

# Mecanismos de acción y de resistencia a los antimicrobianos en bacterias Gram-positivas

J.M. SIERRA Y J. VILA

---

## RESUMEN

---

Las infecciones producidas por bacterias Gram-positivas son cada vez más importantes, particularmente las ocasionadas por aquellos patógenos que presentan multirresistencia, como podría ser el caso de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y los enterococos resistentes a la vancomicina.

El conocimiento de las bases moleculares de los mecanismos de resistencia es útil. En primer lugar, para desarrollar nuevos fármacos que soslayen los mecanismos de resistencia presentes. En segundo lugar, para poder elegir nuevas combinaciones antibióticas, más eficaces para el tratamiento de las infecciones producidas por bacterias Gram-positivas multirresistentes.

Este trabajo pretende revisar cuáles son los mecanismos de acción y resistencia a diversos antimicrobianos usados para el tratamiento de infecciones por parte de bacterias Gram-positivas.

**Palabras clave:** Antibióticos. Mecanismos de acción. Mecanismos de resistencia. Bacterias Gram-positivas.

---

## ABSTRACT

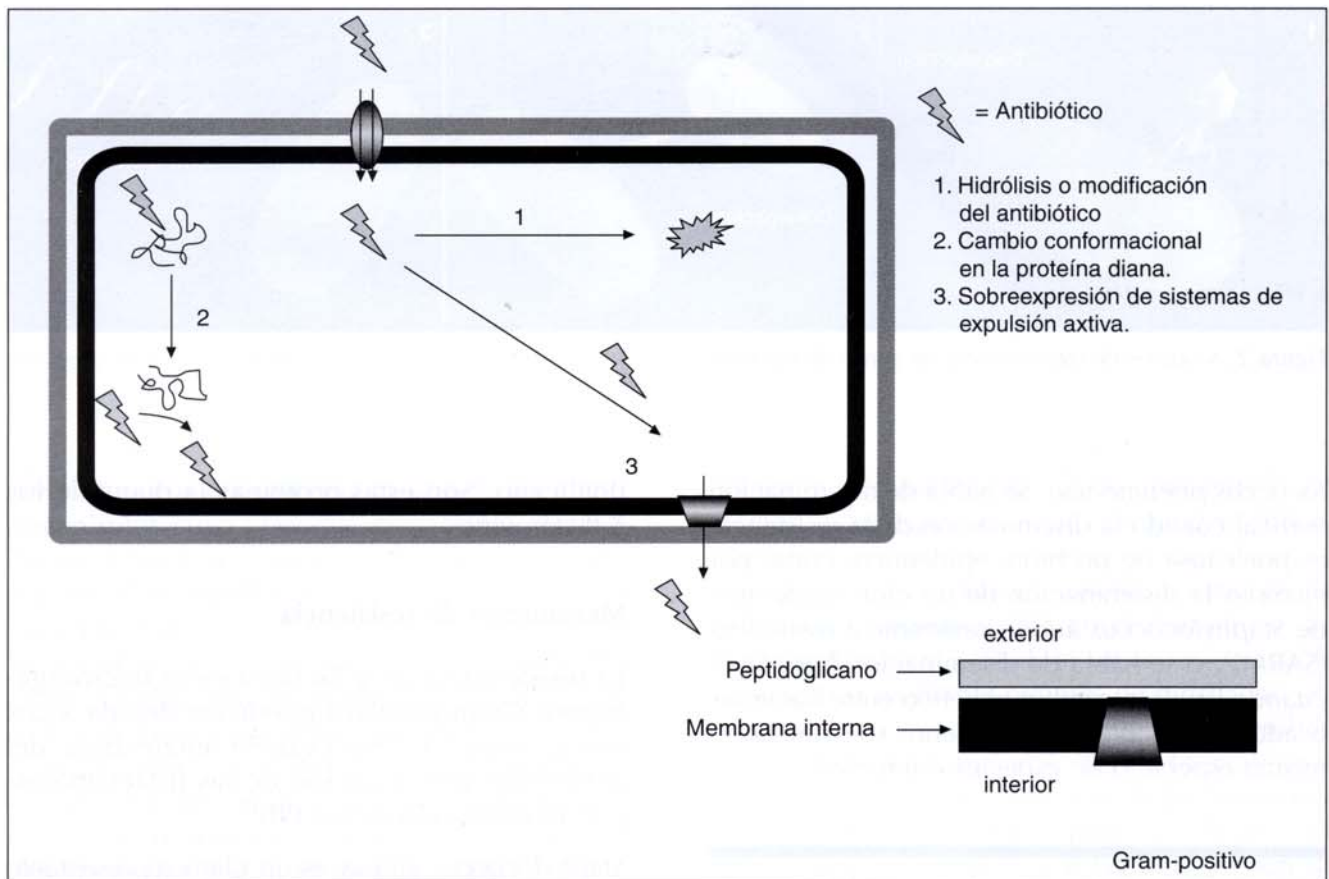
---

Gram-positive infections are important, particularly those caused by pathogens showing multiresistant phenotype, such as methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* and vancomycin-resistant enterococci.

The knowledge of the molecular bases of the mechanisms of resistance would be helpful in developing new antimicrobial agents which can circumvent the mechanisms of resistance and hence would be active in the presence of those mechanisms of resistance and on the other hand to choose new antibiotic combinations.

This work reviews the mode of action of the antimicrobial agents and the mechanism of resistance to several antimicrobial agents used to treat infections caused by Gram-positive bacteria.

**Key words:** Antibiotics. Mode of action. Mechanisms of resistance. Gram-positive bacteria.



**Figura 1.** Esquema de los mecanismos de resistencia los agentes antibacterianos en bacterias Gram-positivos.

## INTRODUCCIÓN

Desde la aparición de la penicilina hasta nuestros días se han descrito diversos agentes antimicrobianos, ya sean naturales o sintéticos, con diferentes mecanismos de acción, y con un espectro de acción más amplio. Por otro lado, la aparición de un nuevo fármaco antimicrobiano ha venido generalmente acompañada años más tarde de la aparición de microorganismos resistentes.

