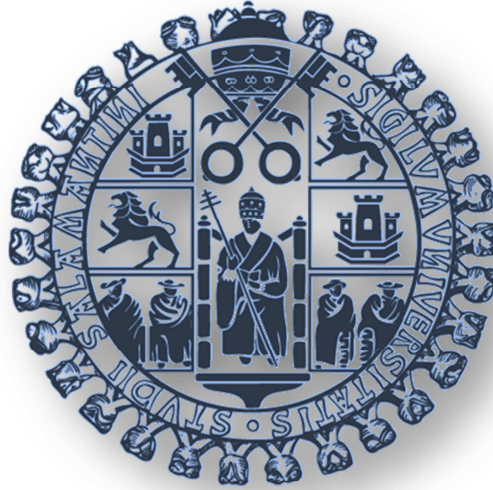


**Programa de Doctorado:  
Salud y Desarrollo en los Trópicos**



**Resistencia plasmídica a linezolid en *Staphylococcus aureus* y estafilococos no productores de coagulasa**

**TESIS DOCTORAL**

**Noelia Calvo Sánchez**

**2017**



## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar quiero agradecer a mis directores de tesis, ya que sin ellos, nada de esto habría sido posible, el Dr. Juan Luis Muñoz y la Dra. María Nieves Gutiérrez que además de aguantarme y guiarme en todo momento han formado parte de mi formación, tanto profesional como personal.

A los adjuntos que contribuyeron a mi formación: el Dr. José Elías, la Dra. Inmaculada García, la Dra. Mónica de Frutos, el Dr. Jesús Iglesias, el Dr. Santiago Muñoz y la Dra. Ángela Sánchez.

A Nieves y Ana solo decirles Gracias y que nunca podré decirles lo que me ayudaron en todo momento.

A mis compañeras residentes, con las que tantas horas he pasado y me ayudaron estos años siendo mi familia, ausente en la ciudad, Lourdes Viñuela, Lucy Asensio, María Siller y Sara Hernández. En especial a Lourdes y Lucy por ser como verdaderas amigas que siempre confiaron en mí y que formarán parte de mi vida para siempre.

A todos mis amigos, los que hice durante esos años y los que estuvieron siempre conmigo, por saber escuchar y darme consejos.

Por último, quiero agradecer a mi familia: a mis padres; que decir de ellos, los que me enseñaron como luchar y me dieron todo lo que tengo, sin ellos nunca llegaría a donde estoy. Mi hermano y mi cuñada por estar al otro lado del teléfono cada vez que necesitaba un consejo.

A mi madrina: Milucha por ser la que más cree en mí( a veces más que yo) por estar siempre de mi lado y apoyarme en cada en cada una de mis aventuras.

# INDICE



## INDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
<b>1.INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
<b>2.EVOLUCIÓN DE LA RESISTENCIA EN <i>S. AUREUS</i></b>	<b>5</b>
<b>3. FACTORES DE PATOGENICIDAD EN <i>Staphylococcus aureus</i></b>	<b>17</b>
3.1. Cassette cromosómico estafilocócico mec(SCCmec)	19
3.2. Epidemiología de las cepas CA-SAMR	20
3.3. Virulencia de las cepas causantes de CA-SAM	21
3.4. Tratamiento de CA-SARM	223
<b>4. OXAZOLIDINONAS</b>	<b>25</b>
4.1. Estructura química	25
4.2. Mecanismo de acción	26
4.3. Actividad intrínseca	28
4.4. Mecanismo de resistencia	33
4.5. Características farmacocinéticas/farmacodinámicas	42
4.6. Efectos adversos	45
4.7. Uso clínico	47
<b>JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b>	<b>51</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>53</b>
1. Selección, identificación y conservación de los aislamientos	55
2. Detección y confirmación de la presencia de mecanismo de resistencia a linezolid	56
3. Detección de factores de patogenicidad en <i>S. aureus</i>	60
4. Determinación del entorno genético del gen <i>cfr</i>	68
<b>RESULTADOS</b>	<b>73</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>91</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>119</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>123</b>





# INTRODUCCIÓN



## 1.INTRODUCCIÓN

*Staphylococcus aureus* es uno de los principales patógenos humanos. Con frecuencia, forma parte de la microbiota de la piel y mucosas, pero puede asimismo aparecer implicado en la etiología de numerosas infecciones, como infecciones de piel y tejidos blandos, neumonías, bacteriemias, infecciones asociadas a catéteres, etc.(Diekema DJ et al., 2001). En torno al 20% de las personas son portadoras de *S. aureus*. (Kluytmans J, et al.1997).

Este microorganismo causa hasta el 40% de las infecciones nosocomiales. Dentro de esta especie tienen especial importancia, por su multirresistencia, las cepas resistentes a metilina (SARM), que son resistentes, en realidad, a la gran mayoría de los beta-lactámicos, con excepción de algunas cefalosporinas de reciente desarrollo y que, en los últimos años, han pasado de ser microorganismos típicamente nosocomiales a aparecer también causando infecciones en la comunidad (CA-SARM).

*S. aureus* es sensible, en condiciones basales, a la mayor parte de los antimicrobianos activos frente a Gram positivos que se han ido desarrollando a lo largo de la historia. La gran capacidad que han demostrado para el desarrollo de resistencia deriva, sobre todo, de su capacidad para adquirir resistencias de manera horizontal, a partir de elementos genéticos transferibles obtenidos, en ocasiones, incluso de géneros y especies filogenéticamente bastante alejados. Aunque algunas resistencias se han desarrollado a partir de la emergencia primaria de mutaciones en *S. aureus*, su relevancia cuantitativa ha sido menor. A estos distintos mecanismos de adquisición de resistencia, hay que añadir la

importancia de la presión ambiental, que ha constituido un elemento fundamental en la selección de cepas y clones resistentes una vez aparecidos. La gran capacidad de *S. aureus* para adquirir resistencias a los antimicrobianos se demostró ya poco después de que el equipo liderado por Florey y Chain en Oxford demostrara las enormes posibilidades terapéuticas de la penicilina, e inaugurara la era antibiótica. Ya a mediados de los años 40 se había manifestado esta capacidad de los estafilococos para desarrollar resistencia a penicilina y, de hecho, menos de 10 años después, la resistencia a penicilina en *S. aureus* se había convertido en el Reino Unido en un problema de notable trascendencia, al menos a nivel hospitalario.

Existen dos características de *S. aureus*, aparentemente contradictorias, que son determinantes en su comportamiento como patógeno y en su epidemiología: se trata de uno de los microorganismos mejor dotados como patógenos, en cuanto a la enorme cantidad de factores de patogenicidad distintos y con diferentes funciones que es capaz de producir, pero al tiempo son unos microorganismos capaces de colonizar de forma completamente asintomática y sin producir tipo alguno de patología a porcentajes importantes de la población, que actúan así como reservorio y vehículo de transmisión del microorganismo. (Belkum J, et al., 1997). Estos portadores tienen, como es lógico, un mayor riesgo de desarrollar infecciones estafilocócicas que los individuos no portadores, pero al mismo tiempo constituyen la principal fuente de difusión de los microorganismos, que se realiza fundamental de forma directa por contacto entre personas, aunque los objetos y superficies contaminadas

también pueden jugar un papel como medios de transmisión del microorganismo. (Muto CA et al., 2003). *S. aureus* tiene una dotación de factores de patogenicidad que le permite causar infecciones en personas previamente sanas. No obstante, existen factores, como la pérdida o alteración de la barrera cutáneo-mucosa o la presencia de patologías o circunstancias previas que comportar un cierto grado de inmunodepresión (diabetes, tratamientos con corticoides u otros fármacos con efecto inmunosupresor, alteraciones funcionales de los neutrófilos, VIH, etc.), que incrementan el riesgo de infección.

Los principales problemas que plantea *S. aureus* en el momento actual, están relacionados con la resistencia a los antimicrobianos, que en algunos casos, como el de la meticilina, han llegado a alcanzar niveles de epidemia a escala mundial. Además, en los últimos años, se están produciendo modificaciones epidemiológicas importantes, ya que la resistencia a meticilina en *S. aureus*, que constituía uno de los paradigmas de infección nosocomial, ya no sólo se localiza en el ámbito hospitalario, sino que también se encuentra a nivel comunitario, asociado habitualmente a determinados cuadros clínicos y con presentaciones considerablemente agresivas. (Klevens RM et al., 2007).

## **2. EVOLUCIÓN DE LA RESISTENCIA EN *S. aureus***

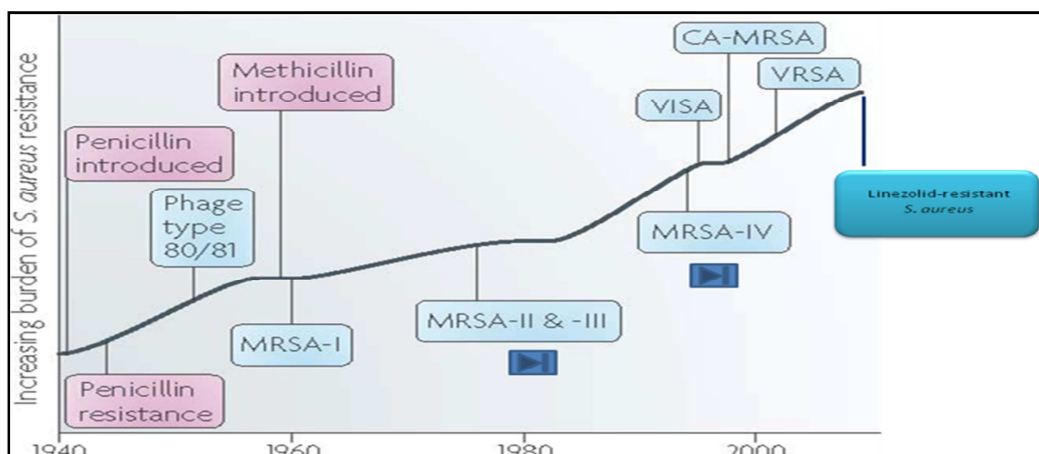
Las primeras resistencias a meticilina se describieron apenas meses después de introducirse en la práctica clínica las primeras penicilinas resistentes a penicilinasas estafilocócicas (meticilina, isoxazolil penicilinas) en 1961. El país donde se aisló por primera vez una cepa SARM fue en Estados Unidos, y a partir

de ahí, la infección se ha convertido en un problema a nivel mundial, evolucionando en una serie de fases asociadas a la irrupción de nuevas cepas que han ido adquiriendo el *cassette* cromosómico portador del gen que condiciona esta resistencia (*mecA*, *mecC*).

### **Fases de las epidemias:**

La evolución de la resistencia a penicilina, meticilina, y la aparición sobre esta resistencia de resistencias adicionales a otros fármacos activos frente a Gram positivos, ha evolucionado en diferentes fases, tal como aparece en la Figura 1.

Primera fase: comienza a mediados de 1940, cuando las cepas de *S. aureus* resistente a penicilina comenzaron a aumentar su frecuencia en los hospitales, fundamentalmente en Gran Bretaña y Estados Unidos.



**Figura 1:** Evolución histórica de la aparición de los clones de SARM y la resistencia a otros antibióticos activos frente a bacterias Gram positivas.

Estas cepas eran portadoras de un plásmido que codificaba una penicilinas, enzima que inactiva tanto a las penicilinas naturales como a las aminopenicilinas. Esta resistencia fue inicialmente esporádica y observada en el

medio hospitalario, pero en dos décadas más del 75% de los aislados eran resistentes y se habían diseminado a la comunidad. (Kirby W et al., 1944).

Estas infecciones eran causadas por cepas que contenía el profago 80/81, y producían la proteína de Panton Valentine, una proteína que posteriormente se demostraría que estaba estrechamente vinculada a la patogenicidad de *Staphylococcus* spp., y a la producción de determinados cuadros clínicos, fundamental infecciones de piel y tejidos blandos e infecciones respiratorias.

La resistencia a la penicilina estimuló el desarrollo de penicilinas semisintéticas resistentes a penicilinas, como la meticilina y todo el grupo de penicilinas isoxazólicas (cloxacilina, oxacilina, etc.)(Barber L et al., 1961).

Segunda fase: Las penicilinas resistentes a penicilinasas (PRPs) fueron introducidas en uso clínico a principios de los años 60, y pocos meses después, se describieron los primeros aislamientos de SARM. Dicha resistencia estaba mediada por el gen *mecA*, de aproximadamente 2 kb, integrado en el DNA cromosómico bacteriano, y asociado a un número variable de otros determinantes genéticos, entre los que pueden encontrarse secuencias de origen plasmídico, transposones, secuencias de inserción y, por lo tanto, genes que contribuyen a expresar resistencia a los antibióticos no  $\beta$ -lactámicos. El gen *mecA* codifica una PBP adicional (PBP2a) con actividad transpeptidasa y muy baja afinidad por los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, que confiere a los microorganismos que la producen resistencia a casi todos los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, y que procede probablemente de *Staphylococcus sciuri*, una especie muy infrecuente como patógeno humano. No

obstante, los mecanismos de resistencia de estas cepas no fueron identificados hasta 20 años después de describirse las primeras resistencias. (Barber M et al., 1961).

La proteína PBP2a es una PBP con baja afinidad por los  $\beta$ -lactámicos, que se mantiene funcionalmente activa cuando el resto de PBPs han sido bloqueadas por el  $\beta$ -lactámico, permitiendo así que la síntesis de la pared bacteriana continúe realizándose. Este mecanismo confiere resistencia a todos los  $\beta$ -lactámicos, incluyendo las cefalosporinas y carbapenemas, con excepción de algunas cefalosporinas desarrolladas recientemente, que constituirían para algunos autores la 5ª generación de cefalosporinas.

Una característica que ha venido siendo habitual en *S. aureus* ha sido su resistencia a otros antimicrobianos pertenecientes a diferentes clases. No se trata de una resistencia cruzada, ya que no existen mecanismos de resistencia comunes, sino de una corresponsencia, es decir, una resistencia a antimicrobianos pertenecientes a grupos químicamente dispares, y con mecanismos de resistencia distintos, pero que, por diferentes motivos, aparecen de forma simultánea en un microorganismo. La resistencia a aminoglucósidos ha sido un marcador habitual, seguida de la resistencia a otros antimicrobianos como macrólidos, lincosamidas y fluoroquinolonas.

En relación a esta afirmación, durante la primera mitad de los años noventa, la resistencia antibiótica de SARM a eritromicina, rifampicina, tetraciclina, gentamicina, tobramicina y ciprofloxacino oscilaba entre el 80 y el 90% de los aislamientos. En la segunda mitad de esta década, el porcentaje de

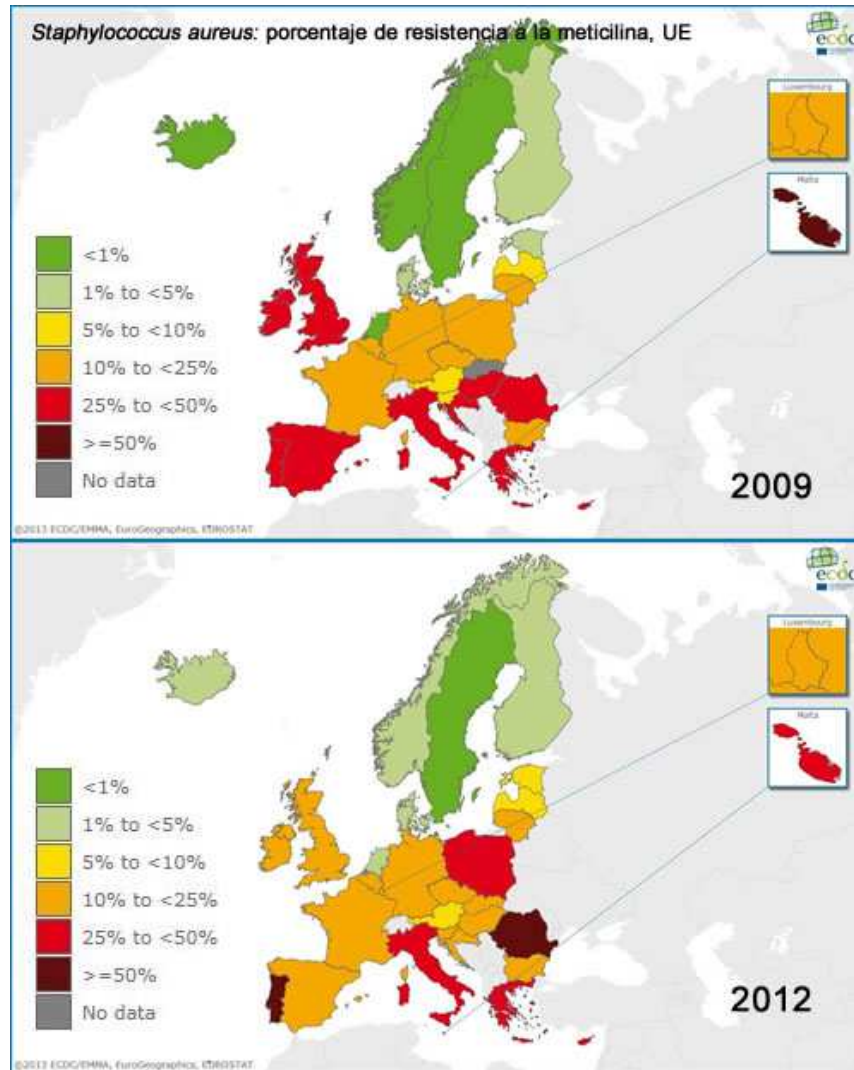


resistencia a eritromicina entre las cepas SARM descendió al 77%, a rifampicina al 45%, a tetraciclina al 46%, y a gentamicina al 51%. Sin embargo, la resistencia a tobramicina fue del 95% y a ciprofloxacino del 98%, unas cifras similares a las detectadas en el período 1990-95. Ello es debido a que las cepas de SARM que circulan en la actualidad presentan, casi invariablemente, resistencia a estos dos últimos antibióticos, a excepción de las cepas aisladas de pacientes pediátricos que son sensibles a ciprofloxacino.

En la década de los 80, las cepas de SARM se extendieron por hospitales de Europa, Australia y Estados Unidos. En Europa se experimentó un notable ascenso en la frecuencia de SARM, desde valores inferiores al 1% en 1980 hasta el 30% en 1991, con una distribución desigual, según los países; mientras Holanda o Dinamarca presentaban una baja prevalencia (6%), los países del sur de Europa, como Grecia, Francia o España, alcanzaron valores notablemente mayores, de hasta el 30%. En Estados Unidos, según datos del *National Nosocomial Infections Surveillance*, durante los años ochenta, los brotes de SARM estaban limitados a hospitales universitarios de más de 1.000 camas, con prevalencias comprendidas entre el 5 y el 10%. En la siguiente década, la frecuencia ascendió hasta el 40% en los grandes hospitales, y llegó hasta un 20% en aquéllos de menos de 200 camas.

En España, la primera descripción de un aislado de SARM se produjo en 1981. Los primeros aislamientos generalizados de SARM en nuestro país fueron en forma de brotes. De forma mayoritaria, estaban producidos por el denominado *clon ibérico*, y coincidía con el traslado de un paciente crítico

colonizado por SARM procedente de otro centro a la UCI. A partir de ahí, la diseminación por el resto del hospital, especialmente por las áreas quirúrgicas, era un problema de tiempo, debido al traslado a las distintas unidades de pacientes que habían sido colonizados por SARM en las UCI. La prevalencia de SARM se ha incrementado progresivamente en nuestro país, y en el momento actual, según el proyecto EPINE, suponen entre el 35 y el 45% de los aislados nosocomiales de *S. aureus*. Su prevalencia ha venido siendo característicamente superior en aislados hospitalarios, y en especial en aislados procedentes de áreas críticas, sobre todo en UCIs. La Red Europea de Vigilancia de Resistencia a los Antimicrobianos (EARS-NET), perteneciente a los ECDC, informa para España unas cifras globales de resistencia a meticilina en *S. aureus*, del 25,3% en 2015. Se trata de una cifra intermedia dentro de los países del sur de Europa, mayor que la de Francia (15,7%), pero menor que las de Italia (34%), Grecia (39%) y Portugal (46,8%). Las bacteriemias por SARM ocasionan porcentajes de mortalidad superiores a las bacteriemias por *S. aureus* sensibles a meticilina (SASM), alcanzando cifras del 20-50% (Cosgrove SE, et al.,2003).



**Figura 2:** Situación actual de la resistencia a meticilina

Las razones principales que motivaron la elaboración de los Programas de Control del SARM fueron:

- **Carácter epidémico.** Las cepas SARM tienen la capacidad de afectar a muchos pacientes en poco tiempo. Es desconocido, y por lo tanto impredecible.
- **Virulencia.** Las cepas de SARM tienen una importante capacidad invasora a partir de la colonización cutánea.

- **Dificultad en el tratamiento antibiótico.** El *clon ibérico* expresa, además de la resistencia a todos los  $\beta$ -lactámicos, una amplia resistencia a otros antiestafilocócicos, con escasos antibióticos alternativos a los glucopéptidos.
- **Aumento de la tasa total de infección por *S. aureus*.** El SARM no sustituye a las infecciones por *S. aureus* sensible a la meticilina, sino que produce un efecto aditivo en el número total de infecciones.
- **Transmisión a través del personal sanitario.** El mecanismo de transmisión implicado con mayor frecuencia es la transmisión cruzada a través de las manos.
- **Eficacia de los programas de control.**

Lamentablemente, no existió una política uniforme en la instauración de medidas de control.

Esta situación epidemiológica inicial de los SARM en España durante la década de los noventa, se instauró progresivamente en la mayor parte de hospitales y fue muy similar a la que aconteció en el resto de los países del sur de Europa, como Portugal, Italia, Francia, Grecia, y también Inglaterra, como se ha comentado anteriormente. Fue ocasionada mayoritariamente por el mencionado clon, absolutamente dominante en toda esta área geográfica. Por el contrario, los países del norte de Europa, como Holanda y los Países Nórdicos, aplicaron estrategias iniciales mucho más drásticas (*search and destroy*) con una búsqueda muy activa y eliminación de casos de SARM. En un contexto de mayor control y

menor consumo hospitalario de antibióticos, el impacto de estas cepas fue mucho más limitado.

El clon que más se ha estudiado es el llamado COL, el cual se descubrió en 1970 e incluye cepas que afectan a los hospitales y a la comunidad desde dicha fecha. En 1980, y por razones que aún se desconocen, comenzaron a desaparecer y así empezó el declive de la segunda fase y el inicio de la tercera fase (Jevons M et al., 1961).

Tercera fase: comienza a mediados de 1970 con cepas que contenían nuevos alotipos.

A medida que se ha incrementado la prevalencia de SARM, también lo ha hecho el uso de antimicrobianos del grupo de los glicopéptidos y lipopéptidos (vancomicina, teicoplanina, daptomicina). Se trata de antimicrobianos de espectro reducido, activos frente a bacterias Gram positivas. Sin embargo, a los problemas derivados de su ruta de administración y de su potencial toxicidad, se han sumado los datos que sugieren una reducción de la actividad de los glicopéptidos frente a SARM. (Siegman-Igra Y et al., 2005).

Estas cepas son de impacto global, pero se centran sobre todo en los hospitales y en pacientes en áreas críticas. En estos pacientes, y debido a la multirresistencia que presentaban con frecuencia los clones de SARM circulantes, fue necesario incrementar el consumo de glicopéptidos, lo que trajo como consecuencia la aparición de cepas con sensibilidad disminuida a vancomicina. En 1997 se describe en Japón el primer aislado de *S. aureus* con sensibilidad disminuida a vancomicina (VISA, por vancomycin-intermediate

*S. aureus*, también conocidos como GISA, (glycopeptide-intermediate *S. aureus*) así como la existencia de cepas con resistencia heterogénea a este antimicrobiano (presencia de células que expresan resistencia en una población que mayoritariamente no la expresa, aunque tiene la capacidad genética para hacerlo, y que al ser resistentes pueden seleccionarse durante el tratamiento con vancomicina) (Udo E et al., 1993).

Poco más tarde aparecen cepas con estas mismas características de sensibilidad en Estados Unidos, en Europa y en España.

La descripción en 2002 de cepas de SARM con resistencia de alto nivel a vancomicina mediada por genes del grupo *van*, iguales a los descritos previamente en enterococos, y la demostración de su transferencia plasmídica *in vivo*, constituyen un motivo de preocupación, si bien hasta el momento actual estas cepas son muy poco frecuentes.

No obstante, se ha descrito que tanto los aislados GISA como los resistentes a vancomicina son habitualmente sensibles a quinupristina/dalfopristina, trimetoprim/sulfametoxazol y linezolid.

Cuarta fase: comienza cuando las cepas de SARM se extienden a la comunidad. Esta difusión empieza a principios de 1990 en el este de Australia, extendiéndose posteriormente a otros países. Probablemente la difusión ha sido amplia, ya que se han descrito aislamientos tanto en países con problemas de SARM previos a esta evolución, como Australia, Estados Unidos y el sur de Europa, como en áreas que han conseguido mantener una prevalencia muy baja de SARM hospitalarios, como Canadá, países nórdicos y Holanda. Se trata de

cepas claramente distinguibles de las cepas de SARM hospitalarias circulantes en ese momento, ya que pertenecen a pulsotipos diferentes, y tienen perfiles de resistencia claramente diferenciados. Estas cepas no son portadoras de la multirresistencia habitual en las cepas de origen hospitalario, sino que han venido ciñendo su resistencia virtualmente a los beta-lactámicos, mostrándose sensibles a grupos como aminoglicósidos o fluoroquinolonas. Además, son cepas frecuentemente productoras de leucocidina de Pantón Valentine, e implicadas en cuadros invasivos graves. (Pan ES, et al., 2003).

La diseminación de SARM de los hospitales a la comunidad era un hecho predecible. Sin embargo, la aparición de nuevas cepas de SARM en la comunidad, genéticamente distintas a las hospitalarias, quizás no lo era tanto.

Actualmente, el rápido aumento de la prevalencia de SARM de origen comunitario en algunos países como Estados Unidos, así como la reciente introducción y diseminación de estas cepas comunitarias en los hospitales, ha difuminado las fronteras entre cepas de adquisición comunitaria y hospitalaria y ha creado la necesidad de realizar una detección precoz y de considerar nuevas estrategias terapéuticas. Hay que tener en cuenta que las cepas de SARM comunitarias pueden causar infecciones graves que requieren ingreso en UCI, y que se han descrito casos de neumonía grave como complicación de casos de gripe producidos por estas cepas comunitarias de SARM .

