



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

**TÍTULO: ALTERNATIVAS EN LA TERAPIA
DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* RESISTENTE A
METICILINA (MRSA)**

Autor/a: Miriam Del Valle Escudero

Tutor: M^a Ángeles Heras Caballero

Convocatoria: Junio

RESUMEN

Los patógenos Gram-positivos, entre los cuales *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), son un verdadero reto terapéutico. En la década pasada, fueron introducidos para su tratamiento clínico el linezolid, la daptomicina y la tigeciclina que se unieron a la vancomicina, existente desde hace ya cuatro décadas. Sin embargo, el progresivo surgimiento de resistencia no predecible a estas drogas y a su transmisión vertical y horizontal (por medio de elementos genéticos móviles), ha derivado en falta de eficacia y efectividad en su uso evidenciando así la necesidad de nuevas incorporaciones para el futuro. La ceftarolina, fue introducida recientemente (2010) y ejemplifica los esfuerzos para el descubrimiento de nuevos antibióticos β -lactámicos activos frente a MRSA. El descubrimiento de drogas pertenecientes a clases antiguas de antibióticos debe ser complementado con el avance en el conocimiento sobre alternativas terapéuticas procedentes de diferentes fuentes, como lo son el fondo marino, el mundo vegetal o la propia síntesis química, que actúen sobre dianas novedosas.

El propósito de esta revisión fue mostrar una línea alternativa a utilizar en la terapia frente a MRSA por medio de drogas activas cuyas dianas no son las usuales: Descripción de la ceftarolina, como cefalosporina de 5^a generación, y otros compuestos no pertenecientes a las clases tradicionales de antibióticos, antracimicina, arcilla Kisameet, defensinas sintéticas, extracto F-10 de *Duabanga grandiflora* y el eugenol.

Palabras clave: Nuevos antibiótico; Multirresistencia a patógenos ESKAPE; bacterias Gram-positivas; Evolución de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina; Proteína de unión a la penicilina; Diseño ceftarolina; Terapias complementarias; Medicina natural.

ABSTRACT

The Gram-positive pathogens, including *Staphylococcus aureus* resistant to meticilina (MRSA) are a real therapeutic challenge. In the last decade they were introduced for clinical treatment linezolid, daptomicina and tigociclina which joined vancomicina, existing for four decades ago.

However, the gradual resistance to these drugs not predictable in vertical and horizontal transmission (through mobile genetic elements) it has resulted in lack of efficiency and effectiveness in the use needing new additions for the future. Ceftarolina, was recently

introduced (2010) and is an example the efforts for the discovery of new antibiotics beta-lactámicos active against MRSA. The discovery of drugs belonging to older kind of antibiotics must be complemented with advance in knowledge about therapeutic alternatives from different investigations, for example seabed, the plant world or chemical synthesis, acting on novel targets.

The purpose of this review was to show alternative line to use in therapy against MRS through active drugs whose targets are not usual: Description ceftalona, as the 5th generation ceclosporine and others components not traditional kinds of antibiotics, Anthracimycin, Kisameet clay, defensin mimetics, bioactive fraction F-10 of *Duabanga grandiflora* and eugenol.

Key words: Novel antibiotic; Multidrug-resistant ESKAPE strain; Gram-positive bacterias; Evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; Penicillin binding protein; Design ceftaroline; Complementary therapies; Natural medicine.

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Una buena forma de adentrarnos en el tema de esta revisión es mediante las palabras de la experta Theresa Braine de la Organización Mundial de la Salud, quien asegura que *“la tubería de antibióticos se está secando mientras que la resistencia a los fármacos existentes es cada vez mayor”*¹. Derivado de este problema surgió la iniciativa 10x20, que es la que actualmente dirige el panorama de la terapéutica antibacteriana con el fin de revitalizar esta batería de antibióticos¹.

Que el desarrollo de fármacos antibacterianos sea una prioridad científica puede explicarse con cifras. En general, las enfermedades infecciosas son la segunda causa de muerte en el mundo y la tercera causa principal de muerte en los países desarrollados². Dentro de este tipo de patologías, las bacterias resistentes a los antibióticos causan en Europa unas 400.000 infecciones con 2,5 millones de días adicionales de hospitalización y 25.000 muertes por año, según datos ofrecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2015) y el centro Europeo para la Prevención y control de enfermedades (ECDE, 2015)³.