La aparición de resistencias está basada en diferentes estrategias en función del mecanismo de acción del agente antimicrobiano<sup>1</sup>. En la figura 1 se observan los principales mecanismos de resistencia a las bacterias Gram-positivas, que son: 1) la inactivación del agente antimicrobiano, ya sea mediante su hidrólisis o su modificación; 2) la reducción de la sensibilidad de la diana frente al antimicrobiano, mediante modificación de la diana del antibiótico, sin que ésta pierda su actividad funcional; y 3) finalmente, encontraríamos los sistemas de expulsión, capaces de sacar al fármaco del interior celular<sup>1</sup>.

Las resistencias generalmente aparecen por mutaciones y posterior selección en presencia de antibiótico o mediante la adquisición de elementos móviles transmisibles, tales como plásmidos, transposones, integrones, etc.

Hay diferentes mecanismos que explican la adquisición o el intercambio de material genético, tales como (Fig. 2): 1) la transducción, que consiste en la vehiculización de material genético inter o intraespecie mediada por bacteriófagos, y se produce generalmente en una especie particular a la cual el bacteriófago es capaz de infectar; 2) la conjugación es capaz de cruzar la barrera entre especies, pudiéndose dar entre bacterias Gram-negativas o Gram-positivas entre sí, e incluso entre Gram-positivas y Gram-negativas. Este mecanismo necesita de un contacto célula-célula, por lo que generalmente se da entre aquellas bacterias que ocupan un mismo nicho ecológico; 3) finalmente, la transformación, presente en aquellas bacterias que son capaces de adquirir ADN exógeno del ambiente que les rodea e integrarlo en su cromosoma<sup>1</sup>. El ejemplo más claro de una bacteria con este mecanismo de adquisición de resistencias es *Strep-*





Figura 2. Modelos de transferencia de genes de resistencia.

*Staphylococcus pneumoniae*. Se habla de diseminación vertical cuando la diseminación de la resistencia es por causa de un brote epidémico, como por ejemplo la diseminación de un clon epidémico de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM)<sup>1</sup>, o se habla de diseminación horizontal cuando hay intercambio genético entre bacterias o adquisición de ADN exógeno, ya sean de la misma especie o de especies diferentes<sup>1</sup>.

## β-LACTÁMICOS

### Mecanismo de acción

Los antibióticos β-lactámicos son agentes antimicrobianos que inhiben la síntesis de la pared bacteriana. Esta inhibición se produce en la última etapa de la síntesis del peptidoglicano. En las bacterias Gram-positivas la pared es muy gruesa y su componente principal es una matriz de peptidoglicano. Éste está constituido por cadenas largas de glúcidos, formadas por la repetición de moléculas de ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina. En las bacterias Gram-positivas el ácido murámico se une entre sí para formar una malla mediante un pentapéptido de glicina. Los β-lactámicos inhiben este proceso de transpeptidación; de este modo debilitan la pared y puede romperse por la presión osmótica intracelular<sup>2</sup>.

Para que los β-lactámicos sean eficaces la bacteria debe encontrarse en fase de multiplicación, es decir, sintetizando la pared bacteriana. Los componentes del peptidoglicano se sintetizan en el citoplasma y son transportados a través de la membrana citoplasmática al espacio periplasmático. A este nivel se encuentran las PBP (*Penicillin Binding Protein*), que en realidad son transpeptidasas y carboxipeptidasas encargadas de las últimas reacciones de la formación del pepti-

doglicano. Son estas proteínas la diana de los β-lactámicos<sup>2</sup>.

### Mecanismos de resistencia

La resistencia a los β-lactámicos en microorganismos Gram-positivos puede ser debida a dos mecanismos: 1) inactivación enzimática del antibiótico por la acción de las β-lactamasas; y 2) modificación de las PBP.

*Staphylococcus aureus* es un claro representante de microorganismos cuyo mecanismo de resistencia a los β-lactámicos está basado en la acción de enzimas que hidrolizan a estos antibióticos: las β-lactamasas (penicilinasas). Éstas difieren de las clásicas β-lactamasas descritas en bacterias Gram-negativas. Estas penicilinasas se clasifican en 4 grupos (A, B, C y D), son de origen plasmídico y afectan a todas las penicilinas naturales y semi-sintéticas, y con menor grado a la meticilina y las cefalosporinas<sup>3</sup>. Estas β-lactamasas pueden distinguirse entre sí mediante sus diferentes cinéticas de hidrólisis a los diferentes antibióticos<sup>3</sup>.

La modificación de las PBP como mecanismo de resistencia a los β-lactámicos es un mecanismo muy frecuente en bacterias Gram-positivas. Así pues, en *Staphylococcus aureus* encontramos la PBP 2A (también llamada PBP2'), que confiere resistencia a todos los β-lactámicos incluyendo cefalosporinas, carbapenemas y monobactamas<sup>4</sup>. Esto condujo a la aparición de los SARM<sup>5</sup>. Esta PBP 2A está codificada por el gen *mecA*, localizado en el cromosoma bacteriano de *Staphylococcus aureus* dentro de un elemento móvil conocido como SCCmec (cassette cromosómico estafilocócico *mec*). Este elemento también contiene genes *ccr* que codifican para recombinasas, las cuales son las responsables de la movilidad. Hasta el momento, se han descrito 5 SSC distintos<sup>6</sup>. La expresión de esta PBP puede ser inducible o constitutiva.



Tabla 1. Fenotipos y mecanismos de resistencia a  $\beta$ -lactámicos en *Streptococcus pneumoniae*

Antibiótico		Mecanismo de resistencia
Pen	CTX	
S	S	Ninguno
I	S	Alteraciones PBP 1a, 2x y 2b
R	R	Alteraciones PBP 1a, 2x y 2b
I/S	R	Alteraciones PBP 1a y 2x (Thr550 $\rightarrow$ Ala)

Pen: penicilina; CTX: cefotaxima; S: sensible; I: intermedio; R: resistente.

*Streptococcus pneumoniae* es uno de los microorganismos cuyo principal mecanismo de resistencia a los  $\beta$ -lactámicos es debido a la presencia de PBP modificadas. No se han descrito  $\beta$ -lactamasas en *Streptococcus pneumoniae*. Hasta el momento, se han descrito 5 PBP diferentes de alto peso molecular (1a, 1b, 2x, 2a, 2b) y una de bajo peso molecular (PBP 3). Las modificaciones en las PBP pueden ser debidas a la recombinación genética que da lugar a genes mosaico<sup>7</sup>, o debidas a mutaciones puntuales en los genes que codifican para las PBP.

