de resistencia de estos microorganismos a este antibiótico.

Se describen variantes entre distintas especies de las que se encuentran: *ermA*, *ermC*, *ermB*, *ermAM*, *ermF*, *ermD*, *ermG*, *ermE*, *ermA'*, y *ermTR*<sup>12,13</sup>.

Se han encontrado genes relacionados con *ermAM* en *Clostridium* y enterobacterias, que se denominaron *ermP*, *ermZ* y *ermBC*<sup>14,15</sup>.

En *S. aureus* los genes *erm* (en particular el gen *ermC*) se encuentran en un plásmido pequeño, multicopia, aunque en *S. aureus* también se lo puede encontrar en el cromosoma bacteriano.

Cuando se realiza el D test con oleandomicina en lugar de eritromicina, se observó que para el gen *ermC* este macrólido no funciona como inductor y que los bajos niveles de resistencia se asocian con el gen *ermA* en *Staphylococcus*<sup>16</sup>.

Menos frecuentemente se han encontrado este tipo de genes en plásmidos más grandes, conjugativos en general asociado resistencia a penicilina (portando *ermB*).

Luego de las primeras descripciones se han encontrado estos plásmidos en múltiples especies de *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Enterococos*<sup>17,18</sup>.

La resistencia a clindamicina por este mecanismo puede ser inducible (iMLS) o constitutiva (cMLS). En *S. aureus* son inductores los macrólidos de 14 y 15 átomos. In vitro, suele utilizarse eritromicina, ya que es un buen inductor de la expresión de esta resistencia, evidenciado en el antibiograma convencional por un aplanamiento en el halo de inhibición para clindamicina cuando se colocan cerca los discos con estos antibióticos (efecto D).

Esta característica no está relacionada con el tipo de gen *erm* involucrado en un principio.

En *Streptococcus* spp. la resistencia inducible puede ser clasificada según el fenotipo de resistencia a los macrólidos de 16 átomos en 3 fenotipos realizando un test con tres discos, eritromicina (colocada en el centro de la placa) con clindamicina y josamicina.

iMLS-A, resistencia a la josamicina, eritromicina e inducible a clindamicina.



redEMC  
Infectología



EUCAST



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA

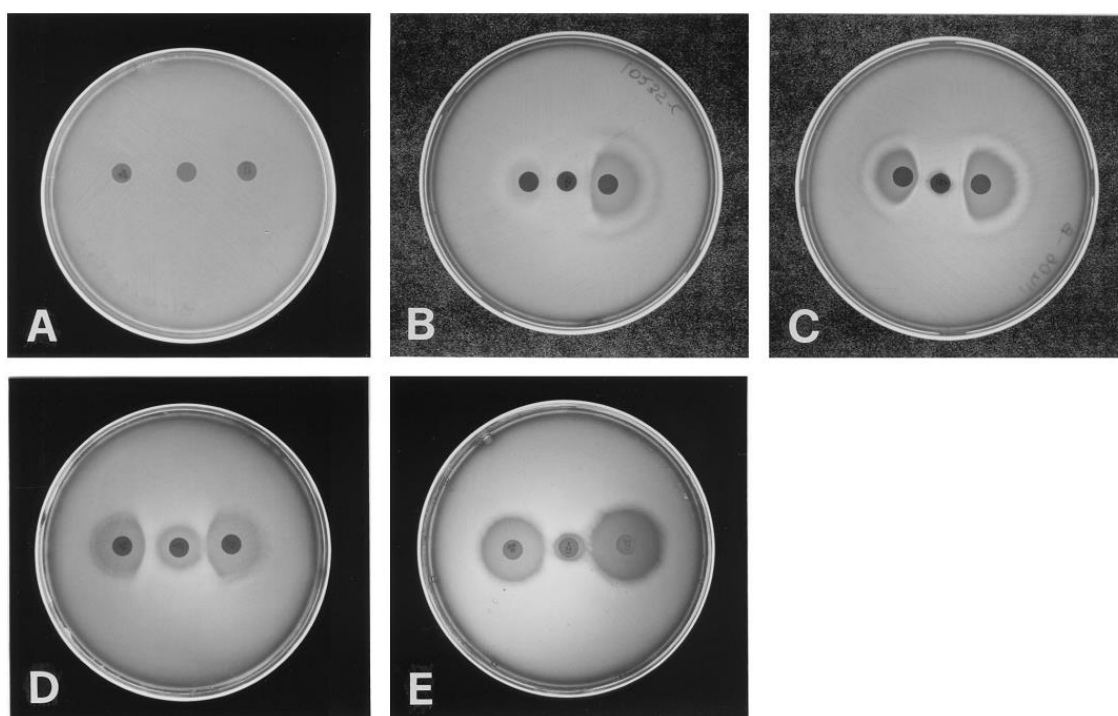


iMLS-B, resistencia inducible a josamicina y clindamicina con alto nivel de resistencia a eritromicina.

iMLS-C, resistencia inducible a josamicina y clindamicina con bajo nivel de resistencia a eritromicina<sup>19</sup>. Ver **Figura 3**.

Las lincosamidas no funcionan in vitro como inductores del gen *erm*. Dosis sub-inhedoras de eritromicina ofician como inductoras del mismo.

Los genes *ermC* fueron los responsables de forma predominante en los MSSA<sup>20</sup>.



**Figura 3.** Fenotipos de resistencia iMLSb tomado de Giovenetti *et al.*<sup>19</sup> Triple-test de disco. Se coloca un disco de eritromicina al centro (30 ug), con un disco de clindamicina (10ug) a la derecha y uno de josamicina (30ug) a la izquierda. (A) fenotipo cMLS (B) fenotipo iMLS (subtipo iMLS-A). (C) fenotipo iMLS (subtipo iMLS-B). (D) fenotipo iMLS (subtipo iMLS-C). (E) fenotipo M.

El mecanismo de la inducción de la resistencia a clindamicina, tiene que ver con cambios conformacionales del ARNm de la metilasa. En ausencia de eritromicina, dicho ARNm se encuentra en una conformación que esconde la secuencia de reconocimiento del ribosoma (secuencia de Shine-Dalgarno o SD). La unión de la eritromicina al ribosoma, generaría un cambio conformacional en el RNAm de la metilasa, que ahora liberaría la SD, lo cual permitiría que fuera leída por el ribosoma y se sintetizara la proteína correspondiente<sup>21</sup>.



redEMC  
Infectología



EUCAST



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



La expresión de resistencia a clindamicina en forma constitutiva es sencilla de obtener a partir de cepas con iMLSb, en condiciones experimentales. Las cepas que presentan cMLSb son frecuentemente aquellos seleccionados de infecciones con alto inóculo.

Se describe que los aislamientos que presentan *ermC*, presentan una tasa de mutación 14 veces mayor que los que portan el gen *ermA*. Esta observación fue realizada en cepas provenientes de aislamientos clínicos y se reprodujo en cepas clonadas con estos genes.

Daurel y col observaron que los cambios genéticos se debían fundamentalmente a la pérdida de un sector de ADN en la región reguladora que se encuentra entre las regiones que codifican las 2 subunidades del ribosoma, que preceden en el genoma al gen *ermC*<sup>22</sup>.

En cepas portadoras de genes *ermC* que se expresan de forma constitutiva en *S. aureus*, se observaron tres tipos diferentes de mutaciones en la región reguladora *ermC*, que corresponden a deleciones, duplicaciones, mutaciones puntuales múltiples y supresiones<sup>23</sup>.

Que un paciente con una infección por un *S. aureus*, portador de la resistencia MLSb inducible durante el tratamiento desarrolle la misma de forma constitutiva está reportado desde hace 40 años. Los primeros reportes, carecen de estudios que permitan afirmar se trate de la cepa portadora de resistencia inducible que en la evolución cambió a fenotipo constitutivo<sup>24</sup>.

Los métodos de tipificación molecular como la electroforesis en campos pulsantes entre otras, disponibles en muchos laboratorios de referencia, son herramientas fundamentales para profundizar en este tipo de hallazgos<sup>25</sup>.

El aumento de los casos CA-MRSA en algunos países, llevó a modificar las recomendaciones de antibioterapia empírica, donde clindamicina surgía como propuesta para el tratamiento empírico de algunas infecciones. Si bien esto no fue universal, se observó en algunos medios una frecuencia aumentada del fenotipo iMLSb que habitualmente se describía cercana al 5-10%<sup>26</sup>. Telechea y col. observaron que a pesar del aumento del consumo de este antibiótico no se observó un aumento concomitante en esta resistencia<sup>27</sup>.

Es discutida la significancia clínica del hallazgo del fenotipo iMLSb en *S. aureus* ya que la mayoría de las infecciones por este microorganismo requiere un curso corto de antibiótico y muchas de ellas con medidas locales, como lo son el drenaje, la limpieza de la infección y el uso de antibiótico tópicos son suficientes para el tratamiento.



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



Parece prudente y es recomendado que en infecciones severas, en pacientes inmunodeprimidos, tratamientos prolongados o con mala evolución clínica, no utilizar este antibiótico si presenta *S. aureus* iMLSb. Del mismo modo las recomendaciones tanto de CLSI como de EUCAST recomiendan informar este fenotipo como resistente o con una nota donde se aclare que cepas resistentes pueden emerger durante el tratamiento.

Por lo tanto, informar este fenómeno desde el laboratorio y buscar esta resistencia realizando el test D, debe formar parte de la rutina en estos microorganismos. El mismo se realiza colocando discos de eritromicina y clindamicina a una distancia de 15-20 mm. Se muestra a continuación el aplanamiento en el halo de inhibición.



**Figura 4.** Test de D donde se muestra el efecto inductor de eritromicina.

## 9.2. Lincosamidas

### 9.2.1. Mecanismo de acción

En este grupo se encuentran dos antibióticos de importancia, lincomicina y clindamicina, siendo este último el más utilizado en la práctica clínica. La lincomicina es un producto natural de algunas especies entre las que se encuentran *Streptomyces lincolnensis*, *S. spinosus* y *Actinomyces roseolus*, siendo clindamicina un derivado semisintético.

Compite con macrólidos y cloranfenicol por el sitio activo, la subunidad 50 s del ribosoma.

Los ribosomas contienen dos subunidades de acuerdo a su coeficiente de sedimentación, siendo el grande (50S) formado por 30 proteínas y 2 cadenas de ARN (23S ARN y 5S ARN). Clindamicina se une a la cadena 23S.





redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



Bloquea la síntesis de proteínas, al inhibir de forma temprana la elongación de la cadena aminoacídica interfiriendo en la unidad peptidil-transferasa<sup>28</sup>. Es un antibiótico bacteriostático, activo sobre microorganismos Gram positivos, anaerobios (incluido *Bacteroides fragilis*). Carece de actividad frente a bacterias Gram negativas a excepción de *Capnocytophaga canimorsus*<sup>29</sup>.

Se ha estudiado el efecto de este antibiótico en inhibir algunos factores de virulencia al inhibir la síntesis proteica, lo que se plantea una ventaja adicional en el uso de algunas infecciones<sup>30,31</sup>.

### 9.2.2. Mecanismos de Resistencia

Los genes *erm* y la modificación del sitio blanco de acción, fueron abordados previamente. Este mecanismo ya sea en su fenotipo inducible o constitutivo resulta el más relevante por frecuencia encontrado en aislamientos clínicos.

Adicionalmente, se ha descrito una metiltransferasa de rRNA codificada por el gen *cfr*, que confiere resistencia a cinco diferentes clases de antimicrobianos: cloranfenicol, lincosamidas, oxazolidinonas, pleuromutilinas y estreptogramina A (ver capítulo de oxazolidinonas).

Dado que muchos de estos antibióticos no suelen testarse en los laboratorios, la aparición de un aislamiento resistente a clindamicina, pero sensible a eritromicina, debe alertar sobre la presencia de este microorganismo.

#### Inactivación enzimática:

Algunas enzimas modificadoras de lincominas (más concretamente nucleotidiltransferasas) fueron identificadas:

*Staphylococcus haemolyticus*: *linA*

*Staphylococcus aureus*: *linA'*

*Enterococcus faecium*: *linB*

Este poco frecuente mecanismo de resistencia a este grupo de antibióticos, se sospecha cuando se observa un fenotipo de resistencia a clindamicina aislada, sin compartir la resistencia con el grupo MLS.



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



Se han descrito en Bacilos Gram negativos, dentro de integrones de clase 1, secuencias que podrían corresponderse con proteínas hipotéticas con una homología de aproximadamente 35% de la nucleotidyl-transferasa codificada por *linB* en *Enterococcus faecium*<sup>32</sup>.

Existen algunas secuencias Lnu (actualmente conocidas como *lin*) depositada en las bases de datos. Estos genes se encuentran en plásmidos, el primero extraído de una cepa de *S. aureus* bovina, secuenciada de forma completa. Se trataba de un plásmido pequeño, como los observados generalmente en las bacterias Gram positivas. La replicación de este plásmidos está compuesta por una proteína iniciadora de la replicación, su sitio dentro del ADN del origen de replicación<sup>33</sup>.

Este mecanismo de resistencia a la lincomicina por la inactivación ha sido detectado en numerosos cepas provenientes de muestras clínicas tanto de *Staphylococcus aureus* como de estafilococos coagulasa negativos. Para la inactivación enzimática del antimicrobiano clindamicina se requiere (ATP, GTP, CTP o UTP) como donador nucleotidyl y Mg<sup>2+</sup> como cofactor.

El mecanismo bioquímico de la inactivación de la lincosamida fue elucidado por un grupo de investigadores Franceses, que determinaron la estructura de la lincomicina y clindamicina inactivada mediante técnicas fisicoquímicas, dando paso a la formación de clindamicina 4- (5'-ciclasa). Esta enzima fue secuenciada e ingresada en la base de datos, cuenta con una longitud de 161 aminoácidos y generalmente difiere de los encontrados en coagulasa negativos en 14 aminoácidos únicamente<sup>34</sup>.

Se ha descrito también una bomba de eflujo en *S. lincolnensis*, codificada por el gen *ImrA*.

Esta proteína presentó como único sustrato lincomicina, no describiéndose hasta el momento este mecanismo de resistencia en otras lincosamidas como clindamicina y macrólidos<sup>35</sup>.