El consumo extendido y habitual de antibióticos beta-lactámicos es el punto de origen principal para la aparición de cepas resistentes a nivel mundial⁴. Es de tal importancia el tratamiento con antibióticos apropiados, que el propio Fleming afirmó que *“no existe fármaco*

ante el que las bacterias no puedan adquirir resistencia, superando, además, los mecanismos de resistencia a las opciones terapéuticas”⁵. Así, muchos estudios sustentan la idea de que los agentes antimicrobianos son generadores de una fuerza selectiva para el surgimiento de resistencias y, por tanto, de ineficacia de la terapia⁶.

Staphylococcus aureus es una de las bacteria Gram-positivas que, además de ser en un 30% de la población un microorganismo comensal de la microbiota intestinal, es capaz de causar graves enfermedades, aunque principalmente se encuentran asociadas a cepas resistentes como lo es *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA), una de las denominadas “superbacterias”². La detección de resistencia se observó por aislamiento en la práctica clínica de cepas MRSA tan sólo un año después de su incorporación (1961) en Inglaterra. Posteriormente, se identificó en EE.UU, en la ciudad de Boston, y para 1981 ya se trataba de una bacteria endémica en los centros de salud de EE.UU⁶.

En sus inicios, MRSA era causante de infecciones nosocomiales en huéspedes inmunodeprimidos, denominándose MRSA asociada al hospital (HA-MRSA). Pero de tan sólo patógeno nosocomial pasó a ser también asociado a la comunidad, lo que lleva a diferenciar HA-MRSA de CA-MRSA⁷. CA-MRSA son cepas más virulentas y transmisibles con nuevos mecanismos de virulencia (codifican las subunidades de PVL)⁶.

S. aureus resistente a meticilina (MRSA) apareció por la adquisición a través de la transmisión horizontal del cassette cromosomal estafilococal (SCC_{mec}) que es el que contiene el gen *mecA* causante de la resistencia a la meticilina⁸. Se localiza integrado de forma independiente (ADN extra-cromosómico) en los genomas de diversos clones MSSA ancestrales que sobreviven por ser evolutivamente más avanzados (presencia de genotipos de resistencia responsables de su supervivencia durante el proceso de presión selectiva ejercido por los antibióticos)⁶. Una hipótesis es que proceda de estafilococos coagulasa-negativos⁹.

Actualmente existe un dilema clínico difícil de gestionar por el aumento progresivo de casos de infecciones HA-MRSA y CA-MRSA. ¿Hay que comenzar la terapia con un antibiótico beta-lactámico o se debe incluir en la terapia un fármaco frente a MRSA? Dirigido y centrado en dichas afecciones, el objetivo de esta revisión sistemática fue aportar una visión de agentes alternativos frente a MRSA con un futuro prometedor: Ceftarolina como nuevo antibiótico (5ª generación de cefalosporinas) y otros compuestos activos en los que el medio marino y vegetal son protagonistas.

METODOLOGÍA

Diseño

Revisión sistemática.

Selección de estudios

Las fuentes de información científica utilizadas fueron: bases de datos electrónicas: PubMed-Medline y Web of Science (2010 a febrero de 2016); un libro: “Microbiología sanitaria y clínica” (1997); y una revista de prensa especializada: “Panorama actual del medicamento” (2015).

Los principales términos MESH en los que se basó la búsqueda fueron: “Drug Design”-Methicillin-Resistant *S.aureus* “Antibacterial Agents/pharmacology” – *S. aureus* drug effects”, “Clinical trials as topic” – Methicillin resistant *S.aureus* “Ceftarolina”- “Ceftobiprole” \ “Development” – “New drugs”-“MRSA” \ “Efficacy” – “Ceftaroline” – “Ceftobiprole” \ “Novel antibiotic” – “MRSA” \ “Efficacy” – “Natural medicine” – “Eskape” \ “Synergistic activity” – “Antimicrobial”.