Según el tipo de alteración, podemos encontrar diferentes fenotipos de resistencia, aunque los mayoritarios son dos (Tabla 1):

1. Alteraciones en las PBP 1a, 2x y 2b ocasionan un fenotipo intermedio o resistente a penicilina y sensible o resistente a cefotaxima. Estos fenotipos son los que se encuentran más frecuentemente en aislamientos clínicos.
2. Alteraciones en las PBP 1a y 2x conjuntamente con una mutación en la Thr550 de la PBP 2x producen un fenotipo sensible o intermedio a penicilina con resistencia elevada a cefotaxima. Sin embargo, este fenotipo se presenta de manera infrecuente.

Un tercer mecanismo de resistencia que aparece en bacterias Gram-positivas es el denominado de tolerancia a  $\beta$ -lactámicos. Este efecto parece generarse por alteraciones genéticas a nivel de la regulación de la actividad autolítica<sup>8</sup>.

## MACRÓLIDOS, LINCOSAMIDAS, CETÓLIDOS Y STREPTOGRAMINAS

### Mecanismo de acción

Estos agentes antimicrobianos, aunque químicamente distintos, están funcionalmente relacio-

nados y comparten el mismo mecanismo de acción, y su espectro antimicrobiano es prácticamente superponible, pero dependiendo de su afinidad por la diana, concretamente en la subunidad ribosomal 50S en el dominio V del ARN ribosómico 23S<sup>9</sup>. Esta unión es reversible y se realiza mediante puentes de hidrógeno entre diferentes radicales hidroxilo del macrólido y determinadas bases del ARN, especialmente A2058 y A2059. Por otro lado, la telitromicina, un cetólido, establece el mismo tipo de uniones pero con el dominio II, y estas uniones son de carácter más fuerte. La afinidad por el ribosoma de la telitromicina es 10 veces mayor que la de la eritromicina y seis veces superior a la de la claritromicina<sup>9</sup>.

Este grupo de agentes antimicrobianos bloquea el orificio de entrada al canal por donde sale la proteína sintetizada del ribosoma.

Los macrólidos desarrollan una actividad antibacteriana lenta y dependiente del tiempo. Su actividad se considera bacteriostática frente a la mayoría de los microorganismos. Sin embargo, en ciertas condiciones, como serían estar en medio alcalino y a concentraciones elevadas frente a *Streptococcus pneumoniae* o *Streptococcus pyogenes*, especialmente si se encuentran en fase de crecimiento logarítmico, pueden comportarse como antibióticos bactericidas<sup>9</sup>. Esto también es debido a que en condiciones de alcalinidad la forma no ionizada del macrólido difunde mejor a través de la membrana citoplasmática. Además, la adición de suero aumenta la actividad de este grupo de antimicrobianos (reduce la CMI)<sup>9</sup>.

### Mecanismos de resistencia

La resistencia a los macrólidos en neumococo ha ido aumentando durante los últimos años. En EE.UU., por ejemplo, se ha incrementado de un 10% en 1995 a un 20,4% en 1999<sup>10</sup>, y en Euro-



Tabla 2. Fenotipos y mecanismos de resistencia a macrólidos

Antibiótico						Mecanismo de resistencia
14M/15M	16M	L	K	SA	SB	
R	R	r o R	S	S	S	<i>ermB</i> inducible
R	R	R	R	S	R	<i>ermB</i> constitutivo
R	S	S	S	S	S	<i>mefA</i>

14M/15M, 16M: macrólidos de 14-15 o 16 átomos de Carbono; L: lincosamidas; K: estólidos; SA: estreptogramina A; SB: estreptogramina B; R: resistente; r: bajo nivel de resistencia; S: sensible.

pa la media está en un 17,2% de cepas resistentes, con un rango del 7,8% en Alemania al 32,2% en España<sup>11</sup>. La resistencia viene dada por dos mecanismos diferentes: por un lado, el mecanismo de metilación del ARNr 23S y, por otro, la síntesis de una bomba de expulsión activa.

1. Mecanismo de metilación: el responsable de este mecanismo de resistencia es una enzima metilasa codificada por el gen *erm*. Se han descrito un gran número de metilasas *erm* asignadas a diferentes clases en función de su identidad genética. Éstas, a su vez, han sido descritas en un gran número de microorganismos<sup>12</sup>. Se ha descrito que por medio de la conjugación se puede transferir el gen *ermA* de *Streptococcus pyogenes* a *Enterococcus faecalis*, *Listeria innocua* y a un *Streptococcus pyogenes* susceptible frente a macrólidos<sup>13</sup>.

Todas estas enzimas metilan el mismo residuo, dando lugar al fenotipo de resistencia conocido como MLS<sub>B</sub>, característico por generar resistencia cruzada a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas de tipo B<sup>8</sup>. El resultado de esta metilación son cambios conformacionales en el sitio P del RNAr y previene la unión del macrólido y el efecto inhibitorio del mismo. La presencia de este gen en *Streptococcus pneumoniae*, por ejemplo, genera niveles de resistencia de 128 µg/ml para la eritromicina. En cambio, los cetólidos, como por ejemplo la telitromicina, no parece verse afectado por este mecanismo de resistencia. Esto puede deberse a que los cetólidos se unen a los dominios II y IV del ARN ribosómico con mayor fuerza que los macrólidos, que sólo se unen al dominio II.

Algunas de estas enzimas son de tipo inducible, mecanismo de resistencia que se describió como predominante en la década de los 70, aunque es muy común encontrar resistencias

de tipo constitutivo en diferentes áreas geográficas<sup>12</sup>. Estos dos tipos pueden distinguirse por la estabilidad de las CMI de las cepas que presentan un fenotipo constitutivo, se hayan hecho crecer en presencia o no del inductor, un macrólido (Tabla 2).