## 9.3. Referencias

1. Cobos-Trigueros N, Ateka O, Pitart C et al. [Macrolides and ketolides]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2009; 27: 412-8.
2. McGuire JM, Bunch RL, Anderson RC et al. [Ilotycin, a new antibiotic]. *Schweiz Med Wochenschr* 1952; 82: 1064-5.
3. Kannan K, Mankin AS. Macrolide antibiotics in the ribosome exit tunnel: species-specific binding and action. *Ann N Y Acad Sci* 2011; 1241: 33-47.
4. Poulsen SM, Kofoed C, Vester B. Inhibition of the ribosomal peptidyl transferase reaction by the mycarose moiety of the antibiotics carbomycin, spiramycin and tylosin. *J Mol Biol* 2000; 304: 471-81.



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



5. Schlunzen F, Harms JM, Franceschi F et al. Structural basis for the antibiotic activity of ketolides and azalides. *Structure* 2003; 11: 329-38.
6. Kannan K, Kanabar P, Schryer D et al. The general mode of translation inhibition by macrolide antibiotics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111: 15958-63.
7. Wilms EB, Touw DJ, Heijerman HG. Pharmacokinetics of azithromycin in plasma, blood, polymorphonuclear neutrophils and sputum during long-term therapy in patients with cystic fibrosis. *Ther Drug Monit* 2006; 28: 219-25.
8. Iannelli F, Santagati M, Santoro F et al. Nucleotide sequence of conjugative prophage Phi1207.3 (formerly Tn1207.3) carrying the *mef(A)/msr(D)* genes for *efl* *ux* resistance to macrolides in *Streptococcus pyogenes*. *Front Microbiol* 2014; 5: 687.
9. Davidson AL, Dassa E, Orelle C et al. Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiol Mol Biol Rev* 2008; 72: 317-64, table of contents.
10. Weisblum B. Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 577-85.
11. Tait-Kamradt A, Davies T, Cronan M et al. Mutations in 23S rRNA and ribosomal protein L4 account for resistance in pneumococcal strains selected in vitro by macrolide passage. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 2118-25.
12. Seppala H, Skurnik M, Soini H et al. A novel erythromycin resistance methylase gene (*ermTR*) in *Streptococcus pyogenes*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 257-62.
13. Leclercq R, Courvalin P. Bacterial resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics by target modification. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 1267-72.
14. Berryman DI, Rood JI. The closely related *ermB-ermAM* genes from *Clostridium perfringens*, *Enterococcus faecalis* (pAM beta 1), and *Streptococcus agalactiae* (pIP501) are flanked by variants of a directly repeated sequence. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1995; 39: 1830-4.
15. Brisson-Noël A, Arthur M, Courvalin P. Evidence for natural gene transfer from gram-positive cocci to *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 1988; 170: 1739-45.
16. Di Modugno V, Guerrini M, Shah S et al. Low level resistance to oleandomycin as a marker of *ermA* in staphylococci. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49: 425-7.
17. Gupta A, Vlamakis H, Shoemaker N et al. A New *Bacteroides* Conjugative Transposon That Carries an *ermB* Gene. *Applied and Environmental Microbiology* 2003; 69: 6455-63.
18. Teuber M, Schwarz F, Perreten V. Molecular structure and evolution of the conjugative multiresistance plasmid pRE25 of *Enterococcus faecalis* isolated from a raw-fermented sausage. *International Journal of Food Microbiology* 2003; 88: 325-9.
19. Giovanetti E, Montanari MP, Mingoia M et al. Phenotypes and Genotypes of Erythromycin-Resistant *Streptococcus pyogenes* Strains in Italy and Heterogeneity of Inducibly Resistant Strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1999; 43: 1935-40.
20. Leclercq R. Mechanisms of Resistance to Macrolides and Lincosamides: Nature of the Resistance Elements and Their Clinical Implications. *Clinical Infectious Diseases* 2002; 34: 482-92.



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



21. Leclercq R, Courvalin P. Bacterial resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics by target modification. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1991; 35: 1267-72.
22. Daurel C, Huet C, Dhalluin A et al. Differences in potential for selection of clindamycin-resistant mutants between inducible erm(A) and erm(C) *Staphylococcus aureus* genes. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 546-50.
23. Werckenthin C, Schwarz S, Westh H. Structural alterations in the translational attenuator of constitutively expressed ermC genes. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1681-5.
24. Watanakunakorn C. Clindamycin therapy of *Staphylococcus aureus* endocarditis. Clinical relapse and development of resistance to clindamycin, lincomycin and erythromycin. *Am J Med* 1976; 60: 419-25.
25. Fines M, Gueudin M, Ramon A et al. In vitro selection of resistance to clindamycin related to alterations in the attenuator of the erm(TR) gene of *Streptococcus pyogenes* UCN1 inducibly resistant to erythromycin. *J Antimicrob Chemother* 2001; 48: 411-6.
26. Pardo L, Vola M, Macedo-Vinas M et al. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children treated in Uruguay. *J Infect Dev Ctries* 2013; 7: 10-6.
27. Telechea H, Speranza N, Lucas L et al. [Antibiotic consumption and antimicrobial susceptibility evolution in the Centro Hospitalario Pereira Rossell in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* era]. *Rev Chilena Infectol* 2009; 26: 413-9.
28. Verdier L, Bertho G, Gharbi-Benarous J et al. Lincomycin and clindamycin conformations. A fragment shared by macrolides, ketolides and lincosamides determined from TRNOE ribosome-bound conformations. *Bioorg Med Chem* 2000; 8: 1225-43.
29. Spizek J, Rezanka T. Lincomycin, clindamycin and their applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 2004; 64: 455-64.
30. Dumitrescu O, Badiou C, Bes M et al. Effect of antibiotics, alone and in combination, on Panton-Valentine leukocidin production by a *Staphylococcus aureus* reference strain. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 384-8.
31. Stevens DL, Ma Y, Salmi DB et al. Impact of antibiotics on expression of virulence-associated exotoxin genes in methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 2007; 195: 202-11.
32. Heir E, Lindstedt BA, Leegaard TM et al. Prevalence and characterization of integrons in blood culture Enterobacteriaceae and gastrointestinal *Escherichia coli* in Norway and reporting of a novel class 1 integron-located lincosamide resistance gene. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2004; 3: 12.
33. Luthje P, von Kockritz-Blickwede M, Schwarz S. Identification and characterization of nine novel types of small staphylococcal plasmids carrying the lincosamide nucleotidyltransferase gene lnu(A). *J Antimicrob Chemother* 2007; 59: 600-6.
34. Brisson-Noel A, Delrieu P, Samain D et al. Inactivation of lincosaminide antibiotics in *Staphylococcus*. Identification of lincosaminide O-nucleotidyltransferases and comparison of the corresponding resistance genes. *J Biol Chem* 1988; 263: 15880-7.

NUEVA  
EDICIÓN  
2018

# INTERPRETACIÓN DEL ANTIBIOGRAMA EN LA PRÁCTICA CLÍNICA DIARIA

CURSO  
ONLINE

18 DE ABRIL - 13 DE JUNIO 2018 - [ATBgrama2018.evimed.net](http://ATBgrama2018.evimed.net)



redEMC  
Infectología

EUCAST



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA

evimed

35. Zhang HZ, Schmidt H, Piepersberg W. Molecular cloning and characterization of two lincomycin-resistance genes, *ImrA* and *ImrB*, from *Streptomyces lincolnensis* 78-11. *Mol Microbiol* 1992; 6: 2147-57.



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



## 10. Resistencia a las Oxazolidinonas

### **Cecília Helena Vieira Franco de Godoy Carvalhaes**

Médica Patóloga Clínica y Doctora en Infectología,  
Coordinadora de la Sección de Microbiología del Laboratorio Central del Hospital de São Paulo  
Investigadora de la Disciplina de Medicina Laboratorial, Departamento de Medicina,  
Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)  
Brasil.

### **Ana Cristina Gales**

Profesora Adjunta de Infectología del Departamento de Medicina de la  
Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo.  
Investigadora 1A del Consejo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (CNPq)  
Miembro de la Cámara Técnica de Resistencia Microbiana (CATREM),  
Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria (ANVISA)  
Coordinadora clínica del Consejo Brasileiro de Susceptibilidad Antimicrobiana (BrCAST)  
Brasil

Las oxazolidinonas son una clase de antimicrobianos sintéticos que actúan como inhibidores efectivos de la síntesis proteica en un gran espectro de bacterias Gram positivas. El linezolid fue la primera oxazolidinona disponible clínicamente para el tratamiento de infecciones abdominales, neumonías e infecciones de piel y partes blandas complicadas y no complicadas. En 2014, una nueva molécula de oxazolidinona fue aprobada para uso clínico en los EUA para el tratamiento de las infecciones de piel y partes blandas, denominada tedizolid (**Imagen 1**). Otras moléculas de oxazolidinona están en desarrollo en el mercado, como la radezolida, moléculas anti-tuberculosis como sutezolida y AZD5847, y anti-*Clostridium difficile*, como la cadazolida<sup>1</sup>. Las oxazolidinonas poseen una excelente actividad contra cocos Gram-positivos, pero no presentan actividad contra bacterias Gram-negativas por no alcanzar concentraciones intracelulares suficientes debido a la eyección por sistemas de eflujo<sup>2</sup>. El linezolid posee actividad contra *Staphylococcus aureus* (sensibles o resistentes a la oxacilina), estafilococos coagulasa negativo, *Enterococcus* spp. (sensibles o resistentes a la vancomicina), y *Streptococcus* spp. (incluso *Streptococcus pneumoniae* resistente a la penicilina). Este compuesto también presenta actividad *in vitro* contra *Clostridium* spp., *Prevotella* spp., *Peptostreptococcus* spp. y *Mycobacterium tuberculosis*, complejo *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium marinum* y micobacterias de crecimiento rápido<sup>3</sup>. Estudios recientes demostraron actividad del tedizolid contra aislados de *S. aureus* resistentes a linezolid<sup>4,5</sup>.

© Curso online "Interpretación del Antibiograma en la práctica clínica diaria"

2018

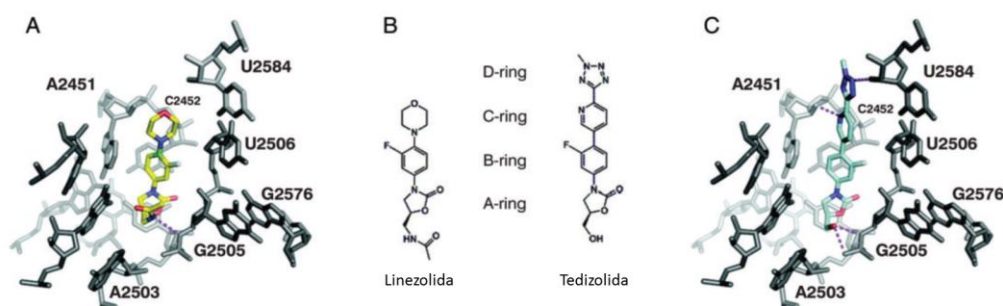


redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



**Imagen 1.** Modelos moleculares de linezolid y tedizolid en el centro de la peptidil transferasa (PTC). **A**, Linezolid (amarillo) en PTC. **B**, Estructura del linezolid y tedizolid. **C**, Tedizolid (verde) en el PTC. Las interacciones críticas están en violeta. El sistema de numeración de 23S de *E. coli* fue utilizado.

Imagen adaptada de Locke et al., *Clin Infect Dis.*, 2014<sup>1</sup>.

## 10.1. Mecanismo de acción de la Oxazolidinonas

Las oxazolidinonas actúan mediante la inhibición de la síntesis proteica en el ribosoma bacteriano<sup>6,7</sup>. El linezolid, específicamente, se enlaza al sitio A del centro de la peptidil transferasa (PTC), lugar en que los aminoácidos son agregados en la construcción de una nueva cadena de péptido, inhibiendo la formación del enlace peptídico a través de la perturbación o impedimento del posicionamiento correcto del aminoacil-tRNA en el PTC<sup>7</sup>. El PTC es una región filogenética altamente conservada y básicamente compuesta por nucleótidos y ARN. Está ubicado en el medio de la subunidad ribosomal 50S, donde las extremidades 3' aminoacil-tRNA y peptidil-tRNA están posicionadas para la transferencia del péptido. Además del enlace del anillo A de linezolid al PTC, el anillo D de tedizolid se enlaza a sitios adicionales en el ribosoma bacteriano, lo que le confiere potencia superior y semivida más larga que el linezolid, confiriéndole mayor comodidad posológica. Las oxazolidinonas también interactúan con los ribosomas mitocondriales, lo que, probablemente, justifica los efectos mielosupresores indeseados de esta clase de antimicrobianos<sup>8</sup>.

El mecanismo de acción de las oxazolidinonas se asemeja al mecanismo de otros antimicrobianos, como el cloranfenicol, los macrólidos, los aminoglucósidos y las tetraciclinas<sup>7,9,10,11</sup>.

## 10.2. Mecanismo de resistencia a las Oxazolidinonas

El primer aislado clínico resistente a linezolid fue de *Enterococcus faecium*, reportado en 1999, en un estudio de compasión, incluso antes de su autorización para uso clínico<sup>12</sup>. Con la diseminación de su



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



uso, aislados resistentes a linezolid fueron reportados en *Staphylococcus* spp. y *Enterococcus* spp., frecuentemente tomados de pacientes que recibieron tratamiento prolongado con linezolid<sup>13</sup>.

Diferentes mecanismos de resistencia a linezolid fueron identificados, en su mayoría relacionados a modificaciones en la conformación de su sitio de enlace<sup>15</sup>. Algunos estudios demostraron actividad de tedizolid contra aislados de *S. aureus* resistentes a linezolid<sup>4,5</sup>. Por lo tanto, los mecanismos de resistencia a linezolid descritos a continuación pueden no conferir resistencia a otros compuestos de la clase de las oxazolidinonas. Hasta el momento, podemos citar cuatro mecanismos de resistencia a linezolid: mutación en los genes 23S rRNA; metilación de la porción 23S rRNA mediada por metiltransferasa Cfr; mutaciones en la proteína ribosomal L3 y L4, y, eyección de la droga por sistemas de eflujo.