Límites: Estudios en humanos, lenguaje en español o inglés y acceso al abstract o texto completo. Fueron incluidos artículos enfocados en drogas para la terapia actual o futura de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) orientados bien en aspectos genéticos o clínicos.

Se excluyeron los trabajos que no aportaran una noción de la genética de resistencia de la bacteria de interés, aquellos cuya intervención no fuese una comparación de la eficacia o grado de resistencia entre típicos antibióticos y las nuevas cefalosporinas (ceftarolina o ceftobiprol), o los que no trataran de compuestos alternativos, entendidos como aquellos con potencial para la terapia futura cuyas dianas no son las tradicionales.

Se incluyeron revisiones sistemáticas, ensayos de la actividad in vitro con diferentes cepas, ensayos clínicos en humanos para el proceso de registro de la droga y estudios observacionales de cohortes; publicados la mayoría entre 2010-2016 y registrados en JCR. Se detectaron 478 referencias de las cuales 117 fueron referentes al tema. De su análisis a texto completo se excluyeron 38 por no comparar intervenciones del estudio y por último se descartaron los que no registraron eventos de interés. Así, finalmente los utilizados para dicha

revisión fueron 29 artículos (principalmente incluidos en JCR), una revista y un libro de texto (31 referencias).

Métodos de revisión

Nº TOTAL (tras excluir: duplicados, anteriores a 2010, no centrados en humanos): 479 referencias + libro: "Microbiología sanitaria y clínica" (1997) + Prensa especializada: "Panorama actual del medicamento" (2015).

PubMed: 258; Medline: 160; Web of Science: 58;



REVISIÓN TÍTULOS Y RESÚMENES:

-Nº DESCARTADOS por no ser referidos al tema: 361

- PubMed: 181; Medline: 148; Web of Science: 32

Nº ELEGIBLES: 117



REVISIÓN DE TEXTO COMPLETO

Nº TOTAL: 117

Nº DESCARTADOS por no comparar intervenciones del estudio: 38

- PubMed: 17; Medline: 8; Web of Science: 13

Nº ELEGIBLES: 80



Nº EXCLUIDOS por no registrar eventos de interés: 50

- PubMed: 13; Medline: 13; Web of Science: 24

Nº INCLUIDOS: 31

- PubMed: 17; Medline: 3; Web of Science: 9

Revista: "Panorama actual del medicamento" (2015).

Libro: "Microbiología sanitaria y clínica" (1997).

RESULTADOS

Bases genéticas de la resistencia bacteriana en *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA)

Conocer la situación actual y la tendencia futura de la terapia para combatir las infecciones por *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) es crucial, ya que esta bacteria Gram-positiva ha logrado sobreponerse a todo antibacteriano introducido en los últimos 50 años¹⁰. Según algunos autores^{11 (p 1047)} "tenemos que ser conscientes de la fluidez del genoma

microbiano... [Y] el conocimiento de [los] mecanismo de resistencia puede ayudar en el diseño de nuevos fármacos”.

En base a la información de Alekshun et al¹¹ (p 3058) sobre: “las características generales de los organismos resistentes a multidroga”, podemos encontrar que los antibióticos claves en la resistencia a MRSA son los beta-lactámicos, fluoroquinolonas y macrólidos; y los agentes aprobados por la FDA para combatir esta multiresistencia son el quinupristin-daftopristin, daftomicina, linezolid, tigeciclina, vancomicina (fármaco de elección por mayor conocimiento clínico) y, recientemente, la ceftarolina¹⁰.

En palabras de Malachowa et al¹²(p3058):

“La base [del grupo de enfermedades por MRSA] es multifactorial y depende en gran medida de la susceptibilidad del huésped [pero] la heterogeneidad de las cepas de *S. aureus* probablemente juega un papel en este proceso”.