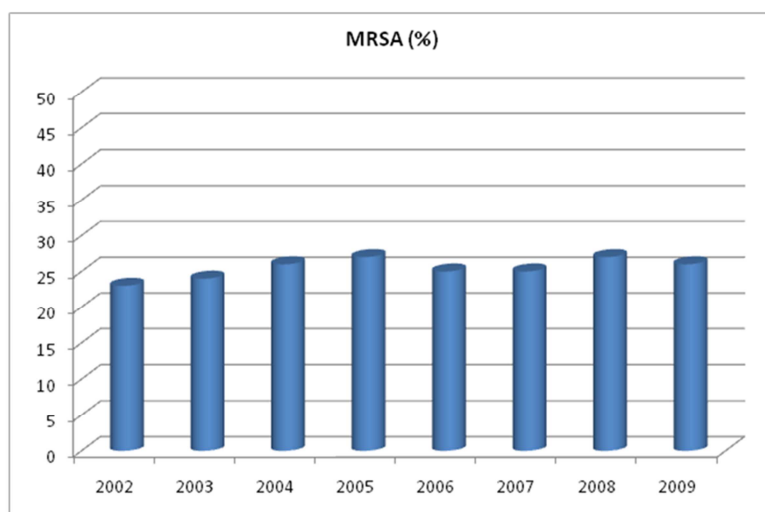
La frecuente multirresistencia de los clones hospitalarios obligó a un uso más frecuente de glicopéptidos, y a la introducción de éstos en protocolos de tratamiento empírico en lugares con una prevalencia media/alta de SARM. Sin

embargo, estudios posteriores han demostrado que, pese a tratarse de antimicrobianos también bactericidas, los glicopéptidos tienen una eficacia clínica reducida cuando las CIMs de vancomicina son superiores a 1 mg/L. Estudios recientes reflejan resultados controvertidos con respecto a la respuesta de MRSA con CIMs > 1 mg/L a glicopéptidos. Algunos autores sugieren que el riesgo de mortalidad se incrementaría cuando infecciones causadas por SARM con CIMs de vancomicina >1 mg/L son tratadas con glicopéptidos Soriano A, et al.2008, mientras otros autores sugieren que, aunque la respuesta farmacodinámica a los glicopéptidos de estos aislados es peor que la de aislados totalmente sensibles, la respuesta clínica puede ser paradójicamente mejor, ya que la capacidad patogénica de estos aislamientos podría estar disminuida. (Laluzza A et al., 2010).

Toda esta situación ha llevado a un incremento de la importancia del comportamiento de antimicrobianos que podían considerarse de segunda línea, como daptomicina o linezolid, y al mismo tiempo a un aumento de su utilización. Por ello, tiene aún mayor importancia el que recientemente se hayan empezado a describir cepas de *S. aureus* resistentes a linezolid, sobre todo de cepas con mecanismos aparentemente susceptibles de transferencia horizontal, que podrían condicionar la utilidad clínica de este antimicrobiano y otros de su grupo a no muy largo plazo.



### MRSA en España (Antimicrobial Resistance Surveillance in Europe 2009)



**Figura 3:** Prevalencia de SARM en España en el período 2002-2009

### 3. FACTORES DE PATOGENICIDAD EN *Staphylococcus aureus*. CA-SARM

Gracias al método de *multilocus sequence typing* (MLST) se ha podido estudiar la evolución histórica de este patógeno. Con este método se secuencian 450 pb de un fragmento interno de 7 genes diferentes que obligatoriamente están en *S. aureus* (*genes house keeping*).

A todos aquellos aislados que contengan las mismas secuencias de esos 7 genes se les considera un clon, y se le asigna una única secuencia tipo (ST) (Enright M et al.2000).

Las diferentes STs, cuando se observan secuencias no idénticas en estos genes, pero existe polimorfismo en menos de tres lugares, se pueden agrupar en complejos clonales (CC). Para poder definir los subclones se necesitan métodos

mucho más sensibles como SPA typing o electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE).

En un estudio de SARM recogidos de todo el mundo entre 1961 y 2004 causantes de infecciones hospitalarias y comunitarias, se observó que el 88% de las cepas se agrupaban en 11 complejos clonales que se clasifican en: CC1, CC5, CC8, CC9, CC12, CC15, CC22, CC25, CC30, CC45 y CC51/121. (Goering RV et al., 2008).

Los aislados que circulan hoy en día son los mismos que circulan desde 1990, por lo que también pertenecen a los mismos complejos clonales.

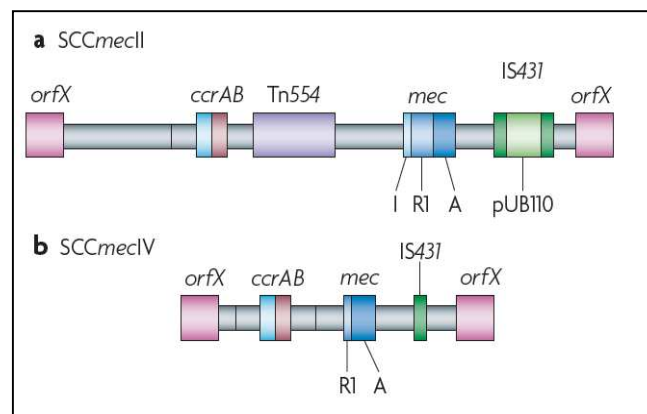
Los complejos clonales CC8 y CC30 son los más prevalentes y los que más veces se han detectado. De hecho, estos dos complejos clonales tienen una gran importancia en las cuatro grandes fases comentadas anteriormente. (Robinson DA et al., 2005).

Como ya se ha mencionado, la primera pandemia de resistencia a penicilina fue atribuible a un clon portador del profago tipo 80/81, que pertenece al complejo clonal CC30. Este clon fue originalmente aislado en Australia en 1953, causando dicha resistencia en hospitales y en la comunidad, y también se demostró que contenía la proteína de Pantón Valentine. Por razones que se desconocen este clon desapareció a principios de 1960 coincidiendo con la introducción de las primeras penicilinas resistentes a penicilinasas estafilocócicas, como la metilicina. (Roundtree P et al., 1958).

### 3.1. Cassette cromosómico estafilocócico *mec* (*SCCmec*)

Este cassette cromosómico estafilocócico *mec* (*SCCmec*) está integrado en el cromosoma de *Staphylococcus* spp, aunque se desconoce su función. Hasta la fecha se han descrito ocho tipos diferentes de *SCCmec* que se agrupan entre *SCCmecI* y *SCCmecVIII*. (Ito T et al., 2001).

La clasificación de los diferentes *SCCmec* se hace en base a dos genes, el gen *mec* y el gen *ccr*, que se caracterizan por ser elementos móviles.



**Figura 4:** Estructura de los *SCCmec* II y IV

Existen tres variantes de genes *mec* denominados *mecA*, *B* y *C*. Dentro del gen *mecA* se hallan los alotipos *SCCmecII*, *SCCmecIII* y *SCCmecVIII*; el gen *mecB* abarca los alotipos *SCCmecI*, *SCCmecIV* y *SCCmecVI* y el gen *mecC* contiene dos subclases el C1 y C2 que contienen el *SCCmecV* y *SCCmecVII*.

El gen *ccr* consiste en un conjunto de dos elementos, el *ccrA* y el *ccrB* que se encuentran en los tipos *SCCmec* del I al IV (figura 4), y también en el *SCCmecVI* y *SCCmecVIII*. Este gen también contiene el *ccrC* que se encuentra en el *SCCmecV* y en el *SCCmecVII*.

En cuanto a la evolución histórica, se sabe que las cepas que causaban infecciones nosocomiales antes de 1990 pertenecían a los grupos *SCCmec* I, II y III. Así, la cepa COL y otra perteneciente al CC8 que circulaban en Inglaterra y Dinamarca eran del tipo *SCCmec* I; sin embargo en 1980 aparecieron nuevas cepas que formaban parte de cc5 y cc8 causando infecciones en hospitales de todo el mundo como en Australia, Nueva York, Japón, Brasil o Hungría y pertenecían a *SCCmec* II y III. (Lina G et al., 2006).

*SCCmec* IV es en la actualidad el más común, e incluye a la mayor parte de los SARM aislados actualmente en la comunidad, que en un principio se identificaron como USA 400 y se denominaron SARM MW2.

### **3.2. Epidemiología de las cepas CA-SARM:**

Los primeros casos de CA-SARM se dieron en Estados Unidos, causados por la cepa que se denominó USA-400 o MW2, y que hoy en día ha sido desplazada por la cepa USA 300, que se encuentra ampliamente establecida en la comunidad y de la cual se han comunicado casos en Dinamarca, Australia y Colombia. (Kennedy AD et al., 2008).

En Europa, el clon que predomina y causa casos de CA-SARM es el clon ST80, mientras en Japón predomina el clon ST59 y en el este de Australia el clon ST30; esto indica que la cepa que causa estas infecciones en la comunidad va a depender del país donde se produzcan dichas infecciones, aunque en la mayor parte de los casos tienen en común los cassettes *SCCmecIV* y *SCCmecV*, que son los más comunes, los más frecuentes en portadores nasales y los causantes más habituales de infecciones de piel y tejidos blandos.

La presencia de la proteína de Panton-Valentine (PVL) en estas cepas es muy variable. En Australia e Inglaterra la mayoría de las cepas no producen PVL, mientras los clones de Dinamarca causantes de infecciones en la comunidad sí contienen habitualmente PVL.

### **3.3. Virulencia de las cepas causantes de CA-SAMR.**

Los aislados de CA-SARM pueden causar infecciones que cursan de manera fulminante y letal.

Todos los estudios que se llevaron a cabo inicialmente se basaron en la cepa USA300, siendo ésta el clon más extendido. Se cree que deriva de la primera cepa que se identificó como causante de infecciones tipo SARM, el clon COL, pero tras varios estudios llevados a cabo en animales se llegó a la conclusión de que USA300 es mucho más virulenta que su antecesor.

Esta diferencia entre ambas se debe principalmente a la existencia de elementos móviles dentro de su dotación genómica, como profagos, plásmidos o transposones que son adquiridos por transferencia horizontal entre cepas similares.

Dichos elementos móviles tienen la capacidad de codificar factores que afectan a la descendencia de las cepas que los poseen, como puede ser la capacidad de transmitir genes que confieren resistencia a ciertos antibióticos o genes que aumenten su capacidad patógena, como por ejemplo los profagos  $\phi$ SA2 o  $\phi$ SA3.

Dichos profagos están presentes en la cepa COL, pero no están presentes en la cepa USA300. El profago  $\phi$ SA2 contiene los genes *LuKS-PV* y *LuKF-PV* que

codifican la PVL, mientras que el  $\phi$ SA3 es portador de genes que codifican estafiloquinasas, proteínas inhibitorias de quinasas y proteínas inhibitorias del complemento; todas estas moléculas son moléculas moduladoras del sistema inmune. (Deleo F et al., 2009).

Otros factores, que podemos encontrar de manera más común en las cepas causantes de CA-SARM y que se asocian a la capacidad patógena de dichas cepas son los siguientes:

1. PVL: es una proteína que se ha estudiado de manera muy extensa desde su descubrimiento hace 70 años. Está compuesta por dos subunidades, *LuK-PV* y *LuKF-PV*, las cuales se encuentran en el profago  $\phi$ SA2, causando la formación de poros en la membrana. A altas concentraciones (por ejemplo 200 nM) causa la muerte mediante procesos líticos, pero a bajas concentraciones (por ejemplo 5 nM) activa parcialmente a los neutrófilos provocando un fenómeno que se conoce como *priming*, que da lugar a la secreción de potentes mediadores de la inflamación. Además, la PVL activa a los neutrófilos y aumenta la producción de peróxido de hidrógeno en el fagolisosoma. Varios estudios demuestran que la producción de PVL se asocia con infecciones de piel graves y neumonías necróticas hemorrágicas.

Los genes que codifican la proteína PVL sólo están presentes en un 1-10% de los aislados de *S. aureus* sensibles a meticilina. Sin embargo, sí están presentes en los clones USA400 y USA300, siendo el clon USA300 el que causa la mayoría de las infecciones por CA-SARM en Estados Unidos,

lo que sugiere que la presencia de PVL es importante en la reciente epidemia de CA-SARM (Kaneko J et al.,1998).

2.  $\alpha$ -hemolisina: es una toxina (también conocida como Hla o  $\alpha$ -toxina) que forma canales que provocan la destrucción de células epiteliales, eritrocitos, fibroblastos y monocitos, dando como resultado la muerte de animales de experimentación a los que se inyecta dicha toxina. Estudios recientes han demostrado que dicha toxina es esencial en el clon USA300, y que ocasiona neumonías letales en ratones usados como modelos de experimentación. También se ha demostrado la correlación entre la  $\alpha$ -toxina y la severidad de la infección pulmonar. (Bubeck J et al., 2007).
3. Moduladores solubles tipo  $\alpha$ -fenol: estos moduladores, PSM $\alpha$ s son un nuevo grupo de péptidos descubiertos en *S. aureus* y que son similares a los que ya se conocían en *S. epidermidis*. Altas concentraciones de estos moduladores aumentan la virulencia de las cepas en las que están presentes, como los clones USA300 y USA400. (Wang R et al., 2007).
4. Elementos móviles del catabolismo de arginina (ACME): estos elementos solamente se encuentran en el clon USA300 y están relacionados con el cassette *SCCmec IV*, que codifica dos factores de virulencia y un grupo de genes que engloban oligopeptidasas (Diep BA et al., 2008).

#### **3.4. Tratamiento de CA-SARM**

Las especiales características de las infecciones extrahospitalarias por CA-SARM han llevado a diferentes autores a recomendar regímenes terapéuticos muy diversos frente a estas infecciones, incluyendo clindamicina, doxiciclina,

minociclina, trimetoprim-sulfametoxazol, así como rifampicina y ácido fusídico como agentes adyuvantes para su uso en combinación.

Vancomicina es todavía el antimicrobiano de elección para el tratamiento de infecciones graves por SARM. El uso de glucopéptidos no está libre de problemas. No son activos por vía oral, de modo que han de administrarse exclusivamente por vía parenteral, lo que conlleva molestias para el paciente, riesgo de efectos adversos y un incremento de los costes secundarios a la estancia hospitalaria necesaria durante su administración intravenosa. Por otro lado, su eficacia es limitada si se requiere su uso durante un tiempo prolongado, o si existe bacteriemia persistente o recurrente durante la terapia. Además presentan efectos nefrotóxicos y están aumentando las cepas resistentes o con sensibilidad reducida a glicopéptidos. Por otra parte, se ha demostrado la existencia de fracasos terapéuticos cuando la CIM de vancomicina es  $>1$  mg/L. De ahí la necesidad cada vez más frecuente de recurrir a otras alternativas, como linezolid.

De hecho, el aumento de las resistencias a los antibióticos activos frente a grampositivos ha puesto de manifiesto la preocupación por el uso apropiado de los antibióticos y la necesidad de contar con nuevos fármacos. Ante este panorama, la industria farmacéutica ha retomado el interés por la investigación en antimicrobianos, y más concretamente en aquellos con actividad frente a bacterias grampositivas, tal como puede deducirse de las comunicaciones presentadas en los últimos congresos internacionales. Las vías y estrategias seguidas consisten en la modificación de antimicrobianos ya conocidos, la



obtención de moléculas nuevas y el redescubrimiento de otras que quedaron en segundo plano, por el poco interés de las infecciones por grampositivos en el momento de su hallazgo y por el desarrollo de los betalactámicos (Chopra I et al.,1997).

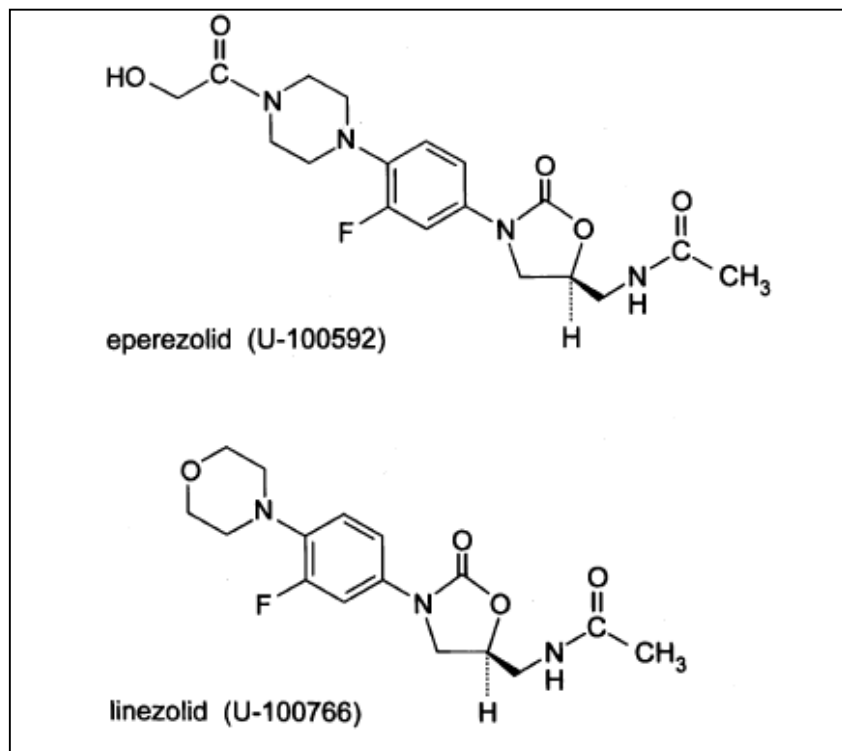
Tanto linezolid como daptomicina, pueden constituir alternativas terapéuticas válidas cuando la CIM de vancomicina o la evolución clínica de los pacientes hagan recomendable la sustitución del glicopéptido.

#### **4. OXAZOLIDINONAS. LINEZOLID.**

##### **4.1. ESTRUCTURA QUIMICA**

Linezolid es un fármaco que pertenece a una familia de antibióticos sintéticos llamados oxazolidinonas fluoradas, descubiertas por DuPont Pharmaceuticals en 1978. Ellos detectaron que ciertas oxazolidinonas tenían actividad frente a patógenos de plantas y animales (Ford C et al.,1999).

A finales de 1980 se descubrieron dos moléculas, que llamaron DuP-721 y DuP-105, que poseían actividad frente a patógenos humanos y que actuaban inhibiendo la síntesis de proteínas en un lugar diferente a los grupos de fármacos ya conocidos con esta misma diana (macrólidos, tetraciclinas, amfenicoles...). Se desarrollaron inicialmente dos fármacos, linezolid y eperezolid, que se diferencian por un radical lateral tal y como se puede observar en la figura 5 (Diekema DI et al.,2009).



**Figura 5:** Estructura química de linezolid y eperezolid

La molécula de linezolid ((S)-[[3-(3-fluoro-4 morfolinilfenil)2-oxo-5 oxazolidinil]metil] acetamida) tiene una estructura tricíclica, con un radical metilacetamida en el anillo oxazolidinona y un flúor en posición 3 del grupo fenilo meta. Posee un grupo morfolino que le confiere una mayor solubilidad y favorece su perfil farmacocinético y tolerabilidad. Presenta configuración enantiómera (S) del radical C-5 metilacetamida en el anillo oxazolidinona que aumenta de actividad eficacia.

#### 4.2 MECANISMO DE ACCIÓN

Los ribosomas de las células procariontas contienen dos subunidades, la 30S y la 50S. La subunidad 30S, a su vez, está constituida por rRNA 16S y 21 polipéptidos y la 50S contiene rRNA 23S y 34 polipéptidos. La síntesis de

proteínas se lleva a cabo en el exterior en tres pasos: iniciación, elongación y terminación. La síntesis proteica comienza transcribiendo RNA mensajero (mRNA) y preparándolo para su traslación al citoplasma, donde se une a la subunidad 30S y al N-formilmetionina (fMet) formando el complejo fMet-mRNA. En este momento se une la subunidad 50S y se forma así el complejo 70S y se inicia la síntesis de proteínas.

Cuando se descubrieron las oxazolidinonas se sabía que inhibían la síntesis de proteínas, pero se desconocía el mecanismo exacto. De hecho, inicialmente se creía que actuaban en la fase de elongación, pero se descartó cuando se compararon sus espectros con los de cloranfenicol, que inhibe la síntesis proteica a través de la inhibición de la peptidiltransferasa, y por tanto sí que actúa de lleno en la fase de elongación (Toh S. M et al., 2007).

Linezolid inhibe la síntesis proteica ribosómica bacteriana al impedir la formación del complejo de iniciación, bloqueando la transducción en un paso previo a la elongación y posterior a la unión de la N-formil-Metionina (N-fMet) al tRNA iniciador. La inhibición se produce porque se bloquea el complejo funcional 70S, esencial en la traducción bacteriana, a través de la unión de linezolid al ARN 23S de la subunidad 50S, distorsionando el punto de unión al Trna (Carmona PM et al., 2003). Se trata por tanto de una diana distinta de las descritas previamente para las otras familias de antimicrobianos que actúan por inhibición de la síntesis proteica.

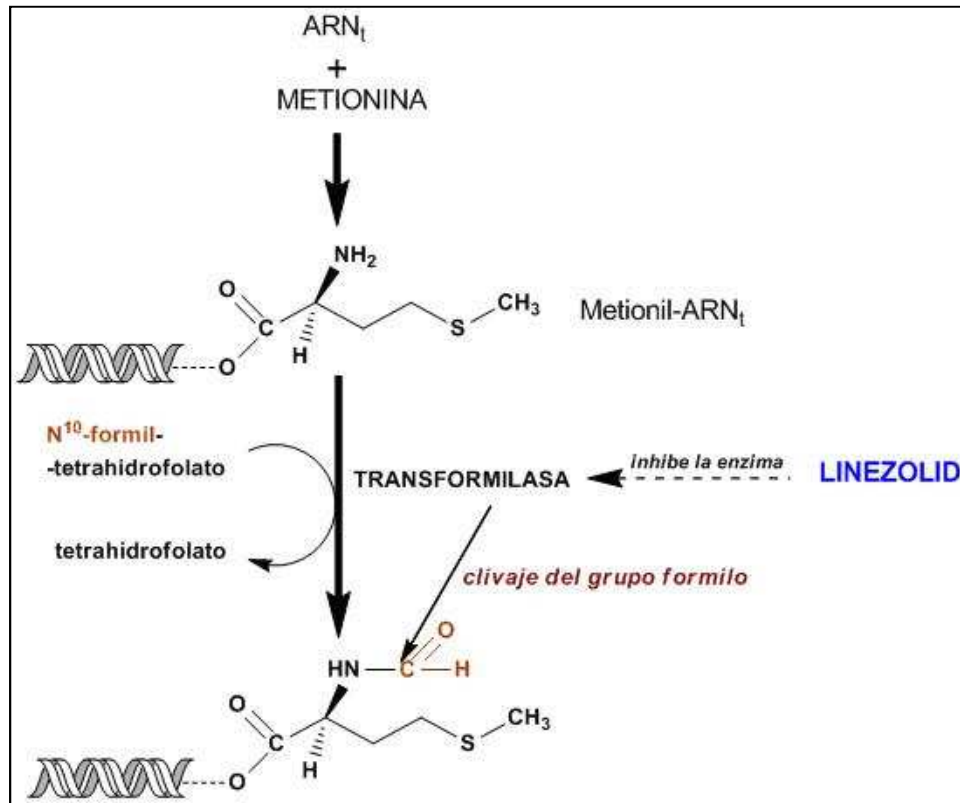


Figura 6: Mecanismo de acción de linezolid

### 4.3. ACTIVIDAD INTRÍNSECA

En conjunto, el espectro de linezolid se centra fundamentalmente en bacterias grampositivas, si bien muestran actividad frente a algunos bacilos gramnegativos y micobacterias.

**Bacterias Gram positivas aerobias:**

Linezolid tiene buena actividad frente a bacterias grampositivas aerobias, incluyendo microorganismos habitualmente resistente a otros grupos de antimicrobianos, como *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM), neumococo resistente a penicilina (PRP) y enterococos resistentes a vancomicina (VRE).

La CIM frente a estafilococos no productores de coagulasa es más baja que frente a *S. aureus* (Draghi DC et al., 2005), y las CIMs son independientes de la resistencia a meticilina.

Linezolid es activo frente a la mayoría de estreptococos, incluyendo los grupos A, B, C, F y G  $\beta$ -hemolíticos, estreptococos del grupo *viridans* y enterococos (Betriu C et al.,2000). La mayoría de estreptococos tienen una CIM de 2 mg/L, pero los del grupo A y los estreptococos del grupo *viridans* tienen valores de 4 mg/L. Las CIMs de enterococos no varían en relación a la resistencia o sensibilidad a vancomicina.

**Bacterias anaerobias:**

La gran mayoría de bacterias grampositivas y gramnegativas anerobias son sensibles a linezolid, incluyendo *Clostridium difficile*, *Fusobacterium* spp., *Prevotella* spp. y *Bacteroides* spp..

**Micobacterias:**

Linezolid es activo frente a *Mycobacterium tuberculosis* y frente a la mayoría de micobacterias atípicas, a excepción de *M. avium* complex, que es generalmente resistente.

En relación con su actividad *in vitro*, es importante destacar su papel como antimicrobiano en los *biofilms*. La mayoría de estas infecciones se relacionan con dispositivos médicos externos (sondas, catéteres, prótesis...). Wilcox MX y colaboradores estudiaron las concentraciones de linezolid y de vancomicina en catéter con bacterias grampositivas después de perfusión de antibióticos por los mismos; ellos encontraron que concentraciones de vancomicina eran generalmente mayores que las concentraciones de linezolid después de una exposición sola, pero ningún antibiótico alcanzó la muerte del 100 % de las bacterias (Wilcox MX et al., 2001).

Wiederhold NP y colaboradores observaron la actividad de linezolid y vancomicina *in vitro* frente a bacterias Gram positivas asociada a *biofilms* en catéter, observando que, aunque ninguno de los dos antimicrobianos erradicaba por completo la colonización bacteriana de los catéteres, tanto linezolid como vancomicina suprimían el crecimiento de *S. aureus* y *S. epidermidis*, mientras linezolid también eliminó cepas comparadas con el control y vancomicina contra VRE (Wiederhold NP, et al. 2005).

Bayston R y colaboradores, al investigar el efecto de penicilina G, linezolid, y rifampicina sobre *Propionibacterium acnes* en *biofilms* demostraron que el tratamiento durante 14 días con penicilina G, linezolid, o la combinación de linezolid mas rifampicina erradicaban el crecimiento de *P. acnes*, mientras que sólo penicilina G tenía este efecto después de 7 días. Después de una nueva incubación de 9 días, el *biofilm* era cultivado de nuevo para detectar un posible recrecimiento del microorganismo. Por su parte, penicilina G con la combinación

linezolid/rifampicina no hubo recrecimiento, pero linezolid solo mostró crecimiento en 14 días. (Bayston R, et. 2007).

Leite B y colaboradores estudiaron la sensibilidad *in vitro* de *biofilms* de *S. epidermidis* frente a daptomicina, linezolid y rifampicina a concentraciones equivalentes a las concentraciones séricas máximas de cada uno de ellos, observándose que la reducción en el recuento de colonias era menor con linezolid (Leite B, et al. 2011).