### 10.2.1. Mecanismo de Resistencia mediado por mutación en los genes 23S rRNA

La unidad 50S del rRNA está compuesta por las porciones 5S rRNA, 23S rRNA y aproximadamente 36 proteínas ribosomales. El dominio V es uno de los segmentos más conservados del rRNA, y es parte integrante del PCT ribosomal. Diversas mutaciones puntuales en el asa central del dominio V de la porción 23S del rRNA son frecuentemente asociadas a la resistencia a linezolid<sup>16</sup>. La sustitución de guanosina por un uracilo en el nucleótido 2576 (G2576U) del 23S rRNA constituye una de las mutaciones descritas con mayor frecuencia y relacionada a la resistencia a linezolid en diferentes especies bacterianas, como: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. pneumoniae*, *E. faecium*, *E. faecalis*, *M. tuberculosis* y *M. smegmatis*<sup>17</sup>. Aunque la mutación G2576U sea la más frecuente, otras mutaciones relacionadas a la resistencia a linezolid fueron descritas, como G2447U y G2505A, respectivamente, en *S. aureus* y *E. faecium*<sup>4,18</sup>. El estándar de resistencia a linezolid puede diferir entre especies de bacterias, y algunas mutaciones solamente fueron encontradas en determinadas especies (**Imagen 2**). El grado de resistencia no es directamente proporcional a la distancia del nucleótido mutado (en particular, G2576U y G2447U) con el punto de interacción de linezolid<sup>19</sup>. Diferentes niveles de resistencia en aislados clínicos pueden ser explicados en función del número de copias del gen rRNA mutados. Por ejemplo, un aislado bacteriano de *Staphylococcus aureus* puede presentar 5 a 6 copias de rRNA<sup>1</sup>. Cuanto mayor sea el número de copias de rRNA presentando mutaciones, mayor es el valor de la CIM de linezolid observado<sup>8,20,21</sup>. Una clara relación entre el número de copias de rRNA mutadas y el valor de la CIM de linezolid fue reportada en *S. aureus*, *E. faecalis* e *E. faecium*<sup>8,20,21</sup>. Por otro lado, tedizolid presenta mayor potencia que linezolid incluso en

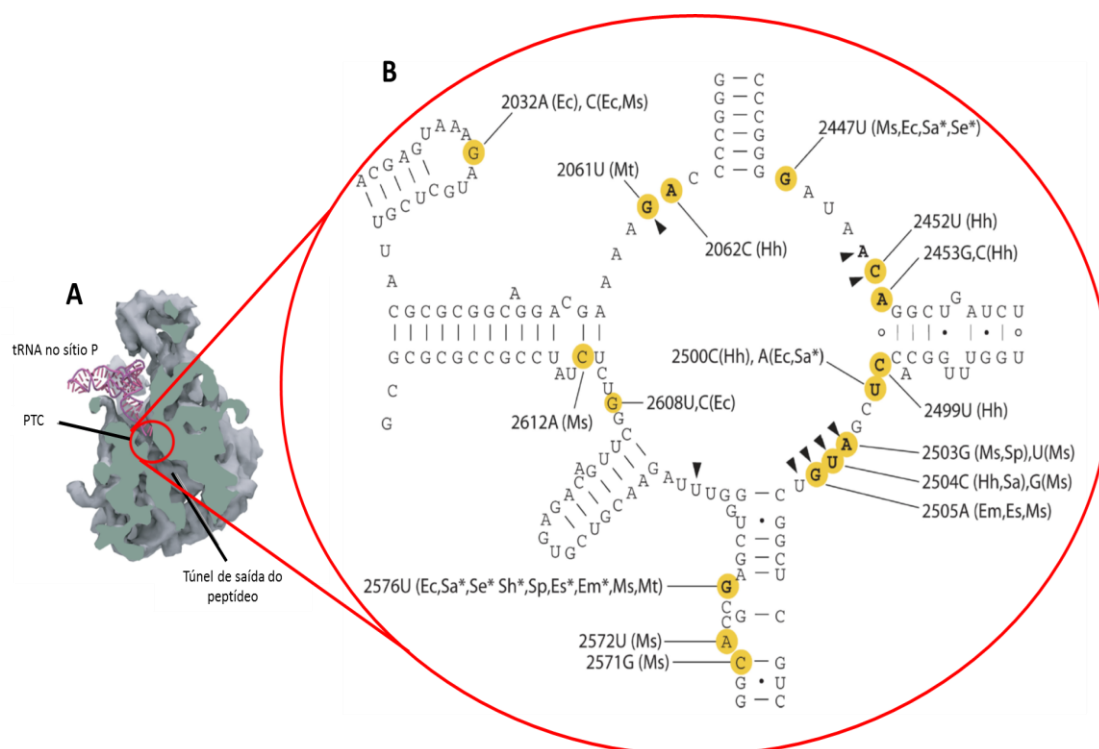




GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



aislados con mayor número de copias de genes presentando mutaciones<sup>4</sup>. Sin embargo, mutaciones en el dominio V del gen 23S rRNA, incluyendo T2500A y la combinación de T2571C/G2576T, fueron observadas en mutantes inducidos en el laboratorio luego de innumerables pasajes por medios de cultivo conteniendo tedizolid. Todos los mutantes seleccionados presentaron resistencia cruzada con linezolid, sin embargo, con menor elevación de la CIM para tedizolid en comparación con la de linezolid<sup>1</sup>.



**Imagen 2. A.** Corte de la subunidad ribosomal con el círculo rojo al redor del PTC. **B.** Estructura secundaria del asa da peptidil-transferasa del dominio V del gen 23S rRNA. Los nucleótidos relacionados directamente en enlace con linezolid están indicados con un triángulo negro. Las posiciones de nucleótidos, en las que mutaciones confieren resistencia a linezolid están marcadas con círculos amarillos. Los nucleótidos en los que mutaciones presentan efecto significativo en las CIMs de linezolid están en negrita. Las mutaciones y microorganismos correspondientes están indicados con las siguientes abreviaciones: Ec (*E. coli*), Sa (*S. aureus*), Se (*S. epidermidis*), Sh (*S. haemolyticus*), Sp (*S. pneumoniae*), Es (*E. faecalis*), Em (*E. faecium*), Ms (*M. smegmatis*), Mt (*M. tuberculosis*), y Hh (*H. halobium*). Los asteriscos indican mutaciones observadas en aislados clínicos.

Adaptada de Long & Vester, Antimicrob. Agents and Chemother, 2012<sup>15</sup>.



redEMC  
Infectología



EUCAST



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



## 10.2.2. Mecanismo de Resistencia mediado por metiltransferasa Cfr

Las modificaciones en el RNA ubicadas cercanas o en el sitio de enlace de los antimicrobianos pueden comprometer su interacción con el ribosoma bacteriano. Moléculas de rRNA son modificadas por grupos metil o residuos de pseudouridina, respectivamente, mediadas por metiltransferasas o enzimas de síntesis de pseudouridina. La pseudouridilación del nucleótido 2504 del 23S rRNA confiere resistencia al linezolid y a la clindamicina, sugiriendo un mecanismo de resistencia intrínseco que protege la bacteria de antimicrobianos que actúan en el PTC<sup>22</sup>.

El único mecanismo de resistencia a linezolid transferible se produce por el gen *cfr* que codifica una metiltransferasa de rRNA. Cfr agrega un grupo metil en la posición C-8 del nucleótido A2503 de la subunidad 23S del rRNA. Esta metilación confiere resistencia a cinco diferentes clases de antimicrobianos cuyo enlace se sobrepone en el PTC, como, cloranfenicol, lincosamidas, oxazolidinonas, pleuromutilinas y estreptogramina A<sup>23</sup>. Identificado por primera vez en un aislado veterinario en Europa al final de la década del 90, el gen *cfr* no fue encontrado en aislados clínicos humanos hasta el 2005, cuando fue descrito en el cromosoma de un aislado de MRSA de Colombia<sup>24,25,26</sup>. A partir de ese momento, diversos aislados clínicos de *Staphylococcus* spp. conteniendo el gen *cfr* en diferentes contextos genéticos y partes del mundo fueron reportados<sup>15</sup>. Además del género *Staphylococcus*, el gen *cfr* también fue identificado en cepas de *Bacillus* spp. y *Proteus vulgaris* de origen animal<sup>27,28</sup>. La presencia del gen *cfr* en elementos genéticos móviles, como plásmidos y transposones, en diferentes regiones geográficas sugiere fuertemente que este gen puede diseminarse entre microorganismos ambientales y bacterias patógenas. No obstante, la sustitución del grupo acetamida en la molécula de linezolid para el grupo hidroximetil en la molécula de tedizolid permite que no haya interferencia de la metilación del nucleótido A2503 del 23S rRNA por el Cfr en el enlace de la tedizolid con el PTC. De esta forma, tedizolid presenta actividad *in vitro* contra aislados *cfr* positivos<sup>5</sup>.

## 10.2.3. Mecanismo de resistencia mediado por mutaciones en L3 y L4

Otro posible mecanismo de resistencia a linezolid son las mutaciones en la proteína L3 ribosomal. La mayor parte de esta proteína está posicionada en la superficie de la subunidad 50S, pero un asa se extiende hasta el PCT. Diversos estudios relacionaron las mutaciones en L3 observadas en aislados clínicos con la resistencia a linezolid en *S. aureus*, *S. cohnii* y *S. epidermidis*<sup>29,30,31</sup>. A pesar de que la mayoría de estos aislados presentan concomitantemente el gen *cfr*, o mutaciones en el gen 23S



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



rRNA, la posición de las mutaciones de L3 corresponden al sitio de enlace de linezolid, sugiriendo su posible contribución a la resistencia a linezolid<sup>31</sup>.

Parte de la proteína ribosomal L4 también se posiciona cercana al PCT. Algunos estudios observaron que las deleciones en el gen de L4 causaron una reducción discreta de la sensibilidad a linezolid en aislados de *S. pneumoniae* (CIM de 1 µg/mL a 4 µg/mL)<sup>32</sup>. Diferentes mutaciones fueron encontradas en *S. epidermidis* y *S. aureus*, sin embargo, no está bien establecido si hay una contribución directa para la resistencia a linezolid<sup>15,33,34</sup>. Es posible que algunas mutaciones en las proteínas ribosomales sean apenas modificaciones aleatorias sin efecto significativo, mientras otras parecen estar relacionadas a la resistencia actuando de manera sinérgica para la resistencia a linezolid<sup>15</sup>.

#### 10.2.4. Mecanismo de resistencia mediado por sistemas de eflujo

La resistencia a linezolid por sistemas de eflujo no es común entre los cocos Gram positivos, a pesar de ser el mecanismo mediante el cual este compuesto no actúa sobre las bacterias Gram negativas. Éste es el único mecanismo de resistencia no relacionado a las modificaciones en el ribosoma bacteriano. Mutaciones que llevan al aumento en la expresión de los genes codificadores de los transportadores ABC en *S. pneumoniae* fueron descritas, así como, en el gen de la superfamilia MFS denominado *ImrS* en aislados de *S. aureus*<sup>35,36</sup>.

### 10.3. Prueba de sensibilidad a las Oxazolidinonas

La sensibilidad a las oxazolidinonas puede estar determinada por métodos cuantitativos y cualitativos. No obstante, por ser fármacos bacteriostáticos los microorganismos presentan crecimiento residual en las pruebas de sensibilidad, lo que dificulta la visualización de la CIM o de la zona de inhibición. Según la recomendación de EUCAST la zona de inhibición para linezolid se debe leer en el sitio de completa inhibición del crecimiento (**Imagen 3**)<sup>37</sup>. A continuación, la **Tabla 1** presenta los puntos de corte clínicos recomendados por EUCAST para interpretación de la categoría de sensibilidad de linezolid y tedizolid contra diverso cocos Gram positivos<sup>38</sup>.



**Imagen 3.** Prueba de sensibilidad de linezolid contra *S. aureus* por método de difusión en disco. La línea blanca señala el sitio donde se debe leer la zona de inhibición del crecimiento bacteriano. Adaptada de EUCAST Reading Guide<sup>37</sup>. Disponible en: <http://www.eucast.org>

Microorganismo	Oxazolidinona	CIM (µg/mL)		Concentración del Disco (µg)	Diámetro	
		S ≤	R >		S ≥	R <
<i>Staphylococcus</i>	Linezolid	4	4	10	21	21
	Tedizolid	0,5 <sup>a</sup>	0,5 <sup>a</sup>		_a,b	_a,b
<i>Enterococcus</i>	Linezolid	4	4	10	19	19
	Tedizolid	IE	IE		IE	IE
<i>Streptococcus</i> A,B,C,G	Linezolid	2	4	10	19	16
	Tedizolid	0,5 <sup>a</sup>	0,5 <sup>a</sup>		_a,b	_a,b
<i>S. pneumoniae</i>	Linezolid	2	4	10	22	19
	Tedizolid	IE	IE		IE	IE
<i>S. viridans</i>	Linezolid	-	-		-	-
	Tedizolid	0,25	0,25		_c	_c

**Tabla 1.** Puntos de corte recomendados para linezolid y tedizolid de acuerdo a EUCAST, 2016. Disponible en: <http://www.eucast.org><sup>38</sup>.



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



<sup>a</sup> Aislados sensibles al linezolid pueden ser reportados como sensibles tedizolid; <sup>b</sup> Testear los aislados resistentes a linezolid por método cuantitativo (CIM); <sup>c</sup> Testear por método cuantitativo (CIM); IE - Insuficiente evidencia de que el microorganismo o grupo es un buen blanco para terapias con este agente.