La variedad de cepas con diferente tipo de resistencia es el resultado de la transferencia horizontal y vertical de los elementos genéticos móviles (MGEs) y de las mutaciones cromosómicas (resistencia intrínseca)¹². Un tipo de MGEs son los cassettes cromosómicos de estafilococos (SCC). Consisten en grandes fragmentos de ADN que pueden codificar resistencia a antibióticos o bien factores de virulencia y de supervivencia (SCC no mec)¹² y, por tanto, MRSA surgió por la integración de SCCmec con *MecA* que produce PBP2A. De tal forma que MRSA codifica cuatro PBP normales más esta extra. Cuando los beta-lactámicos alcanzan el sitio de unión y lo saturan, entonces se inhibe la actividad transpeptidasa y la síntesis de la pared bacteriana se detiene. Sin embargo, la presencia de PBP2a lleva a que, tras la unión del fármaco, PBP2 realice la actividad no afectada de transglicosilación (alargamiento de la cadena de glicano) mientras que PBP2a mantendrá la actividad transpeptidasa (reacción en la que se desplaza el terminal D-Ala y los tallos del péptido en la unidad NAM son reticulados) perdida, superando así la resistencia^{10, 11}.

Datos sobre la terapia actual

Por una parte, sobre la terapia actual, se puede afirmar que la variación en el tiempo de exposición a los antimicrobianos es determinante en el desarrollo de resistencias¹³ y por otra parte, que existe evidencia de ineficacia terapéutica con el registro farmacológico actual¹⁴. La base científica de estas afirmaciones se incluyó en la siguiente tabla:

TEMÁTICA	MÉTODO ESTUDIO	TÉCNICAS	RESULTADOS	CITA
<p>Evolución de la resistencia in vivo (en un solo paciente) según la exposición a vancomicina</p>	<p>-Aislamiento de seis ST239-MRSA III de un paciente con bacteriemia persistente.</p> <p>-Periodo estudio de 77 días.</p> <p>-Uso de diferentes antibióticos (vancomicina, daptomicina, linezolid, quinupristina/daptopristina y tigeciclina).</p> <p>-El primer aislado se obtuvo el día 32 del tratamiento y el último el día 109.</p> <p>-Se determinó la susceptibilidad a vancomicina para los seis aislados definiendo cada cepa como: VSSA, hVISA o VISA.</p> <p>-Se determinó susceptibilidad para la daptomicina, obteniéndose cepas susceptibles y no susceptibles.</p> <p>-Obtención de valores de MICs para linezolid, quinupristina/dalfopristina y tigeciclina.</p>	<p>-Secuenciación de los genomas de los seis aislados (ST239-MRSA-III) por análisis WGS.</p> <p>-Pruebas de susceptibilidad a vancomicina y daptomicina por microdilución en caldo de Muller-Hilton.</p> <p>-Obtención MICs por ETestW.</p>	<p>-A lo largo del tratamiento surgieron fenotipos hVISA y VISA.</p> <p>-Todos los MICs aumentaron con los días de exposición en todos los antibióticos.</p> <p>-Para Q/D susceptibilidad reducida con el aumento del tiempo de exposición: MIC \geq 1 mg/L.</p> <p>-Para linezolid y tigeciclina susceptibilidad frente a las cepas en todo el tratamiento pero con aumento de MIC.</p>	13
<p>Resultados de susceptibilidad a diferentes antibióticos</p>	<p>-60 aislados clínicos de <i>S. aureus</i> obtenidos de un hospital de Malasia durante 2009-2010:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 30 aislados MRSA con 6 principales tipos de secuencia. • 30 aislados MSSA con 20 tipos de secuencia. <p>-Pruebas de sensibilidad con determinación de MICs y MBCs para: vancomicina, amoxicilina/ac.clavulónico, daptomicina, linezolid y tigeciclina.</p>	<p>-Diferenciación entre cepas MSSA y MRSA por tipificación molecular de: <i>SCCmec</i>, <i>spa</i> y MLST.</p> <p>-Determinación de MIC (MIC 50 y MIC 90): inoculación de un gradiente de concentraciones (0,016 y 256 g/ml) de cada antibiótico en placas de Mueller-Hinton y posterior utilización de tiras de prueba E (BioMerieux SA, Francia).</p> <p>-Determinación MBCs (MBC50 y MBC90) por microdilución con caldo de Mueller- Hinton.</p>	<p>-Todos los clones fueron susceptibles a los 5 antibióticos excepto el 26,66% y el 63,33% de las cepas MRSA que fueron resistentes a tigeciclina y amoxicilina/Ac. Clavulónico.</p> <p>-La tigeciclina obtuvo los valores más bajos de CIM90 y MBC90.</p> <p>-La vancomicina presentó el valor CIM90 más alto.</p>	14