2. Expulsión activa: estas bombas de flujo necesitan energía para ejercer su función. La presencia de una bomba de expulsión puede determinarse mediante la presencia de un desacoplador, como el CCCP (carbonil cianida m-clorofenilhidrazona) cuando se calcula la CMI. En una cepa donde no exista este mecanismo de resistencia, la CMI no varía debido a que el inhibidor de bombas de expulsión (CCCP) no ejerce su función, mientras que en una cepa que posea este mecanismo la CMI en presencia de CCCP se verá disminuida.

En 1990, Goldman puso de manifiesto la existencia de una bomba de expulsión, asociada a resistencia a macrólidos en *Staphylococcus epidermidis*<sup>14</sup>. También se ha descrito este mecanismo en *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus aureus*. Los genes que codifican para estas bombas son *mefA* y *msrA*, respectivamente. También está descrita una bomba de expulsión relacionada con la resistencia a lincomicina en *Corynebacterium glutamicum*, así como una bomba de expulsión en *Corynebacterium jeikeium*, codificada por el gen *ermX*, de tipo inducible. Este mecanismo de resistencia no genera un alto nivel de resistencia, suele elevar la CMI de 4 a 8 veces<sup>15</sup>, y en ocasiones suele presentarse concomitantemente junto con una metilasa. La sobreexpresión de estas bombas genera un fenotipo característico, el fenotipo M, aumentando la CMI de los macrólidos de 14 y 15 átomos de carbono sin afectar los macrólidos de 16 átomos de carbono, ni las lincosamidas ni las estreptograminas<sup>8</sup>.



## GLICOPÉPTIDOS

### Mecanismo de acción

Al igual que los  $\beta$ -lactámicos, este grupo de antibióticos actúa sobre la pared bacteriana, inhibiendo su formación, aunque su mecanismo es ligeramente distinto, mientras que los  $\beta$ -lactámicos actúan inhibiendo la tercera fase de la síntesis del peptidoglicano. Los glicopéptidos lo hacen en la segunda fase de síntesis. Esto explicaría la ausencia de resistencias cruzadas entre estos dos grupos de antimicrobianos. Además, los glicopéptidos también alteran la permeabilidad de la membrana citoplasmática de los protoplastos y pueden alterar la síntesis de ARN<sup>16</sup>. Estos mecanismos de acción múltiples podrían explicar la baja tasa de resistencias en la mayoría de microorganismos Gram-positivos.

El mecanismo de acción más aceptado consiste en la inhibición extracelular de la síntesis de peptidoglicano, específicamente los glicopéptidos interactúan con los residuos D-Ala-D-Ala del extremo carboxi-terminal de los precursores del pentapéptido del peptidoglicano, evitando también la unión cruzada entre diferentes cadenas<sup>17</sup>. La unión de los glicopéptidos a estos residuos D-Ala-D-Ala se realiza a través de 5 puentes de hidrógeno, formando un complejo que evita la unión cruzada entre diferentes D-Ala-D-Ala inhibiendo físicamente la acción de las transpeptidasas que generan estos enlaces cruzados<sup>18</sup>. Otro efecto de los glicopéptidos es la inhibición de la transglicosilasa (que es parte de una enzima bifuncional con actividad transpeptidasa), lo que impide el crecimiento de la cadena de peptidoglicano<sup>18</sup>.

### Mecanismos de resistencia

La resistencia a glicopéptidos se describió en primer lugar en *Enterococcus* spp. Esta resistencia está generada por la posesión de genes que alteran la diana y/o por un sistema de regulación que induce o reprime la expresión de ciertos genes. El primero de los mecanismos hace referencia a la posesión de genes *van*, en concreto los genes *vanHAX* o genes muy relacionados a éstos; *vanH* codifica para una  $\alpha$ -ceto-ácido-reductasa que genera un isómero D-Lact; posteriormente, *vanA* codifica para una D-Ala-D-Ala ligasa alterada, que lo que hace es ligar el D-Lact con una D-Ala, con lo que ahora en el extremo

carboxiterminal del pentapéptido del peptidoglicano nos encontramos con la estructura alterada. Pero para ello debe contar con *vanX* para que esa unión tenga efecto. Con este extremo los glicopéptidos pierden uniones (puente de hidrógeno)<sup>18</sup>.

El sistema de regulación está basado en un sistema de dos componentes, codificados por los genes *vanS* y *vanR*. Este sistema responde estimulando la expresión de los genes anteriores.

En función de qué clase de mecanismo de resistencia a glicopéptidos posee una bacteria se han descrito hasta seis fenotipos diferentes, dependiendo de si los genes tienen carácter inducible o no y de su transmisibilidad<sup>16</sup>. El fenotipo *vanA* confiere alta resistencia a vancomicina y teicoplanina, la resistencia es inducible y puede localizarse en plásmidos, por lo que sería fácilmente transmisible. El fenotipo *vanB* presenta moderada resistencia a vancomicina (CMI entre 32-64  $\mu\text{g/ml}$ ), manteniendo sensibilidad frente a teicoplanina. El fenotipo *vanC* presenta bajos niveles de resistencia a vancomicina (CMI 8-32  $\mu\text{g/ml}$ ) y sensibilidad a teicoplanina; este fenotipo se debe a la presencia del gen *vanC*, que es cromosómico, constitutivo y no inducible. Finalmente, los fenotipos *vanD,E,F* presentan bajos niveles de resistencia a vancomicina y son sensibles a teicoplanina, y se diferencian en los genes causantes de la resistencia<sup>16</sup>.

En 1992, se demostró que la resistencia a vancomicina podía transferirse mediante conjugación, en condiciones de laboratorio, desde *Enterococcus faecalis* a *Staphylococcus aureus*<sup>19</sup>, o a diferentes especies de *Listeria*<sup>20</sup>. A partir de los años 90 se empezaron a describir cepas con sensibilidad intermedia a glicopéptidos (GISA). El mecanismo de resistencia en *Staphylococcus aureus* no está bien determinado, lo que caracteriza a este grupo de microorganismos es el poseer una pared celular engrosada, menor tiempo de duplicación, una alterada expresión de las PBP y un incremento de la actividad autolítica, por lo que al parecer la resistencia a glicopéptidos en *Staphylococcus* spp debe ser multifactorial<sup>18</sup>. Actualmente, ya se han descrito dos aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus* que presentan el gen *vanA*<sup>21</sup>.