## 10.4. Referencias

1. Locke JB, Zurenko GE, Shaw KJ, Bartizal K. Tedizolid for the management of human infections: in vitro characteristics. *Clin Infect Dis*. 2014 Jan;58 Suppl 1:S35-42.
2. Schumacher A, Trittler R, Bohnert JA, Kümmerer K, Pagès JM, Kern WV. Intracellular accumulation of linezolid in *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii* and *Enterobacter aerogenes*: role of enhanced efflux pump activity and inactivation. *J Antimicrob Chemother*. 2007 Jun;59(6):1261-4
3. Rodríguez-Avial I, Culebras E, Betriu C, Morales G, Pena I, Picazo JJ. *In vitro* activity of tedizolid (TR-700) against linezolid-resistant staphylococci. *J Antimicrob Chemother*. 2012 Jan;67(1):167-9.
4. Livermore et al., *JAC*, 2009; 63:713-5 Livermore DM, Mushtaq S, Warner M, Woodford N. Activity of oxazolidinone TR-700 against linezolid-susceptible and -resistant staphylococci and enterococci. *J Antimicrob Chemother*. 2009 Apr;63(4):713-5.
5. Shaw KJ, Poppe S, Schaadt R, Brown-Driver V, Finn J, Pillar CM, Shinabarger D, Zurenko G. In vitro activity of TR-700, the antibacterial moiety of the prodrug TR-701, against linezolid-resistant strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Dec;52(12):4442-7.
6. Daly JS, Eliopoulos GM, Reiszner E, Moellering RC Jr. Activity and mechanism of action of DuP 105 and DuP 721, new oxazolidinone compounds. *J Antimicrob Chemother* 1988; 21(6):721-730.
7. Wilson DN. Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nat Rev Microbiol*. 2014 Jan;12(1):35-48.
8. Shaw KJ, Barbachyn MR. The oxazolidinones: past, present, and future. *Ann N Y Acad Sci*. 2011 Dec;1241:48-70.
9. Lin AH, Murray RW, Vidmar TJ, Marotti KR. The oxazolidinone eperzolid binds to the 50S ribosomal subunit and competes with binding of chloramphenicol and lincomycin. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41(10):2127-2131.
10. Livermore DM. Linezolid in vitro: mechanism and antibacterial spectrum. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51 Suppl 2:II9-II16.
11. Fines M, Leclercq R. Activity of linezolid against Gram-positive cocci possessing genes conferring resistance to protein synthesis inhibitors. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45(6):797-802
12. Zurenko G, Todd WM, Hafkin BA, Myers B, Kaufman C, Bock J. Development of linezolid-resistant *Enterococcus faecium* in two compassionate use program patients treated with linezolid [abstract 848]. In: Program and abstracts of the 39<sup>th</sup> Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (San Francisco). Washington, DC: American Society for Microbiology, 1999:118.
13. Tsiodras S, Gold HS, Sakoulas G, Eliopoulos GM, Wennersten C, Venkataraman L, Moellering RC, Ferraro MJ. Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *Lancet*. 2001 Jul 21;358(9277):207-8.
14. Mendes RE, Hogan PA, Jones RN, Sader HS, Flamm RK. Surveillance for linezolid resistance via the Zyvox<sup>®</sup> Annual Appraisal of Potency and Spectrum (ZAAPS) programme (2014): evolving



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



- resistance mechanisms with stable susceptibility rates. *J Antimicrob Chemother.* 2016 Jul;71(7):1860-5.
15. Long KS, Vester B. Resistance to linezolid caused by modifications at its binding site on the ribosome. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Feb;56(2):603-12.
  16. Gu B, Kelesidis T, Tsiodras S, Hindler J, Humphries RM. The emerging problem of linezolid-resistant *Staphylococcus*. *J Antimicrob Chemother.* 2013 Jan;68(1):4-11.
  17. Long KS, Munck C, Andersen TM, Schaub MA, Hobbie SN, Böttger EC, Vester B. Mutations in 23S rRNA at the peptidyl transferase center and their relationship to linezolid binding and cross-resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Nov;54(11):4705-13.
  18. Prystowsky J, Siddiqui F, Chosay J, Shinabarger DL, Millichap J, Peterson LR, Noskin GA. Resistance to linezolid: characterization of mutations in rRNA and comparison of their occurrences in vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45(7):2154-2156.
  19. Miller K, Dunsmore CJ, Fishwick CW, Chopra I. Linezolid and tiamulin cross-resistance in *Staphylococcus aureus* mediated by point mutations in the peptidyl transferase center. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 May;52(5):1737-42.
  20. Marshall SH, Donskey CJ, Hutton-Thomas R, Salata RA, Rice LB. Gene dosage and linezolid resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002 Oct;46(10):3334-6.
  21. Besier S, Ludwig A, Zander J, Brade V, Wichelhaus TA. Linezolid resistance in *Staphylococcus aureus*: gene dosage effect, stability, fitness costs, and cross-resistances. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Apr;52(4):1570-2.
  22. Toh SM, Mankin AS. An indigenous posttranscriptional modification in the ribosomal peptidyl transferase center confers resistance to an array of protein synthesis inhibitors. *J Mol Biol.* 2008 Jul 18;380(4):593-7.
  23. Long KS, Poehlsgaard J, Kehrenberg C, Schwarz S, Vester B. The Cfr rRNA methyltransferase confers resistance to Phenicol, Lincosamides, Oxazolidinones, Pleuromutilins, and Streptogramin A antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006 Jul;50(7):2500-5.
  24. Schwarz S, Werckenthin C, Kehrenberg C. Identification of a plasmid-borne chloramphenicol-florfenicol resistance gene in *Staphylococcus sciuri*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000 Sep;44(9):2530-3.
  25. Toh SM, Xiong L, Arias CA, Villegas MV, Lolans K, Quinn J, Mankin AS. Acquisition of a natural resistance gene renders a clinical strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* resistant to the synthetic antibiotic linezolid. *Mol Microbiol.* 2007 Jun;64(6):1506-14.
  26. Locke JB, Rahawi S, Lamarre J, Mankin AS, Shaw KJ. Genetic environment and stability of cfr in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CM05. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Jan;56(1):332-40.
  27. Dai L, Wu CM, Wang MG, Wang Y, Wang Y, Huang SY, Xia LN, Li BB, Shen JZ. First report of the multidrug resistance gene cfr and the phenicol resistance gene fexA in a *Bacillus* strain from swine feces. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Sep;54(9):3953-5.
  28. Wang Y, Wang Y, Wu CM, Schwarz S, Shen Z, Zhang W, Zhang Q, Shen JZ. Detection of the staphylococcal multiresistance gene cfr in *Proteus vulgaris* of food animal origin. *J Antimicrob Chemother.* 2011 Nov;66(11):2521-6.
  29. Kosowska-Shick K, Julian KG, McGhee PL, Appelbaum PC, Whitener CJ. Molecular and epidemiologic characteristics of linezolid-resistant coagulase-negative staphylococci at a tertiary care hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2010 Sep;68(1):34-9.

NUEVA  
EDICIÓN  
2018

# INTERPRETACIÓN DEL ANTIBIOGRAMA EN LA PRÁCTICA CLÍNICA DIARIA

CURSO  
ONLINE

18 DE ABRIL - 13 DE JUNIO 2018 - ATBgrama2018.evimed.net



redEMC  
Infectología

EUCAST



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA

evimed

30. Locke JB, Hilgers M, Shaw KJ. Novel ribosomal mutations in *Staphylococcus aureus* strains identified through selection with the oxazolidinones linezolid and torezolid (TR-700). *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Dec;53(12):5265-74.
31. Ikonomidis A, Grapsa A, Pavlioglou C, Demiri A, Batarli A, Panopoulou M. Accumulation of multiple mutations in linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* causing bloodstream infections; in silico analysis of L3 amino acid substitutions that might confer high-level linezolid resistance. *J Chemother.* 2016 Feb 10:1-4. [Epub ahead of print]
32. Wolter N et al., *AAC* 2005. 49:3554-3557 Wolter N, Smith AM, Farrell DJ, Schaffner W, Moore M, Whitney CG, Jorgensen JH, Klugman KP. Novel mechanism of resistance to oxazolidinones, macrolides, and chloramphenicol in ribosomal protein L4 of the pneumococcus. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 Aug;49(8):3554-7.
33. Tewhey R, Gu B, Kelesidis T, Charlton C, Bobenchik A, Hindler J, Schork NJ, Humphries RM. Mechanisms of linezolid resistance among coagulase-negative staphylococci determined by whole-genome sequencing. *MBio.* 2014 May 13;5(3):e00894-14.
34. Wong A, Reddy SP, Smyth DS, Aguero-Rosenfeld ME, Sakoulas G, Robinson DA Polyphyletic emergence of linezolid-resistant staphylococci in the United States. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Feb;54(2):742-8.
35. Feng J, Lupien A, Gingras H, Wasserscheid J, Dewar K, Légaré D, Ouellette M. Genome sequencing of linezolid-resistant *Streptococcus pneumoniae* mutants reveals novel mechanisms of resistance. *Genome Res.* 2009 Jul;19(7):1214-23.
36. Floyd JL, Smith KP, Kumar SH, Floyd JT, Varela MF. LmrS is a multidrug efflux pump of the major facilitator superfamily from *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Dec;54(12):5406-12.
37. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Reading guide. EUCAST disk diffusion method for antimicrobial susceptibility testing. v 2.0, 2013. Disponible en: <http://www.eucast.org>
38. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Clinical Breakpoints. v 6.0, 2016. Disponible en: <http://www.eucast.org>



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



## Sección 3: Antibióticos activos sobre la síntesis del ADN

### 11. Resistencia a Quinolonas

**Prof. Agdo. Dr. Rafael Vignoli**

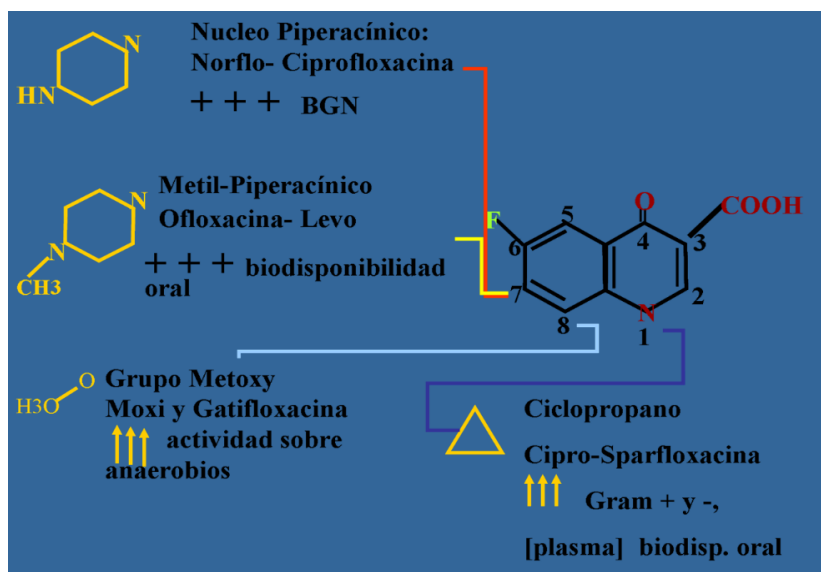
Departamento de Bacteriología y Virología, Facultad de Medicina,  
Universidad de la República, Uruguay.

Integrante del Sistema Nacional de Investigadores de Uruguay (Nivel I).

Las quinolonas constituyen una extensa familia de antibióticos de origen completamente sintético, cuyo primer integrante, el ácido nalidíxico, fue desarrollado en 1962 a partir de la cloroquina<sup>1</sup>. En el año 1963, se publican los primeros resultados de ensayos clínicos en humanos con infecciones urinarias<sup>2</sup>, iniciándose su comercialización en 1967<sup>1</sup>. Si bien el origen sintético hacía suponer que la ocurrencia de resistencia sería esporádica, ya los primeros estudios mostraban valores cercanos al 13%, en *E. coli*<sup>2</sup>.

#### 11.1. Estructura química

La estructura básica de las quinolonas es un doble anillo que presenta, típicamente, un nitrógeno en posición 1, un grupo carboxilo en posición 3 y carbonilo en posición 4 (ver **Figura 1**)<sup>3</sup>.



**Figura 1.** Esquema general de las fluoroquinolonas. Se muestra el núcleo común, incluyendo el nitrógeno en posición 1, el grupo carboxilo en posición 3, el carbonilo en 4 y un átomo de flúor (F) en posición 6 (ver texto).





El agregado de flúor en el carbono 6 dio origen a las fluoroquinolonas, lo que disminuye la probabilidad de aparición de mutantes resistentes y aumenta la actividad sobre bacilos Gram negativos y Gram positivos<sup>1,3</sup>.

La introducción de distintos sustituyentes en las posiciones 1, 7 y 8 modifica el espectro de actividad y las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de las nuevas quinolonas. Algunos de los sustituyentes utilizados y las propiedades que confieren se muestran en la **Figura 1**.

### Sitio blanco de las topoisomerasas

Las quinolonas actúan inhibiendo la acción de las ADN girasas y las topoisomerasas tipo IV bacterianas. A los efectos de comprender mejor el mecanismo de acción y alguno de los mecanismos de resistencia a quinolonas, se describirá brevemente el funcionamiento de dichas enzimas.

Las ADN topoisomerasas catalizan cambios en la topología del ADN que permiten la transición entre formas relajadas y superenrolladas de ADN. Si bien la presencia de estas enzimas es universal en los seres vivos, las diferencias estructurales entre procariontes y eucariotes permiten que las quinolonas actúen selectivamente sobre las primeras<sup>4</sup>. Las DNA topoisomerasas se dividen en tipo I y II, dependiendo si clivan una o las dos hebras del ADN, respectivamente.

Durante la relajación de las hebras de ADN, las topoisomerasas utilizan la energía liberada durante la propia reacción, mientras que la introducción de un superenrollamiento negativo requiere de la hidrólisis de ATP para llevarse a cabo<sup>4</sup>. Las únicas topoisomerasas capaces de llevar a cabo esta tarea son las tipo II<sup>4</sup>.

En procariontes, pueden reconocerse dos tipos de topoisomerasas tipo II, que reciben los nombres de girasa y topoisomerasa IV<sup>4,5</sup>. En ambos casos, están formadas por tetrámeros compuestos por dos subunidades codificadas (para los casos de enterobacterias) por los genes *gyrA* y *gyrB* o *parC* y *parD*, respectivamente.

Mientras que las girasas controlan los superenrollamientos del ADN y reducen la tensión topológica generada por la translocación de los complejos de replicación y transcripción a lo largo del ADN, las topoisomerasas IV liberan hebras de ADN concatenadas luego de la replicación<sup>4,5</sup>.