Los aislamientos con sensibilidad intermedia a vancomicina (h-VISA, VISA) se observaron por primera vez en la década de los 90. La resistencia al linezolid fue detectada en casos clínicos un año después de su aprobación, en 2001, aunque su incidencia en Gram-positivas sigue siendo baja (< 0,5%). La resistencia a daptomicina en *S. aureus* también ha surgido y con una incidencia mayor que la del linezolid, pero con una baja prevalencia, al igual que para la tigeciclina aunque su sensibilidad es aún muy alta¹⁵. Debido a este progresivo surgimiento de resistencia que reduce

las opciones terapéuticas, la ceftarolina es una incorporación muy importante por existir evidencia de eficacia comparable, e incluso valores de MIC inferiores (se detalla en la sección siguiente), a estos antibióticos de primera línea. Además, estos datos sustentan la necesidad urgente de búsqueda de nuevos andamios químicos procedentes de fuentes de origen natural y vegetal dejando entrever su protagonismo futuro en la terapéutica.

Nuevos tratamientos contra MRSA: ceftarolina, y otros compuestos

CEFTAROLINA

	ESTUDIO	TAMAÑO MUESTRA	CARACTERÍSTICAS ESTUDIO	RESULTADOS	CITA
ESTUDIOS DE REGISTRO	Estudio fase II	-100 pacientes con cSSSI. (De los que 88 fueron considerados evaluables). -Pacientes de 15 centros de los EEUU, américa del Sur, África del Sur y Rusia.	-Estudio aleatorizado, de simple ciego, con control activo y grupos paralelos. -Los pacientes fueron asignados aleatoriamente en una proporción 2:1 para recibir 600 mg de ceftarolina cada 12 horas vía intravenosa o el tratamiento estándar con vancomicina de 1g/12h vía IV durante 7-14 días.	-Eficacia y tolerabilidad con ceftarolina no mostraron ser diferentes a las del tratamiento estándar. -El 96.7% del grupo de la ceftarolina y el 88.9% del grupo de la vancomicina lograron curación clínica. -Respuesta microbiológica semejante en ambos grupos: erradicación en el 95.2% de los pacientes del grupo de la ceftarolina y 85.7% en el grupo de la vancomicina.	16
	Estudios para cSSSI: CANVAS I, II	-1378 pacientes con cSSSI de los que 693 recibieron fosamil ceftarolina. -Pacientes de 111 centros de 14 países entre febrero de 2007 y diciembre de 2007.	-Estudio de fase III, doble ciego, controlados y aleatorizados en adultos con cSSSI. --Ceftarolina Vs combinación vancomicina (glucopéptido) y aztreonam (monobactama) en las infecciones de la piel y estructuras de la piel (cSSSI).	-MIC para ceftarolina: 0.06-2 mg/L con MIC90 0.5 mg/L. -Para patógenos Gram-positivos no diferencias en las tasas de curación clínica entre ceftarolina y vancomicina-aztreonam con un 93.8% frente al 94.3%.	16, 17, 18

			-Grupo de 693 pacientes con ceftarolina recibieron 600 mg/12 h vía IV y 685 pacientes recibieron 1 g de vancomicina y 1 g de aztreonam cada 12 h por vía IV. -Tratamiento durante 7-8 días.	-Para patógenos Gram-negativos la tasa de curación fue inferior para ceftarolina en comparación con el grupo de tratamiento base: 95.3% frente al 100%. -Ceftarolina bien tolerada y efectos adversos similares a los de los comparadores.	
Estudios para NAC: FOCUS I, II	1240 pacientes adultos hospitalizados con neumonía adquirida en la comunidad (NAC) grave. Sujetos de 26 países de Asia, África, Europa y América	-Estudio de fase III, doble ciego, controlados y aleatorizados. -Ceftarolina Vs ceftriaxona (cefalosporina 3ª generación) en el tratamiento de neumonía asociada a la comunidad (NAC). -621 pacientes recibieron 600 mg/12h vía IV de ceftarolina y 619 pacientes recibieron 1g/12h vía IV de ceftriaxona. -Tratamiento durante 5-7 días.	-MIC ceftarolina frente a <i>S.aureus</i> : 0.12-0.5 mg/L con CIM90 de 0.25 mg/L -Tasas mayores de éxito para ceftarolina que para ceftriaxona. -Respuesta microbiológica favorable de ceftarolina contra <i>S. aureus</i> con un éxito del 76%. Para ceftriaxona fue del 70.4% -Tasa de curación por NAC causada por <i>S. aureus</i> de un 72% frente al 60% de la ceftriaxona.	16, 17, 19	

