

Mecanismos de resistencia emergentes en grampositivos

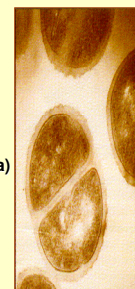


Emilia Cercenado
Servicio de Microbiología
Hospital General Universitario "Gregorio Marañón"
Madrid.

GEMARA-SEIMC. 9 mayo 2012. Bilbao

Evolución de la resistencia en grampositivos

- 1961 - Primera descripción de SARM (gen *mecA*)
- 1989 - R a vancomicina *Enterococcus* spp.
- 1996 - Emergencia de *S. aureus* GISA
- 1999 - Primera descripción SARM-CO
- 2002 - Primera descripción VRSA
- 2001 - Resistencia a linezolid (mutación ribosómica)
- 2005 - "Resistencia" a daptomicina
- 2007 - Resistencia a linezolid (plasmidica, gen *cfr*)
- 2010 - *E. faecium* beta-lactamasa + policlinal
- 2011 - SARM: nuevo gen *mecC*
- 2011 - Enterococos: 9 tipos de operones *van*



Enterococos: resistencia a glicopéptidos

Tabla 1
Características de la resistencia a los glicopéptidos en *Enterococcus* spp.

Fenotipo	Resistencia adquirida*									Resistencia intrínseca
	VanA	VanB	VanD	VanE	VanG	VanL	VanM	VanN	VanC	
CMI vancomicina (mg/l)	16 -> 1.000	4 -> 1.000	16-128	8-32	16	8	> 256	16	2-32	
CMI teicoplanina (mg/l)	16-512	0,25-2	2-4 (64)	0,5	0,5	0,5	96	0,5	0,12-2	
Expresión de la resistencia	Inducible	Inducible	Constitutiva	Inducible	nd	Inducible	nd	Constitutiva	Constitutiva o inducible	
Resistencia transferible	SI	SI	No	No	nd	nd	SI	SI	No	
Gen responsable	<i>vanA</i>	<i>vanB</i>	<i>vanD</i>	<i>vanE</i>	<i>vanG</i>	<i>vanL</i>	<i>vanM</i>	<i>vanN</i>	<i>vanC-1, vanC-2, vanC-3</i>	

- Daptomicina: activa frente a todos los tipos
- Necesario determinar CMI (BHI mejor que MH)
- CMI 8-16 µg/ml: identificar especies:
 - pigmento
 - movilidad
- Caracterización molecular



Cercenado E. EIMC 2011; 29 (Supl 5): 59-65

Enterococos: resistencia adquirida a penicilinas

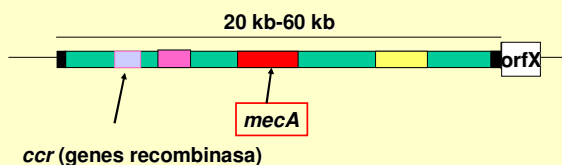
- R de alto nivel: hiperproducción o alteraciones PBP5 (*E. faecium*)
- R de bajo nivel: producción de beta-lactamasa:
 - constitutiva
 - casos esporádicos (*E. faecalis*; *E. faecium*)
 - USA, Canadá, Argentina, Líbano, India
- 2010 Italia: 8 cepas *E. faecium* (distinto PFGE):
 - CC17
 - Operón *blaZ-blaI-blaR1* cromosómico
 - Sólo se detecta actividad beta-lactamasa con alto inóculo o con preincubación con metilicina



Sarti M, et al. J Clin Microbiol 2012; 50:169-72

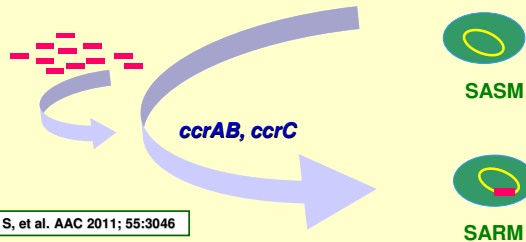
S. aureus: adquisición resistencia a metilicina

- *S. aureus* sensible a metilicina adquiere el gen *mecA*
- *mecA* situado en el elemento cromosómico *SCCmec*
- *SCCmec* integrado en el sitio específico *orfX*