Bayston R y colaboradores estudiaron la acción de linezolid y vancomicina sobre *biofilms* de MRSA, MRSE, *E. faecalis*, y *E. faecium* en derivaciones ventrículo-peritoneales. Tanto linezolid como vancomicina erradicaron la colonización por estafilococos después de 14 días de tratamiento a concentraciones adecuadas en L.C.R y previnieron su recrecimiento en los 14 días siguientes, mientras que ningún otro antimicrobiano condujo a la eliminación total (Bayston R, et al, 2012).

Holmberg y colaboradores. evaluaron la sensibilidad *in vitro* de *E. faecalis* en prótesis de rodilla y cadera. Se determinó la sensibilidad a ampicilina, vancomicina, linezolid, ciprofloxacino, y rifampicina, solos y en combinación, y observaron que para linezolid y para ciprofloxacino combinados con rifampicina se reducía. La combinación de ciprofloxacino y rifampicina fue la más eficaz para reducir el crecimiento bacteriano, después de una exposición de 8 horas al *biofilm*, seguido de la combinación de linezolid y rifampicina (Holmberg et al. 2012).

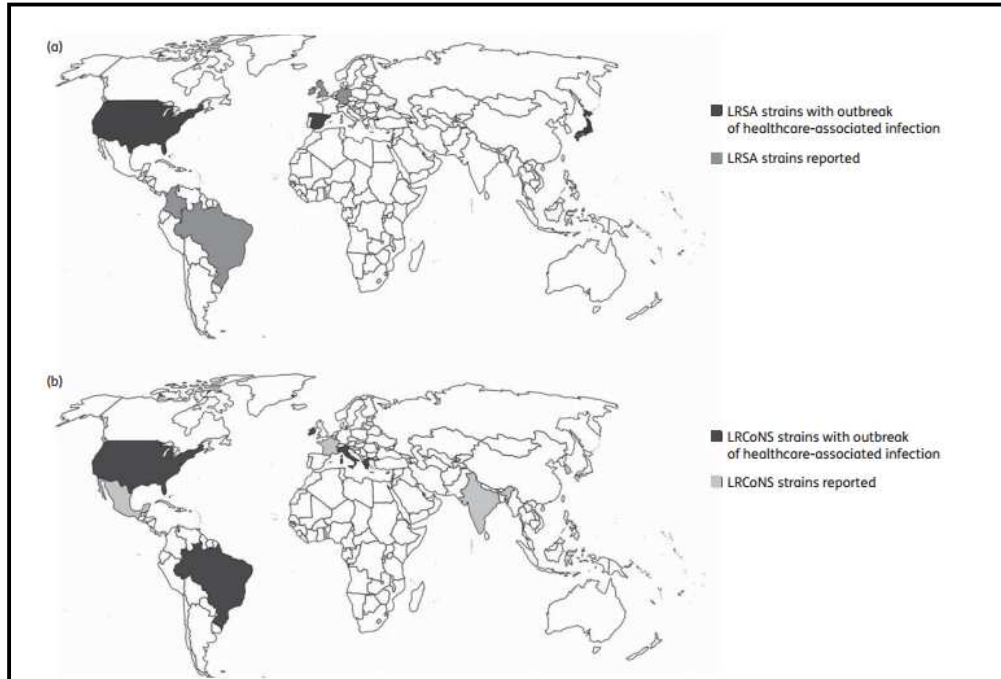
Microorganismo	CIM <sub>90</sub> (mg/l)
<b><i>S. aureus</i></b>	
Sensibles a meticilina	1-4
Resistentes a meticilina	1-4
<b>Estafilococos coagulasa negativa</b>	
Sensibles a meticilina	1-4
Resistentes a meticilina	1-2
<b><i>S. pneumoniae</i></b>	
Sensibles a penicilina	1
Resistentes a penicilina	1
<b>Estreptococos betahemolíticos</b>	2
<b><i>Enterococcus spp.</i></b>	
Sensibles a vancomicina	1-4
Resistentes a vancomicina	1-4
<b><i>Moraxella catharralis</i></b>	4-8
<b><i>Haemophilus influenzae</i></b>	4-16
<b><i>Legionella pneumophila</i></b>	4-16
<b><i>Eikenella corrodens</i></b>	16
<b>Enterobacterias, <i>P. aeruginosa</i></b>	>32
<b><i>Bacteroides fragilis</i></b>	2-4
<b><i>Clostridium difficile</i></b>	2
<b><i>Clostridium perfringens</i></b>	2
<b><i>Fusobacterium spp.</i></b>	1-8
<b><i>Peptostreptococcus spp.</i></b>	2
<b><i>Listeria monocytogenes</i></b>	2
<b><i>Mycobacterium tuberculosis</i></b>	1

Tabla 1: Actividad *in vitro* de linezolid



#### 4.4. MECANISMO DE RESISTENCIA

Linezolid es un antimicrobiano de origen totalmente sintético lo que, *a priori*, hacía menos probable que las bacterias pudieran contener de forma natural genes capaces de condicionar resistencia a este antimicrobiano; de hecho, las primeras bacterias resistentes a linezolid aparecieron por mutaciones en los genes que codifican el rRNA, que constituye la diana de acción del mismo. Al existir en cada microorganismo diferentes copias de los genes que codifican el rRNA, una sola mutación habitualmente no implica resistencia, por lo que las bacterias tienen que acumular mutaciones en varias copias de dichos genes, lo que implica una frecuencia de resistencia mucho más baja. Además, al tratarse de mutaciones cromosómicas, esta resistencia no sería transmisible de manera horizontal. Todo ello explica la baja frecuencia de resistencia encontrada en condiciones reales, en torno a  $1 \times 10^{-9}$  UFC, y hacía prever que, al menos a corto plazo, la resistencia no constituyera un problema determinante para el uso de este antimicrobiano. La mutación más frecuente es G276T (10), aunque *in vitro* se han demostrado otras mutaciones en cepas aisladas de hospitales, indicando así que esas mutaciones aparecen de manera espontánea. Ya se han descrito algunos casos en los que se sugiere que la aparición de resistencias frente a linezolid puede ser consecuencia de la presión selectiva a la que se somete a los microorganismos, (Paladino JA et al., 2003) , y estar asociada a dos puntos de mutación diferentes del ARN ribosómico 23S. (Xiong L et al. , 2000).



**Figura 7:** Prevalencias actuales de las resistencias a oxazolidinonas en el mundo.

Tratamientos prolongados y concentraciones muy por debajo de la concentración mínima inhibitoria (CIM) pueden inducir la aparición de resistencias a este antimicrobiano. (Tsiodras S et al., 2001). Estafilococos y enterococos con CIM de linezolid de 4 mg/L pueden tratarse con éxito. No existen sin embargo datos suficientes que permitan realizar la misma afirmación para especies de estreptococos.

Se han descrito cuatro mecanismos de resistencia para las oxazolidinonas:

1-Mutaciones en genes el dominio V del rRNA 23S.

2-Adquisición de la capacidad de producción de una metiltransferasa ribosómica mediada por el gen *cfr*.

3-Mutaciones en *rpIC* y *rpID*, genes que codifican las proteínas L3 y L4 del ribosoma 50S.

4-Bomba de expulsión del tipo ABC cassette, codificada por el gen *optrA*.

#### 1- Mutación en Dominio V del rRNA 23S.

En los últimos 10 años ha aumentado el número de casos de resistencia a macrólidos, lincosamidas, estreptograminas, cetólidos y oxazolidinonas (MLSKO) asociados a mutaciones en el dominio V del rRNA 23S, y en genes que codifican proteínas ribosómicas como la L4 y L22. Franceschi F, et al. 2004. Estas mutaciones han sido descritas tanto en bacterias grampositivas como en bacterias gramnegativas, y dan lugar a alteraciones espaciales en los bolsillos de unión de los antibióticos al ribosoma, en zonas próximas a las posiciones de interacción del mRNA con el tRNA. Estos cambios espaciales dan lugar a bloqueos en la iniciación y elongación de las proteínas, a obstrucciones en el canal de salida de la proteína naciente y a lecturas erróneas del mRNA, que finalmente desembocan en una síntesis de proteínas disminuida e ineficaz.

Esta resistencia se ha asociado, en el caso de linezolid, con mutaciones en el lazo central de la región V del rRNA 23S. La mayoría de las bacterias tienen múltiples copias de los genes *rna*, que codifican la síntesis del rRNA 23S, lo que implica que el desarrollo de resistencias a estos agentes sea menos probable. Se ha descrito que la resistencia a linezolid en microorganismos como *S. aureus*, estafilococos no productores de coagulasa, estreptococos del grupo *viridans*, *Enterococcus faecium* y *E. faecalis*, es debida a una transversión de G2576T (*E. coli* rRNA 23S). Tsiodras y colaboradores describen en 2001 el primer *S. aureus* resistente a linezolid de un paciente que recibía tratamiento oral con linezolid,

detectando la mutación G2576T en el dominio V del gen *rrna*. (Tsiodras S et al., 2001).

El número de genes mutados en el rRNA depende tanto del tiempo que se exponga el microorganismo a linezolid como de la dosis del fármaco. (Arias CA et al., 2008).

Pillai y colaboradores describieron una serie de SARM resistentes a linezolid en los que la CIM iba aumentando en relación con el aumento del número de mutaciones.

Otras mutaciones descritas que también existen en el dominio V y que generan resistencias a linezolid en enterococos son G2505A, G2512T, G2513T y G2610G y en *S. aureus* G2447T.

## 2- Presencia del gen *cfr*

Se trata de un mecanismo de resistencia plasmídico, mediado por la adquisición de un gen de resistencia, el gen *cfr*, que codifica una metiltransferasa que da lugar a la metilación del carbono 8 de la base A2503 del rRNA 23S, y que condiciona un nuevo fenotipo de resistencia a antimicrobianos inhibidores de la síntesis proteica bacteriana. Un estudio detallado con *footprinting* y espectrometría de masas MALDI-TOF demostró que el gen *cfr* añade un radical metil adicional en la posición A2503 del rRNA 23S. Este residuo A2503 está muy cerca del lugar de unión de los antibióticos, por lo que se considera que la metilación mediada por *cfr* altera la estructura espacial del área, dificultando la interacción entre el antimicrobiano y su diana. El gen *cfr* se describió en el año

2000 en una cepa de *Staphylococcus sciuri* (Kehrenberg C et al., 2007), aislada de ganado bovino, y se asoció a resistencia a cloranfenicol y florfenicol. Posteriormente se describió su asociación también a resistencia a linezolid. El gen estaba, en esta cepa, incluido en un plásmido de 16,5 kb (pSCFS1). Este plásmido, además del gen *cfr*, también contenía un gen *erm33*, derivado de la recombinación de un *ermC* y un *ermA*, que codifica una rRNA metilasa, un gen *spc*, que codifica una espectinomicina adeniltransferasa idéntica a la del trasposón Tn554, y el gen *Isa*, que codifica una bomba de expulsión de tipo ABC. Estos genes condicionan resistencia a macrólidos-lincosamidas-estreptograminas (MLSB), espectinomicina y lincosamidas, además de la resistencia a amfenicoles condicionada por *cfr*.

Posteriormente se describió el gen *cfr* en un plásmido de 35.7 kb (pSCFS3), en una cepa de *S. aureus* de origen porcino. En este caso se trata de un elemento derivado del trasposón Tn558, en el que se enclavan entre los fragmentos *tnpA* y *tnpB*, y produciendo una delección en los mismos, un fragmento que incluye una secuencia de inserción IS21-558 completa y el gen *cfr*. Por primer vez se menciona el importante papel que puede jugar el elemento genético IS21-558 en la transmisión horizontal de *cfr*.

Más tarde se describe el fragmento pSCFS6, en el que se enclava, dentro de un trasposón Tn558, un fragmento *cfr-IsaB* idéntico al descrito en pSCFS1 en *S. sciuri*, flanqueado por dos secuencias de inserción IS21-558, lo que demuestra de nuevo el importante papel de este fragmento en la movilización del gen.

En el último plásmido descrito pSCFS7, aparece de nuevo IS21-558 asociado a *cfr*, aunque en este caso incompleto, y enclavado dividiendo el fragmento *tnpB*.

Posteriormente se ha demostrado que, en *Staphylococcus aureus*, *cfr* también se puede encontrar a nivel cromosómico, aunque probablemente integrado dentro de un elemento movilizable. En este caso, los genes *erm* y *cfr* están agrupados en un solo operón controlado por el promotor de *erm*, el operon *mlr*, que se expresa de manera constitutiva y modifica dos residuos específicos en el rRNA 23S, A2058 y A2053, generando resistencia a todos los antibióticos que actúan sobre la subunidad 50S del ribosoma, (Smith L et al., 2008). En este caso el cluster *ermB/cfr* está flanqueado por secuencias pertenecientes a IS21-558, que probablemente en este caso también ha participado en su movilización.

La asociación de SARM con resistencia a linezolid con cepas de origen animal se ha continuado describiendo. En Alemania se detecta en un MRSA ST398 y St9, cuyo principal reservorio es porcino, pero que pueden colonizar y causar infección en humanos. (Kehrenberg C et al., 2009).

Por otra parte, los elementos genéticos a los que se asocia el gen *cfr*, y en especial la IS21-558, facilitan la difusión en especies próximas, e incluso en otros géneros. Así, en 2007, Toh et al demostraron que el gen *cfr* podía encontrarse, aunque de forma excepcional, asociado a estructuras móviles como transposones y secuencias de inserción en diferentes especies de bacterias gram positivas como estafilococos y enterococos.

En 2013 se publica en Italia un estudio sobre desde 50 aislados de estafilococos no productores de coagulasa, todos ellos resistentes a linezolid, y tras ser caracterizados molecularmente se vio que todos eran portadores del gen *cfr*. (Campanile F et al., 2013). Sin embargo, en un estudio multicéntrico casi simultáneo realizado también en Italia, los estafilococos resistentes a linezolid aislados de bacteriemias presentaban en la mayor parte de los casos la mutación G2576T en el dominio V del rRNA 23S (78,6%), mientras la presencia del gen *cfr* se demostró en un solo aislado. (Russo A et al. 2015).

En 2012, Hansen et. al demostraron que el orden de los *Bacillales* son reservorios naturales del gen *cfr*.

Hace unos años se describe en España (12) el primer brote nosocomial de infecciones por SARM resistente a linezolid. En algunos casos se ha descrito la combinación de la presencia del gen *cfr* con mutaciones cromosómicas en los genes codificadores del RNAr. (Xiong L et al., 2000).

### 3-Mutaciones en *rpLD* y *rpLC*:

Este mecanismo es menos común como causante de resistencia a linezolid y es debido a mutaciones en la proteína L4, que está codificada por el gen *rpLD*, y en la proteína L3, codificada por el gen *rpLC*. Estos dos mecanismos fueron previamente identificados en estreptococos, y se cree que pueden estar involucrados en la resistencia a quinupristina/dalfopristina en *S. pneumoniae* y en *S. aureus*. Se necesitan no obstante más estudios para confirmarlo.

En 2005 se encontraron cepas de estafilococos con este tipo de resistencia en U.S.A., y en 2006 en Bélgica e Italia.

#### 4 Gen *oprtA*:

En 2014 se aprobó la comercialización de una segunda oxazolidinona para uso clínico, tedizolid, cuya indicación son cepas multirresistentes, incluyendo aquellas que son resistentes a linezolid portadoras de gen *cfr*.

Sin embargo se ha descrito un nuevo gen que codifica una transportasa ABC que origina resistencia a ambas oxazolidinonas, el gen *optrA*.

Hasta el momento solo se ha detectado en enterococos y confiere resistencia a linezolid, tedizolid y cloranfenicol. (Wang, Y et al., 2015)

Por otra parte, y como se ha revisado anteriormente, *S. aureus* alberga un gran número de factores determinantes de resistencia y patogenicidad, codificados por genes asociados con frecuencia en zonas genómicas que son transferidas conjuntamente, conocido como islas de patogenicidad. Estas islas pueden albergar determinantes de resistencia, como el cassette *SCCmec*, que alberga el gen *mecA*, responsable de la síntesis de la PBP2a, o factores determinantes de patogenicidad, tales como los genes que codifican la TSST-1, responsable del síndrome del shock tóxico estafilocócico. Con frecuencia, las islas de patogenicidad albergan varios genes con fines diferentes, por lo que la adquisición de genes de resistencia está asociada a la adquisición de otras características por estafilococos. (Tsiodras, S et al., 2001).



MECANISMOS GENÉTICOS	SITIO DE MUTACIÓN O PROTEÍNA RIBOSÓMICA MUTADA*	MICROORGANISMOS
MUTACIONES EN EL DOMINIO V	G2576T	<i>S. aureus</i>
		Estafilococos coagulasa negativo
		<i>S. viridans</i>
		<i>Enterococcus</i> spp.
		<i>S. cohnii</i>
		<i>S. simulans</i>
	G2505A	<i>Enterococcus</i> spp
		<i>S. aureus</i>
	G2512T	<i>Enterococcus</i> spp
	G2513T	<i>Enterococcus</i> spp
	C2610G	<i>Enterococcus</i> spp
	G2447T	<i>S. aureus</i>
	T2500A	<i>S. aureus</i>
	C2192T	<i>S. aureus</i>
	G2447T	<i>S. aureus</i>
	A1743T	<i>S. pneumoniae</i>
	A2503G	<i>S. aureus</i>
		<i>S. pneumoniae</i>
T2504C	<i>S. aureus</i>	
	<i>S. epidermidis</i>	
G2766T	<i>S. aureus</i>	
G2631T	<i>S. epidermidis</i>	
C2543T	<i>S. epidermidis</i>	
C2576T	<i>S. epidermidis</i>	
MUTACIONES EN <i>rpID</i> (L4 r-proteína)*	65WR66 Y 68KG69 DELECCIONES	<i>S. pneumoniae</i>
	A202C	<i>S. aureus</i>
	K68N, L108S, N158S	<i>S. epidermidis</i> <i>S. pneumoniae</i>
MUTACIONES EN <i>rpIC</i> (L3 r-proteína)*	G455A, G463C	<i>S. aureus</i>
	A505T, Δser145	<i>S. aureus</i>
Cfr metiltransferasa	A2503	<i>S. epidermidis</i> <i>S. aureus</i>

**Tabla 2:** Mecanismos de resistencia a linezolid

#### 4.5 CARACTERÍSTICAS FARMACOCINÉTICAS/FARMACODINÁMICAS

Una de las grandes ventajas que presenta este antibiótico es que puede ser administrado tanto por vía oral como por vía intravenosa. Presenta una absorción rápida y completa. El tiempo hasta el pico de concentración plasmática (Tmax) es de 1-2 horas tras la administración de dosis única o múltiple.

##### ***Absorción***

Linezolid se absorbe rápida y ampliamente tras su administración oral. Las concentraciones plasmáticas máximas se alcanzan en las dos horas siguientes a la dosis. La biodisponibilidad oral absoluta de linezolid es completa, de aproximadamente el 100% (estudio cruzado de dosificación oral e intravenosa). La absorción no se ve afectada de forma significativa por los alimentos y la absorción de la suspensión oral es similar a la alcanzada con los comprimidos recubiertos con película. Tras la administración intravenosa de 600 mg 2 veces al día, las Cmax y CIMn plasmáticas de linezolid (media y [DE]) determinadas en el estado estacionario fueron de 15,1 [2,5] mg/l y 3,68 [2,68] mg/l, respectivamente. En otro estudio, tras administrar 600 mg dos veces al día por vía oral hasta alcanzar niveles estables, las Cmax y CIMS fueron de 21,2 [5,8] mg/l y 6,15 [2,94] mg/l, respectivamente. Los niveles estables se alcanzaron al segundo día de administración.

##### ***Distribución***

El volumen de distribución medio en el estado estacionario en adultos sanos es de 40-50 litros y se aproxima al agua corporal total. La unión a proteínas plasmáticas se sitúa alrededor de un 31% y no es dependiente de la

concentración. En estudios con voluntarios, las concentraciones de linezolid tras múltiples dosis se determinaron en varios fluidos corporales de un número limitado de sujetos. Las proporciones de linezolid en saliva y sudor frente al plasma fueron de 1,2:1,0 y 0,55:1,0, respectivamente. Las proporciones en el fluido de revestimiento epitelial y células alveolares del pulmón determinadas con Cmax en el estado estacionario fueron de 4,5:1,0 y 0,15:1,0, respectivamente. En un estudio en sujetos con derivaciones ventrículo-peritoneales sin inflamación meníngea significativa, la Cmax entre el linezolid en el líquido cefalorraquídeo y en el plasma fue de 0,7:1,0 después de la administración de dosis múltiples de linezolid.

***Penetración en los tejidos:***

Se ha demostrado una buena penetración en tejido adiposo, piel y músculo esquelético, y otros estudios han demostrado una buena penetración en huesos y tejidos prostático. (Lovering AM et al., 2002). Tiene buena penetración en tejidos pulmonares de pacientes con neumonía asociada a ventilación, en diagnosticados por broncoscopia y pacientes sanos, (Conte JE et al., 2002). La penetración de Linezolid en líquido cefalorraquídeo (LCR) ha sido estudiado por varios autores; Tsona y colaboradores, muestran la penetración de LCR después de una dosis de 600 mg en 18 pacientes después de neurocirugía (Tsona, A et al., 2010), Boak y colaboradores demostraron una buena distribución en pacientes con ventriculitis por estafilococos no productores de coagulasa (Boak LM et al., 2006) y Myrianthefs y colaboradores observaron la buena penetración en pacientes que recibieron linezolid como profilaxis (Myrianthefs P et al., 2006)

### **Metabolismo**

Linezolid se metaboliza principalmente por la oxidación del anillo morfolínico, dando lugar, principalmente, a la formación de dos metabolitos inactivos del ácido carboxílico de anillo abierto: el ácido aminoetoxiacético (PNU-142300) y la hidroxietilglicina (PNU-142586). La hidroxietilglicina (PNU-142586) es el metabolito humano predominante y se cree que se forma a través de un proceso no enzimático. El metabolito ácido aminoetoxiacético (PNU-143000) es menos abundante. También se han caracterizado otros metabolitos inactivos menores.

Su aclaramiento se realiza, principalmente, por un mecanismo no renal (65%) y en menor medida por mecanismo renal (35%). Su bajo aclaramiento renal (40 mL/min) parece indicar que el fármaco experimenta reabsorción tubular. En equilibrio de estado estacionario el 30% del fármaco aparece en orina en forma libre y el 50% como dos metabolitos ácido carboxílicos. (Slatter, JG et al., 2001).

#### 4.6. EFECTOS ADVERSOS

Los efectos adversos más frecuentes en los pacientes que se trataron con este medicamento fueron: diarrea, dolor de cabeza, náuseas y vómitos.

Se ha puesto de manifiesto que tratamientos de más de 28 días con linezolid pueden causar neuropatía óptica acompañada de pérdida de visión, discromatopsia, y alteraciones hematológicas como anemia y trombocitopenia Zyvox, 2002, todos de intensidad moderada y duración limitada, por lo que se recomienda que a los pacientes tratados con este antibiótico se les practique un hemograma completo semanalmente cuando vayan a tener una duración de dicho tratamiento de más de 14 días.

Linezolid es un inhibidor no selectivo de la monoaminoxidasa (IMAO), por lo cual puede potenciar los efectos de los restantes fármacos que producen este mismo efecto: antidepresivos IMAO e inhibidores selectivos y reversibles de la MAO (RIMA). Además, la administración simultánea de linezolid con fármacos que se metabolizan a través de esta enzima o que aumentan la disponibilidad de los neurotransmisores fisiológicos que son catabolizados por la MAO, puede resultar peligrosa. Entre los fármacos posiblemente implicados se encuentra los simpaticomiméticos directos e indirectos, los fármacos serotoninérgicos, etc...

En los animales, la administración de linezolid se asoció con una supresión de la médula ósea reversible dependiente de la dosis y la duración. Se cree que es debida a que linezolid inhibe el ribosoma mitocondrial y no el ribosoma citoplasmático (Leach KL et al., 2007). Esta mielosupresión se

caracterizó por una disminución de la hematopoyesis y una disminución de los niveles de eritrocitos, leucocitos circulantes y plaquetas.

Efectos adversos	Linezolid (n=2046)	Vancomicina	Q/D
Diarrea	+++	+	+
Dolor de Cabeza	+++	+	+
Náuseas	+++	+	++
Vómitos	++	+	+
Insomnio	++	+	+
Constipado	++	++	+
Picor o Alergia	++	+	+
Vértigo	++	+	+
Fiebre	+	-	+
Alteración del gusto	+	+	+
Trastornos vaginales	+	-	+
Alt. hepáticas	+	-	-
Decoloración lingual	+	-	-
Artralgia	-	-	+++
Mialgia	-	-	+++
Problemas venosos	+	+	+++
Nefrotoxicidad	-	+	-
Ototoxicidad	-	+	-

**Tabla 3:** Frecuencia con la que ocurren los efectos adversos con linezolid, vancomicina y quinupristina/dalfopristina( Q/D) en pruebas clínicas

#### 4.7. USO CLÍNICO

Linezolid fue aprobado por la FDA para su uso en adultos en 2000 y para uso pediátrico en 2005, y por la Agencia europea para la evaluación del medicamento (EMA) en el 2001. Fue aprobado para su uso en el tratamiento de pacientes con neumonía nosocomial y neumonía adquirida en la comunidad, infecciones complicadas de piel y tejidos blandos, bacteriemias, endocarditis y osteomielitis por enterococos resistentes a vancomicina y estafilococos resistentes a meticilina y neumococos resistentes a penicilina, cuando se tenga la certeza o se sospeche que estén causadas por bacterias Gram-positivas sensibles a linezolid. Para determinar si linezolid es un tratamiento adecuado, deben tenerse en cuenta los resultados de las pruebas microbiológicas o la prevalencia de resistencia entre las bacterias Gram-positivas a los antibióticos.

Ha sido empleado también satisfactoriamente para el tratamiento en pacientes con endocarditis, bacteriemia, osteomielitis y tuberculosis. (Vardaskas K et al., 2009).

Linezolid sólo debe ser usado en pacientes con infecciones complicadas de piel y tejidos blandos en los que se sospeche o se tenga la certeza de coinfección por microorganismos Gram-positivos, si no hay otras alternativas terapéuticas disponibles. En estas circunstancias, debe iniciarse concomitantemente tratamiento frente a microorganismos Gram-negativos. El tratamiento con linezolid debe iniciarse únicamente en el ámbito hospitalario y tras la valoración por un médico especialista, como un microbiólogo o un

especialista en enfermedades infecciosas. Se deben tener en cuenta las recomendaciones oficiales sobre el uso adecuado de agentes antibacterianos.