OTROS COMPUESTOS

COMPUESTO	CARACTERÍSTICAS DEL ESTUDIO	RESULTADOS	CITA
ANTRACIMICINA: Compuesto marino obtenido de la cepa de <i>Streptomyces</i> .	- Estudio sobre 14 cepas de <i>S. aureus</i> y sobre otros patógenos como <i>E. faecalis</i> , <i>K. Pneumoniae</i> y <i>A. baumannii</i> . -Determinación de MIC mediante microdilución en caldo. -Determinación cinética de letalidad (a partir de muestras	-Actividad potente frente a todas las cepas de <i>S. aureus</i> ensayadas incluyendo MSSA, MRSA y VRSA con MIC < 0.25 mg/ L. -La actividad frente a Gram-positivos fue potente pero disminuida un 20% en presencia de suero humano (baja estabilidad) aunque con efectos sobre MRSA a concentraciones sub-MIC.	20

	<p>al 0x, 1x, 5x, 10x o 20x MIC).</p> <p>-Cálculo del efecto post-antibiótico (con muestras al 1x y 10x MIC).</p> <p>-Citotoxicidad en células de mamíferos con la línea del carcinoma cervical humano HeLa.</p> <p>-Estudios de mecanismos de acción acción por control de la incorporación de precursores radiomarcados de ADN ([3H- timidina]), ARN ([3H]-uridina), síntesis de Proteínas ([3H]- Leucina) y de la pared celular ([3H]- N-acetilglucosamina) a dosis crecientes de la especie vegetal.</p>	<p>-Antracicina no es activa frente a patógenos Gram-negativos importantes como <i>Klebsiella pneumoniae</i> y <i>Acinetobacter baumannii</i> con MIC > 64 mg/ L.</p> <p>-Efectos post-antibióticos mínimos (crecimiento bacteriano rápido tras la eliminación del fármaco) pero potente y rápida actividad bactericida.</p> <p>-Compuesto mínimamente tóxico para células humanas.</p>	
<p>ARCILLA MINERAL NATURAL DEL LAGO KISAMEET</p>	<p>-Estudio de perfil de resistencia antibacteriana sobre 16 cepas de patógenos ESKAPE de la ciudad de Vancouver.</p> <p>-Ensayo in vitro para determinar su efecto frente a patógenos ESKAPE (<i>Enterococcus faecium</i>, <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Klebsiella pneumoniae</i>, <i>Acinetobacter baumannii</i>, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Enterobacter</i>).</p> <p>-Estudio de viabilidad de cepas por siembra de diluciones a las 0, 5 y 24 h de la siembra.</p>	<p>-Actividad bactericida potente frente a cepas de Enterobacterias y <i>A. baumannii</i> tras 5 horas de exposición y actividad bactericida potente frente a cepas de <i>S.aureus</i>, <i>K. pneumoniae</i>, entre otras, a las 24 h de exposición (diferente susceptibilidad y espectro de acción).</p> <p>-Los extractos acuosos de la arcilla demuestran el mismo espectro facilitando su uso para preparaciones definidas.</p> <p>-Presenta también propiedades anti-fúngicas y dispersión de biopelículas.</p>	21
<p>DEFENSINA MIMÉTICA DE PLOMO BAS00127538</p>	<p>-Identificación, caracterización química y base molecular de unión de diversos compuestos que imitan las interacciones de α- defensinas humanas como HNP1 y el peptidoglicano o lípido II.</p> <p>-Ensayo de actividad antibacteriana contra <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i>. Determinación de MIC de la defensina mimética de plomo BAS00127538 mediante Micromyx para cepas</p>	<p>-De los 75 compuestos, 28 (37.6%) mostraron acción específica frente a MRSA, 6.6% fueron igualmente activos contra <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i> y el 46% no mostraron actividad.</p> <p>-La defensina mimética de plomo BAS00127538 fue de las más activas con potente actividad tanto frente a Gram-positivos como Gram-negativos.</p>	22