La resistencia a glicopéptidos en *Streptococcus* sí se ha relacionado con los genes *van*. Así pues, se han descrito cepas de *Streptococcus gallolyticus* que contenían los genes *vanA* y *vanB*, pero por el contrario no ha ocurrido lo mismo con *Streptococcus pneumoniae*, aunque en esta especie sí se han descrito cepas clínicas que pre-



sentan tolerancia a glicopéptidos, mecanismo que está asociado a que un sistema de regulación de dos componentes, VncS-VcnR, en respuesta a varios antibióticos, pone en marcha el sistema de autólisis<sup>18</sup>.

## AMINOGLUCÓSIDOS

### Mecanismo de acción

Los aminoglucósidos son antimicrobianos con un espectro de acción bastante amplio, son activos frente a una gran variedad de patógenos Gram-negativos y Gram-positivos de gran relevancia clínica, no siendo tan efectivos para *Bacteroides spp.*, *Streptococcus pneumoniae* y otros microorganismos anaerobios<sup>22</sup>. De todos modos, la actividad frente a bacterias Gram-positivas, que incluye *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Enterococcus*, reside fundamentalmente en la sinergia que exhibe este grupo de antimicrobianos cuando se asocian a  $\beta$ -lactámicos o glicopéptidos<sup>23</sup>.

La acción de los aminoglucósidos comprende tres fases: interacción con la superficie externa de la membrana celular bacteriana, transporte a través de la membrana y, finalmente, unión a la subunidad 30S<sup>23</sup>. Esta unión a la subunidad 30S del ribosoma juega un papel importante a la hora de impedir una correcta traducción del ARNm a proteína. El ribosoma posee tres dominios importantes para la correcta formación de proteínas, llamados A (por aminoacil), P (por peptidil) y E (por exit). El llamado dominio A es donde se une el ARNt reconociendo el ARNm para la correcta síntesis de proteínas. Es en este dominio donde se unen los aminoglucósidos e interfieren en este reconocimiento entre el correcto ARNt y el ARNm. Además, la interacción de los aminoglucósidos también interfiere en la translocación del ARNt desde el dominio A hacia el dominio P<sup>24</sup>. El mecanismo de acción propuesto es el siguiente: los aminoglucósidos que contienen un anillo de 2-deoxiestreptamina se unen al surco mayor de la  $\alpha$ -hélice H44 del 16S ARN; el resultado de esta unión es un cambio en la conformación natural de la subunidad 30S del ribosoma, lo que provoca errores de traducción, con la consecuencia de que las proteínas sintetizadas no son funcionales<sup>22</sup>.

### Mecanismos de resistencia

Se han propuesto diversos tipos de mecanismos de resistencia a los aminoglucósidos, como son

la penetración y acumulación del antimicrobiano del interior de la bacteria, modificaciones de la diana ribosomal, y la modificación enzimática del antimicrobiano.

Se han descrito mutaciones en *Staphylococcus aureus* que tienen influencia sobre el potencial eléctrico de la membrana, y esto produce resistencia a los aminoglucósidos<sup>25</sup>. Aunque el mecanismo de resistencia mayoritario en aislamientos clínicos, ya sean Gram-negativos o Gram-positivos, es la modificación enzimática de los antibióticos. Estos aminoglucósidos modificados pierden afinidad por su diana, lo que facilita la supervivencia bacteriana en presencia del antimicrobiano<sup>22</sup>.

Tres familias diferentes de enzimas modificantes de aminoglucósidos se han descrito hasta el momento. Éstas son: 1) fosfotransferasas (APH); 2) acetiltransferasas (AAC); y 3) nucleotidiltransferasas (NTC). Cada una de estas enzimas se caracteriza por usar un cosustrato diferente para su reacción. Las APH usan ATP para fosforilar un determinado grupo hidroxil de los aminoglucósidos, las AAC usan acetil coenzima A como donante del grupo acetilo para transferirlo a los aminoglucósidos, y las NTC usan ATP para transferir un grupo AMP a un determinado grupo hidroxilo de los aminoglucósidos<sup>22</sup>.

Una de las enzimas más frecuentemente encontrada entre bacterias Gram-positivas, y especialmente entre el género *Staphylococcus* y *Enterococcus*, es una enzima bifuncional, AAC6'/APH2". Esta enzima genera resistencia a gentamicina, tobramicina y kanamicina, y está localizada en el interior de transposones, generalmente compuestos del tipo Tn4001 en *Staphylococcus aureus*, Tn 4301 en *Staphylococcus epidermidis*, y Tn 5281 en *Enterococcus Faecalis*<sup>26</sup>. Esta localización facilita su diseminación. Udou<sup>27</sup> describe que en un hospital universitario el 80% de las infecciones producidas por SARM presentaba resistencia a los aminoglucósidos, y que el 56% era debido a la presencia de esta enzima bifuncional.

## OXAZOLIDINONAS

### Mecanismo de acción

Las oxazolidinonas son una nueva clase de agentes antimicrobianos sintéticos de gran actividad frente a patógenos Gram-positivos, incluyendo a *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina,



*Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* y enterococo, ya sea éste resistente o no a vancomicina.

Aunque aún no está completamente claro del todo cuál es su mecanismo de acción, existen estudios que demuestran que las oxazolidinonas se unen al ribosoma, concretamente a la subunidad 50S<sup>28</sup>, bloqueando el complejo inicial, inhibiendo la formación del complejo 70S, y si este complejo ya estuviera formado inhibe la translocación de la cadena peptídica desde el sitio A al sitio P del ribosoma<sup>29</sup>. Además, no existe resistencia cruzada con otros grupos de antibióticos que también inhiben la síntesis de proteínas.

### Mecanismo de resistencia

Hasta el momento, el único mecanismo de resistencia descrito es la modificación de la diana<sup>29</sup>, mediante una mutación que se produce en el dominio V del asa central del ARNr 23S, donde se encuentra el centro peptidil-transferasa. Estas mutaciones probablemente cambian la conformación del sitio de unión de las oxazolidinonas a la subunidad 50S del ribosoma<sup>16,30,31</sup>. Se han descrito varias mutaciones en diferentes posiciones del ARNr 23S que son capaces de inducir resistencia<sup>29,31</sup>. Éstas están presentes en las posiciones G2576, G2447, T2500 y T2537 en *Staphylococcus aureus*<sup>29</sup>, y en las posiciones G2576, G2512, G2513, G2505 y C2610 en enterococos<sup>31</sup>.