## **JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**



La aparición de aislamientos clínicos de estafilococos pertenecientes a diferentes especies, portadores del gen *cfr* de resistencia a linezolid, supone un potencial peligro para la futura utilidad clínica de linezolid y otras oxazolidinonas. Es de interés conocer si, en el caso de los aislamientos de la misma especie, se trata de un microorganismo que ha sufrido una expansión clonal, o si se trata de microorganismos distintos que han ido adquiriendo por separado el elemento portador del gen *cfr*. Es también de interés conocer la estructura del elemento genético portador del gen *cfr*, y los factores de virulencia y patogenicidad a los que se asocia en las diferentes especies.

#### **OBJETIVOS GENERALES:**

1. Determinar el entorno genético del gen *cfr* en aislamientos clínicos de estafilococos resistentes a linezolid.
2. Determinar los factores de patogenicidad asociados a esta resistencia en aislamientos de estafilococos resistentes a linezolid.

#### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS.:**

1. Determinar la estructura de genes que rodea al gen *cfr* en aislamientos clínicos ya obtenidos de diferentes especies de estafilococos, probablemente emparentada con modificaciones del trasposon Tn558.

2. Determinar, de manera sistemática, la presencia del gen *cfr* en todos los aislamientos de bacterias Gram positivas resistentes a linezolid obtenidas en nuestro centro a lo largo de 6 meses, así como su entorno genético.

3. Determinar, en los aislamientos clínicos ya disponibles de *S. aureus* sensible y resistente a metilina, *S. epidermidis* y *S. haemolyticus*, otros factores de patogenicidad, virulencia, resistencia, etc que se asocien a estos microorganismos, mediante microarrays genéticos específicos.

# **MATERIAL Y MÉTODOS**



## 1. Selección, identificación y conservación de los aislamientos clínicos.

Se estudiaron un total de 29 aislamientos clínicos de *Staphylococcus* spp. caracterizados inicialmente como resistentes a linezolid por E-test. Los aislamientos procedían de lesiones de piel y tejidos blandos y de hemocultivos de pacientes con de bacteriemia. De los 29 aislamientos objeto de estudio, 7 fueron identificadas como *Staphylococcus aureus*, 9 como *Staphylococcus epidermidis* y 13 como *Staphylococcus haemolyticus*.

La identificación de los microorganismos se realizó inicialmente mediante métodos bioquímicos convencionales, y se corroboró mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, usando un espectrómetro Autoflex II y la base de datos Biotyper ( Bruker Daltonics, Alemania) (1).

El estudio de sensibilidad se llevó a cabo inicialmente mediante microdilución con un sistema automatizado (WalkAway, Beckmann Coulter, USA). La sensibilidad a meticilina fue corroborada mediante detección de la proteína PBP 2a por inmunocromatografía de membrana (BinaxNow PBP2a, Alere, USA), y la sensibilidad a linezolid fue corroborada mediante E- test (bioMérieux, La Balme Les Grottes, Francia).

Los aislamientos se mantuvieron congelados en caldo con glicerol a -80°C según los métodos habituales.

## **2. Detección y confirmación de la presencia de mecanismos de resistencia a linezolid.**

Una vez confirmadas identificación y sensibilidad, se procedió a determinar, mediante PCR y secuenciación, la presencia y secuencia de los genes *cfr*, que es el primer gen descrito asociado a resistencia transferible a linezolid, *optrA*, descrito más recientemente, y dominio V del rRNA 23S.

### 2.1 Extracción del ADN

La extracción del ADN total de los aislamientos se realizó a partir de una resiembra de las colonias puras en agar sangre (bioMérieux, La Balme Les Grottes, Francia). Para ello, se realizó una suspensión de turbidez 2 en la escala de McFarland, equivalente aproximadamente a  $6 \times 10^8$  UFC/mL. A partir de aquí, se llevó a cabo una extracción automatizada mediante el extractor NucliSENS easyMAG (bioMérieux, La Balme Les Grottes, Francia), partiendo de un volumen de suspensión bacteriana de 500  $\mu$ l para obtener un volumen de eluido de 60  $\mu$ l.

### 2.2. Amplificación

Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador Eppendorf PersonalCycler. Se utilizó la mezcla de amplificación PCR MasterMix (Promega, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las características técnicas de las reacciones de amplificación de los genes *cfr*, *optrA* y del dominio V del RNA ribosómico 23S aparecen en las tablas 3-5 (Shore A et al., 2010).



Primer directo <i>cfr-d</i>	5'-TGAAGTATAAAGCAGGTTGGGAGTCA-3'	
Primer reverso <i>cfr-r</i>	5'-ACCATATAATTGACCACAAGCAGC-3'	
PCR		
Ciclos	Tª	Tiempo
1 ciclo	94°C	1 minuto
34 ciclos	94°C	1 minuto
	48°C	2 minutos
	72°C	3 minutos
1 ciclo	72°C	7 minutos

**Tabla 3:** Condiciones de la PCR de detección del gen *cfr*

Primer directo <i>optrA-d</i>	5'-AGGTGGTCAGCGAACTAA-3'	
Primer reverso <i>optrA-r</i>	5'-ATCAACTGTTCCCATTCA-3'	
PCR		
Ciclos	Tª	Tiempo
1 ciclo	94°C	1 minuto
25 ciclos	94°C	30 segundos
	46°C	30 segundos
	72°C	1 minuto
1 ciclo	72°C	10 minutos

**Tabla 4:** Condiciones de la PCR de detección del gen *optrA*

Primer directo rRNA-d	5'-AGGTGGTCAGCGAACTAA-3'	
Primer reverso rRNA-r	5'-ATCAACTGTTCCCATTCA-3'	
PCR		
Ciclos	Tª	Ciclos
1 ciclo	94°C	1 ciclo
25 ciclos	94°C 50°C 72°C	25 ciclos
1 ciclo	72°C	1 ciclo

**Tabla 5:** Condiciones de la PCR para el dominio V del RNA ribosómico 23S

Los amplificadores obtenidos en el caso del rRNA 23S fueron posteriormente secuenciados en un secuenciador ABI Prism (Perkin Elmer, USA), y las secuencias obtenidas leídas con el software Chromas (Techelysium Pty LTD, Australia) y comparadas con la secuencia nativa de rRNA 23S mediante el software Blast2Seq (NCBI, NIH, USA).

2.3. Detección y separación de los amplificados en gel de agarosa. Purificación, secuenciación e interpretación de los amplificados.

✓ **Detección y separación de los amplificados**

Los productos de amplificación se separaron y detectaron mediante electroforesis convencional en geles de agarosa al 1.5% en tampón TBE 0.5x. Se utilizó SYBR<sup>®</sup> Green (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, USA) a una concentración de 10.000x como agente intercalante fluorescente entre las dos cadenas de ADN en el momento de fusión de la agarosa. Una vez solidificado el gel, se cargaron los pocillos con las muestras, constituidas por 10 µl del amplificado con 10 µl del tampón de carga Blue/Orange Loading Dye 6x (Promega, USA), previamente diluido según las instrucciones del fabricante. Como control de peso molecular se utilizó 100 bp DNA ladder (100-1500 pb) (Promega, USA). La visualización de los amplificados se realizó en un transiluminador de luz ultravioleta.

✓ **Purificación de los amplificados**

Tras la amplificación por PCR, permanecen en la mezcla de reacción, junto con las copias del amplificado, muchos dNTPs y oligonucleótidos sin utilizar. Todos estos restos pueden interferir en la posterior reacción de secuenciación. Para evitarlo, los amplificados fueron purificados mediante un equipo que hidroliza todos estos restos utilizando enzimas hidrolíticas, una exonucleasa y fosfatasa alcalina (ExoSAP-IT PCR Product Cleanup, Affymetrix, ThermoFisher Scientific, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### ✓ **Secuenciación de los amplificados**

La secuenciación automática de los amplificados se realizó según el método de Sanger, mediante electroforesis capilar con terminadores fluorescentes BigDye™ de Applied Biosystems en el Servicio de Secuenciación de Ácidos Nucleicos de la Universidad de Salamanca.

### ✓ **Interpretación de los amplificados**

La visualización e interpretación de las secuencias obtenidas se realizó con el software Chromas Lite v.2.01. La herramienta informática BLAST disponible en <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov> se utilizó para comparar dichas secuencias con las depositadas en la base de datos <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez> (NCBI, National Center for Biotechnology Information).

### **3. Detección de factores de patogenicidad en *S. aureus***

La detección de factores de patogenicidad se llevó a cabo mediante un equipo de amplificación/hibridación StaphType (Clondiag-Alere, Alemania), que determina 333 secuencias que corresponden a 171 genes distintos y sus variantes alélicas (Tabla 6).

<b>Genes</b>	<b>Fenotipo Resistencia</b>
<i>mecA</i>	Beta-lactámicos
<i>blaZ</i>	Beta-lactamasa
<i>ermA</i>	MLS <sub>B</sub>
<i>ermB</i>	
<i>ermC</i>	
<i>linA</i>	Lincosamidas

**Tabla 6.1:** Genes de resistencia a antimicrobianos determinados por el microarray StaphType.

Genes	Fenotipo Resistencia
<i>msrA</i>	Macrólidos
<i>mefA</i>	
<i>mbpBM</i>	
<i>vatA</i>	Estreptograminas
<i>vatB</i>	
<i>vga</i>	
<i>vgaA</i>	
<i>vgb</i>	
<i>aacA-aphD</i>	Aminoglicósidos
<i>aadD</i>	
<i>aphA</i>	
<i>sat</i>	Estreptotricina
<i>dfrA</i>	Trimetoprima
<i>far</i>	Ácido fusídico
<i>mupR</i>	Mupirocina
<i>tetK</i>	Tetraciclinas
<i>tetM</i>	
<i>tetEfflux</i>	
<i>cat</i>	Cloranfenicol
<i>fexA</i>	
<i>cfr</i>	Oxazolidinonas, lincosamidas, fenicoles, pleuromutilinas estreptogramina A
<i>fosB</i>	Fosfomicina, bleomicina
<i>vanA</i>	Vancomicina
<i>vanB</i>	
<i>vanZ</i>	
<i>Locus R mercurio</i>	Mercurio
<i>qacA</i>	Bomba de expulsión no específica
<i>qacC</i>	

**Tabla 6.2:** Genes de resistencia a antimicrobianos determinados por el microarray StaphType

Genes	Fenotipo
<i>tst-1</i>	Toxina del síndrome del shock tóxico
<i>Tst-RF122</i>	Toxina del síndrome del shock tóxico (alelo cepas bovinas)
<i>entA</i>	Enterotoxina A
<i>entB</i>	Enterotoxina B
<i>entC</i>	Enterotoxina C
<i>entD</i>	Enterotoxina D
<i>entE</i>	Enterotoxina E
<i>entH</i>	Enterotoxina H
<i>entJ</i>	Enterotoxina J
<i>entK</i>	Enterotoxina K
<i>entL</i>	Enterotoxina L
<i>entQ</i>	Enterotoxina Q
<i>entR</i>	Enterotoxina R
<i>Cluster egc</i>	Enterotoxinas G/I/M/N/O/U
<i>PVL</i>	Leucocidina de Pantón-Valentine
<i>lukM/lukF-P83</i>	Leucocidina de Pantón-Valentine (alelo cepas bovinas)
<i>lukF</i>	Componente B y hemolisina
<i>lukS</i>	Componente C y hemolisina
<i>hlgA</i>	Componente A y hemolisina
<i>lukD</i>	Componente D leucocidina
<i>lukE</i>	Componente E leucocidina
<i>hl</i>	Proteína similar a hemolisina
<i>hla</i>	$\alpha$ (Toxina $\alpha$ )
<i>hld</i>	Hemolisina $\delta$

**Tabla 7.1:** Genes asociados a virulencia y tipado determinados por el microarray StaphType.

Genes	Fenotipo
<i>hlIII</i>	Hemolisina III
<i>sak</i>	Estafilokinasa
<i>Chp (CHIPS)</i>	Proteína inhibidora de la quimiotaxis
<i>scn</i>	Proteína estafilocócica inhibidora del complemento
<i>etA</i>	Toxina exfoliativa A
<i>etB</i>	Toxina exfoliativa B
<i>etD</i>	Toxina exfoliativa D
<i>edinA</i>	Inhibidor del factor de diferenciación epidérmico A
<i>edinB</i>	Inhibidor del factor de diferenciación epidérmico B
<i>edinC</i>	Inhibidor del factor de diferenciación epidérmico C
<i>splA</i>	Serina proteasa A
<i>splB</i>	Serina proteasa B
<i>splE</i>	Serina proteasa E
<i>sspA</i>	Proteasa antiopsonizante
<i>sspB</i>	Proteasa antiopsonizante
<i>sspP</i>	Proteasa antiopsonizante
<i>Locus ACME</i>	Elemento móvil asociado al catabolismo de la arginina
<i>Grupo agr</i>	Tipado agr (accessory gene regulator)

**Tabla 7.2** : Genes asociados a virulencia y tipado determinados por el microarray StaphType.

<b>Genes</b>	<b>Fenotipo</b>
<i>mecA</i>	Definitorio de SAMR
<i>mecI</i>	Proteína transductora MecR1
<i>mecR</i>	Proteína reguladora resistencia a meticilina
<i>ugpQ</i>	Glicerofosforil-diester-fosfodiesterasa
<i>ccrA-1</i>	cassette cromosómico Recombinasa A
<i>ccrA-2</i>	cassette cromosómico Recombinasa A
<i>ccrA-3</i>	cassette cromosómico Recombinasa A
<i>ccrA-4</i>	cassette cromosómico Recombinasa A
<i>ccrB-1</i>	cassette cromosómico Recombinasa B
<i>ccrB-2</i>	cassette cromosómico Recombinasa B
<i>ccrB3</i>	cassette cromosómico Recombinasa B
<i>ccrB-4</i>	cassette cromosómico Recombinasa B
<i>ccrC</i>	cassette cromosómico Recombinasa C
<i>merA</i>	Reductasa mercurio
<i>merB</i>	alkilmercurio
<i>kdpA-SCC</i>	ATPasa transportadora de potasio
<i>kdpB-SCC</i>	ATPasa transportadora de potasio
<i>kdpC-SCC</i>	ATPasa transportadora de potasio
<i>kdpD-SCC</i>	Kinasa histidina

**Tabla 8:** Genes asociados a caracterización de SCCmec por el microarray StaphType.



Genes	Fenotipo
Capsule-1	Tipo capsular 1
Capsule-5	Tipo capsular 5
Capsule-8	Tipo capsular 8
<i>icaA</i>	Proteína relacionada con la adhesión intercelular
<i>icaC</i>	Proteína relacionada con la adhesión intercelular
<i>icaD</i>	Proteína relacionada con la adhesión intercelular
<i>bap</i>	Proteína de superficie implicada en la formación de biofilm

**Tabla 9:** Genes asociados a caracterización de la cápsula por el microarray StaphType.

Genes	Fenotipo
<i>bbp</i>	Sialoproteína
<i>clfA</i>	Clumping factor A
<i>fib</i>	Proteína unión fibrinógeno
<i>ebpS</i>	Proteína unión fibronectina
<i>fnb</i>	Proteína unión fibrinógeno
<i>sdr</i>	Proteína unión fibrinógeno
<i>map</i>	Proteína análoga complejo de histocompatibilidad
<i>sasG</i>	Proteína G de superficie
<i>hds1</i>	DNAasa
<i>set</i>	Proteína función superantígeno

**Tabla 10:** Genes asociados a caracterización de adhesinas( MSCRAMMs) por el microarray StaphType.

Una vez confirmada la identificación de las cepas y la presencia, en su caso, del gen *cfr*, se procedió a la extracción del ADN de las cepas y su purificación, mediante un equipo Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para ello se añade un asa de 10  $\mu$ l de la muestra a un tubo Eppendorf que contiene 200  $\mu$ l de una mezcla de enzimas de extracción. Hay que tener la precaución de no incorporar una cantidad excesiva de la muestra, ya que en caso contrario la extracción puede no ser óptima al saturarse el sistema y no llevarse a cabo una correcta digestión o producirse una saturación del filtro de la columna.

Se incuba la mezcla durante 60 minutos a 37°C a 550 rpm. Al acabar esta primera incubación, se añaden 25  $\mu$ l de proteinasa K (Sigma Aldrich, USA) y 200  $\mu$ l de una solución desnaturizante incluida en el equipo, dejando incubar la mezcla a 56°C durante 60 minutos a 550 rpm. La incubación con proteinasa K es crítica para la correcta disrupción de la pared estafilocócica y la liberación de su ADN.

A partir de este punto, se sigue el protocolo del equipo para purificar las muestras.

Tras finalizar el proceso de extracción y purificación se obtiene un eluido que será la muestra para la PCR. Previamente se debe cuantificar el ADN presente en dicho eluido, que no debe ser inferior a 1.8-2  $\mu$ g a  $A_{260}/A_{230}$ .

La PCR se realiza bajo las condiciones que aparecen en la Tabla 6, utilizando los primers proporcionados en equipo (secuencias no suministradas).

PCR		
Ciclos	Tª	Tiempo
1 ciclo	96°C	5 minutos
45 ciclos	96°C	20 segundos
	50°C	20 segundos
	72°C	30 segundos
1 ciclo	4°C	Conservación

**Tabla 11:** Condiciones de la PCR inicial en el sistema StaphType

Una vez llevada a cabo esta PCR se realiza la hibridación con los microarray, lo que permite determinar de manera simultánea numerosos genes estafilocócicos asociados a resistencia, patogenicidad, que aparecen reflejados en la Tabla x. Aunque, históricamente, los microarray han sido usados en gran parte para estudios de expresión génica, gradualmente han sido aplicados en la detección y caracterización de patógenos microbianos, determinación de antimicrobianos y supervisión de infecciones microbianas mediante la investigación de la expresión genómica del anfitrión. (29). Gracias a los array podemos clasificar las cepas entre los distintos complejos clonales.

El método consiste en que todas las muestras son amplificadas de manera simultánea, y además durante este paso se añade biotina-16-dUTP para que se una a los amplicones resultantes. Dichos amplicones son hibridados a los microarray, mientras se lleva a cabo una limpieza, añadimos una solución de

parada, provocando que las muestras que han sufrido hibridación precipiten al fondo del pocillo.

Finalmente la imagen producida en los microarray es leída de manera automática por un software (CLONDIAG, Jena, Alemania).

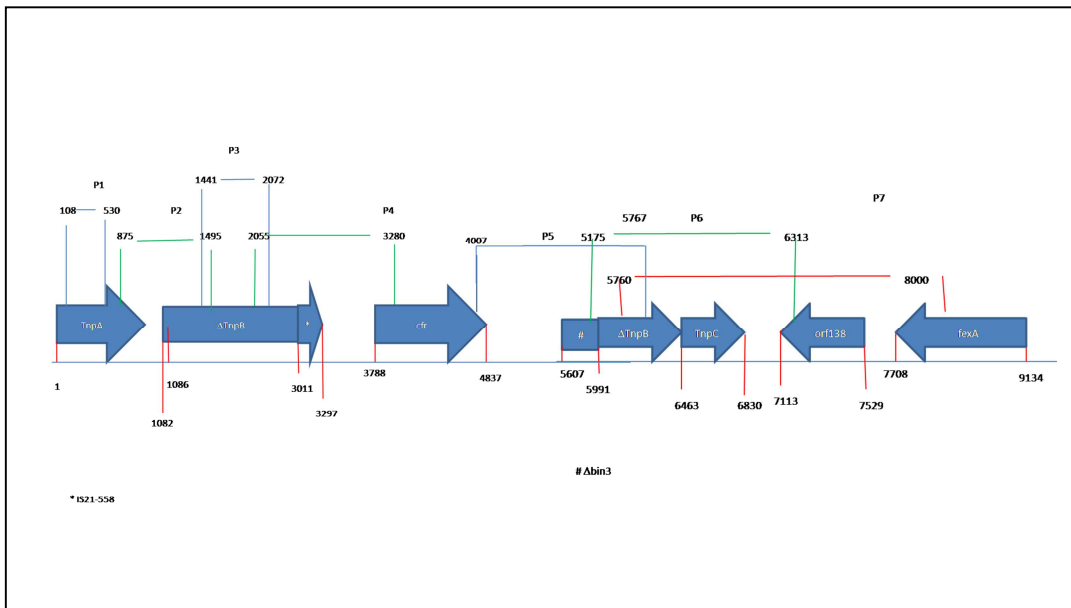
#### **4. Determinación del entorno genético del gen *cfr* en *Staphylococcus* spp.**

Asumiendo que el gen *cfr* probablemente se encontraría incluido en una estructura derivada del transposón Tn558, tal como se ha descrito en todos los casos anteriores, se puso en marcha una estrategia de estudio de dicho transposón siguiendo el protocolo descrito por Kehrenberg y Schwartz en 2006. Inicialmente se realizaron una serie de amplificaciones para determinar la existencia de cada uno de los fragmentos integrantes del Tn558 (Tabla 7).

Gen	Nombre	Secuencia	Tamaño fragmento
<i>cfr</i>	cfr-D	TGA AGT ATA AAG CAG GTT GGG AGT CA	746
	cfr-R	ACC ATA TAA TTG ACC ACA AGC AGC	
<i>fexA</i>	fexA-D	GTA CTT GTA GGT GCA ATT ACG GCT GA	1,272
	fexA-R	CGC ATC TGA GTA GGA CAT AGC GTC	
<i>tnpA</i>	tnpA-D	GGT TCA GAA AGT AAT TGT GGA GGA	930
	tnpA-R	TGT GGC ATG CGT ATG ACG TA	
<i>tnpB</i>	tnpB-D	GGA ACA GTG ATA AGC CGG ATG	1,419
	tnpB-R	ACA TGG TCC TGC AAT TAC TGG TA	
<i>tnpC</i>	tnpC-D	CAG CTA GCT AAA GAC AAG TCG GA	289
	tnpC-R	GTT CAT TCT CTT CTA ACG CCT T	
<i>tnpB-fexA</i>	tnpB-fexA-D	CAC AGG CAC TTC CTA ATG GCT AT	2,475
	tnpB-fexA-R	GCA GGA AGT ATT GGT GTT GGA AC	
<i>tn558</i>	Tn558-D	ACC AGA TTA ACA TCA GGC CAA G	5,741
	Tn558-R	TTA CGG TCA GAA GAA TGT ACC ACA	

**Tabla 12:** PCRs para determinación de fragmentos descritos en el Tn558.

Posteriormente se estudió la estructura del transposón mediante amplificación por PCR solapada de diferentes fragmentos intergénicos, según el esquema que aparece en la figura 8.



**Figura 8:** Esquema de PCRs solapadas para la identificación completa del entorno genético de *cfr*.

En total, por cada aislamiento se realizaron 7 reacciones de PCR. Los oligonucleótidos utilizados se muestran en la tabla 13 y las condiciones de PCR en la Tabla 14.

PCR 1 (TnpA):	95°C x 1'
PCR 2 (TnpA-ΔTnpB)	35ciclos: 95°C x 30'', 42°C x 30'',
PCR 4 (ΔTnpB- cfr)	72°C x 30'' 72°C x 1'
PCR 6 (Δbin3- ΔTnpB-TnpC-orf138)	
PCR 3 (ΔTnpB)	95°C x 1'
PCR 5 ( cfr-Δbin3- ΔTnpB)	35ciclos: 95°C x 30'', 51°C x 30'',
PCR 7 (Δbin3- ΔTnpB-TnpC-orf138-FexA):	72°C x 30'' 72°C x 1'

**Tabla 13:** Diseño de PCR solapadas sobre el Tn558

Gen	Oligonucleótido(secuencia 5'→3')	Tamaño amplificado (pb)
TnpA	<b>TnpA-D</b> GGATAATACGGGCAA <b>TnpA-R</b> GCTTTGACTTGTCCA	108/503 TnpA
TnpA-ΔTnpB	<b>TnpA-ΔTnpB-D</b> GACTAGGAAAACGGACA <b>TnpA-ΔTnpB-R</b> GTTAAGTAGGTCCGGTA	875 TnpA a 1495 ΔTnpB
ΔTnpB	<b>ΔTnpB-D</b> CGATAACCGAAGTGCCTA <b>ΔTnpB-R</b> TACCCTAAAGTGCCGAAG	1441/2072 ΔTnpB
ΔTnpB- IS21-558 -cfr	<b>ΔTnpB-cfr-D</b> TACCCTAAAGTGCCGAA <b>ΔTnpB- cfr-R</b> CCGTTTCTACTCTCTCA	2055 ΔTnpB a 3280 cfr
cfr- Δbin3-ΔTnpB	<b>Cfr- Δbin3- ΔTnpB-D</b> ACGCTGCTTGTGGTCA <b>Cfr-Δbin3-ΔTnpB-R</b> ACATGGTCCTGCAATTACT	4007 cfr a 5767 ΔTnpB
Δbin3-ΔTnpB-TnpC-orf138	<b>Δbin3-ΔTnpB-TnpC-orf138-D</b> GCAATGATTGCTGAGCA <b>Δbin3-ΔTnpB-TnpC-orf138-R</b> CCCAGATGTTAACACCA	5175 Δbin3 a 6313 orf138
Δbin3-ΔTnpB-TnpC-orf138-fexA	<b>Δbin3-ΔTnpB-TnpC-orf138-fexA-D</b> CACAGGCACTTCCTAATGG <b>Δbin3-ΔTnpB-TnpC-orf138-fexA-R</b> GCAGGAAGTATTGGTGTTG	5770 ΔTnpB a 8000 fexA

**Tabla 14:** Condiciones de PCR para el estudio de Tn558





## **RESULTADOS**



Los estudios de actividad *in vitro* confirmaron la resistencia a linezolid en todos los aislamientos, con CIMs que oscilaron entre 8 y >256 mg/L. Todos los aislados mostraron el mismo perfil de sensibilidad, incluyendo su sensibilidad a glicopéptidos. Las CIMs de linezolid de los aislados estudiados aparecen reflejadas en la Tabla 15

Antimicrobianos	Microorganismos		
	<i>S. aureus</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. epidermidis</i>
Penicilina	R	R	R
Meticilina	R	R	R
Gentamicina	S	S	S
Eritromicina	S	S	S
Clindamicina	R	R	R
Rifampicina	S	S	S
Tetraciclina	R	R	R
Cloranfenicol	R	R	R
Linezolid	R	R	R
Vancomicina	S	S	S

Tabla 15: Perfil de sensibilidad a antimicrobianos de los aislados estudiados.

En todos los aislamientos se detectó asimismo la presencia de la proteína PBP 2a, una PBP de baja afinidad que es codificada por el gen *mecA* y es la responsable de la resistencia de estos microorganismos a todos los antibióticos  $\beta$ -lactámicos.