	<p>bacterianas clínicamente relevantes y estudio de citotoxicidad contra dos líneas celulares humanas.</p> <p>-Estudio de la base molecular de unión entre defensina-Lípido II.</p>		
<p>EXTRACTO DE DUABANGA GRANDIFLORA (F – 10)</p>	<p>-Estudios de efectos de inhibición de F – 10 sola y en combinación con un fármaco beta-lactámico, la ampicilina, frente a cepas MRSA.</p> <p>- Cálculo de MIC mediante la microdilución en caldo.</p> <p>-Estudio de la actividad sinérgica usando un tablero de ajedrez methodand para examinar crecimientos cinéticos.</p>	<p>-MIC de F – 10 contra MRSA fue 750 mg/L lo que supuso una acción cuatro veces superior a la de su extracto crudo (MIC: 300 mg/ L).</p> <p>-Como resultado de la interacción sinérgica, el MIC de F-10 y ampicilina fue 64 veces inferior a la concentración necesaria para la ampicilina sola frente a MRSA: 0.78 mg/ L frente a MIC 50 mg/ L.</p> <p>-Western blot sugiere la inhibición de PBP2a de cultivos MRSA que crecen bajo un tratamiento conjunto de F-10 y ampicilina.</p>	23
<p>EUGENOL (4-alil-2-metoxifenol)</p>	<p>-Se aislaron 72 cepas clínicas de <i>S.aureus</i> (43MRSA y 29 de MSSA) identificadas en el Departamento de Microbiología Clínica del hospital universitario de Dongguk Ilsan, Goyang, Corea del Sur.</p> <p>-Evaluación del efecto del eugenol en la formación de biopelículas de MRSA y MSSA tanto in vitro como sobre la colonización bacteriana usando el modelo in vivo de la otitis media (OM).</p> <p>-determinación de MIC y MBC utilizando el método de microdilución en caldo y su efecto en la formación de biopelículas por el ensayo de placa de CV-microtiter. - Estudio capacidad de matar bacterias dentro de las biopelículas y su efecto sinérgico con carvacrol por la prueba del tablero de ajedrez.</p>	<p>-Los valores de MIC de eugenol para <i>S. aureus</i> variaron entre 0,01% a 0,04%, con el MBC aproximadamente dos veces superior de la MIC.</p> <p>-No se observaron diferencias en los valores de CIM entre el MRSA y MSSA.</p> <p>-Eugenol disminuyó significativamente la formación de biopelículas in vitro en MRSA y MSSA: A bajas concentraciones, la disminución en el crecimiento de biopelícula era dependiente de la dosis, alcanzando la inhibición completa de la formación de biopelículas en concentraciones más altas.). Las biomásas de biopelículas se redujeron significativamente tras el tratamiento eugenol. Del mismo modo, el número de bacterias viables se redujeron significativamente en las biopelículas tratadas con eugenol.</p> <p>-Efecto sinérgico de eugenol con carvacrol (fenol monoterpénoide constituyente del orégano) contra las biopelículas de <i>S.aureus</i>. El MBEC se redujo 4 veces.</p>	24

DISCUSIÓN

De entre todos los grupos de antibióticos, las cefalosporinas es la clase más prescrita debido a tres de sus características: amplio espectro de actividad, eficacia demostrada y elevada seguridad²⁵. En base a su espectro de actividad se encontraban clasificadas en cuatro generaciones hasta que en 2003 Ishikawa et al. descubrió la fosamil ceftarolina²⁶. Este nuevo antibacteriano, junto al ceftobiprol, forman una nueva subclase cuya actividad está dirigida principalmente frente a bacterias Gram-positivas y, especialmente, contra MRSA (característica más distintiva) dando lugar así a la quinta generación. Estas cefalosporinas anti-MRSA son los beta-lactámicos nuevos más importantes²⁷.