S. aureus: adquisición resistencia a metilicina

SCCmec I, II, III, IV, V (5C2& 5), VI, VII (*V_T*), VIII, IX, X, XI

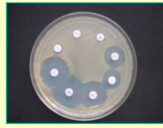


Li S, et al. AAC 2011; 55:3046

Tipos I, II, III: nosocomiales; Tipo IV: comunitario/nosocomial
Tipo V: asociado con ganado porcino
Tipo XI: asociado con ganado vacuno

SARM-CO (SCCmecIV). Evolución de resistencia

- 826 cepas invasivas USA300:
 - *ermC*: 7% (eritro/clinda)
 - *mupA*: 3% (RAN a mupirocina)
 - *aac(6')aph(2'')*: 0,8% (AG)
 - *dfrA*: 1% (SXT)
- Plásmido pSK41-like: RAN mupi + Gm + Tp



McDougal LK. AAC 2010;54:3804

- SARM-CO (asociado a ganado) ST398:
 - R a tetraciclina
 - Multi-resistente: gen *cfr* (transmisible)



Kehrenberg C, et al. AAC 2009; 53:779

SARM con SCCmec tipo XI

Antibiograma: resistencia a la meticilina, oxacilina, cefoxitina

Detección de la PBP2a: negativo

Detección gen *mecA* por PCR (sistemas comerciales): NEGATIVO

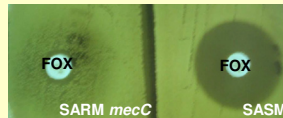
SCCmec tipo XI:

- Incluye genes homólogos pero muy divergentes del *mecA*
- *mecA* LGA251 (*mecC*)
- Aislados sensibles a antibióticos no-beta-lactámicos
- Complejos clonales: CC130, CC1943, CC705, CC425 (bovino)
- Reino Unido, Dinamarca, Irlanda, Alemania (medio rural)

Shore AC, et al; AAC 2011; 55:3765
García-Alvarez L, et al; Lancet Infect. Dis. 2011; 11:595
Cuny C, et al. PLoS ONE 2011; 6:e24360
Stegger M, et al. Clin Microbiol Infect 2012; 18:395

Detección de SARM con el gen *mecC*

- Variante divergente de *mecA* (<70% homología)
- 63% similitud Aa con la PBP2a
- Sistemas automatizados: oxacilina-S, cefoxitina-R
- Mejor detección: disco de cefoxitina

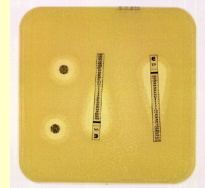


- Detección PBP2a:
 - Oxid: negativo (con/sin inducción)
 - Clearview: positivo (previa inducción con cefoxitina)
- Cepas sensibles al resto de grupos de antibióticos

Stegger M, et al. Clin Microbiol Infect 2012; 18:395
Laurent F, et al, P-1272, 22nd ECCMID. Londres 2012
Larsen A, et al; P-1317, 22nd ECCMID. Londres 2012

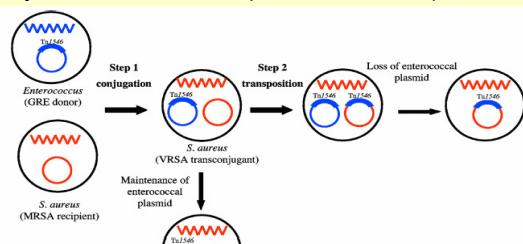
Mecanismos de resistencia a vancomicina en *S. aureus*

- VRSA
- GISA/VISA
- hGISA
- Sensible, pero CMIs vancomicina elevadas
- Tolerancia a actividad bactericida de vancomicina



VRSA

- Adquisición de genes *vanA* de enterococos (Tn1546)
- 11 casos (USA, India, Iran)
- Oxacillin + vancomycin: efecto sinérgico
- Bajo nivel de diseminación (elevado *fitness cost*)

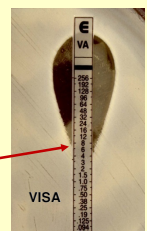
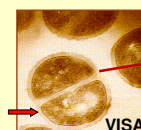
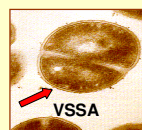