Especies (nº aislados)	Intervalo de CIM (mg/L) (mediana)
<i>S. aureus</i> (7)	8->256 (8)
<i>S. haemolyticus</i> (14)	64->256 (>256)
<i>S. epidermidis</i> (8)	16->256 (>256)

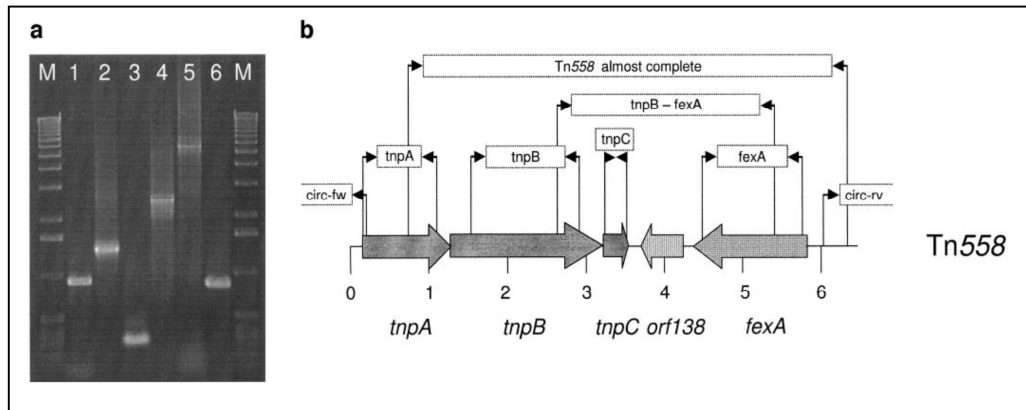
Tabla 16: CIM a linezolid de los aislados estudiados.

Mediante extracción de ADN plasmídico y PCR se demostró en todas las cepas la presencia plasmídica del gen *cfr*. La secuenciación del gen *cfr* demostró que se trataba de una secuencia idéntica a los *cfr* descritos en pSCFS1 (Nº acceso GenBank: NC\_005076.1) (17Shore) y pSCFS6 (Nº acceso GenBank: AM408573.1) (15Shore), y que mostraba una similitud del 99,9% con el gen *cfr* de pSCFS3 (Nº acceso GenBank: AM086211.1) (18Shore) diferenciándose de éste último solamente en la base 761, que no se traduce en cambios de aminoácidos. No se detectaron, por el contrario, mutaciones asociadas a los genes *rrn*. Tampoco se demostró en aislamiento alguno la presencia del gen *optrA*.

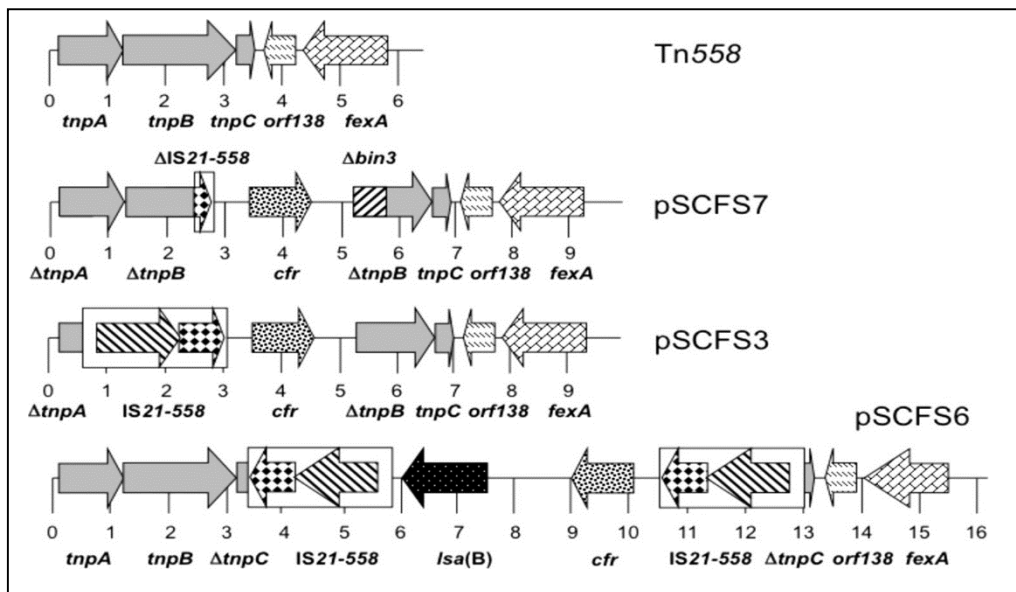
Las cepas incluidas en el presente estudio se demostró, inicialmente, que eran positivas para los genes *cfr* y *fexA*. Ello hacía presuponer que el gen *cfr* se encontraba incluido en una estructura derivada del transposón Tn558, tal como se ha descrito en todos los casos anteriores, se puso en marcha una estrategia de estudio de dicho transposón siguiendo un protocolo similar al descrito por Kehrenberg y Schwarz en 2006 (Figura 9).

De este modo, se obtuvieron amplificadores que se correspondían con el tamaño esperado para *tnpA* (930 bp), *tnpC* (289 bp), *fexA* (1272 bp) y para el fragmento *tnpB-fexA*, que incluye la ORF138 (2475 bp). Por el contrario, el *tnpB* no ofreció el tamaño esperado de 1419 bp, sino que ofreció un tamaño muy superior, en torno a 2.500 bp mayor de los esperado, lo que sugería una estructura por tanto más similar a la del plásmido pSCFS7 descrito en 2010 en una cepa de ST8-SARM-IVa aislada en Irlanda (Figura 10). En esta estructura, el fragmento *tnpB* muestra un tamaño sensiblemente superior, y una estructura

notablemente distinta, al hallarse escindido en dos partes por la inserción de un fragmento de la secuencia de inserción IS21-558, un fragmento de un gen *bin3*, y por el propio gen *cfr* completo.



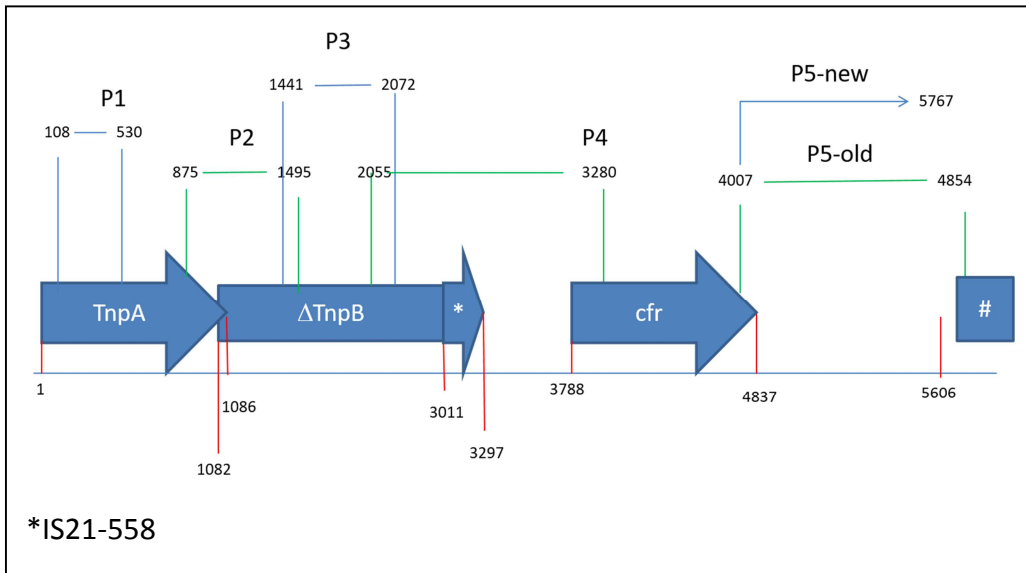
**Figura 9:** Estructura del transposón Tn 558, y características de las parejas de *primers* utilizadas en el estudio.



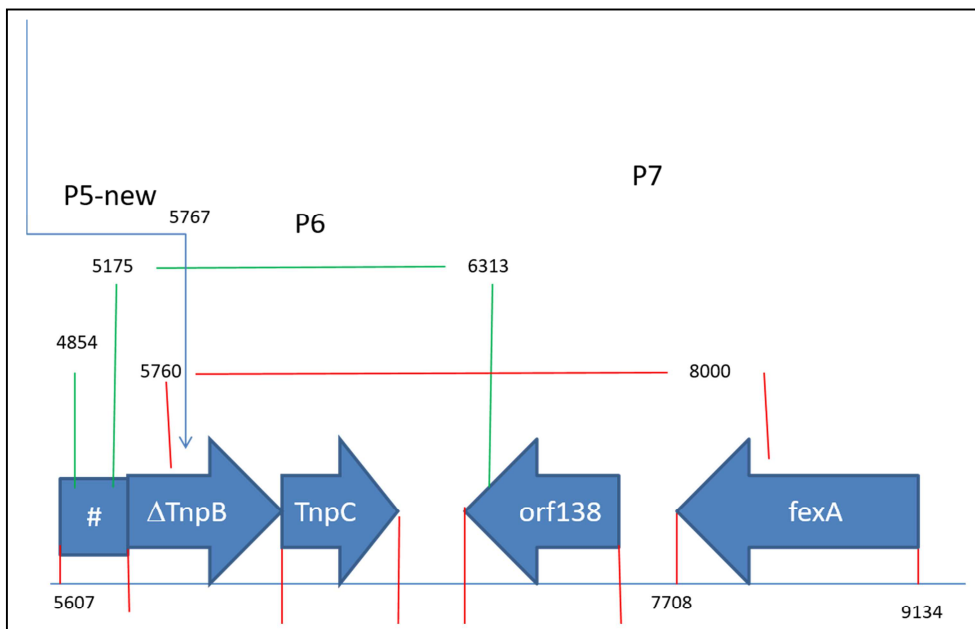
**Figura 10:** Representación esquemática de la organización de las diferentes variantes del Tn558 portadores del gen *cfr*, incluyendo el plásmido pSCFS7 (nº acceso: FR675942)

Puesto que la situación más probable era que se tratase del plásmido pSCFS7 (la otra alternativa sería que se tratara de una estructura completamente

nueva), se diseñó un set de *primers* para identificar el contenido del este fragmento de 4500 bp contenido dentro de *tnpB*. (Figuras 11 y 12).



**Figura 11:** Diseño de *primers* para el estudio del entorno genético de *cfr*

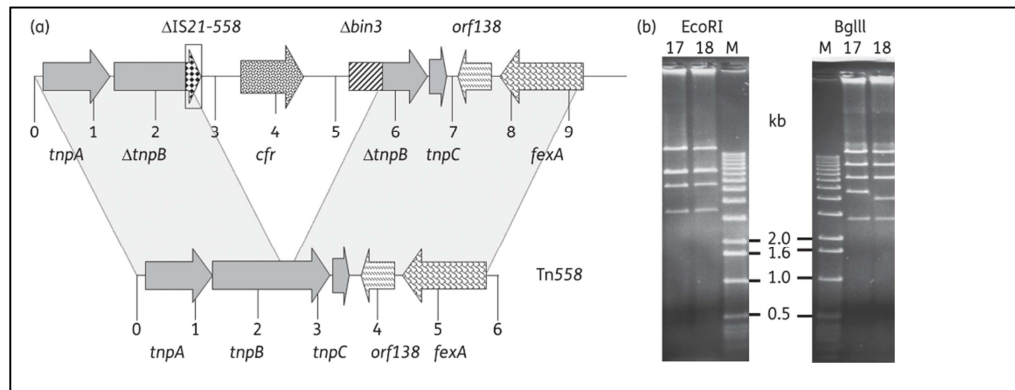


**Figura 12:** Diseño de *primers* para el estudio del entorno genético de *cfr*

El estudio demostró que, en todos los casos, se trataba de la misma estructura descrita por Shore en 2010 . El amplicón *tnpB* comprendía 4.043 bp,

de los que sólo pertenecían a *tnpB* el fragmento inicial (bases 1-859) y el final (bases 3826-4043). Las cerca de 3.000 bases adicionales corresponden a un elemento IS21-558, concretamente a las 297 bases finales del fragmento *IStBS*, que tiene una homología moderada (50-70%) con otras transposasas del mismo grupo *IS21*, una IR situada inmediatamente después, el gen *cfr* ya mencionado y un fragmento que incluye aproximadamente la mitad de la secuencia de una resolvasa (*bin3*) previamente descrita en Tn552. En todos los casos, el fragmento descrito se encontraba incluido en un plásmido de aproximadamente 40kb (pSCFS7 se describe como un plásmido de 45 kb) (Figura 13).

Los estudios de transformación llevados a cabo por el equipo del Dr. Stephan Schwarz en Neustadt-Mariesee (Alemania) con dos de las cepas incluidas en el estudio (un *S. aureus* y un *S. haemolyticus*) confirmaron que el plásmido no era portador de otros genes de resistencia mas que los incluidos en este fragmento. La restricción del plásmido con EcoR1 y BglIII mostró que se trataban de estructuras virtualmente idénticas.



**Figura 13:** Estructura del fragmento descrito en comparación con el trasposón Tn558, y restricción con EcoRI y BglIII.

El estudio de las cepas de *S. aureus* mediante *microarrays* permitió, en primer lugar, su clasificación de acuerdo con los criterios epidemiológicos utilizados en *S. aureus* y SARM. Todas las cepas inicialmente identificadas con *S. aureus* fueron positivas para los 12 genes que el sistema utiliza para corroborar la identificación.

Las cepas 1 a la 6 pertenecen al tipo *agrII*, mientras la cepa 7 perteneció al grupo *agrI*. Todas las cepas presentan amplificación positiva para los fragmentos de cassette *SCCmec mecA* y *• • mecR*, pero no para *mecR* ni *mecI*, lo que demuestra que son portadoras de un *SCCmec* de tipo IV. Por otra parte, amplifican los fragmentos *ccrA-2* y *ccrB-2*, pero no el resto de *ccr* ni los genes *mer* y *kdpA*, B, C, D y E, lo que indica que se trata de un complejo *ccr* de tipo 2. De acuerdo con todos estos datos, se trata en todos los casos de cepas pertenecientes al complejo clonal 5 (CC5), uno de los habituales entre las cepas de SARM adquiridas en la comunidad en el momento actual.

Con el fin de analizar de una forma clara los resultados obtenidos, se han diferenciado los resultados obtenidos respecto a los genes implicados en



resistencia a antimicrobianos y los resultados respecto a la presencia de genes de virulencia, ambos referidos en Material y métodos.

De acuerdo con lo que aparece en la Tabla 17, ninguno de los aislamientos fue productor de toxina del síndrome del shock tóxico estafilocócico, ni en su alelo humano ni en el bovino.

Genes	Fenotipo	SA1	SA2	SA3	SA4	SA5	SA6	SA7
<i>tst-1</i>	Toxina del síndrome del shock tóxico	-	-	-	-	-	-	-
<i>Tst-RF122</i>	Toxina del síndrome del shock tóxico (alelo cepas bovinas)	-	-	-	-	-	-	-
<i>entA</i>	Enterotoxina A	+	+	+	+	+	+	-
<i>entB</i>	Enterotoxina B	-	-	-	-	-	-	-
<i>entC</i>	Enterotoxina C	-	-	-	-	-	-	-
<i>entD</i>	Enterotoxina D	-	-	-	-	-	-	-
<i>entE</i>	Enterotoxina E	-	-	-	-	-	-	-
<i>entH</i>	Enterotoxina H	-	-	-	-	-	-	-
<i>entJ</i>	Enterotoxina J	-	-	-	-	-	-	-
<i>entK</i>	Enterotoxina K	-	-	-	-	-	-	-
<i>entL</i>	Enterotoxina L	+	-	+	+	+	+	-
<i>entQ</i>	Enterotoxina Q	-	-	-	-	-	-	-
<i>entR</i>	Enterotoxina R	-	-	-	-	-	-	-
Cluster <i>egc</i>	Enterotoxinas G/I/M/N/O/U	+	+	+	+	+	+	+

**Tabla 17:** Genes asociados a virulencia y tipado determinados por el *microarray StaphType*.

Todos los aislados fueron productores de alguna enterotoxina. Se observan tres perfiles de producción: seis de las siete cepas (SA1-SA6) son portadoras de los genes *ent*, en concreto del alelo N315, y del cluster *egc*, responsables de la presencia de enterotoxinas, concretamente enterotoxina A (la

más frecuente en *S. aureus*), y las enterotoxinas G/M/N/O/U. Dos cepas (SA2 y SA7) carecen del gen *entL* y SA7 carece del gen *entA*, por lo que no es productora de la enterotoxina A. Ninguno de los aislados produjo las enterotoxinas B, C, D, E, H, J, K, Q y R.

Genes	Fenotipo	SA1	SA2	SA3	SA4	SA5	SA6	SA7
<i>lukF/S-PVL</i>	Leucocidina de Panton-Valentine	-	-	-	-	-	-	-
<i>lukM/F-P83</i>	Leucocidina de Panton-Valentine (alelo cepas bovinas)	-	-	-	-	-	-	-
<i>lukF/S-hlgA</i>	$\gamma$ -hemolisina	+	+	+	+	+	+	-
<i>lukD/E</i>	Leucocidina	+	+	+	+	+	+	
<i>etA</i>	Toxina exfoliativa A	-	-	-	-	-	-	-
<i>etB</i>	Toxina exfoliativa B	-	-	-	-	-	-	-
<i>etD</i>	Toxina exfoliativa D	-	-	-	-	-	-	-
<i>edinA</i>	Inhibidor del factor de diferenciación epidérmico A	-	-	-	-	-	-	-

**Tabla 18.1** : Genes asociados a virulencia y tipado determinados por el *microarray StaphType*.

Genes	Fenotipo	SA1	SA2	SA3	SA4	SA5	SA6	SA7
<i>edinB</i>	Inhibidor del factor de diferenciación epidérmico B	-	-	-	-	-	-	-
<i>edinC</i>	Inhibidor del factor de diferenciación epidérmico C	-	-	-	-	-	-	-
Locus <i>ACME</i>	Elemento móvil asociado al catabolismo de la arginina	-	-	-	-	-	-	-
Grupo <i>agr</i>	Tipado <i>agr</i> (accessory gene regulator)	+(II)	+(II)	+(II)	+(II)	+(II)	+(II)	+(I)

**Tabla 18.2** : Genes asociados a virulencia y tipado determinados por el *microarray StaphType*.

Ninguno de los aislados era productor de leucocidina de Pantone-Valentine, (genes *lukF/lukS*-PV) ni en su variante humana ni en la variante bovina (*lukM/lukF*-P83) muy frecuente en las cepas de origen animal. Por el contrario, sí fueron positivos los genes *lukF/lukS/hglA*, asociados a la producción de una hemolisina  $\gamma$  de características casi idénticas a la leucocidina de Pantone-Valentine, aunque asociada a un *locus* genético distinto, así como de otra leucocidina perteneciente a la misma familia, *lukE/lukD*. Respecto a la leucocidina X/Y, estas cepas sólo parecen ser capaces de producir uno de sus dos componentes (*lukY*), en concreto su variante 1.

El estudio del genoma en lo que se refiere a factores de patogenicidad fue positivo asimismo para una secuencia (*h1111*) que ha sido identificada como una

posible hemolisina III, el gen *sak*, que codifica una estafilokinasas, un *chp*, que codifica una proteína CHIPS (chemotaxis inhibitor protein staphylococcal), que tiene efecto antiinflamatorio, y un *scn*, que codifica una proteína del grupo SCIN (Staphylococcal complement inhibitor) con funciones antiopsonizantes.

Por el contrario, los genes *et* determinantes de la síntesis de toxinas exfoliativas fueron negativos en todos los casos.

Se detecta asimismo la presencia de los genes *sspA/B/P*, que codifican proteasas con funciones antiopsonizantes, y varias serina proteasas de la familia *spl*, comunes en *S. aureus* dentro del islote de patogenicidad Sa $\beta$ .

Respecto a la presencia de otros genes, las seis primeras cepas presentan el gen accesorio regulador *agrII* y la SA7, sin embargo, posee el gen regulador *agrI*. Estos genes son importantes en la virulencia de *S. aureus* en infecciones de piel y tejidos blandos, regulando la expresión de genes responsables exoenzimas, de la síntesis de proteínas de unión al fibrinógeno, e incrementando la expresión del gen *mecA*.

Ninguna cepa presentaba el locus ACME (elemento móvil asociado al catabolismo de la arginina implicado en la capacidad de crecimiento y supervivencia en el hospedador), que se sabe que es mucho más frecuente en cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina, sobre todo aquellos portadores del *cassette SCCmec* tipo IVa.

En cuanto a los genes relacionados con el tipo capsular, las cepas 1-6 fueron positivas para el tipo capsular 5, además de ser positivas para varias proteínas relacionadas con la adhesión intercelular (*IcaA*, *IcaC*, *IcaD*).

Dentro del grupo de proteínas MSCRAMM (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules), las cepas 1 al 6 fueron positivas para una proteína de unión a sialoproteínas (*bbp*), *clumping factor (clfA)*, y para proteínas de unión al fibrinógeno (*fib*, *sdrC*, *sdD*), a la fibronectina (*ebh*, *fnbA*, *ebpS*) y al factor von Willebrand (*vwb*).

Se detectó también la presencia del gen *map*, que codifica la síntesis de una proteína análoga a las del MHC de clase II, y que al parecer tiene funciones inmunomoduladoras, modulando la acción de los linfocitos T frente al microorganismo, del gen *sasG*, que codifica la síntesis de la proteína de superficie G y del gen *hsd*, que codifica la síntesis de la DNAasa presente habitualmente en *S. aureus*.

Se detecta asimismo la presencia de varios genes de la familia *set/ssl*, que se piensa que codifican proteínas con probables funciones de superantígeno (*setC*, *set6*, *set 7*, *set8/ssl3*, *set8/ssl3*, *set9/ssl4*, *set3/ssl5*, *set1/ssl7*, *set2/ssl8*, *set5/ssl9*, *set4/ssl10*, *set2/ssl11*, *setB*).

Genes	Fenotipo Resistencia	SA1	SA2	SA3	SA4	SA5	SA6	SA7
<i>mecA</i>	Beta-lactámicos	+	+	+	+	+	+	+
<i>blaZ</i>	Beta-lactamasa	+	+	+	+	+	+	+
<i>ermA</i>	MLS <sub>B</sub>	-	-	-	-	-	-	-
<i>ermB</i>		-	-	-	-	-	-	-
<i>ermC</i>		-	-	-	-	-	-	-
<i>linA</i>	Lincosamidas	+	+	+	+	+	+	+
<i>msrA</i>	Macrólidos	-	-	-	-	-	-	-
<i>mefA</i>		-	-	-	-	-	-	-
<i>mbpBM</i>		-	-	-	-	-	-	-
<i>vatA</i>	Estreptograminas	-	-	-	-	-	-	-
<i>vatB</i>		-	-	-	-	-	-	-
<i>vga</i>		-	-	-	-	-	-	-
<i>vgaA</i>		-	-	-	-	-	-	-
<i>vgb</i>		-	-	-	-	-	-	-
<i>aacA-aphD</i>	Aminoglicósidos	-	-	-	-	-	-	-
<i>aadD</i>		+	+	+	+	+	+	+
<i>aphA</i>		-	-	-	-	-	-	-
<i>sat</i>	Estreptomicina	-	-	-	-	-	-	-

**Tabla 19:** Genes asociados a virulencia y tipado determinados por el *microarray StaphType*.

Genes	Fenotipo Resistencia	SA1	SA2	SA3	SA4	SA5	SA6	SA7
<i>dfrA</i>	Trimetoprima	-	-	-	-	-	-	-
<i>far</i>	Ácido fusídico	-	-	-	-	-	-	-
<i>mupR</i>	Mupirocina	-	-	-	-	-	-	-
<i>tetK</i>	Tetraciclinas	-	-	-	-	-	-	-
<i>tetM</i>		-	-	-	-	-	-	-
<i>tetEfflux</i>		+	+	+	+	+	+	+
<i>cat</i>	Cloranfenicol	-	-	-	-	-	-	-
<i>fexA</i>		+	+	+	+	+	+	+
<i>cfr</i>	Oxazolidinonas, lincosamidas, fenicoles, pleuromutilinas estreptogramina A	+	+	+	+	+	+	+
<i>fosB</i>	Fosfomicina, bleomicina	+	+	+	+	+	+	+
<i>vanA</i>	Vancomicina	-	-	-	-	-	-	-
<i>vanB</i>		-	-	-	-	-	-	-
<i>vanZ</i>		-	-	-	-	-	-	-
<i>Locus R mercurio</i>	Mercurio	-	-	-	-	-	-	-
<i>qacA</i>	Bomba de expulsión	-	-	-	-	-	-	-
<i>qacC</i>	no específica	-	-	-	-	-	-	-

**Tabla 20:** Genes asociados a virulencia y tipado determinados por el *microarray StaphType*.

En relación con genes asociados a resistencia a antimicrobianos, la dotación de este tipo de genes es relativamente pobre. Las 7 cepas de *S. aureus* estudiadas portaban los mismos genes de resistencia. El 100% de las cepas portaban el gen *blaZ*, gen responsable de la presencia de una penicilinas



plasmídica, inducible, que inactiva la penicilina G, carboxipenicilinas y ureidopenicilinas. Además todas las cepas eran resistentes a meticilina, detectando en todas ellas el gen *mecA*, responsable de la síntesis de una PBP2a de baja afinidad.

Cabe destacar que ninguna de las 7 cepas poseía genes de resistencia a macrólidos ni por presencia de metilasa ni por mecanismos expulsivos (*erm*, *mef*). Todos ellos eran portadores en cambio del gen *linA*, que codifica resistencia de manera específica a lincosamidas (lincomicina, clindamicina).

Respecto a otros genes determinantes de resistencia a otros antimicrobianos, las 7 cepas eran portadoras del gen *aaaD*, gen que codifica la síntesis de una adeniltransferasa (ANT) que adenila el grupo hidroxilo, impidiendo la unión del aminoglucósido al ribosoma, y generando resistencia de manera específica a tobramicina y neomicina. Asimismo, todas las cepas presentaban el gen *tetE*, que codifica una bomba de expulsión que elimina tetraciclinas y el gen *fosB*, gen plasmídico que codifica una metalotioltransferasa que inactiva la fosfomicina.

Obviamente, todas las cepas eran portadoras del gen *cfr*, y además del gen *fexA*, que ya se ha descrito previamente como integrante del entorno genético de *cfr* dentro de la estructura pSCFS7, de la que eran portadores todos los aislados estudiados.

En resumen se observa que las cepas desde SA1 a SA6 comparten los mismos genes responsable de virulencia y de resistencia pero la cepa

denominada SA7 muestra un patrón totalmente distinto en relación a la presencia de dichos genes.

## **DISCUSIÓN**



Motivos diversos y heterogéneos han confluído para hacer que, en las últimas décadas, el desarrollo y comercialización de nuevos antimicrobianos se hayan reducido de forma alarmante (Gould y Bal, 2003). En la práctica, solo han aparecido dos moléculas que se puedan considerar pertenecientes a clases de antibióticos completamente nuevas: daptomicina (lipopéptidos) y linezolid (oxazolidinonas).