Se describirá a continuación el modelo propuesto para el funcionamiento de la DNA girasa de *E. coli* (o modelo de las dos puertas de Roca y Wang)<sup>6</sup>



redEMC  
Infectología

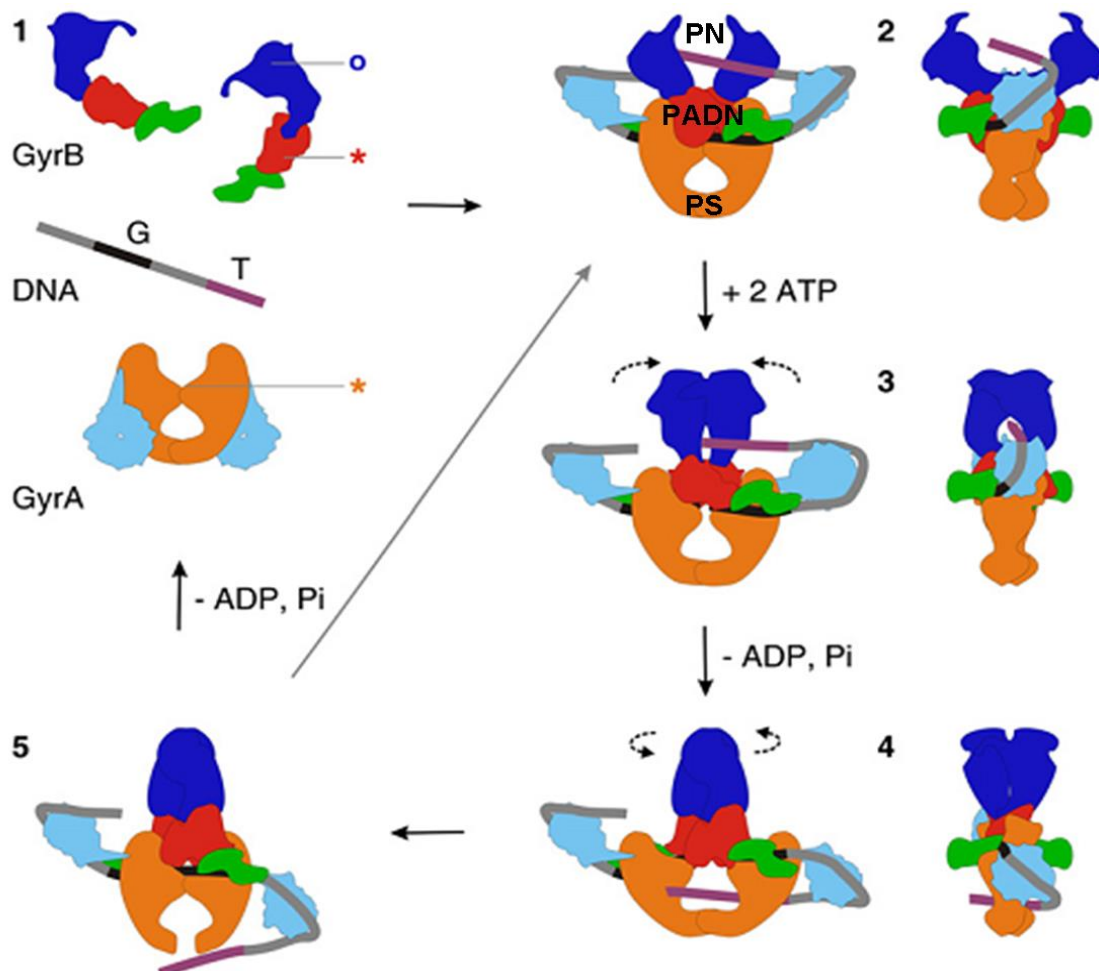


UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



Se reconocen tres interfaces en la ADN girasa, que pueden encontrarse en conformación abierta o cerrada, siendo éstas: a) el dominio N terminal de GyrB o puerta N, b) la interfase GyrA-GyrB-ADN o puerta ADN, y el extremo C terminal de GyrA o puerta de salida. La explicación del funcionamiento de la girasa se realiza en la **Figura 2**.



**Figura 2.** Esquema del mecanismo de superenrollamiento de la ADN girasa. **Paso 1:** se muestran las subunidades de la girasa tal cual se presentan en solución. Las dos subunidades de GyrA se encuentran como dímeros, mientras que las subunidades de GyrB se ven como monómeros. Se representa un fragmento de ADN donde se señala el segmento G (a ser clivado), para introducir el superenrollamiento positivo por pasaje del segmento T. **Paso 2:** atrapamiento del ADN alrededor de la enzima, presentando el segmento T sobre el segmento G, con un entrecruzamiento positivo. **Paso 3:** una vez formados los dímeros de GyrB, se produce la unión de ATP y el atrapamiento del segmento T, mientras que el segmento G es transitoriamente clivado. **Paso 4:** la hidrólisis de una molécula de ATP permite la rotación de GyrB, lo que produce el pasaje del segmento T a través del segmento G clivado. **Paso 5:** la religación del segmento G introduce dos nuevos superenrollamientos negativos en el DNA. La reacción culmina con la hidrólisis de una nueva molécula de ATP, que permite la liberación del segmento T, lo cual libera a la enzima. El asterisco señala el sitio de clivado del ADN, y el círculo indica el bolsillo de unión a ATP.

Tomado y modificado de Costenaro y col.<sup>7</sup>.



## 2.IV.C. Mecanismo de acción

Las quinolonas, que no pueden unirse ni al ADN ni a las girasas por separado, actúan formando un complejo ternario ADN-girasa-quinolona una vez que el ADN ya ha sido clivado, pero antes de su religación. La interacción con el ADN sería por intercalamiento, de modo que los anillos aromáticos de las quinolonas se unen al sitio de clivado del ADN. De este modo, producen el desalineamiento de ambos extremos del ADN, impidiendo la religación<sup>4</sup>.

Por otro lado, interactúa con discretas regiones de ambas subunidades de las girasas (aproximadamente 40 aminoácidos), de modo de impedir la liberación de las mismas del ADN. El resultado final es la estabilización y la acumulación de los complejos ternarios<sup>8,9</sup>.

La detención del funcionamiento de la horquilla de replicación y el clivado del ADN, sin posterior religado, llevan a las quinolonas a alcanzar su efecto bactericida sobre los microorganismos sensibles<sup>4</sup>.

## 2.IV.D. Mecanismos de resistencia a quinolonas

Los primeros mecanismos de resistencia en ser descritos para las quinolonas fueron: alteraciones en los sitios blanco y disminución de la acumulación de las mismas en el interior bacteriano, debido a impermeabilidad de la membrana y/o a sobreexpresión de bombas de eflujo<sup>10</sup>. En ambos casos, los mecanismos de resistencia estaban codificados a nivel del cromosoma bacteriano y no eran transferibles horizontalmente.

### 2.IV.D.a. Alteraciones del sitio blanco:

Si bien, como ya se mencionó, las quinolonas interactúan tanto con las topoisomerasas como con el ADN, la resistencia a quinolonas habitualmente se produce debido a la ocurrencia de mutaciones en los genes que codifican para las distintas topoisomerasas, particularmente en una pequeña zona de dichos genes denominada RDRQ (Región Determinante de Resistencia a Quinolonas), en inglés, QRDR. Para el caso de GyrA, la RDRQ involucra cambios aminoacídicos entre las posiciones 51 a 106, mientras que las mutaciones en *parC* involucran las posiciones 23 a 176. Si bien las RDRQ involucran alrededor de 50 y 150 nucleótidos, respectivamente, la mayoría de las mutaciones descritas se da en las posiciones 83 y 87, en GyrA, y 80 y 84, en ParC<sup>11</sup>. Para el caso de las quinolonas no fluoradas, como el ácido nalidíxico, alcanza una mutación para conferir alta resistencia; sin embargo, para las fluoroquinolonas se requiere la acumulación de dos mutaciones en *gyrA* y al menos una más en *parC*<sup>10</sup>.



redEMC  
Infectología



EUCAST



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



## 2.IV.D.b. Disminución en la captación de quinolonas:

La disminución en el pasaje de las quinolonas al interior de la bacteria está usualmente asociada a dos factores: el aumento de la impermeabilidad a estos antibióticos y/o la sobreexpresión de bombas de eflujo, naturalmente presentes en los microorganismos.

### 2.IV.D.b.i. Alteraciones en la permeabilidad:

Se asocian a la disminución en la expresión de porinas, fundamentalmente OmpF, en *E. coli*, y proteínas homólogas, en otras enterobacterias como *K. pneumoniae*<sup>12</sup>.

### 2.IV.D.b.ii. Bombas de eflujo:

Las bacterias tienen un amplio número de bombas de eflujo, fundamentalmente, asociadas a la membrana interna, lo cual les permite eliminar diversas sustancias tóxicas fuera del citoplasma. Se reconocen cinco familias de bombas de eflujo, que se denominan, en inglés, MATE (*Multidrug And Toxic-compound Extrusion*), MFS (*Major Facilitator Superfamily*), SMR (*Small Multidrug Resistance*), RND (*Resistance Nodulation Division*) y ABC (ATP binding cassette) (ver **Figura 3**).

Si bien AcrAB-TolC es la bomba de eflujo que más contribuye a la resistencia a quinolonas en *E. coli*, las cinco familias han sido asociadas, en mayor o menor medida, a resistencia a dichos antibióticos, ya sea en expresión en estado basal o en condiciones de hiperexpresión por alteración de mecanismos regulatorios<sup>13,14</sup>. A excepción de la familia SMR, donde se ha identificado una sola bomba perteneciente a este grupo que expulsa quinolonas (Mmr en *Mycobacterium smegmatis*), las otras cuatro familias han sido encontradas en diversos microorganismos, incluyendo la familia *Enterobacteriaceae*<sup>14</sup>.

En la **Figura 3**, se muestra un esquema de las cinco familias de bombas (modificado y adaptado de Piddock 2006 y Li *et al* 2015<sup>13,15</sup>, incluyendo, en cada caso, un ejemplo de bombas involucradas en resistencia a quinolonas.

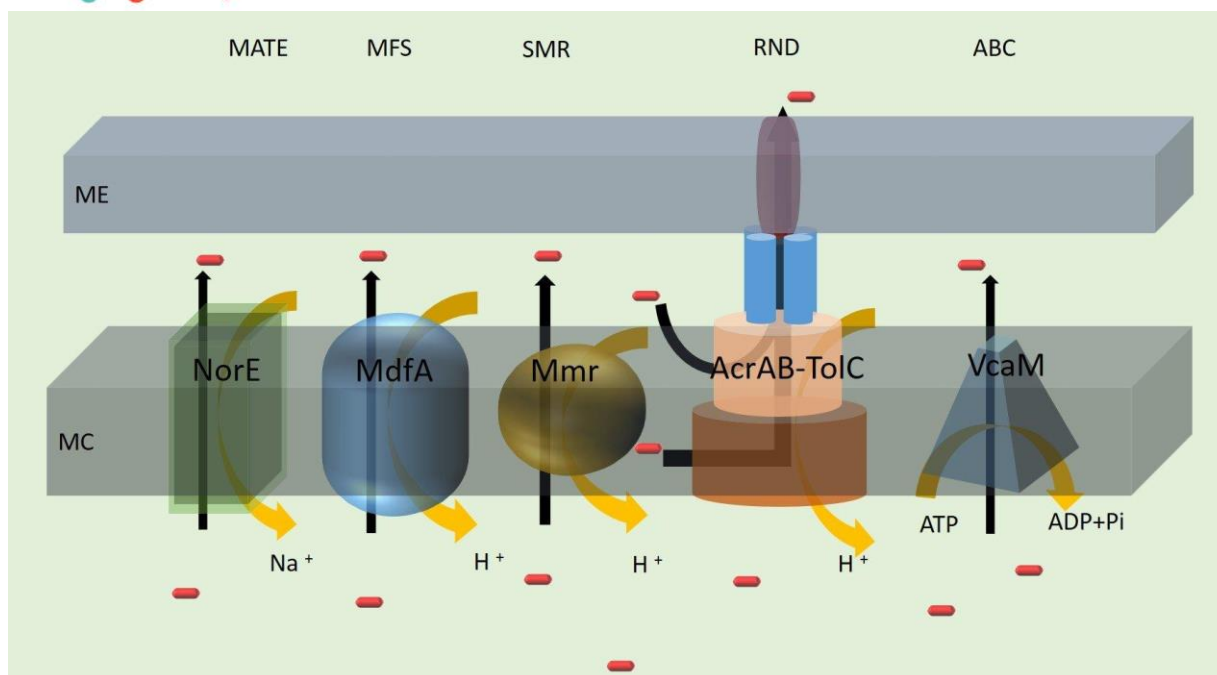


redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



**Figura 3:** Esquema de las cinco familias de bombas de eflujo. MATE (*Multidrug and Toxic-Compound Extrusion*), MFS (*Major Facilitator Superfamily*), SMR (*Small Multidrug Resistance*), RND (*Resistance Nodulation Division*) y ABC (*ATP binding cassette*). El flujo de las moléculas se representa con las flechas negras, los antibióticos se representan como “píldoras rojas”. Los ejemplos puestos en cada grupo han sido reportados como responsables de poder exportar quinolonas. Por una descripción más detallada de los compuestos excluidos por cada tipo de bomba, ver Poole K 2005<sup>14</sup>.

## 2.IV.D.c. Mecanismos transfe

### ribles de resistencia a quinolonas

Luego de la introducción de las fluoroquinolonas en el arsenal de antimicrobianos en el año 1980, no fue sino hasta 1998 que se describió el primer caso de resistencia transferible a quinolonas<sup>16</sup>. Se le llamó a este gen *qnr*, por *quinolone-resistance*, y fue el primero de una larga serie de alelos y variantes que al día de hoy involucra a más de 100 alelos, que se distribuyen en siete variantes distintas de *qnr*.

<http://www.lahey.org/qnrStudies/>

Desde el punto de vista mecánico, se reconocen tres mecanismos diferentes de resistencia transferible a quinolonas:

- Resistencia por protección o enmascaramiento del sitio blanco.
- Resistencia por inactivación enzimática.
- Bombas de eflujo.



redEMC  
Infectología



EUCAST



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



## a) Resistencia por enmascaramiento del sitio blanco

Como ya se comentó, este fue el primer mecanismo descrito correspondiente a una proteína codificada por el gen *qnr* presente en plásmidos conjugativos y, dentro de estos, asociado a integrones de clase 1<sup>17</sup>. Su presencia es capaz de cuadruplicar los niveles de concentración inhibitoria mínima (CIM) de una cepa sensible<sup>18</sup>.

El producto del gen *qnr* es una proteína (Qnr) de 218 aminoácidos, perteneciente a una familia de proteínas de pentapéptidos repetidos. Esta proteína se une específicamente a la ADN girasa y la topoisomerasa IV, y se postula que, de esta manera, evita la formación del complejo ADN-girasa, requerido para que las quinolonas ejerzan su efecto<sup>19,20</sup>. Si bien la protección conferida por esta proteína es de bajo nivel, la importancia clínica de este mecanismo se explica por su capacidad de complementar la resistencia cromosómica a quinolonas, conferida por mutaciones en las topoisomerasas, disminución en la expresión de porinas y sobreexpresión de diversas bombas de eflujo, mediado por mutaciones en genes reguladores<sup>21</sup>. Adicionalmente, facilitaría la selección de mutaciones cromosómicas a concentraciones de quinolonas, que de otro modo resultarían letales en ausencia de dicho gen.

El gen antes descrito pasó a llamarse *qnrA*, ya que más tarde se identificaron, en especies de enterobacterias, otros miembros de la familia de pentapéptidos repetidos codificados en plásmidos, como QnrB<sup>22</sup>, QnrC<sup>23</sup>, QnrD<sup>24</sup> y QnrS<sup>25</sup>.