La presencia de múltiples genes que codifican para el gen del 23S ARNr en el genoma bacteriano sugiere que un aumento en el porcentaje de genes que posean la mutación estaría asociado a un incremento en la resistencia<sup>31,32</sup>. Asimismo, debido a este mismo fenómeno de la posesión de diversos genes codificantes para el ARNr 23S, hay autores que postulan que la dificultad en encontrar cepas resistentes probablemente debido a que se deben acumular varias mutaciones para alcanzar altos niveles de resistencia<sup>31</sup>.

---

## TETRACICLINAS

---

### Mecanismo de acción

Para llegar al interior celular, las tetraciclinas penetran en el interior de la bacteria mediante un proceso dependiente de energía mediado por un gradiente de protones<sup>8,33</sup>. Este grupo de

antimicrobianos actúan también sobre la síntesis proteica de los microorganismos uniéndose a la subunidad 30S del ribosoma para ejercer su función<sup>34</sup>. Concretamente, hay estudios que indican que las tetraciclinas se unen a la proteína S7, proteína que forma parte de la subunidad 30S del ribosoma<sup>34,35</sup>, e interactúan con diversas bases del ARNr 16S. La unión de la tetraciclina al ribosoma parece debilitar la unión del ARNt al ribosoma. Además, la posición de la proteína S7 en la subunidad 30S parece superponerse al sitio de unión del aminoacil-ARNt, lo que bloquea la entrada de éste al sitio A del ribosoma impidiendo la elongación de la cadena peptídica<sup>36</sup>.

### Mecanismo de resistencia

En bacterias Gram-positivas existen dos mecanismos de resistencia a tetraciclinas:

1. Expulsión activa de las tetraciclinas a través de una proteína de membrana. Los genes encontrados más frecuentemente en bacterias Gram-positivas que codifican para estas bombas de expulsión son tetK y tetL. Sin embargo, este mecanismo no ha sido descrito en *Streptococcus pneumoniae*. Este tipo de genes generalmente se encuentra en pequeños elementos transmisibles, pequeños plásmidos que ocasionalmente se integran en el cromosoma<sup>35,37</sup>. Además, este tipo de resistencia puede ser inducible<sup>34</sup>.
2. Protección ribosomal. Los genes más comúnmente encontrados en microorganismos Gram-positivos son tetM, tetO y tetQ. Éstos codifican para proteína soluble capaz de unirse al ribosoma, de tal manera que impiden la unión de las tetraciclinas al mismo, probablemente debido a un cambio conformacional en el ribosoma<sup>36</sup>, sin que esto llegue a afectar a la síntesis proteica. Estos determinantes de resistencia suelen encontrarse también en elementos transmisibles como transposones, etc.

---

## QUINOLONAS

---

### Mecanismo de acción

Las quinolonas actúan inhibiendo dos enzimas, las topoisomerasas tipo II, implicadas en la replicación y transcripción del ADN. En concreto, se trata de la ADN-girasa y de la topoisomerasa IV.



Estas dos proteínas son tetrámeros formados por dos subunidades A y dos subunidades B, GyrA, GyrB para la ADN-girasa y ParC, ParE (GrlA, GrlB en *Staphylococcus aureus*) para la topoisomerasa IV. Estas dos enzimas presentan una gran homología entre ellas.

La ADN-girasa cataliza un superenrollamiento negativo en la cadena de ADN, facilitando la separación de la doble hélice de DNA para facilitar la formación de la horquilla de replicación<sup>38</sup>. Por otro lado, la topoisomerasa IV es responsable del desencadenamiento de las dos cadenas «hijas», permitiendo la segregación de los dos nuevos cromosomas bacterianos en dos nuevas células «hijas»<sup>38</sup>.

El mecanismo de acción de las quinolonas consiste en la formación de un complejo quinolona-enzima-ADN, el cual bloquea la acción normal de la enzima, lo que inhibe la síntesis de ADN y acaba por provocar la muerte celular<sup>39,40</sup>.

En microorganismos Gram-positivos se ha descrito que la diana principal de las quinolonas es principalmente la topoisomerasa IV, aunque existen diferentes estudios que demuestran que esto depende de la afinidad de la quinolona por su diana, por lo que, dependiendo de la quinolona, la diana principal puede variar, como por ejemplo el caso del esparfloxacino, cuya diana principal es la ADN-girasa<sup>41,42</sup>.

---

## MECANISMO DE RESISTENCIA

---

Los mecanismos de resistencia a quinolonas se pueden agrupar, en general, en tres: 1) alteración de la proteína diana; 2) sobreexpresión de bombas de expulsión activa; 3) protección de la diana. En bacterias Gram-positivas no se ha descrito este tercer mecanismo de resistencia, mientras que sí se ha hecho en bacterias Gram-negativas tales como *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. Este mecanismo está mediado por un gen plasmídico llamado *qnr*<sup>43-45</sup>. Se desconoce cuál es su mecanismo de diseminación, aunque se ha sugerido que se transfiere mediante conjugación.

La alteración de la diana viene dada por mutaciones en los genes codificantes para la ADN-girasa y la topoisomerasa IV, *gyrA*, *gyrB*, y *parC* *parE*, (*grlA*, *grlB* en *Staphylococcus aureus*), respectivamente. Estas mutaciones tienen como objetivo cambiar el aminoácido donde la quinolona interacciona, perdiendo esta afinidad por la

proteína diana con la consecuencia que las quinolonas pierden actividad. Existen también microorganismos como *Listeria monocytogenes* que presentan una resistencia intrínseca, debido a que ya presentan unos aminoácidos distintos y con menos afinidad a las quinolonas en los sitios de interacción entre la quinolona y la ADN-girasa<sup>46</sup>.