Linezolid fue autorizado por la FDA para su uso clínico en 2000, y se convirtió rápidamente en un recurso importante en el manejo de las infecciones por bacterias Gram positivas, con indicación en el tratamiento de infecciones de piel y tejidos blandos complicadas y no complicadas, y en neumonía tanto nosocomial como comunitaria por Gram positivos, así como en el tratamiento de infecciones por *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina (VRE), incluyendo la bacteriemia.

Su espectro, su farmacocinética, con un comportamiento muy similar para la forma oral y la parenteral, y las posibilidades que abre por tanto para las terapias secuenciales, le han convertido en un antimicrobiano muy utilizado en infecciones por Gram positivos, en especial cuando se trata de Gram positivos multirresistentes como SARM o VRE.

Como ocurre con otros antimicrobianos que actúan sobre el ribosoma, linezolid tiene un espectro peculiar, que incluye estafilococos tanto sensibles como resistentes a metilina, enterococos sensibles y resistentes a vancomicina, estreptococos, corinebacterias, *Mycobacterium tuberculosis* y diferentes especies de bacterias anaerobias (Zurenko et al., 1996). En general, las CIMs de

linezolid frente a estafilococos sensibles se sitúan entre 1 y 4 mg/L en la mayor parte de los estudios previos al lanzamiento (Jones et al, 1996; Wise et al, 1998).

Los dos estudios principales posteriores al lanzamiento (Zyvox Annual Appraisal of Potency and Spectrum (ZAAPS), vigente desde 2002, y Linezolid Experience and Accurate Determination of Resistance (LEADER), vigente desde 2004) (Mendes et al., 2014a; Mendes et al., 2014b; Flamm et al 2012a; Flamm et al 2012b; Flamm et al, 2013a; Flamm et al, 2013b) muestran una buena evolución de los datos de resistencia. En el programa LEADER para 2010-2012, con aislados procedentes exclusivamente de Estados Unidos, sólo un 5,5-7,5% de los estafilococos se inhiben a concentraciones  $\leq 0,5$  mg/L, pero las CIM<sub>50</sub> para SARM y SASM se mantienen en 1 mg/L, y la CIM<sub>90</sub> es de 1 mg/L frente a MRSA y 2 mg/L frente a MSSA. Menos del 0,1% de los SASM y SARM mostraron CIMs de linezolid  $>8$  mg/L. Los estafilococos no productores de coagulasa se muestran discretamente más sensibles, con CIM<sub>50</sub> de 0,5 mg/L, CIM<sub>90</sub> de 1 mg/L, y ningún aislado con una CIM  $>8$ mg/L. Los datos del programa ZAAPS, con aislados de origen internacional, son similares, con CIM<sub>50</sub> y CIM<sub>90</sub> de 1 mg/L y 2 mg/L respectivamente, tanto para SASM como para SARM, y CIM<sub>50</sub> y CIM<sub>90</sub> de 0,5 mg/L y 1 mg/L para estafilococos no productores de coagulasa. En este caso, no se detectó aislado alguno con CIM  $>8$  mg/L ni en *S. aureus* ni en estafilococos no productores de coagulasa.

El ribosoma bacteriano es la diana sobre la que actúan un mayor número de familias de antimicrobianos (macrólidos, lincosamidas, estreptograminas, tetraciclinas, amfenicoles, aminoglicósidos...). La mayor parte de estos fármacos

actúan inhibiendo, en una u otra forma, la acción de la peptidil-transferasa de la subunidad 50S. La acción sobre el ribosoma tiene algunas desventajas, como es el hecho de que se trate, con frecuencia, de antimicrobianos bacteriostáticos, pero tiene también importantes ventajas. El ribosoma es una estructura virtualmente igual en todas las bacterias, y está presente en todas ellas, por lo que la acción sobre el mismo implica, con frecuencia, un espectro muy amplio. Por otra parte, la mayor parte de las bacterias contienen varias copias del gen que codifica el rRNA 23S (*rrn*) (en Gram positivos, habitualmente, entre 4 y 6), de modo que la aparición de una mutación en una copia del gen no redonda significativamente en un incremento de la CIM (Toh et al, 2007). Un incremento importante de la CIM requeriría la acumulación de mutaciones en varias copias del gen, y ello, como es lógico, reduce la probabilidad de emergencia de mutantes resistentes, al menos a través de este mecanismo.

Inicialmente se consideró que el mecanismo de acción de linezolid derivaba de su capacidad para interferir con la síntesis de proteínas en las fases de iniciación de la misma (Lin et al., 1997). Estudios posteriores sugieren que el mecanismo de acción de linezolid podría ser más complejo que la simple interacción con el centro peptidil transferasa de la subunidad 50S. Linezolid interactúa también directamente con el rRNA, en especial con la posición A2602, impidiendo la unión, o al menos el posicionamiento adecuado del aminoacil-tRNA con respecto al centro peptidil transferasa (Leach et al., 2007). Parece, no obstante, interactuar también con la proteína ribisómica L27, con la proteína asociada al ribosoma LepA y con el tRNA (Colca et al., 2003). Estas interacciones

podrían estar relacionadas con la propia formación del ribosoma y con la fidelidad de la traducción.

Los planteamientos teóricos iniciales eran optimistas en relación con la probabilidad de desarrollo de resistencia, ya que se trataba de un fármaco de síntesis, por lo que no era probable que existieran en la naturaleza mecanismos de resistencia específicos desarrollados. Esta premisa venía corroborada por el hecho de que, en los estudios previos al lanzamiento, la cobertura frente a los Gram positivos probados era prácticamente completa (Ballow et al., 2002a, 2002b; Bolmstrom et al., 2002; Mutnick et al., 2002; Mutnick et al., 2003). Por otra parte, estaba el hecho ya mencionado de la redundancia del gen *rrn*, que hacía que una mutación en una sola copia del gen, en general, no tuviera una repercusión significativa sobre la CIM de linezolid. Los primeros estudios de sensibilidad avalaban el planteamiento teórico relativo a la selección de mutantes resistentes. Los mutantes resistentes se obtenían solamente tras numerosos pases en medios con concentraciones crecientes del fármaco, con una frecuencia extremadamente baja ( $8 \times 10^{-11}$ ) en estafilococos, y aún más baja en enterococos (Zurenko et al., 1996). Durante los estudios en fase 3 y en programas de uso compasivo del fármaco, previo a su lanzamiento, surgen 15 casos de resistencia, siempre en enterococos y, con frecuencia, en pacientes que habían recibido una dosificación inadecuada (Zyvox, 2010).

Después de la aprobación de la FDA empezaron a describirse casos de resistencia a linezolid (Gales et al, 2006; Meka et al, 2004; Tsiodras et al., 2001; Wilson et al., 2003; Johnson et al., 2002; Auckland et al., 2002). Todos ellos se



asociaban a mutaciones en el gen que codifica la síntesis del rRNA 23S. Dado el amplio uso del antimicrobiano, corroboraban la impresión inicial de baja frecuencia de selección de resistencia, y se asociaban habitualmente a tratamientos prolongados por encima de las tres semanas (Peeters & Sarria, 2005). Casi todos los casos se asociaban además a procedimientos invasivos, implicación de órganos profundos y presencia de elementos extraños (prótesis, cuerpos extraños, catéteres...) y abscesos no drenados (Zyvox 2010). La infrecuencia de resistencia venía avalada por los resultados del estudio LEADER, que tras 9 años de estudio y >40.000 aislados de estafilococos y enterococos estudiados, obtuvo unas cifras de resistencia entre el 0,03% y el 1,83% (Mendes et al, 2014a). Las cifras de resistencia en estafilococos se incrementaron en los primeros años (entre 2004 y 2009 en *S. aureus*, y entre 2004 y 2008 en estafilococos no productores de coagulasa), para después permanecer estables o incluso tender a la baja durante el resto del estudio. El estudio ZAAPS mantuvo unas cifras de resistencia incluso inferiores (<1,2%) durante todo el estudio.

En todos estos aislados resistentes, dicha resistencia se asociaba a la presencia de mutaciones en varios de los alelos del gen *rrn* (Marshall et al, 2002), y la presencia de estas mutaciones tenía un coste importante en el *fitness* del microorganismo. Se demostró incluso que este fenotipo tendía a revertir, aunque no completamente, al fenotipo sensible, cuando desaparecía la presión selectiva positiva del antimicrobiano (Tsakris et al, 2007).

Otro dato importante en relación con la resistencia a linezolid ha sido la ausencia de resistencia cruzada, tal como ya sugerían los primeros estudios

(Fines & Leclerq, 2000). Aislados resistentes a antimicrobianos con dianas muy próximas, incluso superpuestas a la de linezolid, se mantenían sensibles a éste (Long et al, 2010). Solamente se demostró una resistencia cruzada parcial con tiamulina, una pleuromutilina utilizada en veterinaria. Los aislados seleccionados como resistentes a tiamulina, en los que esta resistencia se asociaba a mutaciones en la proteína L3, era sensibles a linezolid; sin embargo, los aislados seleccionados como resistentes a linezolid, asociados a mutaciones en el rRNA 23S, lo eran también a tiamulina (Miller et al, 2008).

Algo similar ocurría en relación con cloranfenicol. Los aislados seleccionados resistentes a cloranfenicol eran sensibles a linezolid, mientras los aislados resistentes a linezolid, en especial aquellos asociados a mutaciones en las posiciones G2447, A2503, T2504, G2505 y G2576 del rRNA 23S, eran resistentes a cloranfenicol (Long et al, 2010).

Además de las mutaciones en el gen *rrn*, se han descrito alteraciones en las proteínas L3 y L4 asociadas a resistencia a linezolid. De hecho, estudios previos habían ya descrito la asociación entre mutaciones en la proteína L3 y resistencia a pleuromutilinas (Bosling et al., 2003; Miller et al., 2008; Gentry et al., 2007; Kosowska-Shick et al., 2006; Pringle et al., 2004) pero, como se menciona más arriba, eran mutaciones que no mostraban resistencia cruzada con linezolid. Algunos estudios de selección de mutantes han hallado mutaciones en L3 y L4 asociadas a resistencia a linezolid (Locke et al 2009a, 2009b), pero en la mayoría de los casos no ha sido posible establecer una relación causa efecto de manera irrefutable. En la mayor parte de los casos se trata de mutaciones

entre los aminoácidos 127 y 174 de la proteína L3, o entre los aminoácidos 65 y 72 de la L4 (Wolter et al., 2005; Kosowska-Shick et al., 2010; Locke et al., 2010; Mendes et al., 2010a, 2010b, 2012, 2013; Endimiani et al., 2011; Beckert et al., 2012; LaMarre et al., 2013; Pournaras et al., 2013; Cui et al., 2013; de Almeida et al., 2013; Baos et al., 2013) y con frecuencia aparecen asociadas a cambios en el rRNA 23S o a la presencia del gen *cfr*, lo que dificulta averiguar su trascendencia real.

Este tipo de alteraciones se han observado fundamental en estafilococos no productores de coagulasa, mientras que sólo se han observado de manera excepcional en *S. aureus* y en enterococos. Algunos autores incluso afirman que, cuando estos cambios en L3 y L4 están presentes simultáneamente con mutaciones en el rRNA 23S, reducirían el coste de *fitness* de aquellas (Billal et al., 2011). Según este autor, una mutación en Y137 en L3 en *Streptococcus pneumoniae* (equivalente a la posición F147 en *S. epidermidis*), restauraría el coste en *fitness* de la mutación G2576 en *rrn*. Otros autores han sugerido que las mutaciones en L3 actuarían de forma sinérgica con las mutaciones en *rrn*, de modo que, para alcanzar niveles similares de incremento en la CIM de linezolid, se requeriría la mutación de menos alelos de *rrn* (Mendes et al., 2012). Ha de tenerse en cuenta que se han descrito mutaciones en L3 y en L4 en aislados sensibles a linezolid (Wong et al., 2010), lo que contribuye a cuestionar el papel, al menos a nivel individual, de estas mutaciones en la resistencia a linezolid.

Aunque la transferencia horizontal de mutaciones en el rRNA 23S o en las proteínas L3 y L4 es posible desde el punto de vista teórico, hasta el momento no se han descrito.

Estos supuestos respecto a la resistencia a linezolid (baja frecuencia, asociación casi exclusiva a mutaciones en el rRNA 23S, ausencia de resistencia cruzada con resistencias seleccionadas por otros antimicrobianos de los que actúan sobre la síntesis proteica bacteriana) se mantuvieron inamovibles hasta que Schwarz et al (2000), descubren que el gen *cfr*, hasta entonces descrito fundamentalmente en estafilococos de origen animal, asociado a resistencia a amfenicoles y susceptible de transmisión plasmídica, era capaz de causar también resistencia a linezolid.

Crf es una metil transferasa muy similar a RlmN, y probablemente derivada de ella. RlmN es una metil transferasa perteneciente a la superfamilia de enzimas S-adenosil-L-metionina (Yan et al, 2010), que monometila el carbono 2 de la adenina en la posición 2503 del rRNA 23S, mientras Cfr cataliza la metilación del carbono 8 de esa misma adenina (A2503) (Toh et al., 2008; Atkinson et al., 2013). Esta metilación de lugar al fenotipo de resistencia conocido como PhLOPS<sub>A</sub>, y que afecta a la actividad antimicrobiana de amfenicoles, lincosamidas, oxazolidinonas, pleuromutilinas y estreptograminas A (Long et al., 2006). La repercusión de la resistencia a la mayoría de estos grupos en infecciones estafilocócicas es relativamente reducida, ya que los amfenicoles se retiraron casi completamente del uso clínico hace ya años, por su potencial toxicidad medular, las pleuromutilinas (retapamulina, tiamulina, valnemulina)

son antimicrobianos de uso veterinario, y tanto las lincosamidas (clindamicina, lincomicina) como las estreptograminas, aunque son activos frente a Gram positivos, no son antimicrobianos de primera línea en el tratamiento de infecciones estafilocócicas.

La potencial trascendencia de este fenotipo de resistencia deriva por tanto, fundamentalmente, de su repercusión en la actividad de linezolid.

El gen *cfr* fue descrito inicialmente en 2000, integrado en un plásmido transferible de 16,5 kb (pSCFS1) hallado en un aislamiento porcino de *S. sciuri* (Schwarz et al., 2000; Kehrenberg et al., 2004), y fue hallado posteriormente en diversos estudios, sobre todo asociado con resistencia a amfenicoles en aislados de origen animal. El plásmido pSCFS1 codifica además una eritromicina metilasa, a través de un gen *erm*, que condiciona resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas del grupo B (fenotipo MLS<sub>B</sub>), y es portador de un gen *IsaB*, que codifica resistencia a lincosamidas (Kehrenberg et al., 2004).

*cfr* fue descrito por primera en *S. aureus* de origen humano en Colombia, en 2005 (Toh et al., 2007). A partir de ahí, numerosos autores han descrito la presencia de *cfr* en aislamientos de diferentes especies de estafilococos de origen humano. (Mendes et al., 2008, 2010a, 2010b; Cui et al., 2013; Chen et al., 2013; Fessler et al., 2013; Gopegui et al., 2012; Quiles-Melero et al., 2013; Shore et al., 2010).

El mecanismo de resistencia condicionado por el gen *cfr* tiene un potencial epidémico mayor, al encontrarse integrado en un plásmido, y se trata

de un mecanismo enzimático, capaz de condicionar resistencia de forma autónoma y con un alto nivel de repercusión sobre las CIMs del antimicrobiano.

*cfr* ha sido descrito casi sistemáticamente asociado a elementos móviles en numerosos microorganismos, tanto Gram positivos como Gram negativos (*E. faecalis* (Diaz et al., 2012; Liu et al., 2012); *Micrococcus caseolyticus* y *Jeotgalicoccus pinnipedialis* (Wang et al., 2012a); *Bacillus* spp. (Zhang et al., 2011; Wang et al., 2012b; Dai et al., 2010); *Streptococcus suis* (Wang et al., 2013); *E. coli* (Zhang et al., 2014); *Proteus vulgaris* (Wang et al., 2011), en la mayor parte de los casos de origen animal. Datos recientes sugieren que microorganismos del orden *Bacillales* serían el reservorio natural de los genes *cfr* (Hansen et al., 2012).

Los genes *cfr* descritos en estafilococos están en casi todos los casos asociados a plásmidos sensiblemente mayores que pSCFS1 (entre 36 y 45 kb), y dentro de ellos a un transposón Tn558 que incluye un gen de resistencia a amfenicoles *fexA*. Sobre él se enclavan, en diferentes posiciones, fragmentos de un elemento IS21-558, que se ha mostrado decisivo a la hora de movilizar al elemento *cfr*. Así, en el plásmido pSCFS3 (Kehrenberg et al., 2007) un fragmento integrado por un elemento IS21-558 y el gen *cfr*, se encuentra enclavado dentro de un elemento Tn558, produciendo una delección en los fragmento TnpA y TnpB. Una estructura virtualmente idéntica se ha descrito en MRSA en Nueva York (Locke et al., 2014) y en *S. aureus* y *S. epidermidis* en hospitales de Ohio (Mendes et al., 2013). No obstante, en este mismo estudio se describe una estructura, también en *S. aureus*, idéntica a una estructura portadora de *cfr* e integrada en el cromosoma, que se había descrito previamente en *P. vulgaris* (Wang et al.,

2011), lo que indica la ubicuidad y la posibilidad de salto entre especies de estas estructuras, lo que, indudablemente, plantea un problema importante desde el punto de vista epidemiológico. En *E. coli* se ha descrito un fragmento idéntico al que aloja al gen *cfr* en el primer plásmido descrito en *S. sciuri* (pSCFS1) flanqueado por dos secuencias de inserción IS26 (Zhang et al., 2014), lo que reafirma el potencial de transmisión entre especies de estos elementos móviles. Una estructura similar a la hallada en pSCFS3, aunque enclavada en otro *locus*, ha sido descrita en el plásmido pJP1, descrito en *M. caseolyticus* y *J. pinnipedialis* de origen animal (Wang et al., 2012a).

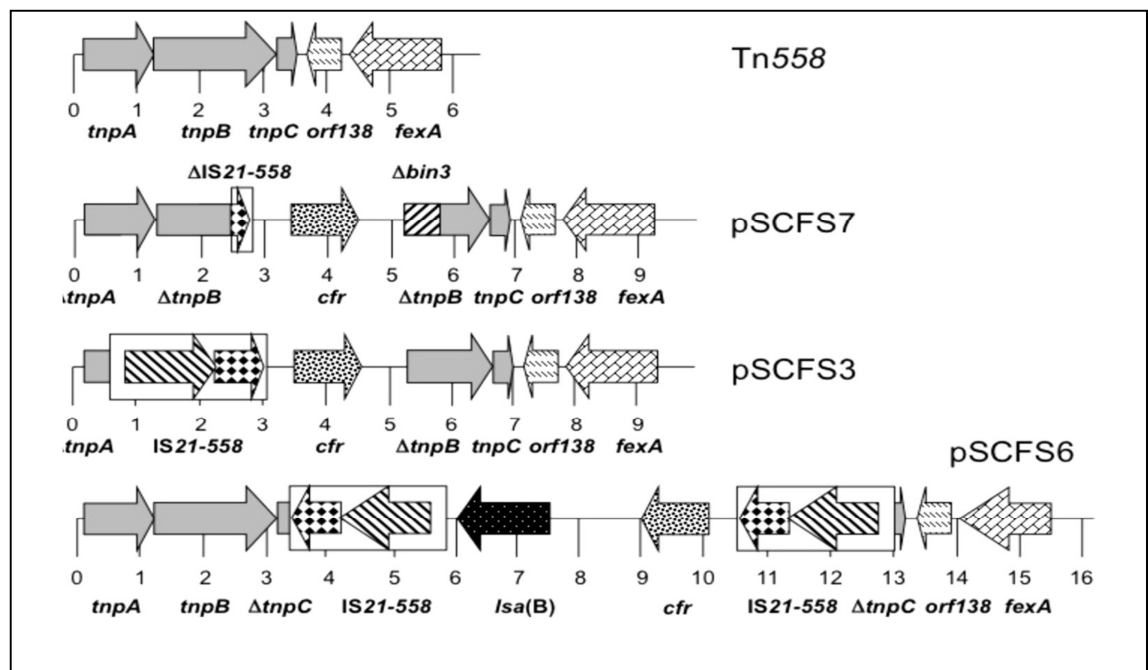
Recientemente se ha descrito un entorno idéntico al de pSCFS3 en el clon pandémico ST22-MRSA-IV (Shore et al., 2016).

El plásmido pSCFS6 (Kehrenberg et al., 2007), se corresponde también con un transposón Tn558, portador del gen *fexA*, sobre el que se ha enclavado, sobre el fragmento *tnpC*, una estructura formada por dos IS 21-558 flanqueando un gen *IsaB*, que condiciona resistencia de bajo nivel a lincosamidas, y un *cfr*. Una estructura similar, aunque con reordenación de los fragmentos, se ha descrito tanto en *S. aureus* (Shore et al., 2016) como en *S. epidermidis* (Bender J et al., 2015).

El elemento pSCFS7 fue descrito por Shore et al. (Shore et al., 2010) en Irlanda, y como los anteriores consiste en un transposón Tn558, en el que se enclava, generando una delección en *tnpB*, un mosaico formado por un pequeño fragmento de IS 21-558, *cfr* y una región que presenta homología con un fragmento del gen *bin3* de *Bacillus mycoides*, que codifica una DNA invertasa.

Posteriormente no se ha descrito en otras publicaciones, más que en la realizada por nosotros con el grupo de Schwarz en 2013 (Fessler et al, 2013). Tanto el fragmento como el tamaño del plásmido son virtualmente idénticos a los descritos por Shore, por lo que probablemente se trate del mismo elemento. Al igual que en nuestro caso, la cepa descrita en Irlanda pertenece al tipo SCCmec IV, pero en el caso irlandés se trata de una cepa productora de leucocidina de Pantón Valentine, mientras que nuestros aislados son negativos en todos los casos.

En 2010 se describió la presencia del gen *cfr* en el género *Bacillus*, en una cepa obtenida de heces porcinas en China (Dai et al., 2010). El gen *cfr* se detectó en un nuevo plásmido de 16.5 kb (pBS-01) que incluía asimismo un gen *ermB* que confiere el fenotipo de resistencia MLS<sub>B</sub>.



**Figura 6:** Estructura genéticas en las que se ha descrito asociado más frecuentemente el gen *cfr*



Un estudio reciente muestra cómo elementos pSCFS7-*like* como el descrito en este estudio son susceptibles de transmisión horizontal con alta eficacia, desde MRSA, tanto a *S. epidermidis* como a enterococos (Cafini et al., 2016).

La resistencia a linezolid asociada al gen *cfr* presenta características preocupantes por varios motivos:

- la presencia de *cfr* ya no sólo en diferentes especies de estafilococos, sino también en otros Gram positivos, sugiere una considerable movilidad y capacidad para difundir a diferentes géneros y especies, probablemente por su inclusión en elementos genéticos con una alta capacidad de recombinación. La posibilidad de diseminación entre especies, incluyendo su aparición en especies Gram negativas filogenéticamente distantes de sus reservorios habituales (Mendes et al., 2010b, 2013; Wang et al., 2012a; Cafini et al., 2016), plantea por tanto un potencial epidémico a considerar.
- la posible emergencia de brotes epidémicos de microorganismos portadores de *cfr*, descritos hasta el momento en *S. aureus* y *S. epidermidis* (Bonilla et al., 2010; Cai et al., 2012; Morales et al., 2010).
- También es un hecho preocupante que el propio gen *cfr* condicione resistencia no sólo a linezolid, sino también a amfenicoles, lincosamidas, estreptograminas y pleuromutilinas, antimicrobianos que, aunque prácticamente retirados algunos del uso humano, se siguen utilizando en veterinaria. De este modo, el uso de estos antimicrobianos puede

seleccionar indirectamente resistencia a linezolid que posteriormente pase a aislados humanos.

- Por otra parte, con frecuencia este gen va asociado en el mismo elemento genético a genes que codifican resistencia a otros antimicrobianos activos frente a Gram positivos (macrólidos, lincosamidas, estreptograminas), de modo que el uso de antimicrobianos pertenecientes a cualquiera de estos grupos podría seleccionar indirectamente resistencia a linezolid. Esto puede tener importancia en el caso de algún grupo de antimicrobianos utilizado muy frecuentemente en medicina, sobre todo en el ámbito extrahospitalario, como es el caso de los macrólidos.
- Otro indicio de la capacidad de difusión de estos elementos genéticos es el hecho de que se hayan descrito asociados a diferentes cassette *SCCmec* de SARM.

En España surgió la alarma ante el primer brote de *S. aureus* resistentes a linezolid, ocurrido en 2008 en el Hospital Clínico de San Carlos, en Madrid (Bonilla et al., 2010). El brote afectó a 15 pacientes a lo largo de tres meses, la mayor parte de ellos ingresados en UCI. Todos los aislados correspondían a un mismo clon, mostraban CIMs de linezolid de 16-32 mg/L y eran portadores del gen *cfr*, aunque en este estudio no se investigó el entorno genético del mismo. Ninguno de los aislados eran portadores de mutaciones en el dominio V del rRNA 23S, incluyendo la más frecuente G2576T.

Un estudio posterior en el mismo centro (Baos et al., 2013) monitorizó la presencia de organismos portadores de *cfr* entre 2008 y 2011. No se volvieron a hallar aislados de *S. aureus* portadores de *cfr*, pero la cifra de *S. epidermidis* resistentes a linezolid, un 58% de los cuales eran *cfr+*, se mantuvo en torno al 20-25% pese a las medidas de control de la infección adoptadas. Ello confirma de nuevo el papel de los estafilococos no productores de coagulasa como reservorio de resistencias, a partir de los cuales pueden extenderse a otros patógenos, fundamentalmente *S. aureus* y enterococos.

Los datos disponibles de los programas LEADER y ZAAPS muestran que, aunque la prevalencia de la resistencia a linezolid se mantiene aproximadamente estable, se han convertido en endémico en algunos centros de Estados Unidos (Mendes et al., 2008) y de varios países europeos y americanos (Flamm et al., 2013b; Mendes et al., 2010a, 2010b). En España los datos obtenidos en los últimos años son heterogéneos. En un estudio sobre 5 años en un gran hospital de Madrid (Quiles Melero et al., 2013), se observó que el 2,5% de los aislados de estafilococos eran resistentes a linezolid. El 80% de ellos eran *S. epidermidis* y *S. haemolyticus*, y sólo un 2,8% eran *S. aureus*. La prevalencia en UCI fue mucho mayor, del 18%. Menos del 10% eran *S. aureus*, pero todos ellos eran portadores de *cfr*. En cambio, entre los estafilococos no productores de coagulasa, que supusieron el 91,9% de los estafilococos aislados de UCI y resistentes a linezolid, sólo el 10% (todos ellos *S. epidermidis*) eran portadores de *cfr*. Del resto, la práctica totalidad eran resistentes por ser portadores de la mutación G2576T en el gen *rrn*.