En el año 2008, se describe un nuevo gen perteneciente a la familia *qnr* asociado a superintegrones de *Vibrio cholerae*, denominado *qnrVC*<sup>26</sup>. A diferencia de los demás grupos de genes *qnr*, los derivados de *qnrVC* tienen dos características particulares: por un lado, presentan una estructura de gen cassette, con un sitio *attC* para reconocimiento de *int1*<sup>26</sup>, y por otro, pese a tener dicha estructura, presentan su propio promotor<sup>27</sup>.

Como ya se comentó, al momento se describen más de 100 alelos, distribuyéndose en siete variantes de *qnrA*, 88 de *qnrB*, una de *qnrC*, dos de *qnrD*, nueve de *qnrS* y siete de *qnrVc*, sumado al más reciente denominado *qnrE*. <http://www.lahey.org/qnrStudies/>

## b) Resistencia por inactivación enzimática

Un segundo mecanismo de resistencia transferible a quinolonas es el conferido por el gen *aac(6′)-Ib-cr*, el cual resulta de dos mutaciones (codones 102 y 179) en el gen *aac(6′)-Ib*. Este último, codifica para una aminoglucósido acetiltransferasa que brinda resistencia a kanamicina, amikacina,



tobramicina y fluoroquinolonas<sup>28</sup>. La modificación enzimática de las fluorquinolonas ocurre por la acetilación del nitrógeno en el anillo piperazilínico. Ciprofloxacina y norfloxacina son los únicos compuestos que poseen un grupo piperazilínico no sustituido, siendo las únicas fluoroquinolonas modificadas por esta nueva enzima. En base a lo antedicho puede darse la co-selección de resistencia a dos clases distintas de drogas llevada a cabo por una misma enzima<sup>28</sup>.

Los niveles de resistencia conferidos por este mecanismo son similares a los descritos para *qnr*, alcanzando a cuadruplicar los niveles de resistencia a ciprofloxacina en relación a la misma cepa antes de incorporar el gen *aac(6)-Ib cr*. Al igual que lo descrito para los genes *qnr*, la presencia de estos genes, si bien confiere bajos niveles de resistencia, favorece la selección de mutantes resistentes por modificaciones en diversos genes que confieren niveles más altos de resistencia.

La acumulación de estos mecanismos transferibles en un mismo microorganismo comienza a hacerse más frecuente, fundamentalmente en *K. pneumoniae* productor de CTX-M-15<sup>29,30</sup>. Los dos mecanismos juntos en un mismo plásmido, son capaces de conferir valores de resistencia absoluta a ciprofloxacina, elevando los valores de CIM de ciprofloxacina a 1 mg/L.

### c) Bombas de eflujo

Estrictamente hablando, la primera bomba de eflujo transferible capaz de conferir sensibilidad disminuida a quinolonas fue *oqxAB*, la cual fue descrita en 2003 en *E. coli* resistente a olaquinox<sup>31</sup>. Sin embargo no se le asignó actividad sobre fluoroquinolonas hasta 2007<sup>32</sup>. *OqxAB* es una bomba perteneciente a la familia RND, que utiliza TolC como componente de membrana externa. Sin embargo confiere resistencia de un modo dependiente de sus niveles de expresión<sup>33</sup>.

En el año 2007 se describe en Japón y Francia la segunda bomba de eflujo transferible que causa disminución de la sensibilidad a las fluorquinolonas. El gen codificante recibe el nombre de *qepA*<sup>34,35</sup> y se designa a la proteína codificada *QepA*. Por similitud de secuencias y funcionalidad, esta proteína pertenece al grupo de las bombas MSF (*major facilitator subfamily*) presentando una alta especificidad de sustrato por norfloxacina, ciprofloxacina y enrofloxacina. La presencia de *QepA* puede producir aumentos de hasta 40 veces los niveles de resistencia a estos antibióticos<sup>35</sup> dependiendo de los niveles de expresión.



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



## 11.2. Evidencia del impacto de la resistencia de bajo nivel a fluoroquinolonas

En modelos de infección urinaria en ratón, cuando se produce la infección con *E. coli* que presentan CIM de ciprofloxacina tan bajas como 0.19 mg/L, mediadas por la presencia de genes *qnr*, se producen fallos terapéuticos al ser tratados con ciprofloxacina a dosis equivalentes a las suministradas en humanos<sup>36</sup>. Por otro lado, utilizando el mismo modelo, CIM de ciprofloxacina tan bajas como 0.06 mg/L se asociaron a fallos terapéuticos cuando estaba presente la enzima Aac(6')Ib-cr<sup>37</sup>. En este caso, los autores evidencian un *clearance* de ciprofloxacina aumentado a nivel renal, lo cual es atribuido a la acción de la Aac(6')Ib-cr, sin observar disminución detectable de la concentración plasmática de ciprofloxacina. Teniendo en cuenta esta evidencia, no solamente sería necesario poder determinar los valores de CIM a fluoroquinolonas, sino también poder hacer una aproximación al mecanismo de resistencia involucrado.

### Diagnóstico de laboratorio

Existen importantes discrepancias entre las guías CLSI y EUCAST, como se ve en la Tabla 1. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con las oximiinocefalosporinas, en este caso ambas instituciones utilizan las mismas cargas en los discos, por lo que es posible utilizar una u otra regla indistintamente.

Fluoroquinolonas	Reglas EUCAST					Reglas CLSI					
	CIM breakpoint		Carga del disco (µg)	diámetro del disco (mm)		CIM breakpoint			diámetro del disco (mm)		
	S ≤	R >		S ≥	R <	S ≤	RI	R≥	S≥	RI	R≤
Ciprofloxacina	0.25	0.5	5	26	24	1	2	4	21	16-20	15
Ciprofloxacina, <i>Salmonella</i> spp.	0.06	0.06				0.06	0.12-0.5	1	31	21-30	20
Pefloxacin (screen), <i>Salmonella</i> spp.			5	24	24						
Levofloxacina	0.5	1	5	23	19	2	4	8	17	14-16	13
Moxifloxacina	0.25	0.25	5	22	22						
Nalidixic acid			30			16		32	19	14-18	13
Norfloxacina (uncomplicated UTI only)	0.5	1	10	22	19	4	8	16	17	13-16	12
Ofloxacina	0.25	0.5	5	24	22	2	4	8	16	13-15	12

**Tabla 1.** Guías CLSI y EUCAST (2017/18) para la interpretación de la sensibilidad a quinolonas en enterobacterias.



NUEVA  
EDICIÓN  
2018

# INTERPRETACIÓN DEL ANTIBIOGRAMA EN LA PRÁCTICA CLÍNICA DIARIA

CURSO  
ONLINE

18 DE ABRIL - 13 DE JUNIO 2018 - ATBgrama2018.evimed.net



redEMC  
Infectología

EUCAST



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA

evimed

Como se puede ver, existen puntos de corte diferenciales para *Salmonella* spp. en ambas recomendaciones. Estos puntos de corte están basados en los ECOFF de estos microorganismos, que es de 0,064 mg/L

(<http://mic.eucast.org/Eucast2/SearchController/search.jsp?action=&BeginIndex=50&Micdif=mic&NumberIndex=50&Antib=47&Specium=-1>).

De acuerdo a la evidencia comentada previamente, en base a modelos de infecciones en ratón, incluso en infecciones urinarias (al menos las altas), deberían tomarse en cuenta también los puntos de corte establecidos para *Salmonella* spp.

Hay que tener en cuenta que, de trabajar con equipos automatizados, los mismos no dan valores tan bajos de CIM como los requeridos para poder determinar estos niveles de susceptibilidad. En estos casos, será necesario realizar determinaciones adicionales de sensibilidad, al menos en el caso de infecciones graves. En este contexto, puntos de corte de 0,125mg/l de ciprofloxacina han sido propuestos para definir una categoría de resistencia intermedia para este microorganismo<sup>38</sup>.

No obstante estas limitaciones en algunos sistemas automatizados, analizando ampliamente el perfil de sensibilidad de un microorganismo, en algunos casos es posible aproximarse bastante a un resultado seguro, si tenemos en cuenta el límite inferior de informe del aparato en uso, los puntos de corte y los ECOFF. En la Tabla 2, se pueden observar las comparaciones de estos valores para el caso de *E. coli*.

ATB	ECOFF	PC ≤ EUCAST (CLSI)	Límite ≤		ECOFF	PC ≤ EUCAST (CLSI)	Límite ≤
BLEE				Imipenem	0,5	2 (1)	0,25
Ampi	8	8	2	Mero	0,125	2 (1)	0,25
Ampi/sul	8	8	2	Amikacina	8	8 (16)	2
PTZ	8	8 (16)	4	Gentamicina	2	2 (4)	1
Cefotaxime	0,25	1	1	Ac. Nal	16	16	2
Ceftazidime	0,5	1 (4)	1	Cipro	0,064	0,5 (1)	0,25
Cefepime	0,125	1 (2)	1	Colistina	2	2	0,5
				SXT	20	20 (40)	20

**Tabla 2.** Se muestran los ECOFF para *E. coli* de distintos antibióticos, los puntos de corte (PC) de EUCAST y CLSI y el límite inferior de CIM que detecta un equipo automatizado. Si en PC aparece un solo valor, es que estos son coincidentes. En caso de haber discrepancias, el valor de CLSI se muestra entre paréntesis. Se encuentran coloreados en verde aquellos PC que coinciden con los ECOFF y los límites del aparato que cubren estos valores; en amarillo, aquellos que no cubren estos valores, pero no se encuentran más alejados de dos a cuatro diluciones, y en rojo, los valores mayores.

Como se ve en la **Tabla 2**, el problema principal es con la ciprofloxacina. De acuerdo a los mecanismos de resistencia analizados, la resistencia a quinolonas puede involucrar a ácido nalidíxico, ciprofloxacina y amikacina (dentro de los antibióticos presentes en este panel). Tanto los valores ECOFF de ácido nalidíxico como de amikacina parecen estar un poco altos, a juzgar por valores de CIM de dichos antibióticos encontrados en microorganismos productores de Aac(6')Ib-cr y qnr, respectivamente. Sin embargo, si los valores de CIM al ácido nalidíxico y amikacina son  $\leq 2$  mg/l, muy probablemente la CIM a ciprofloxacina estará por debajo de los valores ECOFF.

Finalmente, se han diseñado un par de diagnósticos fenotípicos para la detección de aac(6')Ib-cr, el primero, para detectarla en aislamientos con alta resistencia a fluoroquinolonas, fue propuesto por Wachino y cols. en 2011<sup>39</sup>. Para esto, se utilizan dos tubos con LB + 8 mg/l de norfloxacina; al primero se le agrega al aislamiento sospechoso de presentar la enzima y el otro se deja sin nada. Se pone a incubar toda la noche. Al otro día, se gotean 10  $\mu$ l de cada caldo en dos discos de papel de 6 mm de diámetro, que se colocan en una placa de Mueller-Hinton sembrada con un McFarland 0,5 de una



redEMC  
Infectología

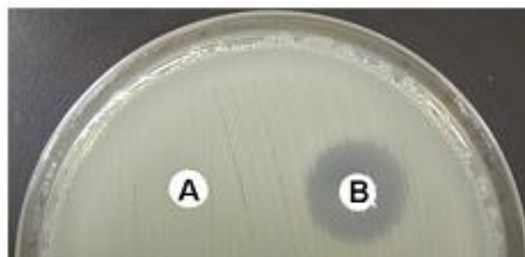


UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



cepa de *E. coli* ATCC 25922. A las 24 horas de incubación, se observará un halo de inhibición de unos 18 mm de diámetro alrededor del disco que contiene caldo sin bacteria, mientras que se observará una disminución del halo (que podrá alcanzar los 6 mm) si el aislamiento estudiado presenta la enzima buscada, como se ve en la **Figura 4**.



**Figura 4.** Prueba para la detección de *aac(6')Ib-cr* propuesta por Wachino y cols.<sup>39</sup> Disco A, goteado con caldo con cepa productora de *aac(6')Ib-cr*; B, disco sembrado con caldo sin microorganismos. Por más explicación, ver el texto.

Dado que estos tests se realizan solo sobre microorganismos resistentes a fluoroquinolonas, su utilidad es de carácter epidemiológico, más que clínico.

En el año 2013, Andres y cols.<sup>40</sup> proponen la realización de un test realizado directamente en el antibiograma por disco difusión. Una diferencia de 5 mm o más a favor del diámetro del halo de levofloxacina, con relación al de ciprofloxacina (ambos discos de 5 µg), evidencia la presencia de *aac(6')Ib-cr*.

## 11.3. Referencias

1. Emmerson AM, Jones AM. The quinolones: decades of development and use. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2003; 51: 13-20.
2. Ward-Mcquaid JF, Jichlinski D, Macis R. Nalidixic Acid in Urinary Infections. *Br Med J* 1963; 2: 1311-4.
3. Strahilevitz J, Hooper D. Quinolones. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. Philadelphia, Churchill, Livingstone-ELSEVIER 2009; 487.
4. Collin F, Karkare S, Maxwell A. Exploiting bacterial DNA gyrase as a drug target: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011; 92: 479-97.
5. Drlica K, Zhao X. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 1997; 61: 377-92.