La adquisición de resistencia a las quinolonas en general es gradual y está relacionada con el número de mutaciones que presentan los microorganismos en la región determinante de resistencia a quinolonas, principalmente en los genes *gyrA* y *parC*<sup>40,47</sup>. Asimismo, y de forma general, se puede decir que la primera mutación aparece en la topoisomerasa IV, concretamente en el gen *parC*, aunque se ha demostrado que esto depende de la afinidad de las quinolonas por su diana. De este modo, encontramos por ejemplo que el esparfloxacino genera las primeras mutaciones en la ADN-girasa (en el gen *gyrA*)<sup>40,41,48</sup>. Mutaciones en los genes *gyrB* y *parE* no juegan un papel importante en la adquisición de resistencias. También cabe destacar un grupo de microorganismos Gram-positivos, entre los cuales podemos destacar a los géneros *Corynebacterium*, *Campylobacter* y *Helicobacter*, los cuales sólo poseen ADN-girasa con lo que mutaciones sólo en el gen *gyrA* ya son suficientes para generar resistencia a quinolonas<sup>49</sup>.

Otro dato a tener en cuenta en la adquisición de mutaciones que generen resistencia es la capacidad mutagénica de las propias. En un estudio hecho en nuestro laboratorio (datos no publicados) se revela que el grado de mutagenicidad de las quinolonas está relacionada con la capacidad de seleccionar o generar mutantes resistentes.

El segundo mecanismo de resistencia es la sobreexpresión de sistemas de expulsión activa, que puede darse concomitantemente con la adquisición de mutaciones. Estos sistemas de expulsión activa tienen como finalidad expulsar el antibiótico del interior celular y acaban por modular la CMI final del microorganismo. Así, podemos encontrar dos cepas con las mismas mutaciones en los genes diana pero con diferentes CMI, probablemente debido a la sobreexpresión de una bomba de expulsión en una de ellas. Los mecanismos de expulsión mejor caracterizados en Gram-positivos son NorA<sup>41,47,50,51</sup> en el caso de *Staphylococcus aureus*, PmrA<sup>48,52,53</sup> en el caso de *Streptococcus pneumoniae*, Bmr en el caso de *Bacillus*, y Lde en el caso de *Listeria*



*monocytogenes*<sup>54</sup>. Usando inhibidores para este tipo de bombas de flujo se ha llegado a caracterizar que casi un 50% de las cepas de *Staphylococcus aureus* y de *Streptococcus pneumoniae* podrían presentar este tipo de mecanismo de resistencia<sup>47,48,53,55</sup>. Aunque no todas las quinolonas se ven afectadas de la misma manera, probablemente por la acción conjuntamente de distintas bombas de expulsión<sup>52,56-58</sup>.

Recientemente, se ha descrito como posible mecanismo de resistencia, concretamente en *Staphylococcus aureus*, la reducción en la expresión de las proteínas diana, ADN-girasa y topoisomerasa IV, aunque en cepas obtenidas *in vitro*<sup>59</sup> esto podría explicar pequeñas diferencias en la CMI de dos cepas con las mismas mutaciones, aunque no se ha estudiado en cepas clínicas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Berger-Bachi B. Resistance mechanisms of Gram-positive bacteria. *Int J Med Microbiol* 2002;292:27-35.
- Marin M, Gudiol F. Beta-lactam antibiotics. *Enf Infec Microbiol Clin* 2003;21:42-55.
- Zygmunt DJ, Stratton CW, Kernodle DS. Characterization of 4 Beta-Lactamases Produced by *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36:440-5.
- Cercenado E. *Staphylococcus aureus*: evolución de la sensibilidad. Estudios multicéntricos de participación nacional. En: Álvarez Lerma F (ed). Problemática actual en el tratamiento de infecciones por bacterias grampositivas en pacientes hospitalizados. 2004.
- Livermore DM. Antibiotic resistance in staphylococci. *Int J Antimicrob Agents* 2000;16:S3-S10.
- Ito T, Ma XX, Takeuchi F, et al. Novel type V staphylococcal cassette chromosome mec driven by a novel cassette chromosome recombinase, ccrC. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:2637-51.
- Chambers HF. Penicillin-binding protein-mediated resistance in pneumococci and staphylococci. *J Infect Dis* 1999;179:S353-S9.
- Vila J, García E. *Streptococcus pneumoniae*. Mecanismos de resistencia. evolución de la sensibilidad. Estudios multicéntricos de participación nacional. En: Álvarez Lerma F (ed). Problemática actual en el tratamiento de infecciones por bacterias grampositivas en pacientes hospitalizados. 2004;5.
- Mensa J, García-Vázquez E, Vila J. Macrolides, ketolides and streptogramins. *Enf Infec Microbiol Clin* 2003;21:200-8.
- Kaplan SL. Review of antibiotic resistance, antibiotic treatment and prevention of pneumococcal pneumonia. *Paediatr Respir Rev* 2004;5(Suppl A):S153-S8.
- Felmingham D, Gruneberg RN. The Alexander Project 1996-1997: latest susceptibility data from this international study of bacterial pathogens from community-acquired lower respiratory tract infections. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45:191-203.
- Roberts MC, Sutcliffe J, Courvalin P, et al. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:2823-30.
- Giovanetti E, Magi G, Brenciani A, et al. Conjugative transfer of the erm(A) gene from erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* to macrolide-susceptible *S. pyogenes*, *Enterococcus faecalis* and *Listeria innocua*. *J Antimicrob Chemother* 2002;50:249-52.
- Goldman RC, Capobianco JO. Role of An Energy-Dependent Efflux Pump in Plasmid Pnc24-Mediated Resistance to 14-Membered and 15-Membered Macrolides in *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34:1973-80.
- Pechere JC. Macrolide resistance mechanisms in Gram-positive cocci. *Int J Antimicrob Agents* 2001;18:S25-S8.
- Pigrau C. Oxazolidinones and glycopeptides. *Enf Infec Microbiol Clin* 2003;21:157-65.
- Walsh TR, Howe RA. The prevalence and mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Ann Rev Microbiol* 2002;56:657-75.
- Pootoolal J, Neu J, Wright GD. Glycopeptide antibiotic resistance. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 2002;42:381-408.
- Noble WC, Virani Z, Cree RGA. Co-Transfer of Vancomycin and Other Resistance Genes from *Enterococcus faecalis* Nctc-12201 to *Staphylococcus aureus*. *Fems Microbiol Letters* 1992; 93:195-8.
- Biavasco F, Giovanetti E, Miele A, et al. In vitro conjugative transfer of VanA vancomycin resistance between Enterococci and Listeriae of different species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996;15:50-9.
- Depardieu F, Perichon B, Courvalin P. Detection of the van alphabet and identification of enterococci and staphylococci at the species level by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2004;42:5857-60.
- Vakulenko SB, Mobashery S. Versatility of Aminoglycosides and prospects for their future. *Clin Microbiol Rev* 2003;16:430-+.
- Palomino J, Pachon J. Aminoglycosides. *Enf Infec Microbiol Clin* 2003;21:105-15.
- Kotra LP, Haddad J, Mobashery S. Aminoglycosides: Perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:3249-56.
- Miller MH, Edberg SC, Mandel LJ, et al. Gentamicin Uptake in Wild-Type and Aminoglycoside-Resistant Small-Colony Mutants of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1980; 18:722-9.
- Hodel-Christian SL, Murray BE. Characterization of the gentamicin resistance transposon Tn5281 from *Enterococcus faecalis* and comparison to staphylococcal transposons Tn4001 and Tn4031. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:1147-52.
- Udou T. Dissemination of nosocomial multiple-aminoglycoside-resistant *Staphylococcus aureus* caused by horizontal transfer of the resistance determinant (aacA/aphD) and clonal spread of resistant strains. *Am J Infect Control* 2004;32:215-9.
- Zhou CC, Swaney SM, Shinabarger DL, Stockman BJ. H-1 nuclear magnetic resonance study of oxazolidinone binding to bacterial ribosomes. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:625-9.
- Bozdogan M, Appelbaum PC. Oxazolidinones: activity, mode of action, and mechanism of resistance. *Int J Antimicrob Agents* 2004;23:113-9.
- Xiong L, Kloss P, Douthwaite S, et al. Oxazolidinone resistance mutations in 23S rRNA of *Escherichia coli* reveal the central region of domain V as the primary site of drug action. *J Bacteriol* 2000;182:5325-31.
- Livermore DM. Linezolid in vitro: mechanism and antibacterial spectrum. *J Antimicrob Chemother* 2003;51(Suppl 2):ii9-16.
- Marshall SH, Donskey CJ, Hutton-Thomas R, et al. Gene dosage and linezolid resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:3334-6.
- Roberts MC. Tetracycline therapy: update. *Clin Infect Dis* 2003;36:462-7.
- Schnappinger D, Hillen W. Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms. *Arch Microbiol* 1996;165:359-69.
- Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 2001;65:232-60.
- Zhanel GG, Homenuik K, Nichol K, et al. The glycolcyclines: a comparative review with the tetracyclines. *Drugs* 2004; 64:63-88.
- Roberts MC. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiol Rev* 1996;19:1-24.
- Drlca K. Mechanism of fluoroquinolone action. *Curr Opin Microbiol* 1999;2:504-8.
- Blondeau JM. Fluoroquinolones: mechanism of action, classification, and development of resistance. *Surv Ophthalmol* 2004; 49(Suppl 2):S73-S8.
- Hooper DC. Fluoroquinolone resistance among Gram-positive cocci. *Lancet Infect Dis* 2002;2:530-8.
- Ruiz J, Sierra JM, De Anta MT, Vila J. Characterization of sparfloxacin-resistant mutants of *Staphylococcus aureus* obtained *in vitro*. *Int J Antimicrob Agents* 2001;18:107-12.
- Hooper DC. Mode of action of fluoroquinolones. *Drugs* 1999; 58(Suppl 2):6-10.
- Tran JH, Jacoby GA. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *PNAS of USA* 2002;99:5638-42.