Périchon B, Courvalin P. AAC 2009; 53:4580
Thati V, et al. Indian J Med Res 2011; 134:704
Aligholi M, et al. Med Princ Pract 2008; 17:432

Características de h-GISA y GISA

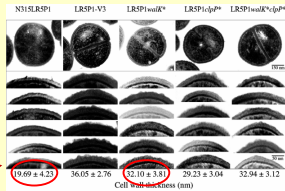
- Engrosamiento pared celular:
 - previene la difusión de vancomicina
 - hiperexpresión de PBP2 y PBP2'
 - aumento producción muropéptidos anormales
 - reducción expresión PBP4
 - aumento niveles de D-Ala-D-Ala
- reducción del entrecruzamiento del péptidoglicano
 - Reducción actividad autolítica
 - Lento crecimiento

Howden BP, et al; CMR 2010; 23:99-139
Charles et al. Clin Infect Dis 2004; 38:448
Howe et al. Emerging Infect Dis 2004; 10:855



Bases genéticas de la R a vancomicina en VISA

- VISA: se generan a partir de VSSA por múltiples mutaciones espontáneas
- Adquisición secuencial de mutaciones en sistemas regulatorios
- Mutaciones en reguladores alteran la expresión de >100 genes involucrados en la síntesis de pared celular, procesos celulares y metabolismo
- 39 cepas VISA, mutaciones en:
 - vrasR*: 20,5%
 - graRS*: 10,3%
 - walRK*: 61,5%
 - clpP*: 7,7%
- Engrosamiento de la pared celular



Shoji M, et al; AAC 2011; 55:3870

Tolerancia

Inhibitory and Bactericidal Activities of Daptomycin, Vancomycin, and Teicoplanin against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates Collected from 1985 to 2007^a

Maria M. Traczewski,^{1*} Bradley D. Katz,² Judith N. Steinberg,² and Steven D. Brown¹

Vancomicina

MIC (μg/ml)	No. of isolates ^a		% Tolerant at MIC
	Tolerant	With the indicated MIC	
≤0.25	0	2	0.0
0.5	1	120	0.8
1	26	348	7.5
2	2	7	28.6
4	0	2	0.0
8	0	0	0.0
≥16	0	0	0.0
Total	29	479	6.1

^a Tolerant ratio of intermediate MICs to MICs that are at CLSI guidelines.

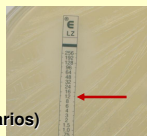
• Relevancia clínica: desconocida

Resistencia a linezolid en grampositivos

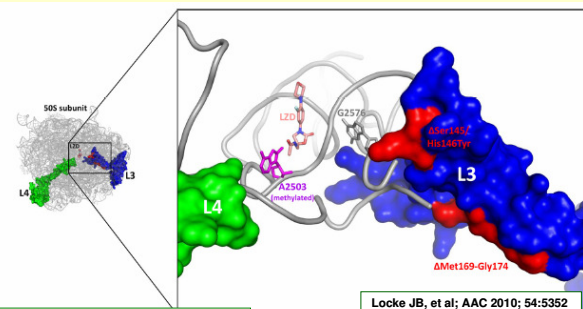
- Mecanismos de R:
 - Diversas mutaciones 23S ARNr (en 1 o más copias; *rrn*)
 - R mediada por el gen *cfr* (metilasa, transferible)
 - Mutaciones proteínas ribosómicas L3 y L4 (genes *rplC* y *rplD*)
 - Coexistencia de varios mecanismos

Adquisición:

- Pacientes tratados tiempo prolongado con linezolid
- Diseminación de clones resistentes (pacientes-sanitarios)
- Diseminación de transposones o plásmidos (*cfr*)
- Aumento de nivel de R según nº alelos mutados del gen 23S ARNr
- SCoN ¿reservorio del gen *cfr* en hospitales?