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



6. Roca J, Wang JC. DNA transport by a type II DNA topoisomerase: evidence in favor of a two-gate mechanism. *Cell* 1994; 77: 609-16.
7. Costenaro L, Grossmann JG, Ebel C et al. Modular structure of the full-length DNA gyrase B subunit revealed by small-angle X-ray scattering. *Structure* 2007; 15: 329-39.
8. Aedo S, Tse-Dinh YC. Isolation and quantitation of topoisomerase complexes accumulated on *Escherichia coli* chromosomal DNA. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56: 5458-64.
9. Zhang H, Guo J, Li D et al. Confirmation of quinolone-induced formation of gyrase-DNA conjugates using AFM. *Bioorg Med Chem Lett* 2013; 23: 4622-6.
10. Ruiz J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2003; 51: 1109-17.
11. Kim ES, Hooper DC. Clinical importance and epidemiology of quinolone resistance. *Infect Chemother* 2014; 46: 226-38.
12. Domenech-Sanchez A, Martinez-Martinez L, Hernandez-Alles S et al. Role of *Klebsiella pneumoniae* OmpK35 Porin in Antimicrobial Resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 3332-5.
13. Li XZ, Plesiat P, Nikaido H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Rev* 2015; 28: 337-418.
14. Poole K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56: 20-51.
15. Piddock LJ. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19: 382-402.
16. Martínez-Martínez L, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *The Lancet* 1998; 351: 797-9.
17. Wang M, Tran JH, Jacoby GA et al. Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 2242-8.
18. Wang M, Sahm DF, Jacoby GA et al. Emerging plasmid-mediated quinolone resistance associated with the qnr gene in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1295-9.
19. Tran JH, Jacoby GA, Hooper DC. Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein QnrA with *Escherichia coli* topoisomerase IV. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 3050-2.
20. Tran JH, Jacoby GA, Hooper DC. Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 118-25.
21. Vinué L, Corcoran MA, Hooper DC et al. Mutations That Enhance the Ciprofloxacin Resistance of *Escherichia coli* with qnrA1. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2016; 60: 1537-45.
22. Quiroga MP, Andres P, Petroni A et al. Complex class 1 integrons with diverse variable regions, including aac(6')-Ib-cr, and a novel allele, qnrB10, associated with ISCR1 in clinical enterobacterial isolates from Argentina. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 4466-70.
23. Wang M, Guo Q, Xu X et al. New plasmid-mediated quinolone resistance gene, qnrC, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 1892-7.



redEMC  
Infectología



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



24. Cavaco LM, Hasman H, Xia S et al. qnrD, a Novel Gene Conferring Transferable Quinolone Resistance in *Salmonella enterica* Serovar Kentucky and Bovismorbificans Strains of Human Origin. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 603-8.
25. Hopkins KL, Wootton L, Day MR et al. Plasmid-mediated quinolone resistance determinant qnrS1 found in *Salmonella enterica* strains isolated in the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2007; 59: 1071-5.
26. Fonseca EL, Dos Santos Freitas F, Vieira VV et al. New qnr gene cassettes associated with superintegron repeats in *Vibrio cholerae* O1. *Emerg Infect Dis* 2008; 14: 1129-31.
27. da Fonseca EL, Vicente AC. Functional characterization of a Cassette-specific promoter in the class 1 integron-associated *qnrVC1* gene. *Antimicrob Agents Chemother*; 56: 3392-4.
28. Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA et al. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med* 2006; 12: 83-8.
29. Bado I, Gutiérrez C, García-Fulgueiras V et al. CTX-M-15 in combination with aac(6')-Ib-cr is the most prevalent mechanism of resistance both in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*, including *K. pneumoniae* ST258, in an ICU in Uruguay. *J Glob Antimicrob Resist* 2016; 6: 5-9.
30. Cruz GR, Radice M, Sennati S et al. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants among oxyiminocephalosporin-resistant Enterobacteriaceae in Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2013; 108: 924-7.
31. Sorensen AH, Hansen LH, Johannesen E et al. Conjugative plasmid conferring resistance to olaquinox. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 798-9.
32. Hansen LH, Jensen LB, Sorensen HI et al. Substrate specificity of the OqxAB multidrug resistance pump in *Escherichia coli* and selected enteric bacteria. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60: 145-7.
33. Rodríguez-Martínez JM, Díaz de Alba P, Briales A et al. Contribution of OqxAB efflux pumps to quinolone resistance in extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2013; 68: 68-73.
34. Yamane K, Wachino J-i, Suzuki S et al. New Plasmid-Mediated Fluoroquinolone Efflux Pump, QepA, Found in an *Escherichia coli* Clinical Isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2007; 51: 3354-60.
35. Perichon B, Courvalin P, Galimand M. Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by QepA-mediated efflux in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 2464-9.
36. Jakobsen L, Cattoir V, Jensen KS et al. Impact of low-level fluoroquinolone resistance genes qnrA1, qnrB19 and qnrS1 on ciprofloxacin treatment of isogenic *Escherichia coli* strains in a murine urinary tract infection model. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2012; 67: 2438-44.
37. Guillard T, Cambau E, Chau F et al. Ciprofloxacin Treatment Failure in a Murine Model of Pyelonephritis Due to an AAC(6')-Ib-cr-Producing *Escherichia coli* Strain Susceptible to Ciprofloxacin In Vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2013; 57: 5830-5.

NUEVA  
EDICIÓN  
2018

# INTERPRETACIÓN DEL ANTIBIOGRAMA EN LA PRÁCTICA CLÍNICA DIARIA

CURSO  
ONLINE

18 DE ABRIL - 13 DE JUNIO 2018 - [ATBgrama2018.evimed.net](http://ATBgrama2018.evimed.net)



redEMC  
Infectología

EUCAST



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA



38. Rodríguez-Martínez JM, Machuca J, Calvo J et al. Challenges to accurate susceptibility testing and interpretation of quinolone resistance in Enterobacteriaceae: Results of a Spanish multicentre study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2015; 70: 2038-47.
39. Wachino J-i, Yamane K, Arakawa Y. Practical Disk-Based Method for Detection of Escherichia coli Clinical Isolates Producing the Fluoroquinolone-Modifying Enzyme AAC(6-aminopenicillanic acid)-Ib-cr. *Journal of Clinical Microbiology* 2011; 49: 2378-9.
40. Andres P, Lucero C, Soler-Bistué A et al. Differential Distribution of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes in Clinical Enterobacteria with Unusual Phenotypes of Quinolone Susceptibility from Argentina. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2013; 57: 2467-75.

NUEVA  
EDICIÓN  
2018

# INTERPRETACIÓN DEL ANTIBIOGRAMA EN LA PRÁCTICA CLÍNICA DIARIA

CURSO  
ONLINE

18 DE ABRIL - 13 DE JUNIO 2018 - [ATBgrama2018.evimed.net](http://ATBgrama2018.evimed.net)



redEMC  
Infectología

EUCAST

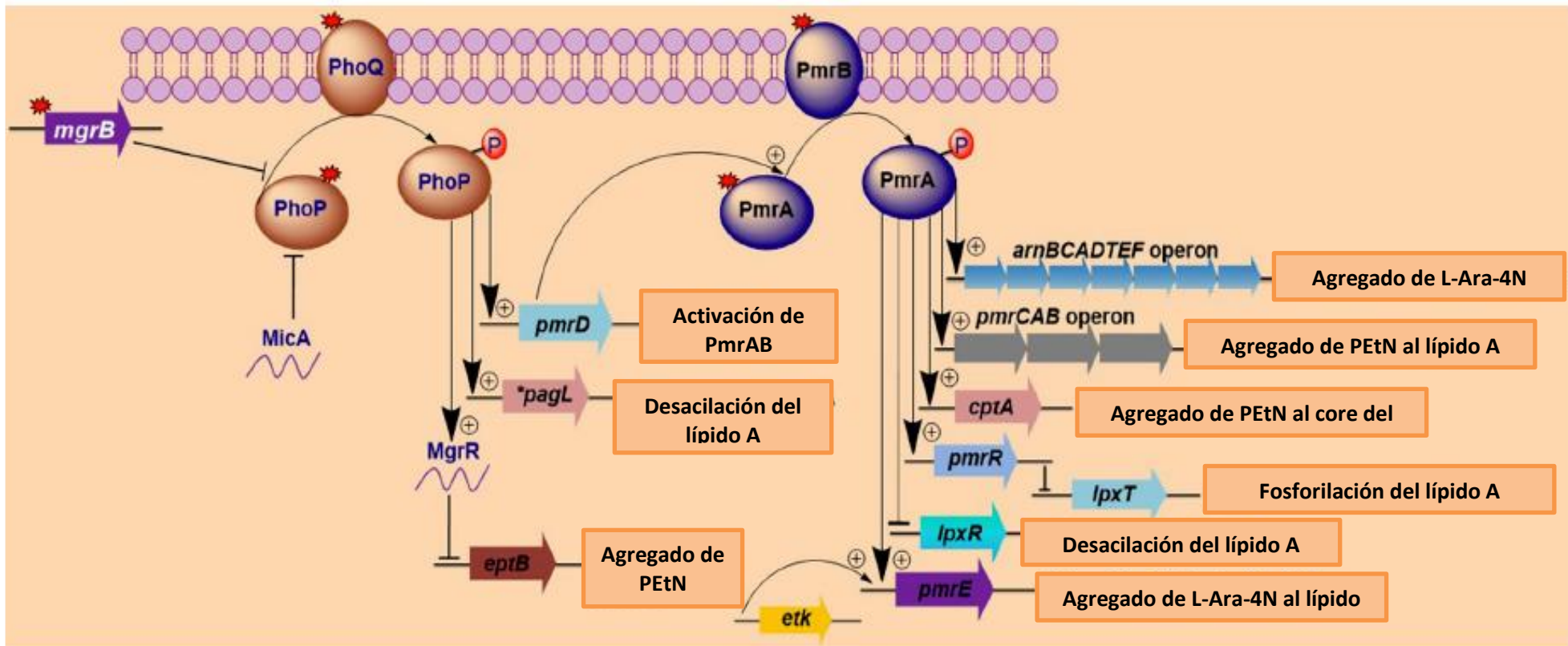


UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

GESTIÓN EDUCATIVA,  
INFORMATIVA Y LOGÍSTICA

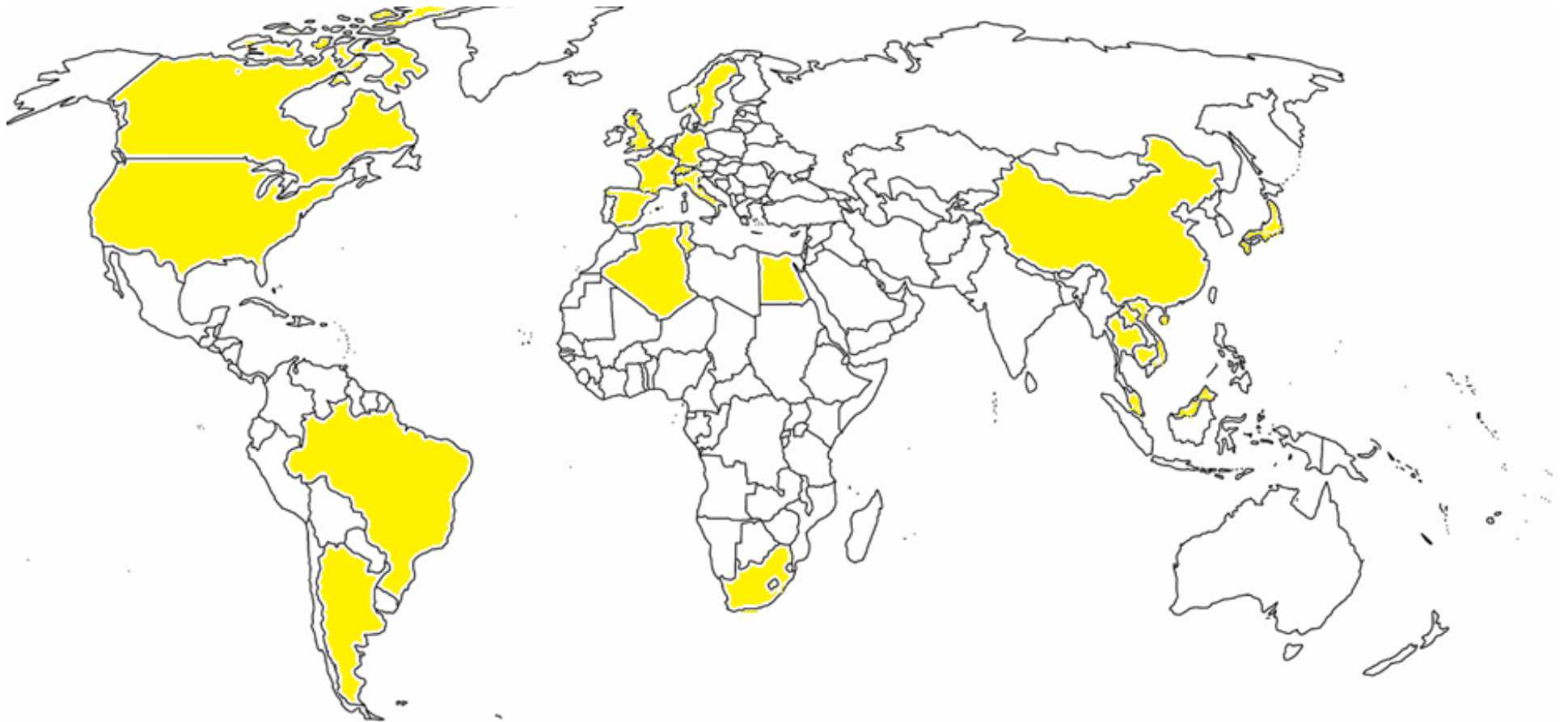


## FIGURAS ANEXAS



**Figura 5 Capítulo 1.** Activación de la modificación del LPS bacteriano mediado por TCS en bacterias Gram negativas. Los principales TCS detectados en bacterias Gramnegativas son PhoPQ y PmrAB. Estos sistemas son capaces de regular los distintos genes involucrados, fundamentalmente, en la resistencia a las polimixinas. La activación de PhoPQ y PmrAB es capaz de mediar diferentes modificaciones en el lípido A bacteriano. En las bacterias de mayor importancia clínica, ocurre generalmente agregado de de L-Ara-4N e PEtN. En esta Figura es posible visualizar la presencia de los dos reguladores negativos descritos hasta este momento (*mgrB* y *MicA*) en bacterias Gram negativas. Figura adaptada de Olaitan *et al.* *Frontiers in Microbiol.* 2014;5:643.