44. Rodríguez-Martínez JM, Pascual A, García I, Martínez-Martínez L. Detection of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnr* among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing AmpC-type beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother* 2003;52:703-6.
45. Wang M, Tran JH, Jacoby GA, et al. Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:2242-8.
46. Lampidis R, Kostrewa D, Hof H. Molecular characterization of the genes encoding DNA gyrase and topoisomerase IV of *Listeria monocytogenes*. *J Antimicrob Chemother* 2002;49:917-24.
47. Sierra JM, Marco F, Ruiz J, et al. Correlation between the activity of different fluoroquinolones and the presence of mechanisms of quinolone resistance in epidemiologically related and unrelated strains of methicillin-susceptible and -resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect* 2002;8:781-90.
48. Pan XS, Fisher LM. Targeting of DNA gyrase in *Streptococcus pneumoniae* by sparfloxacin: selective targeting of gyrase or topoisomerase IV by quinolones. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:471-4.
49. Sierra JM, Martínez-Martínez L, Vázquez F, et al. Relationship between mutations in the *gyrA* gene and quinolone resistance in clinical isolates of *Corynebacterium striatum* and *Corynebacterium amycolatum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2005;49 (en prensa).
50. Sierra JM, Ruiz J, De Anta MTJ, Vila J. Prevalence of two different genes encoding NorA in 23 clinical strains of *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 2000;46:145-6.
51. Kaatz GW, Seo SM, Ruble CA. Efflux-mediated fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:1086-94.
52. Gill MJ, Brenwald NP, Wise R. Identification of an efflux pump gene, *pmrA*, associated with fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:187-9.
53. Brenwald NP, Gill MJ, Wise R. Prevalence of a putative efflux mechanism among fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:2032-5.
54. Godreuil S, Galimand M, Gerbaud G, et al. Efflux pump Lde is associated with fluoroquinolone resistance in *Listeria monocytogenes*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:704-8.
55. Piddock LJ. Mechanisms of fluoroquinolone resistance: an update 1994-1998. *Drugs* 1999;58(Suppl 2):11-8.
56. Kaatz GW, Moudgal VV, Seo SM. Identification and characterization of a novel efflux-related multidrug resistance phenotype in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 2002;50:833-8.
57. Kaatz GW, Seo SM, O'Brien L, et al. Evidence for the existence of a multidrug efflux transporter distinct from NorA in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:1404-6.
58. Pestova E, Millichap JJ, Siddiqui F, et al. Non-PmrA-mediated multidrug resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 2002;49:553-6.
59. Ince D, Hooper DC. Quinolone resistance due to reduced target enzyme expression. *J Bacteriol* 2003;185:6883-92.