Resistencia a linezolid



Schnitzler et al; EJCMID 2011; 30:121
Wong et al; AAC 2010; 54:742
Rahin et al; CID 2003; 36:e146
Shaw et al; Ann NY Acad Sci 2011; 1241:48
Long KS, Vester B. AAC 2012; 56:603

Locke JB, et al; AAC 2010; 54:5352

Resistencia a linezolid

- Programa LEADER 2009; 6.414 cepas, 56 centros, USA
- Linezolid-R (0,34%); G2576T, mutaciones en L3 y L4, *cfr*
- SCoN: 1,1%
- *S. aureus* linezolid-R (2 cepas, *cfr*+)

TABLE 1. Cumulative percentages of inhibition results at each linezolid MIC with testing of six different groups of Gram-positive cocci isolated from all U.S. Census regions (LEADER Program, 2009; 6,414 strains)

Organism group (no. tested)	Cumulative % inhibited at linezolid MIC (μg/ml) of:						
	≤0.12	0.25	0.5	1	2	4	≥8
Viridans group streptococci (264)	1.1	2.7	34.5	97.7	100.0		
<i>S. pneumoniae</i> (659)	0.6	3.8	43.4	96.5	100.0		
Beta-hemolytic streptococci (401)	0.5	0.5	11.2	99.5	100.0		
CoNS (816)	0.1	1.4	37.1	94.4	98.3	98.9	100.0 ^a
Enterococci (1,017)	0.0	0.1	4.0	53.4	98.9	99.2	99.6 ^b
<i>S. aureus</i> (3,257)	0.1	0.2	0.9	41.5	99.8	99.9	>99.9 ^c

Farrel DJ, et al. AAC 2011; 55:3684

Resistencia a linezolid

- Programa anual Zyvox 2009; 5754 cepas, 22 países
- 8 cepas linezolid-R (0,14%); 5 países; G2576T y *cfr*
- SCoN: 0,48%
- No *S. aureus* linezolid-R

Table 3
Cumulative percentage inhibition results at each linezolid MIC when testing 6 different groups of Gram-positive pathogens on 5 continents (ZAAPS, 2009)

Organism group (no. tested)	Cumulative % inhibited at linezolid MIC (μg/ml)						
	≤0.12	0.25	0.5	1	2	4	≥8
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (636)	1.1	2.5	38.8	98.7	100.0		
Viridans group streptococci (214)	0.0	1.9	30.4	96.3	100.0		
β-Hemolytic streptococci (375)	0.0	0.0	7.2	98.4	100.0		
<i>Staphylococcus aureus</i> (2958)	0.0	0.1	1.3	37.5	100.0		
Enterococci (744)	0.0	0.0	4.3	51.5	99.5	99.5	100.0
CoNS (827)	0.0	0.9	25.9	94.1	99.3	99.5	100.0

Biedenbach DJ et al. DMID 2010; 68: 459

Resistencia a linezolid en España

Descripción de brotes por diferentes especies

- Treviño et al; EJCMID 2009; 28:527. *S. epidermidis*
- Gómez Gil et al; DMID 2009; 65:175. *E. faecalis*
- Rodríguez Aranda et al; DMID 2009; 63:398. *S. haemolyticus*
- Morales et al; CID 2010;50:821. *S. aureus*
- Cercenado et al; 51st ICAAC. Chicago 2011. *S. aureus*
- Múltiples comunicaciones a congresos describen casos esporádicos y brotes por diferentes especies