En un estudio en Barcelona publicado también en 2013 (Sierra et al., 2013) sobre 2215 MRSA causantes de bacteriemia aislados entre 1999 y 2010, se encontró un solo aislado *cfr* + (0,05%).

Posteriormente se describió la adquisición del gen *optrA*, descubierto en 2015 en China, y que codifica una bomba de expulsión del tipo *ATP-binding cassette transporter* que, como *cfr*, confiere resistencia tanto a oxazolidinonas (linezolid y tedizolid) como a fenicoles (Wang et al., 2015). *optrA* se describió inicialmente en enterococos, mostrándose más frecuente en *E. faecalis* que en *E. faecium*, y más frecuente en aislados de origen animal que en aislados humanos (4,2% frente a 0,6%). Sin embargo, ya en este estudio se demostró que el gen *optrA* era funcional en estafilococos si se transmitía por conjugación. Un segundo estudio llevado a cabo en China en aislados del periodo 2010-2014 (Cai et al., 2015) muestra una prevalencia en aislados de enterococos de origen humano del 2,9%, pero con el dato preocupante de que no se trata de aislados con un alto grado de clonalidad, sino que están distribuidos en 25 pulsotipos y en 20 tipos MLST, lo que sugiere una alta dispersión del gen en las poblaciones de enterococos. Un segundo estudio publicado en China en 2016 sobre aislados de 2004-2014 (Cui et al., 2016), muestra una clara tendencia al alza en su prevalencia, que pasa del 0,4% en 2004 al 3,9% en 2014.

El estudio del entorno genético de *optrA* muestra un entorno muy variable, pudiendo estar vehiculado por diferentes tipos de plásmidos, y también situado en diferentes localizaciones dentro del cromosoma bacteriano (He et al., 2016).

En Europa se ha descrito de manera infrecuente (Brenciani et al., 2016; Cavaco et al., 2017), y siempre en enterococos. Sin embargo, en 2016 se describe, también en China, un aislado de *S. sciuri* portador de *optrA* y de *cfr* (Li et al., 2016), que confería resistencia a oxazolidinonas y fenicoles. El aislado era portador de un plásmido de 60563 bp (pWo28-3), que incluía los genes de resistencia *optrA*, *cfr*, *fexA*, *aadD* y *aacA-aphD*. El plásmido presentaba tres regiones (A, B and C). La region A albergaba todos los genes de resistencia excepto *optrA*, y mostraba una homología prácticamente total con los plásmidos ya mencionados pJP1 and pJP1-like de *J. pinnipedialis* y *S. lentus*. *optrA* se localizaba en la región B, con un entorno genético idéntico al del plásmido pE349 descrito en enterococos.

Un estudio posterior llevado a cabo también en China, sobre aislados porcinos de SARM y de enterococos no productores de coagulasa (Fan et al., 2016) no encuentra el gen *optrA* en SARM, pero encuentra una prevalencia del 6,9% en estafilococos no productores de coagulasa, siempre en aislados de *S. sciuri*. En la mayoría de los aislados se encontraba en el cromosoma, pero en cuatro aislados se encontraba en un plásmido de características virtualmente idénticas al plásmido pWo28-3 mencionado más arriba.

El estudio de nuestros aislados de *S. aureus* mediante *microarrays* permitió, en primer lugar, su clasificación de acuerdo con los criterios epidemiológicos utilizados en *S. aureus* y SARM. De acuerdo con los datos obtenidos, se trata de cepas perteneciente al complejo clonal 5 (CC5) y portadora de un cassette *SCCmec* de tipo IV, uno de los habituales entre las

cepas de SARM adquiridas en la comunidad en el momento actual. Se trata de un clon conocido como clon pediátrico, o USA800, y en el que no se había descrito previamente la presencia de estos mecanismos de resistencia. El aislamiento descrito por Shore et al. en 2010 en Irlanda es portador asimismo de un cassette *SCCmec* tipo IV, pero pertenece al clon USA 300 en lugar de pertenecer al USA 800 como los descritos en este estudio. El complejo clonal 5 es un complejo ampliamente extendido tanto entre aislamientos nosocomiales como comunitarios, que habitualmente es portador del *cluster* de genes codificadores de enterotoxinas *egc*, que incluye los genes *seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo*, y *seu/y*, como de hecho ocurre en las cepas estudiadas.

Dentro de este complejo clonal se han descrito diferentes elementos *SCCmec*. Así, se han descritos cepas portadoras del *SCCmec* I, como la conocida como clon italiano o tipos españoles de PFGE E6/9/15/17/18. Esta cepa se ha descrito ampliamente en Centroeuropa, donde se comporta fundamentalmente como un clon hospitalario, aunque se ha descrito también esporádicamente en otras áreas (Israel, Malta, Australia, Paraguay). Otra cepa con las mismas características, la cepa Geraldine, es un clon aislado habitualmente como CA-SARM en Francia, mientras cepas similares, pero portadoras de un *SCCmec* I truncado son aisladas con frecuencia en Australia (Monecke et al., 2011).

Por su parte la cepa ST5-SARM-II, perteneciente asimismo al CC5, es una cepa pandémica. Se trata de un complejo clonal heterogéneo, que probablemente se haya generado a partir de la transferencia del *SCCmec* II a diferentes precursores MSSA-CC5 en diferentes momentos. Las cepas Mu3 y

Mu50, resistentes a glicopéptidos por hiperproducción de pared bacteriana, pertenecen a este grupo.

Se han descrito cepas CC5-SARM-III en zonas geográficas diversas, (África, Corea, Alemania), con origen tanto humano como animal, aunque fundamentalmente con éste último.

Se han descrito asimismo cepas pertenecientes al CC5, y asociadas al *SCCmec* V; al VI, que inicialmente plantearon bastante confusión con las asociadas al IV, y que son especialmente frecuentes en algunos países vecinos como Portugal; al VII, y a elementos *SCCmec* compuestos o múltiples (Monecke et al., 2011).

Por último, el grupo CC5-SARM-IV, al que pertenecen las cepas estudiadas, conocido coloquialmente como clon pediátrico, tal como se ha referido previamente, ha alcanzado características pandémicas y considerable relevancia clínica.

Al ser portadoras de un cassette *SCCmec* IV convencional, eran portadoras de los genes *mecA*, *d-mecR*, *ugpQ*, *dcs-Q9XB68*, *ccrA2* y *ccrB2* que lo integran. Además, como la casi totalidad de los aislamientos clínicos actuales de *S. aureus*, era portador del operón de la  $\beta$ -lactamasa estafilocócica (*blaZ*, *blaI*, *blaR*).

Al igual que ocurre con otro clon pandémico al que se ha hecho referencia previamente, el ST5-CC5-SARMII, los aislamientos pertenecientes a este grupo suelen ser portadores de diversos genes codificadores de enterotoxina, fundamental *sea-N315* y el cluster *sed/sej/ser*. No se trata de una

característica infrecuente, ya que en estudios previos, la mayoría de ellos realizados sobre aislamientos de origen alimentario, muestran que entre el 60 y el 70% de los aislamientos disponen de la dotación genética necesaria para producir algún tipo de enterotoxina.

Los genes que determinan la producción de estas enterotoxinas pueden tener codificación plasmídica (*sed, sej, ser*), fágica (*sea, see, sep*) o cromosómica (*seb, sec, seg, seh, sei, sek, sel, sem, sen, seo, seq, seu*) (Tsen et al., 1998)

En este caso, el alelo *sea-N315*, que codifica la enterotoxina A es, en efecto, positivo. Estudios previos muestran que los genes que codifican la enterotoxina A aparecen en torno al 25% de los aislamientos clínicos, repartiéndose los dos alelos (*sea-N315* y *sea-320E*) aproximadamente al 50%. (Dinges et al., 2000)

Sin embargo, carece del *cluster sed/sej/ser*, que codifica las enterotoxinas D, J y R, siendo en cambio portador del *cluster egc*, que incluye los genes *seg/sei/sem/sen/seo/seu*, que codifican las enterotoxinas G, I, M, N, O y U. Existen pocos estudios relativos a la prevalencia de genes productores de toxinas estafilocócicas en muestras clínicas. Los datos existentes en estudios relativos a muestras alimentarias muestran que, al menos en ese ámbito, este es un perfil relativamente infrecuente (1,1% del total), que se registra sobre todo en muestras de origen cárnico, y que es mucho menos frecuente que la presencia aislada de los genes *sep* (13%), *sec* (10,9%) o *sea* (8,6%). Sin embargo, en un estudio reciente en *S. aureus* causantes de mastitis en ganado bovino, encuentra



que los genes *sei*, *sen* y *seu* aparecen en un 44% de los aislados, *seo* en un 28% y *sem* y *sep* en un 16% (Wang et al., 2017).

En cepas clínicas se encuentran entre los genes de patogenicidad más frecuentes. Un estudio reciente sobre cepas aisladas de infecciones osteoarticulares detectó la presencia del *cluster egc* en un 52% de los aislamientos. (Lattar et al., 2012).

En cambio, genes codificadores de enterotoxinas que se encuentran con frecuencia en muestras clínicas en este estudio, como *sec*, *sel* (16,8%) y *seb* (8,4%), no aparecen en nuestros aislados.

Otros genes de virulencia, como los genes que codifican la toxina de síndrome de shock tóxico estafilocócico (*tst-1* y *tst-RF122*) y los que codifican los factores de inhibición de células epidérmicas A, B y C (*edinA*, *B* y *C*) son infrecuentes en este grupo y, en efecto, en las cepas estudiadas son también negativos. La presencia de *tst-1* se ha demostrado en torno al 10% de las cepas de origen alimentario (Cha et al., 2006) y en torno al 5% de las cepas de origen clínico. (Tsen et al., 1998)

Tampoco se detectaron genes asociados a la producción de leucocidina de Pantón Valentine (PVL), muy relacionada con la patogenicidad de las nuevas cepas de CA-SARM, sobre todo a nivel respiratorio, de piel y tejidos blandos, que sí se ha descrito ocasionalmente en aislamientos de este grupo en diferentes países europeos, África y Australia. Sí fueron, en cambio, positivos los genes codificadores de otras leucocidinas con dos componentes, como *lukD-lukE* y

*lukX-luk*, bastante más frecuente que la PVL en otros estudios, ya que están presentes en torno al 60% de las cepas. (Luedicke et al., 2010)

Otros factores de patogenicidad como el locus ACME, las toxinas exfoliativas o los factores de inhibición de la diferenciación celular fueron asimismo negativos.

Los genes asociados a la adherencia y formación de biopelículas, como los del grupo *ica* fueron asimismo positivos, como lo fueron otros factores de adherencia a elastina, fibronectina, etc.

Se trata de un grupo en que son infrecuentes la mayor parte de los determinantes de resistencia a antimicrobianos, a excepción de los asociados a la resistencia a meticilina. En el caso de las cepas estudiadas, además de los genes *cfr* y *fexA*, no se detectan otros genes codificadores de resistencia a beta-lactámicos, macrólidos, lincosamidas, estreptograminas, mupirocina, ácido fusídico o sulfamidas, glicopéptidos y compuestos derivados del amonio cuaternario. No se detectaron tampoco algunos de los genes más habituales como causantes de resistencia a tetraciclinas (*tetK*, *tetM*), pero en cambio sí se detectó, en las cepas perteneciente al tipo *agr* II la presencia de *tetE*, que codifica una bomba de expulsión que afecta a este grupo de antimicrobianos.

En relación con los amfenicoles, la cepa era portadora, como se ha mencionado, del los genes *cfr* y *fexA*, pero carecía de genes codificadores de cloranfenicol acetiltransferasas (*cat*). Dentro de los genes de resistencia a aminoglicósidos, se detectó la presencia de *aadD*, que codifica una aminoglicosidasa que hidroliza a neomicina y tobramicina, y que es uno de los genes de resistencia más frecuentes en este grupo (a excepción de *mecA*),

observándose su presencia en alrededor del 50% de las cepas. En un estudio reciente en aislados de origen animal, el gen de resistencia a minoglicósidos más frecuente fue *aacA-aphD*, que se detectó en el 55,3% de los aislados, seguido de *aadD*, que se detectó en el 40,4% (Argudin et al., 2015).

Los genes integrantes del locus *agr* (accessory gene regulator) están considerados los principales reguladores de la expresión de factores de virulencia ligada a la fase de crecimiento en *S. aureus*. (Otto M, 2001)

Estos genes se activan en el paso de la fase de crecimiento exponencial a la estacionaria. Se ha demostrado que son polimórficos (Dufour et al., 2002), de modo que *S. aureus* se puede dividir en 4 grupos en función de este polimorfismo del locus *agr*, que se ha demostrado que se asocian con el patrón de enfermedad. (Jarraud et al., 2002)

Así, se ha demostrado que los síndromes tóxicos generalizados y los cuadros exfoliativos se asocian preferentemente al *agr* IV, mientras que el *agr* II, al que pertenecen la mayor parte de las cepas aquí estudiadas, se asocian sobre todo a cuadros supurados y a endocarditis.

La cepa presenta genes codificadores tanto de hemolisina  $\alpha$  como  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ . En conjunto, la producción de estas hemolisinas es frecuente en cepas clínicas y de origen animal, aunque en algunas de ellas no se ha demostrado claramente su papel en la producción de enfermedad. La presencia de hemolisina  $\alpha$  no es sorprendente, ya que es casi sistemática en *S. aureus* (está presente en un 97% de las cepas). Su síntesis está controlada por el locus *agr*, por lo que se trata de una toxina que aparece fundamentalmente en la fase post-exponencial. Se ha

propuesto que funcionaría como un surfactante que disgrega la membrana celular, y experimentalmente se han demostrado de manera clara sus efectos citotóxicos. Sin embargo, no se ha podido asociarla a ningún cuadro concreto, y su papel en la patogenia de los diferentes cuadros estafilocócicos está por aclarar. (Dinges et al., 2000)

La hemolisina  $\alpha$  es asimismo producida por un porcentaje importante de las cepas, y es con diferencia la mejor conocida en cuanto a sus mecanismos de acción y control. Al igual que la hemolisina  $\delta$ , está también controlada por el locus *agr*. Hay no obstante que tener en cuenta que se ha descrito que algunas cepas contienen el gen *hla* pero no producen toxina  $\alpha$ . Esta circunstancia se observa sobre todo en cepas productoras de síndrome del shock tóxico, y se debe a mutaciones en el gen estructural que impiden la síntesis de una proteína estructuralmente correcta. (Dinges et al., 2000)

La **hemolisina  $\alpha$**  es producida principalmente por cepas de origen animal, aunque es frecuente también en cepas de origen humano. Su papel en la producción de enfermedad no está definitivamente aclarado.

Finalmente, la hemolisina  $\gamma$  es una toxina con dos componentes, similar a la leucodicina de Pantón Valentine (PVL), aunque producida sistemáticamente por todos los aislamientos, en lugar de por un 2-3% como la PVL. (Dinges et al., 2000)

En definitiva, se trata de uno de los primeros grupos de aislados de *S. aureus* con resistencia a linezolid derivada de la presencia del gen *cfz* en los que se estudia, en España, tanto el entorno genético del gen *cfz* como su dotación

genética en cuanto a factores de resistencia y de patogenicidad. El gen *cfr* se encuentra en un entorno genético *pSCFS7-like*, virtualmente igual al descrito por Shore et al. La aparición del mismo entorno tanto en SARM como en *S. epidermidis* y *S. haemolyticus* sugiere una notable eficacia para la transferencia entre especies distintas, lo que supone un peligro potencial notable para la utilidad clínica de este grupo de antimicrobianos a medio plazo. De confirmarse, serán necesarias medidas estrictas de control de la infección y de control y restricción del uso de antimicrobianos para limitar la difusión de este tipo de resistencia.



## **CONCLUSIONES**





1. Los 29 aislados estudiados (7 *S. aureus*, 8 *S. epidermidis* y 14 *S. haemolyticus*) resistentes a linezolid, son portadores del gen *cfr*.
2. Ninguno de los aislados estudiados es portador del gen *optrA*.
3. En todos los aislados, independientemente de la especie, el gen *cfr* está incluido en un elemento móvil, que es portador asimismo del gen *fexA*, causante de resistencia a amfenicoles.
4. El elemento móvil hallado en todos los aislados resistentes a linezolid era un elemento idéntico, o al menos extremadamente similar al elemento pCSFS7, descrito por Shore en 2010 en un SARM PVL+, portador de un SCCmec de tipo IV perteneciente al clon USA300.
5. Los aislados de SARM incluidos en este estudio eran asimismo portadores de un SCCmec de tipo IV, pero pertenecían al complejo clonal 5 y al clon USA800. Siete de los aislados pertenecían al tipo *agr* II, y uno al tipo *agr* I.
6. Todos los aislados eran portadores de muy pocos mecanismos de resistencia a antimicrobianos, más allá de la producción de penicilinas estafilocócica y de los citados genes *cfr* y *fexA*.

7. El estudio del plásmido completo en uno de los SARM y uno de los estafilococos no productores de coagulasa, indica que probablemente todos los aislados son portadores del mismo plásmido.
  
8. Todos los SARM eran portadores de un perfil de factores de patogenicidad muy similar, que incluye la presencia del *cluster egc* de producción de enterotoxinas, varias hemolisinas y proteasas, una cápsula tipo 5, diferentes factores de adhesión y MSCRAMMs y varias proteínas con características de superantígeno.
  
9. La presencia de *cfr* en un elemento pSCFS7, en un clon de SARM distinto al clon en que ha sido descrito previamente, y su presencia también en diferentes especies de estafilococos no productores de coagulasa, alojado dentro del mismo elemento móvil y muy probablemente dentro del mismo plásmido, sugiere una considerable facilidad de estos elementos para moverse no sólo entre diferentes clones de SARM, sino también entre diferentes especies de estafilococos. Ello le da unas posibilidades de difusión preocupantes, que hacen necesario controlar tanto la prevalencia de la resistencia a oxazolidinonas en estafilococos, como el uso correcto de esta familia de fármacos.

## **BIBLIOGRAFÍA**



Argudín MA, Vanderhaeghen W, Butaye P. Diversity of antimicrobial resistance and virulence genes in methicillin-resistant non-*Staphylococcus aureus* staphylococci from veal calves. *Res Vet Sci.* 2015; 99: 10-16.

Arias CA, Vallejo M, Reyes J, Panesso D, Moreno J, Castaneda E, Villegas MV, Murray BE, Quinn JP. Clinical and microbiological aspects of linezolid resistance mediated by the *cfr* gene encoding a 23S rRNA methyltransferase. *J. Clin. Microbiol.* 2008, 46,892-896.

Atkinson GC, Hansen LH, Tenson T, Rasmussen A, Kirpekar F, Vester B. Distinction between the Cfr methyltransferase conferring antibiotic resistance and the housekeeping RlmN methyltransferase. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57: 4019–4026.

Auckland C, Teare L, Cooke F, Kaufmann ME, Warner M, Jones G, Bamford K, Ayles H, Johnson AP. Linezolid-resistant enterococci: report of the first isolates in the United Kingdom. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50: 743–746.

Ballou CH, Biedenbach DJ, Rossi F, Jones RN. Multicenter assessment of the linezolid spectrum and activity using the disk diffusion and Etest methods: report of the Zyvox(R) Antimicrobial Potency Study in Latin America (LA-ZAPS). *Braz J Infect Dis* 2002a; 6: 100–109.

Ballou CH, Jones RN, Biedenbach DJ. A multicenter evaluation of linezolid antimicrobial activity in North America. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002b; 43: 75–83.

Baos E, Candel FJ, Merino P, Pena I, Picazo JJ. Characterization and monitoring of linezolid-resistant clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* in an intensive care unit 4 years after an outbreak of infection by *cfr*-mediated linezolid-resistant *Staphylococcus aureus*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; 76: 325–329.

Barber M. Methicillin-resistant staphylococci. *J. Clin. Pathol.* 1961; 14: 385-393.

Bayston R, Nuradeen B, Ashraf W, Freeman BJ. Antibiotics for the eradication of *Propionibacterium acnes* biofilms in surgical infection. *J Antimicrob Chemother.* 2007;60(6):1298–1301.

Bayston R, Ullas G, Ashraf W. The action of linezolid or vancomycin on biofilms in ventriculoperitoneal shunts in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012. [Epub ahead of print.].

Beckert P, Hillemann D, Kohl TA, Kalinowski J, Richter E, Niemann S, Feuerriegel S. *rpIC T460C* identified as a dominant mutation in linezolid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56: 2743–2745.

Belkum J, Verbrugh A. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin. Microbiol. Rev.* 1997;10: 505-520.

Bender J, Strommenger B, Steglich M, Zimmermann O, Fenner I, Lensing C, Dagwadordsch U, Kekulé AS, Werner G, Layer F. Linezolid resistance in clinical

isolates of *Staphylococcus epidermidis* from German hospitals and characterization of two *cfr*-carrying plasmids. J Antimicrob Chemother 2015; 70: 1630-1638.

Betriu C, Redondo M, Palau ML, et al. Comparative in vitro activities of linezolid, quinupristin-dalfopristin, moxifloxacin, and trovafloxacin against erythromycin-susceptible and -resistant streptococci. Antimicrob Agents Chemother. 2000;44(7):1838–1841.

Billal DS, Feng J, Leprohon P, Legare D, Ouellette M. Whole genome analysis of linezolid resistance in *Streptococcus pneumoniae* reveals resistance and compensatory mutations. BMC Genomics 2011; 12: 512.

Boak LM, Li J, Spelman D, du Cros P, Nation RL, Rayner CR. Successful treatment and cerebrospinal fluid penetration of oral linezolid in a patient with coagulase-negative *Staphylococcus ventriculitis*. Ann Pharmacother. 2006; 40(7-8): 1451-1455.

Bolmstrom A, Ballou CH, Qwarnstrom A, Biedenbach DJ, Jones RN. Multicentre assessment of linezolid antimicrobial activity and spectrum in Europe: report from the Zyvox antimicrobial potency study (ZAPS-Europe). Clin Microbiol Infect 2002; 8: 791–800.

Bonilla H, Huband MD, Seidel J, Schmidt H, Lescoe M, McCurdy SP, Lemmon MM, Brennan LA, Tait-Kamradt A, Puzniak L, Quinn JP. Multicity outbreak of linezolid-

resistant *Staphylococcus epidermidis* associated with clonal spread of a *cfr*-containing strain. Clin Infect Dis 2010; 51: 796–800.

Bosling J, Poulsen SM, Vester B, Long KS. Resistance to the peptidyl transferase inhibitor tiamulin caused by mutation of ribosomal protein L3. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 2892–2896.

Brenciani A, Morroni G, Vincenzi C, Manso E, Mingoia M, Giovanetti E, Varaldo PE. Detection in Italy of two clinical *Enterococcus faecium* isolates carrying both the oxazolidinone and phenicol resistance gene *optrA* and a silent multiresistance gene *cfr*. J Antimicrob Chemother 2016; 71: 1118-1119.

Bubeck J, Bae T, Otto M, Deleo F, Schneewind O. Poring over pores:  $\alpha$ -hemolysin and Panton-Valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus* pneumonia. Nature Med. 2007; 13:1405-1406.

Cafini F, Nguyen le TT, Higashide M, Román F, Prieto J, Morikawa K. Horizontal gene transmission of the *cfr* gene to MRSA and *Enterococcus*: role of *Staphylococcus epidermidis* as a reservoir and alternative pathway for the spread of linezolid resistance. J Antimicrob Chemother 2016; 71: 587-592.

Cai J, Wang Y, Schwarz S, Lv H, Li Y, Liao K, Yu S, Zhao K, Gu D, Wang X, Zhang R, Shen J. Enterococcal isolates carrying the novel oxazolidinone resistance gene *optrA* from hospitals in Zhejiang, Guangdong, and Henan, China, 2010-2014. Clin Microbiol Infect 2015; 21: 1095.e1-4.



Cai JC, Hu YY, Zhang R, Zhou HW, Chen GX. Linezolid-resistant clinical isolates of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci and *Enterococcus faecium* from China. J Med Microbiol 2012; 61: 1568–1573.

Campanile F, Mogelli G, Bongiorno D et al. Worrying trend of new multiple mechanisms of linezolid resistance in staphylococcal clones diffused in Italy. J Clin Microbiol. 2013; 51(4): 1256-1259.

Carmona PM, Romá E et al. Papel de Linezolid en terapéutica antimicrobiana. Enferm Infecc Microbiol Clin 2003; 21(1):3.

Cavaco LM, Korsgaard H, Kaas RS, Seyfarth AM, Leekitcharoenphon P, Hendriksen RS. First detection of linezolid resistance due to the *optrA* gene in enterococci isolated from food products in Denmark. J Glob Antimicrob Resist 2017; 9: 128-129.

Cha JO, Lee JK, Jung HY, Yoo JY, Park YK, Kim Bs, Lee YS. Molecular analysis of *Staphylococcus aureus* isolates associated with staphylococcal food poisoning in South Korea. J Appl Microbiol 2006; 101: 864–871.

Chen H, Wu W, Ni M, Liu Y, Zhang J, Xia F, He W, Wang Q, Wang Z, Cao B, Wang H. Linezolid-resistant clinical isolates of enterococci and *Staphylococcus cohnii* from a multicentre study in China: molecular epidemiology and resistance mechanisms. Int J Antimicrob Agents 2013; 42: 317–321.

Chopra I, Hodgson J, Metcalf B, Poste G. The search for antimicrobial agents effective against bacteria resistant to multiple antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997; 41:497-503.

Colca JR, McDonald WG, Waldon DJ, Thomasco LM, Gadwood RC, Lund ET, Cavey GS, Mathews WR, Adams LD, Cecil ET, Pearson JD, Bock JH, Mot JE, Shinabarger DL, Xiong L, Mankin AS. Cross-linking in the living cell locates the site of action of oxazolidinone antibiotics. *J Biol Chem* 2003; 278: 21972–21979.

Conte JE Jr, Golden JA, Kipps J, Zurlinden E. Intrapulmonary pharmacokinetics of linezolid. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46(5):1475-1480.

Cosgrove SE, Sakoulas G, Perencevich EN, et al. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *S. aureus* bacteremia: a meta-analysis. *Clin Infect Dis.* 2003; 36: 53-59.

Cui L, Wang Y, Li Y, He T, Schwarz S, Ding Y, Shen J, Lv Y. Cfr-mediated linezolid-resistance among methicillin-resistant coagulase-negative Staphylococci from infections of humans. *PLoS ONE* 2013; 8: e57096.

Cui L, Wang Y, Lv Y, Wang S, Song Y, Li Y, Liu J, Xue F, Yang W, Zhang J. Nationwide surveillance of novel oxazolidinone resistance gene *optrA* in *Enterococcus* isolates in China from 2004 to 2014. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; 60: 7490-7493.