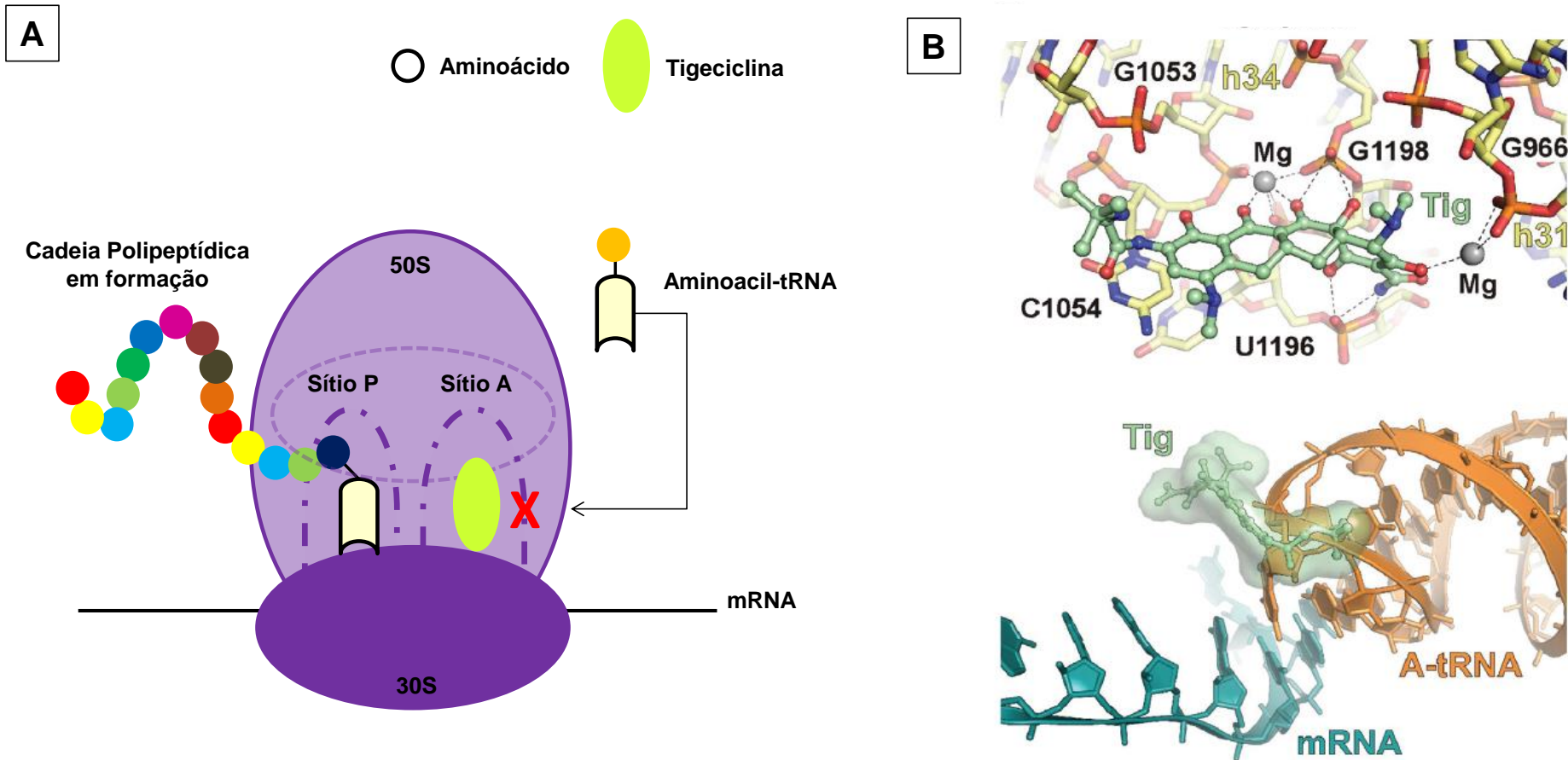


**Figura 6 Capítulo 1.** Diseminación de microorganismos transportando el gen *mcr-1*. El gen *mcr-1* fue descubierto en aislamientos de *E. coli* provenientes de China, y en pocos meses fue detectado en varias otras regiones del mundo. Se cree que este mecanismo ya fuera común en muestras ambientales, y que el uso de polimixina en la cría de animales para consumo haya facilitado la diseminación del mismo. Los países coloreados en amarillo son aquellos lugares donde se detectaron muestras positivas de *mcr-1*, hasta mayo de 2016.

Fenotipo/ Modificación	Genotipo (Operón)	Especie	Resistencia a la vancomicina	Resistencia a la teicoplanina	Expresión
VanA <sup>9</sup> D-Ala-D-Lac	<i>vanA</i>	<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i>	Alto grado de resistencia CIM, 64 -1000 µg/mL	Alto grado de resistencia CIM, 16-512 µg/mL	Resistencia Inducible (alto grado)
VanB <sup>12,13</sup> D-Ala-D-Lac	<i>vanB</i>	<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i>	Alto grado de resistencia CIM, 4-512 µg/mL	Sensible CIM, ≤0.5 µg/mL	Resistencia Inducible (alto grado)
VanC <sup>3,8,14</sup> D-Ala-D-Ser	<i>vanC1</i> , <i>vanC2</i> y <i>vanC3</i>	<i>E. gallinarum</i> , <i>E. casseliflavus</i> , <i>E. flavescens</i>	Bajo grado de resistencia CIM, 2-32 µg/mL	Sensible CIM, ≤0.5 µg/mL	Resistencia constitutiva (bajo grado)
VanD <sup>15</sup> D-Ala-D-Lac	<i>vanD</i>	<i>E. faecium</i>	Moderado a alto grado de resistencia CIM, 64-256 µg/mL	Bajo grado de resistencia CIM, 4-32 µg/mL	Resistencia Inducible
VanE <sup>16</sup> D-Ala-D-Ser	<i>vanE</i>	<i>E. faecalis</i>	Bajo grado de resistencia CIM, 16 µg/mL	Sensible CIM, ≤0.5 µg/mL	Resistencia Inducible
VanG <sup>17</sup> D-Ala-D-Ser	<i>vanG</i>	<i>E. faecalis</i>	Bajo grado de resistencia CIM, ≤ 16 µg/mL	Sensible CIM, ≤0.5 µg/mL	Resistencia Inducible
VanL <sup>18</sup> D-Ala-D-Ser	<i>vanL</i>	<i>E. faecalis</i>	Bajo grado de resistencia CIM, 8 µg/mL	Sensible	Resistencia Inducible
VanM <sup>19</sup> D-Ala-D-Lac	<i>vanM</i>	<i>E. faecium</i>	Alto grado de resistencia CIM, >256 µg/mL	Alto grado de resistencia	Resistencia Inducible
VanN <sup>20</sup> D-Ala-D-Ser	<i>vanN</i>	<i>E. faecium</i>	Bajo grado de resistencia CIM, 16 µg/mL	Sensible CIM, ≤0.5 µg/mL	Resistencia constitutiva

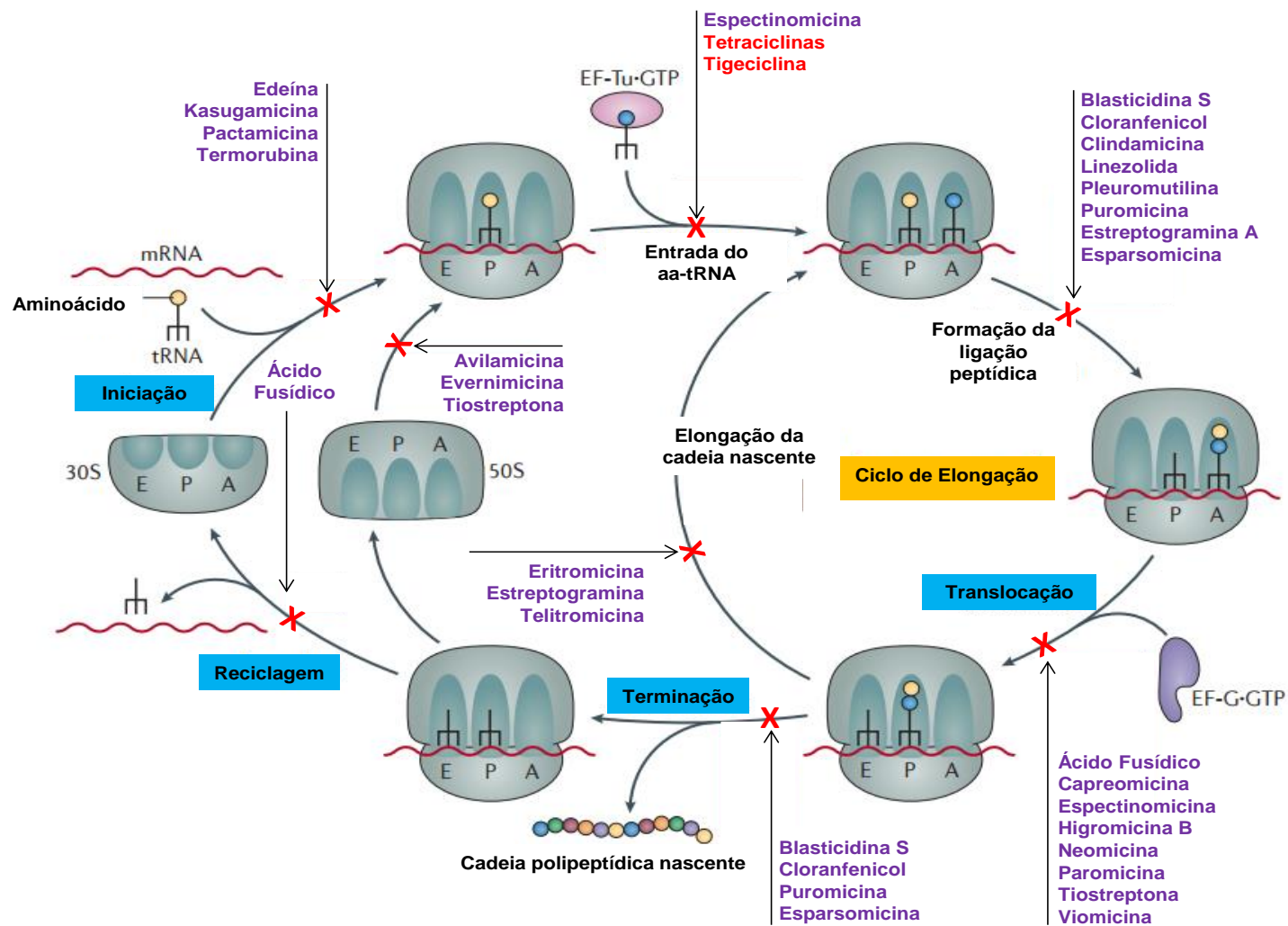
**Tabla 1 Capítulo 5.** Fenotipos y genotipos descritos en *Enterococcus* spp. resistentes a la vancomicina.

CIM: concentración inhibitoria mínima.

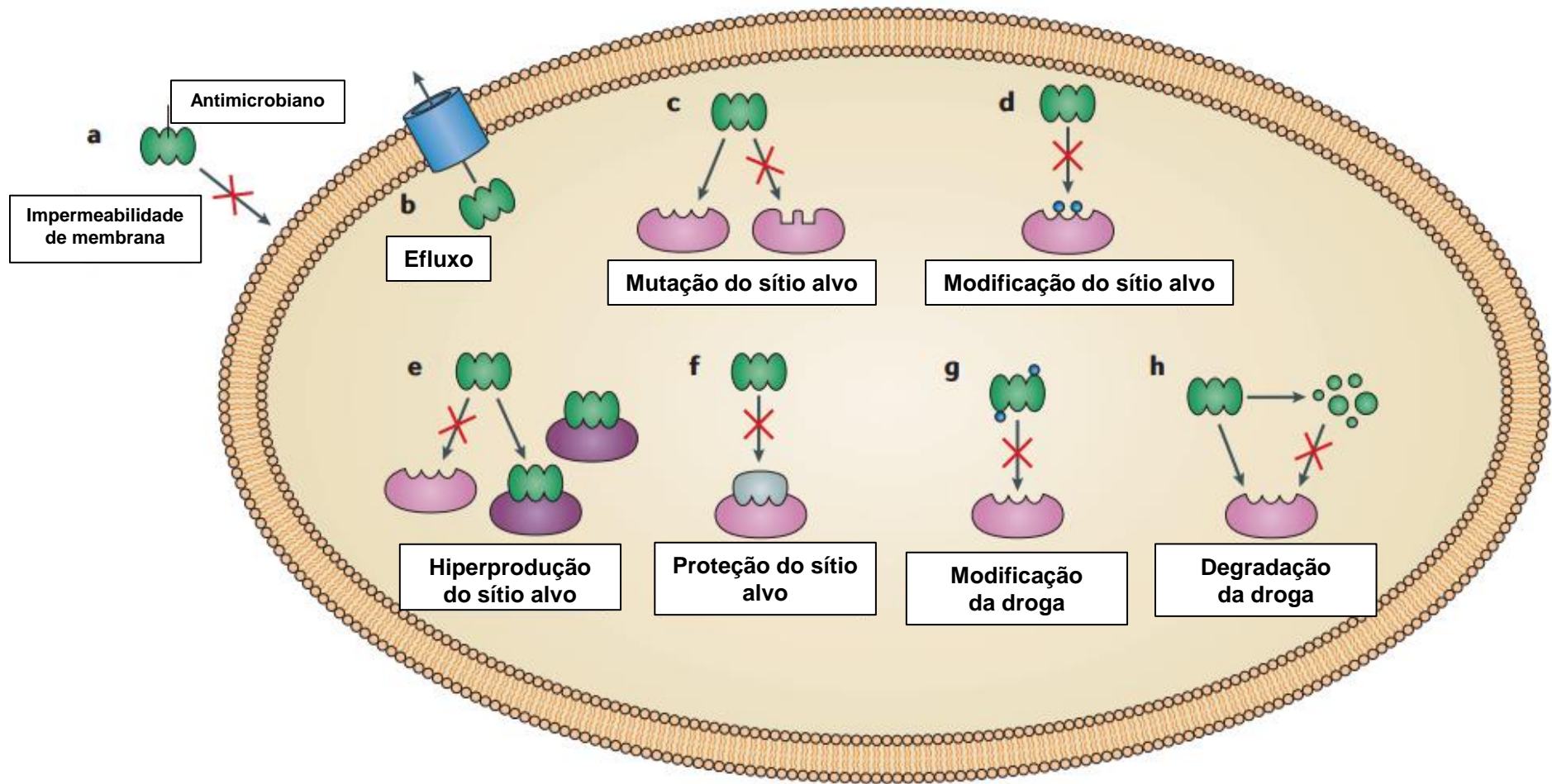


**Figura 3 Capítulo 8.** Mecanismo de acción de las glicilciclinas (tigeciclina). **(A)** Inhibición de la síntesis proteica mediante la unión de tigeciclina al sitio A de la subunidad ribosomal 30S bacteriana. **(B)** Estructura tridimensional de la molécula de tigeciclina uniéndose al sitio ribosomal, en relación con el aminoacil-ARNt y al ARNm.

Figura B adaptada de Nguyen *et al.* Biol Chem. 2014;395(5):559-75<sup>19</sup>.



**Figura 4 Capítulo 8.** Sitio de unión de diferentes clases de antimicrobianos durante las cuatro fases de la síntesis proteica bacteriana. Figura adaptada de Wilson DN. Nat Rev Microbiol. 2014;12(1):35-48<sup>35</sup>.



**Figura 5 Capítulo 8.** Diferentes mecanismos de resistencia que pueden afectar a los antimicrobianos que actúan inhibiendo la síntesis de proteínas bacterianas.

Figura adaptada de Wilson DN. *Nat Rev Microbiol.* 2014;12(1):35-48<sup>35</sup>.