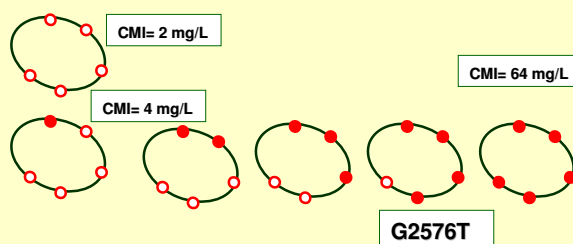


Resistencia adquirida a linezolid. Cepas clínicas

Microorganismos	Mecanismo de resistencia	R cruzada
<i>S. aureus</i> <i>S. epidermidis</i>	Mutaciones 23S ARNr G2576T, T2500A, G2447T, otras G2576T, G2603T, C2534T, T2504A, G2474T, G2505A, otras	Pleuromutilinas
<i>S. haemolyticus</i> , SCoN <i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i> <i>S. oralis</i>	G2576T, otras G2576T G2576T G2576T	
<i>S. aureus</i> <i>S. epidermidis</i> <i>S. haemolyticus</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i>	Adquisición metiltransferasa Cfr Metila A2503 del 23S ARNr Fenotipo PhLOPS _A	Cloranfenicol Lincosamidas Pleuromutilinas Estreptogramina A Macrólidos 16-C
<i>S. aureus</i> SCoN	Mutaciones riboproteínas L3 y L4	Macrólidos Cloranfenicol
<i>S. pneumoniae</i> <i>C. perfringens</i> * * (porcino)	Mutaciones riboproteína L4	Macrólidos Cloranfenicol

Desarrollo de R mutacional a linezolid

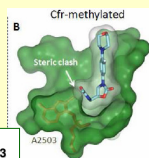
- Mutación puntual inicial en una copia del gen 23S ARNr
- Recombinación homóloga entre restantes copias
- Aumento nº mutaciones y aumento de CMI
- Resistencia heterogénea y homogénea



Resistencia a linezolid por cfr

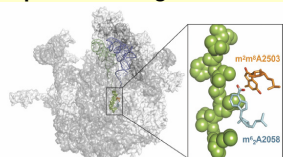
- 1997: *cfr* en estafilococos (veterinaria -vacas/cerdos-)
- 2005. SARM humanos (Colombia. CMI 16 mg/L)
- Mecanismo de R: metilación en A2503 (23S ARNr)
- R cruzada: PhLOPS_A y macrólidos 16-C
- *cfr*: plásmidos, transposones, elementos inserción: facilidad para diseminar la R
- *S. sciuri*, *S. lentus*, *S. epidermidis*, *S. aureus*, *S. simulans*, *E. faecium*, *E. faecalis*, *Bacillus* spp.
- *cfr* cromosómico en *P. vulgaris* (China)
- Amplio nº de microorganismos reservorio de *cfr*
- Resistencia reversible

Díaz L, et al; AAC 2012; Apr 9, Epub
Long KS, Vester B. AAC 2012; 56:603



Coste biológico de la R a linezolid (fitness cost)

- **Resistencia mutacional:**
 - una sola mutación: bajo coste biológico
 - acumulación de mutaciones: pérdida de *fitness*
 - uso prolongado de linezolid: aumento de mutaciones
 - reversibilidad de la resistencia
- **Resistencia por *cfr*:**
 - bajo coste biológico
 - muchos reservorios (cepas colonizadoras, SCoN)
 - presencia de genes *erm* aumenta el coste biológico



La Marre JM, et al; AAC 2011; 55:3714

Resistencia a daptomicina

- Programa vigilancia US 2007-2008; 12.443 cepas
- 55,9% SARM; 74% SCoN-MR; 75,4% ERV *E. faecium*
- Cepas NO-SENSIBLES

Table 2
Frequency of occurrence of daptomycin MIC values for the organisms tested

Organism (no. total)	No. of isolates (%) inhibited at MIC (μg/mL) of							
	≤0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8
<i>S. aureus</i>								
Oxacillin-susceptible								
2007-2008 (1563)	5 (0.1)	207 (5.8)	2769 (77.7)	572 (16.1)	10 (0.3)	1 (<0.1)	-	-
2002-2003 (1879)	2 (0.1)	123 (6.5)	1440 (76.6)	305 (16.3)	6 (0.3)	-	-	-
Oxacillin-resistant								
2007-2008 (4514)	2 (<0.1)	106 (2.4)	3171 (70.3)	1189 (26.3)	38 (0.8)	7 (0.2)	1 (<0.1)	-
2002-2003 (1598)	1 (0.1)	32 (2.0)	1043 (65.3)	512 (32.0)	10 (0.6)	-	-	-
<i>E. faecalis</i>								
2007-2008 (1401)	5 (0.4)	9 (0.6)	48 (3.4)	484 (34.6)	726 (51.8)	125 (8.9)	4 (0.3)	-
2002-2003 (981)	2 (0.2)	10 (1.0)	87 (8.9)	478 (48.7)	367 (37.1)	38 (3.9)	2 (0.2)	-
<i>E. faecium</i>								
Vancomycin-susceptible								
2007-2008 (203)	0 (0.0)	2 (1.0)	4 (2.0)	7 (3.5)	57 (28.1)	117 (57.6)	14 (6.9)	2 (1.0)
2002-2003 (93)	0 (0.0)	2 (2.2)	1 (1.1)	1 (1.1)	12 (12.9)	52 (55.9)	24 (25.8)	1 (1.1)
Vancomycin-resistant								
2007-2008 (640)	2 (0.3)	2 (0.3)	10 (1.6)	14 (2.2)	204 (31.9)	376 (58.8)	30 (4.7)	2 (0.3)
2002-2003 (949)	1 (0.1)	3 (0.3)	5 (0.5)	29 (3.1)	153 (16.2)	535 (56.4)	219 (23.1)	4 (0.4)