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; 54: 3953–3955.

de Almeida LM, de Araujo MR, Sacramento AG, Pavez M, de Souza AG, Rodrigues F, Gales AC, Lincopan N, Sampaio JL, Mamizuka EM. Linezolid resistance in Brazilian *Staphylococcus hominis* strains is associated with L3 and 23S rRNA ribosomal mutations. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57: 4082–4083.

Deleo F, Diep B, Otto M. Host defense and pathogenesis in *Staphylococcus aureus* infections. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* 2009; 23: 17-34.

Diaz L, Kiratisin P, Mendes R, Panesso D, Singh KV, Arias CA. Transferable plasmid-mediated resistance to linezolid due to *cfr* in a human clinical isolate of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56: 3917–3922.

Diekema D. I.; Jones, R. N. Oxazolidinones: A review. *Drugs* 2000, 59, 7–16. Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, et al. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin Infect Dis.* 2001;32 (Suppl 2): S114-S132.

Diep BA, Stone GG, Basuino L, Graber CJ, Miller A, des Etages SA, Jones A, Palazzolo-Balance AM, Perdreau-Remington F, Sensabaugh GF, DeLeo FR, Chambers HF. The arginine catabolic mobile element and staphylococcal chromosomal cassette mec linkage: convergence of virulence and resistance in the USA 300 clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Infect. Dis. 2008; 197:1523-1530.

Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Revs 2000; 13: 16-34.

Draghi DC, Sheehan DJ, Hogan P, Sahm DF. In vitro activity of linezolid against key gram-positive organisms isolated in the united states: results of the LEADER 2004 surveillance program. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49(12):5024–5032.

Dufour P, Jarraud S, Vandenesch F, Greenland T, Novick R P, Bes M, Etienne J, Lina G. High genetic variability of the *agr* locus in *Staphylococcus* species. J Bacteriol 2002; 184: 1180–1186.

Endimiani A, Blackford M, Dasenbrook EC, Reed MD, Bajaksouszian S, Hujer AM, Rudin SD, Hujer KM, Perreten V, Rice LB, Jacobs MR, Konstan MW, Bonomo RA. Emergence of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* after prolonged treatment of cystic fibrosis patients in Cleveland, Ohio. Antimicrob Agents Chemother 2011; 55: 1684–1692.

Enright M, Day N, Davies C, Peacock S, Spratt B. Multilocus sequences typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 2000; 38: 1008-1015.

Fan R, Li D, Wang Y, He T, Feßler AT, Schwarz S, Wu C. Presence of the *optrA* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus sciuri* of porcine origin. Antimicrob Agents Chemother 2016; 60: 7200-7205.

Fessler AT, Calvo N, Gutierrez N, Munoz Bellido JL, Fajardo M, Garduño E, Monecke S, Ehricht R, Kadlec K, Schwarz S. Cfr-mediated linezolid resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus haemolyticus* associated with clinical infections in humans: two case reports. J Antimicrob Chemother 2013; 69: 268–270.

Fines M, Leclercq R. Activity of linezolid against Gram-positive cocci possessing genes conferring resistance to protein synthesis inhibitors. J Antimicrob Chemother 2000; 5: 797–802.

Flamm RK, Farrell DJ, Mendes RE, Ross JE, Sader HS, Jones RN. LEADER surveillance program results for 2010: an activity and spectrum analysis of linezolid using 6801 clinical isolates from the United States (61 medical centers). Diagn Microbiol Infect Dis 2012a; 74: 54–61.

Flamm RK, Farrell DJ, Mendes RE, Ross JE, Sader HS, Jones RN. ZAAPS program results for 2010: an activity and spectrum analysis of linezolid using clinical isolates from 75 medical centers in 24 countries. *J Chemother* 2012b; 24: 328–337.

Flamm RK, Mendes RE, Ross JE, Sader HS, Jones RN. An international activity and spectrum analysis of linezolid: ZAAPS program results for 2011. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013b; 76: 206–213.

Flamm RK, Mendes RE, Ross JE, Sader HS, Jones RN. Linezolid surveillance results for the United States: LEADER Surveillance Program 2011. *Antimicrob Agents Chemother* 2013a; 57: 1077–1081.

Ford C.; Hamel J.; Stapert D.; Moerman J.; Hutchinson D.; Barbachyn M.; Zurenko, G. Oxazolidinones: A new class of antimicrobials. *Infect. Med.* 1999, 16, 435–445.

Franceschi F, Kanyo Z, Sherer EC, Sutcliffe J. Macrolide resistance from the ribosome perspective. *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* 2004,4,177-191.

Gales AC, Sader HS, Andrade SS, Lutz L, Machado A, Barth AL. Emergence of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* during treatment of pulmonary infection in a patient with cystic fibrosis. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 27: 300–302.

Gentry DR, Rittenhouse SF, McCloskey L, Holmes DJ. Stepwise exposure of *Staphylococcus aureus* to pleuromutilins is associated with stepwise acquisition of mutations in *rplC* and minimally affects susceptibility to retapamulin. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 2048–2052.

Goering RV, Shawar RM, Scangarella NE, O’Hara FP, Amrine-Madsen H, West JM, Dalessandro M, Becker JA, Walsh SL, Miller LA, Horn SF, Thomas ES, Twynholm ME. Molecular epidemiology of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates from global clinical trials. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46: 2842-2847.

Gopegui ER, Juan C, Zamorano L, Perez JL, Oliver A. Transferable multidrug resistance plasmid carrying *cfp* associated with *tet(L)*, *ant(4<sub>-Ia</sub>)*, and *dfrK* genes from a clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST125 strain. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56: 2139–2142.

Gould IM, Bal AM. New antibiotic agents in the pipeline and how they can help overcome microbial resistance. *Virulence* 2013; 4: 185–191.

Hansen LH, Planellas MH, Long KS, Vester B. The order *Bacillales* hosts functional homologs of the worrisome *cfp* antibiotic resistance gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56: 3563–3567.

He T, Shen Y, Schwarz S, Cai J, Lv Y, Li J, Feßler AT, Zhang R, Wu C, Shen J, Wang Y. Genetic environment of the transferable oxazolidinone/phenicol resistance gene

*optrA* in *Enterococcus faecalis* isolates of human and animal origin. J Antimicrob Chemother 2016; 71: 1466-1473.

Holmberg A, Mörgelin M, Rasmussen M. Effectiveness of ciprofloxacin or linezolid in combination with rifampicin against *Enterococcus faecalis* in biofilms. J Antimicrob Chemother. 2012;67(2):433–439.

Ito T, Katayama Y, Asada K, Mori N, Tsutsumimoto K, Tiensasitorn C, Hiramatsu K. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents. Chemother. 2001; 45: 1323-1336.

Jarraud S, Mougel C, Thioulouse J, Lina G, Meugnier H, Forey F, Nesme X, Etienne J, Vandenesch F. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (alleles), and human disease. Infect Immun 2002; 70, 631–641.

Jevons M. Celbenin-resistant staphylococci. Br. Med. J. 1961; 1: 124-125.

Johnson AP, Tysall L, Stockdale MV, Woodford N, Kaufmann ME, Warner M, Livermore DM, Asboth F, Allerberger FJ. Emerging linezolid-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from two Austrian patients in the same intensive care unit. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2002; 21: 751–754.



Jones RN, Johnson DM, Erwin ME. In vitro antimicrobial activities and spectra of U-100592 and U-100766, two novel fluorinated oxazolidinones. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 720–726.

Kaneko J, Kimura T, Narita S, Tomita T, Kamio Y. Complete nucleotide sequence and molecular characterization of the temperate staphylococcal bacteriophage  $\Phi$ PVL carrying Panton-Valentine leukocidin genes. *Gene*.1998; 215: 57-67.

Kehrenberg C, Aarestrup FM, Schwarz S. IS21-558 insertion sequences are involved in the mobility of the multiresistance gene *cfr*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 483-487.

Kehrenberg C, Aarestrup FM, Schwarz S. IS21-558 Insertion Sequences Are Involved in the Mobility of the Multiresistance Gene *cfr*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007; 51, 2: 483-487.

Kehrenberg C, Cuny C, Strommenger B, Schwarz S, Witte W. Methicillin-resistant and-susceptible *Staphylococcus aureus* strains of clonal lineages ST398 and ST9 from swine carry the multidrug resistance gene *cfr*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009,53,779-781.

Kehrenberg C, Ojo KK, Schwarz S. Nucleotide sequence and organization of the multiresistance plasmid pSCFS1 from *Staphylococcus sciuri*. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54: 936–939.

Kennedy AD, Otto M, Braughton KR, Whitney AR, Chen L, Mathema B, Mediavilla, JR, Byrne KA, Parkins LD, Tenover FC, Kreiswirth BN, Musser JM, De Leo FR . Epidemic community-associated methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*: recent clonal expansion and diversification. Proc. Natl Acad. Sci. 2008; 105: 1327-1332.

Kirby W. Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant staphylococci. Science. 1944; 99: 452-453.

Klevens RM, Morrison MA, Nadle J, Petit S, Gershman K, Ray S, Harrison LH, Lynfield R, Dumyati G, Townes JM, Craig AS, Zell ER, Fosheim GE, McDougal LK, Carey RB, Fridkin SK. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. JAMA. 2007; 298: 1763-1771.

Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. Clin Microbiol Rev 1997; 10: 505–520.

Kosowska-Shick K, Clark C, Credito K, McGhee P, Dewasse B, Bogdanovich T, Appelbaum PC. Single- and multistep resistance selection studies on the activity of retapamulin compared to other agents against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50: 765–769.

Kosowska-Shick K, Julian KG, McGhee PL, Appelbaum PC, Whitener CJ. Molecular and epidemiologic characteristics of linezolid-resistant coagulase-negative

staphylococci at a tertiary care hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010; 68: 34–39.

Lalueza A, Chaves F, San Juan R, et al. Is high vancomycin minimum inhibitory concentration a good marker to predict the outcome of methicillin-resistant *S. aureus* bacteremia?. *J Infect Dis* 2010; 201:311-312.

LaMarre J, Mendes RE, Szal T, Schwarz S, Jones RN, Mankin AS. The genetic environment of the *cfr* gene and the presence of other mechanisms account for the very high linezolid resistance of the *Staphylococcus epidermidis* isolate 426-3147L. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57: 1173–1179.

Lattar SM, Tuchscher LP, Centrón D, Becker K, Predari SC, Buzzola FR, Robinson DA, Sordelli DO. Molecular fingerprinting of *Staphylococcus aureus* isolated from patients with osteomyelitis in Argentina and clonal distribution of the *cap5(8)* genes and of other selected virulence genes. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; 31: 2559-2666.

Leach KL, Swaney SM, Colca JR, McDonald WG, Blinn JR, Thomasco LM, Gadwood RC, Shinabarger D, Xiong L, Mankin AS. The site of action of oxazolidinone antibiotics in living bacteria and in human mitochondria. *Mol. Cell* 2007,26,393-402.

Leite B, Gomes F, Teixeira P, Souza C, Pizzolitto E, Oliveira R. In vitro activity of daptomycin, linezolid and rifampicin on *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Curr Microbiol.* 2011;63(3):313–317.

Li D, Wang Y, Schwarz S, Cai J, Fan R, Li J, Feßler AT, Zhang R, Wu C, Shen J. Co-location of the oxazolidinone resistance genes *optrA* and *cfr* on a multiresistance plasmid from *Staphylococcus sciuri*. *J Antimicrob Chemother* 2016; 71: 1474-1478.

Lin AH, Murray RW, Vidmar TJ, Marotti KR. The oxazolidinone eperezolid binds to the 50S ribosomal subunit and competes with binding of chloramphenicol and lincomycin. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 2127–2131.

Lina G, Durand G, Berchich C, Short B, Meugnier H, Vandenesch F, Etienne J, Enright MC. Staphylococcal chromosome cassette evolution in *Staphylococcus aureus* inferred from *ccr* gene complex sequence typing analysis. *Clin. Microbiol. Infect.* 2006; 12: 1175-1184.

Liu Y, Wang Y, Wu C, Shen Z, Schwarz S, Du XD, Dai L, Zhang W, Zhang Q, Shen J. First report of the multidrug resistance gene *cfr* in *Enterococcus faecalis* of animal origin. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56: 1650–1654.

Locke JB, Hilgers M, Shaw KJ. Mutations in ribosomal protein L3 are associated with oxazolidinone resistance in staphylococci of clinical origin. *Antimicrob Agents Chemother* 2009a; 53: 5275–5278.

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* 2009b; 53: 5265–5274.

Locke JB, Morales G, Hilgers MG, Rahawi CK, Jose Picazo S, Shaw J, Stein KJL. Elevated linezolid resistance in clinical *cfr*-positive *Staphylococcus aureus* isolates is associated with co-occurring mutations in ribosomal protein L3. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 5352–5355.

Locke JB, Zuill DE, Scharn CR, Deane J, Sahm DF, Goering RV, Jenkins SG, Shaw KJ. Identification and characterization of linezolid-resistant *cfr*-positive *Staphylococcus aureus* USA300 isolates from a New York City medical center. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58(12): 6949-6952.

Long KS, Munck C, Andersen TM, Schaub MA, Hobbie SN, Bottger 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; 54: 4705–4713.

Long KS, Poehlsgaard J, Kehrenberg C, Schwarz S, Vester B. The *cfr* rRNA methyltransferase confers resistance to phenicols, lincosamides, oxazolidinones, pleuromutilins, and streptogramin A antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 2500–2505.

Lovering AM, Zhang J, Bannister GC, et al. Penetration of linezolid into bone, fat, muscle and haematoma of patients undergoing routine hip replacement. *J Antimicrob Chemother.* 2002; 50:73-77.

Luedicke C, Slickers P, Ehricht R, Monecke S. Molecular fingerprinting of *Staphylococcus aureus* from bone and joint infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010; 29: 457-463.

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; 46: 3334–3336.

Meka VG, Gold HS. Antimicrobial resistance to linezolid. *Clin Infect Dis* 2004; 39; 1010–1015.

Mendes RE, Deshpande L, Rodriguez-Noriega E, Ross JE, Jones RN, Morfin-Otero R. First report of staphylococcal clinical isolates in Mexico with linezolid resistance caused by *cfr*: evidence of in vivo *cfr* mobilization. *J Clin Microbiol* 2010b; 48: 3041–3043.

Mendes RE, Deshpande LM, Bonilla HF, Schwarz S, Huband MD, Jones RN, Quinn JP. Dissemination of a pSCFS3-like *cfr*-carrying plasmid in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates recovered from hospitals in Ohio. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57: 2923–2928.

Mendes RE, Deshpande LM, Castanheira M, DiPersio J, Saubolle MA, Jones RN. First report of *cfr*-mediated resistance to linezolid in human staphylococcal clinical isolates recovered in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 2244–2246.

Mendes RE, Deshpande LM, Costello A, Farrell DJ. Molecular epidemiology of *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates from USA hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56: 4656–4661.

Mendes RE, Deshpande LM, Farrell DJ, Spanu T, Fadda G, Jones RN. Assessment of linezolid resistance mechanisms among *Staphylococcus epidermidis* causing bacteraemia in Rome, Italy. *J Antimicrob Chemother* 2010a; 65: 2329–2335.

Mendes RE, Flamm RK, Hogan PA, Ross JE, Jones RN. Summary of linezolid activity and resistance mechanisms detected during the 2012 LEADER surveillance program for the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2014a; 58: 1243–1247.

Mendes RE, Hogan PA, Streit JM, Jones RN, Flamm RK. Zyvox® Annual Appraisal of Potency and Spectrum (ZAAPS) Program: report of linezolid activity over nine years (2004–2012). *J Antimicrob Chemother* 2014b; 69: 1582-1588.

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; 52, 1737– 1742.

Monecke S, Coombs G, Shore AC, Coleman DC, Akpaka P, Borg M, Chow H, Ip M, Jatzwauk L, Jonas D, Kadlec K, Kearns A, Laurent F, O'Brien FG, Pearson J, Ruppelt A, Schwarz S, Scicluna E, Slickers P, Tan HL, Weber S, Ehricht R. A field guide to pandemic, epidemic and sporadic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS One*. 2011; 6: e17936.

Morales G, Picazo JJ, Baos E, Candel FJ, Arribi A, Pelaez B, Andrade R, de la Torre MA, Fereres J, Sanchez-Garcia M. Resistance to linezolid is mediated by the *cfr* gene in the first report of an outbreak of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 2011; 50: 821–825.

Mutnick AH, Biedenbach DJ, Turnidge JD, Jones RN. Spectrum and potency evaluation of a new oxazolidinone, linezolid: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1998–2000. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; 43: 65–73.

Mutnick AH, Enne V, Jones RN. Linezolid resistance since 2001: SENTRY

Muto CA, Jernigan JA, Ostrowsky BE, Richet HM, Jarvis WR, Boyce JM, Farr BM. SHEA guideline for preventing nosocomial transmission of multidrug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus*. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 2003; 24: 362-386.



Myrianthefs P, Markantonis SL, Vlachos K, et al. Serum and Cerebrospinal Fluid Concentrations of Linezolid in Neurosurgical Patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50(12):3971-3976.

Otto M. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* peptide pheromones produced by the accessory gene regulator agr system. *Peptides* 2001; 22: 1603–1608.

Paladino JA. Linezolid: una oxazolidinona antimicrobiana. *Am J Health-Syst Pharm* 2003; 2(3):151-160.

Pan ES, Diep BA, Carleton HA, Charlebois ED, Sensabaugh GF, Haller BL, Perdreau-Remington F. Increasing prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in California. *Clin. Infect. Dis.* 2003; 37: 1384-1388.

Peeters MJ, Sarria JC. Clinical characteristics of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Am J Med Sci* 2005; 330: 102–104.

Pournaras S, Ntokou E, Zarkotou O, Ranellou K, Themeli-Digalaki K, Stathopoulos C, Tsakris A. Linezolid dependence in *Staphylococcus epidermidis* bloodstream isolates. *Emerg Infect Dis* 2013; 19: 129–132.

Pringle M, Poehlsgaard J, Vester B, Long KS. Mutations in ribosomal protein L3 and 23S ribosomal RNA at the peptidyl transferase centre are associated with

reduced susceptibility to tiamulin in *Brachyspira* spp. isolates. *Mol Microbiol* 2004; 54: 1295–1306.

Quiles-Melero I, Gomez-Gil R, Romero-Gomez MP, Sanchez-Diaz AM, de Pablos M, Garcia-Rodriguez J, Gutierrez A, Mingorance J. Mechanisms of linezolid resistance among staphylococci in a tertiary hospital. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 998–1001.

Robinson Da, Kearns AM, Holmes A, Morrison D, Grundmann H, Edwards G, O'Brien FG, Tenover FC, McDougal LK, Monk AB, Enright MC. Re-emergence of early pandemic *Staphylococcus aureus* as a community-acquired methicillin-resistant clone. *Lancet*. 2005; 365:1256-1258.

Roundtree P, Beard M. Further observations on infections with phage type 80 staphylococci in Australia. *Med. J.Aust.* 1958; 2: 789-795.

Russo A, Campanile F, Falcone M et al. Linezolid-resistant staphylococcal bacteraemia: A multicentre case-case-control study in Italy. *Int J Antimicrob Ag.* 2015; 45(3):255-61.

Schwarz S, Werckenthin C, Kehrenberg C. Identification of a plasmid-borne chloramphenicol-florfenicol resistance gene in *Staphylococcus sciuri*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 2530–2533.

Shore A, Breman O, Ehricht R, Monecke S, Schwarz S, Slickers P, Coleman D. Identification and Characterization of the Multidrug Resistance Gene *cfr* in a

Panton-Valentine Leukocidin-Positive Sequence Type 8 Methicilin-Resistant *Staphylococcus aureus* Iva (USA300) Isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54; 12: 4978-4984.

Shore AC, Lazaris A, Kinnevey PM, Brennan OM, Brennan GI, O'Connell B, Feßler AT, Schwarz S, Coleman DC. First report of *cfr*-carrying plasmids in the pandemic sequence type 22 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* staphylococcal cassette chromosome mec type IV clone. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; 60: 3007-3015.

Siegman-Igra Y, Reich P, Orni-Wasserlauf R, et al. The role of vancomycin in the persistence or recurrence of *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *Scand J Infect Dis* 2005; 37: 572–578.

Sierra JM, Camoez M, Tubau F, Gasch O, Pujol M, Martin R, Domínguez MA. Low prevalence of Cfr-mediated linezolid resistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Spanish hospital: case report on linezolid resistance acquired during linezolid therapy. *PLoS One* 2013; 8: e59215.

Slatter, JG; Saler, DI; Feenstra, KL; Welshman, IR. Pharmacokinetics, metabolism, and excretion of linezolid following and oral dose of (14C) linezolid to healthy human subjects. *Drug Metab Dispos.* 2001; 29:1136-45.

Smith L, Mankin AS. Transcriptional and translational control of the *mlr* operon, which confers resistance to seven classes of protein synthesis inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008, 52, 1703-1712.

Soriano A, Marco F, Martínez JA, et al. Influence of vancomycin minimum inhibitory concentration on the treatment of methicillin-resistant *S. aureus* bacteremia. *Clin Infect Dis* 2008; 46:193-200.

Toh S. M.; Xiong L.; Arias C. A.; Villegas M. V.; Lolans K.; Quinn J.; Mankin, A. S. Acquisition of a natural resistance gene renders a clinical strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* resistant to the synthetic antibiotic linezolid. *Mol. Microbiol.* 2007, 64, 1506–1514.

Tsakris A, Pillai SK, Gold HS, Thauvin-Eliopoulos C, Venkataraman L, Wennersten C, Moellering Jr RC, Eliopoulos GM. Persistence of rRNA operon mutated copies and rapid reemergence of linezolid resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60: 649–651.

Tsen HY, Yu GK, Wang KC, Wang SJ, Chang MY, Lin LY. Comparison of the enterotoxigenic types, toxic shock syndrome toxin 1 (TSST-1) strains and antibiotic susceptibilities for enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from food and clinical samples. *Food Microbiol* 1998; 15: 33–41.

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; 358: 207–208. Tsona A, Metallidid S, Foroglou N, et al. Linezolid penetration into cerebrospinal fluid and brain tissue. *J Chemother.* 2010; 22(1): 17-19.

Udo E, Pearman J, Grubb W. Genetic analysis o community isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Western Australia. J. Hosp. Infect. 1993; 48: 97-108.

Vardaskas, K; Kioumis, L.: Falagas, M. Association of pharmacokinetic and pharmacodynamic Tsiodras S aspects of linezolid with infection outcome. Curr. Drug Metab. 2009,10, 2-12.

Wang D, Zhang L, Yong C, Shen M, Ali T, Shahid M, Han K, Zhou X, Han B. Relationships among superantigen toxin gene profiles, genotypes, and pathogenic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. J Dairy Sci 2017; 100: 4276-4286.

Wang R, Braughton KR, Kretschmer D, Bach TH, Queck SY, Li M, Kennedy AD, Dorward DW, Klebanoff SJ, Peschel A, DeLeo FR, Otto M. Identification of novel cytolytic peptides as Key virulence determinants for community-associated SARM. Nature Med. 2007; 13: 1510-1514.

Wang Y, Li D, Song L, Liu Y, He T, Liu H, Wu C, Schwarz S, Shen J. First report of the multiresistance gene *cfr* in *Streptococcus suis*. Antimicrob Agents Chemother 2013; 57: 4061–4063.

Wang Y, Lv Y, Cai J, Schwarz S, Cui L, Hu Z, Zhang R, Li J, Zhao Q, He T, Wang D, Wang Z, Shen Y, Li Y, Feßler AT, Wu C, Yu H, Deng X, Xia X, Shen J. A novel gene, *optrA*, that confers transferable resistance to oxazolidinones and phenicols and

its presence in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* of human and animal origin. J Antimicrob Chemother 2015; 70: 2182-2190.

Wang Y, Schwarz S, Shen Z, Zhang W, Qi J, Liu Y, He T, Shen J, Wu C. Co-location of the multiresistance gene *cfr* and the novel streptomycin resistance gene *aadY* on a small plasmid in a porcine *Bacillus* strain. J Antimicrob Chemother 2012b; 67: 1547–1549.

Wang Y, Wang Y, Schwarz S, Shen Z, Zhou N, Lin J, Wu C, Shen J. Detection of the staphylococcal multiresistance gene *cfr* in *Micrococcus caseolyticus* and *Jeotgalicoccus pinnipedialis*. J Antimicrob Chemother 2012a; 67: 1824– 1827.

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; 66: 2521–2526.

Wiederhold NP, Coyle EA, Raad II, Prince RA, Lewis RE. Antibacterial activity of linezolid and vancomycin in an in vitro pharmacodynamic model of Gram-positive catheter-related bacteraemia. J Antimicrob Chemother. 2005;55(5):792–795.

Wilcox MH, Kite P, Mills K, Sugden S. *In situ* measurement of linezolid and vancomycin concentrations in intravascular catheter-associated biofilm. J Antimicrob Chemother. 2001;47(2):171–175.

Wilson P, Andrews JA, Charlesworth R, Walesby R, Singer M, Farrell DJ, Robbins M. Linezolid resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother 2003; 51: 186–188.

Wise R, Andrews JM, Boswell FJ, Ashby JP. The in vitro activity of linezolid (U-100766) and tentative breakpoints. J Antimicrob Chemother 1998; 42: 721–728.

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; 49: 3554–3557.

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; 54: 742–748.

Xiong L, Kloss P, Douthwaite S et al. Oxazolidinone resistance mutations in 23 rRNA of *Escherichia coli* reveal the central region of domain V as the primary site of drug action. J Bacteriol 2000; 182: 5325–31.

Yan F, LaMarre JM, Rohrich R, Wiesner J, Jomaa H, Mankin AS, Fujimori DG. RlmN and Cfr are radical SAM enzymes involved in methylation of ribosomal RNA. J Am Chem Soc 2010; 132: 3953–3964.

Zhang WJ, Wu CM, Wang Y, Shen ZQ, Dai L, Han J, Foley SL, Shen JZ, Zhang Q. The new genetic environment of *cfr* on plasmid pBS-02 in a *Bacillus* strain. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66: 1174–1175.

Zhang WJ, Xu XR, Schwarz S, Wang XM, Dai L, Zheng HJ, Liu S. Characterization of the IncA/C plasmid pSCEC2 from *Escherichia coli* of swine origin that harbours the multiresistance gene *cfr*. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69: 385–389.

Zurenko GE, Yagi BH, Schaadt RD, Allison JW, Kilburn JO, Glickman SE, Hutchinson DK, Barbachyn MR, Brickner SJ. *In vitro* activities of U-100592 and U-100766, novel oxazolidinone antibacterial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 839–845.

Zyvox (linezolid) package insert. Rydaimere, New South Wales: Pharmacia Australia.2002.

Zyvox, 2010. Zyvox Package Insert. [http://www.pfizer.com/products/rx/rx\\_product\\_zyvox.jsp](http://www.pfizer.com/products/rx/rx_product_zyvox.jsp).