- = No isolates with this MIC value.

Sader HS et al; DMID 2009; 65:158

Resistencia a daptomicina

31 hospitales, 14 países de Europa (2002–2009)

Organismos		n	DAPTOMICINA CMI mg/L			% sensibles
			MIC ₅₀	MIC ₉₀	Rango	
<i>S. aureus</i>	OXA-S	3.550	0,25	0,5	<0,06–2	99,9
	OXA-R	1.292	0,25	0,5	<0,06–2	99,9
SCoN	OXA-S	447	0,25	0,5	<0,06–1	100
	OXA-R	1.495	0,25	0,5	<0,06–1	100
<i>E. faecalis</i>	VAN-S	1.113	0,5	1	<0,06–4	100
	VAN-R	34	0,5	1	0,25–2	100
<i>E. faecium</i>	VAN-S	322	2	4	<0,06–8	99,7
	VAN-R	69	2	4	0,5–8	98,6
<i>Streptococcus β-hemol</i>		660	<0,06	0,25	<0,06–0,5	100
<i>Streptococcus g. viridans</i>		340	0,25	0,5	0,03–2	99,1

• Cepas no-sensibles (<0,1%)

Sader HS, et al.; Clin Microbiol Infect 2006;12:844
Sader HS, et al.; J. Chemother 2011;23:200

Resistencia a daptomicina

• Desarrollo de resistencia (**aumento de CMI**) durante tratamientos prolongados y fracaso clínico:

SARM:

- Endocarditis, bacteriemia (tromboflebitis, osteomielitis, artritis séptica)
- Focos sin drenar

Lee et al; AAC 2010; 54:4038
Mangili et al; CID 2005; 40:1058
Marty et al; JCM 2006; 44:595

***E. faecium* y *E. faecalis*:**

- Bacteriemia, endocarditis

Montero et al; AAC 2008; 52:1167
Muñoz-Price et al; CID 2005; 41:565
Sabot et al; AAC 2005;49:1664
Kanafani et al; SJID 2007;39:75

***Corynebacterium jeikeium*:**

- Bacteriemia en neutropénico (CMI >256 mg/L)

Schoen et al; JCM 2009; 47:2328

Resistencia a daptomicina: *S. aureus*

• “No-sensible”:

- CMI daptomicina ≤ 1 mg/L: sensible
- CMI daptomicina > 1 mg/L: no-sensible
- Dificultad para desarrollo de R (bajo *fitness*, <10⁻¹⁰)¹
- Escasos aislados clínicos R a daptomicina^{2, 3}
- Disminución de sensibilidad en hVISA, VISA⁴



- Cepas aisladas de pacientes que recibieron vancomicina, que nunca recibieron daptomicina, que recibieron un curso corto o largo de daptomicina o que no recibieron ningún antibiótico⁵⁻⁷

¹Silverman et al. AAC 2004; 45:1799. ²Sader et al. J Chemother 2005;17:477.
³Sabot et al. AAC 2005; 49:1664-5; ⁴Cui et al. AAC 2006; 50:1079-82; ⁵Boucher HW, et al. CID 2007;45:601. ⁶Lee et al; AAC 2010; 54:4038; ⁷Mangili et al; CID 2005; 40:1058

Resistencia a daptomicina: *S. aureus*

• Disminución de actividad en VISA:

- engrosamiento de pared impide difusión de daptomicina

• Desarrollo de mutaciones durante el tratamiento:

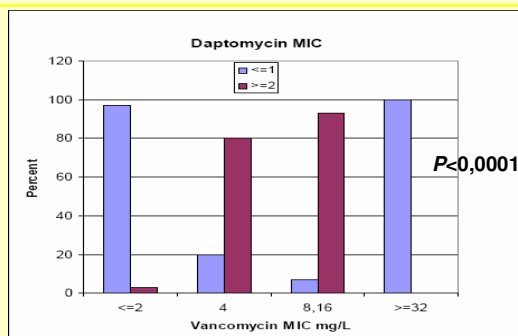
- mutaciones *mprF* y *pgsA* (síntesis fosfolípidos membrana)
- mutaciones *cls2* (cardiolipina-sintasa)
- aumenta la carga (+) de membrana

- otras mutaciones: *yycG*, *rpoB*, *rpoC*
- disminuyen la carga negativa de la membrana celular
- engrosamiento de la pared celular

• Alteran el contenido de fosfolípidos de membrana celular

Peleg AY, et al; PLoS ONE 2012; 7(1):e28316
Sass P, et al; J Bacteriol 2012; 194:2107
Cui et al; AAC 2010; 54:5222

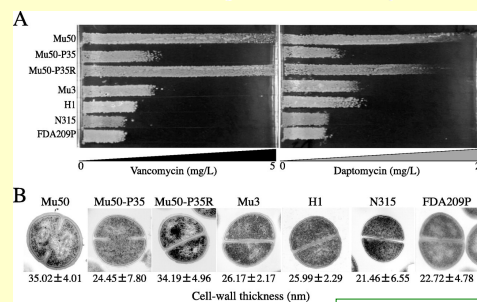
Correlación CMIs vancomicina-daptomicina



Patel JB. CID 2006; 42:1652

Resistencia a daptomicina: *S. aureus*

SARM: la correlación entre sensibilidad reducida a DAP y VAN en VISA se debe al engrosamiento de la pared



Cui et al. AAC 2006; 50:1079

Resistencia a daptomicina: enterococo

- **Bases genéticas:**
 - alguna diferencia con estafilococos
 - mutaciones genes metabolismo de fosfolípidos (*cls*, *gdpD*)
 - mutaciones en genes de proteínas de membrana (*liaF*)
- **Alteraciones:**
 - Cambios en estructura de pared celular
 - Alteraciones permeabilidad de membrana
 - Alteración del potencial de membrana
 - Emergencia de cepas R a daptomicina “*de novo*”
- **Falsa resistencia con sistemas automatizados**

Arias CA, et al. NEJM 2011; 365:892
 Palmer KL, et al; AAC 2011; 55:3345
 Kelesidis T, et al; Emerg Infect Dis 2012; 18: 674
 Cercenado E, et al; Abstract P-1657; 22nd ECCMID. Londres 2012

Resistencia a daptomicina

- Actinomicetos ambientales
- Inactivación enzimática de daptomicina
- Desacilación mediada por proteasas
- Otras proteasas de mamíferos y humanas pueden degradar daptomicina

¿futuro mecanismo de resistencia clínica?



D'Costa VM, et al; AAC 2012; 56:757

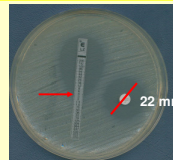
Detección de R a linezolid y a daptomicina

LINEZOLID:

• Falsa sensibilidad

Etest y disco-difusión

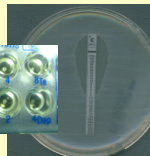
- Cepas *cfr*+: Etest: 3 mg/L (S);
- difusión disco: 22 mm (S);
- microdilución: >4 mg/L (R)



DAPTOMICINA:

• Falsa resistencia en enterococos con sistemas automatizados

- No utilizar difusión con discos
- Discrepancias entre diferentes métodos
- Método estándar: microdilución en caldo



Arias CA, et al; J Clin Microbiol 2008; 46:892
 Cercenado E, et al; Abstract P-1657. 22nd ECCMID. Londres 2012