En este momento, los fármacos de primera línea para infecciones por *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) son la vancomicina, daptomicina, linezolid y, como la más reciente incorporación, la ceftarolina²⁸. El 8 de septiembre de 2010, recibió la aprobación de la FDA para el tratamiento de las infecciones complicadas de la piel y estructuras de la piel (por estudios de registro CANVAS I y II), y para la neumonía asociada a la comunidad (por estudios FOCUS I y II) con el nombre comercial de teflaro[®]. Posteriormente, en 2012, fue aprobada por la Agencia Médica Europea (EMA) con la denominación comercial de zinforo[®]. Otra cefalosporina, el ceftobiprol, fue, en realidad, la primera en completar los ensayos clínicos de fase III pero no obtuvo la aprobación de la FDA^{25, 26, 27}.

Ceftarolina presenta actividad contra bacterias Gram-positivas entre las que destacan, por relevancia clínica, *S.pneumoniae*, *S.aureus* y *S.pyogenes*; y también algunas especies gram-negativas (*Haemophilus influenzae* y *Moraxella catarrhalis*), incluyendo fenotipos resistentes^{16, 18}. Esta acción es de elevada importancia pues es el único antibiótico aprobado para utilizar frente a hetero-resistentes a la vancomicina (h-VISA) y resistentes a la vancomicina (VRSA)¹⁵.

La ceftarolina es el metabolito activo del fosamil ceftarolina, profármaco que tras ser administrado por vía intravenosa es convertido por fosfatasas plasmáticas en la forma bioactiva¹⁸.

La base de la superación de la resistencia de MRSA por los beta-lactámicos es, como se he mencionado, determinada por la presencia de PBP2a codificada por el gen *mecA* adquirido como elemento genético móvil junto al casete cromosómico *mec* (SCC*mec*). Esta

enzima tiene baja afinidad por beta-lactámicos tradicionales por dos factores: elevada constante de asociación para formar el complejo reversible Michaelis en el sitio activo (PBP2a- beta-lactámico) y por una baja constante de velocidad para, en un segundo paso, formar la especie acil-enzima por enlace covalente con la serina S398^{28, 29}.

La química farmacéutica que detalla su síntesis fue desarrollada a partir del cefozopran, cefalosporina de cuarta generación. En este grupo de antibióticos, los perfiles de actividad dependen de la variación en la cadena lateral del grupo acil-amino en posición 7 del anillo beta-lactámico, y de la sustitución del anillo cefem (dihidrotiazina)²⁶. En base a esto, la afinidad por PBP2a se debe al grupo alcoxi-imina del resto acilo de C-7 y es potenciada por el espaciador en C3 del anillo cefem que es un 2 tiotiazol^{16,26}. El grupo oxima mantiene el espectro de las cefalosporinas de tercera y cuarta generación. Estudios recientes como lo es la cristalografía de rayos X, representan la enzima PBP2a como una proteína con un dominio alostérico a 60Å del sitio activo. Ambos sitios están implicados en la catálisis y a ambos se puede unir la ceftarolina^{18,28,30}. Estas son nociones sustentadas en el modelo estructural para dicha enzima. PBP2a presenta un sitio activo cerrado pero debe poder acoplar las dos hebras del peptidoglicano para realizar su función transpeptidasa; dicha explicación se haya en el alosterismo. De tal forma que existen tres ligandos alostéricos: ácido murámico (monómero del peptidoglicano), el remanente acil-D-ala-D-ala del peptidoglicano y la anti-MRSA ceftarolina. La unión de la cefalosporina de 5ª generación de forma reversible al sitio alostérico induce un cambio conformacional que abre el sitio activo para producir el complejo inhibidor acil-enzima, capacidad que no poseen los beta-lactámicos usuales^{28,30}. La falta de esta acción mimética en los b-lactámicos tradicionales, se entiende por la ausencia de ese dominio alostérico en las conformaciones de las PBP nativas tal y como se concluye de las técnicas de rayos X a las que también han sido sometidas³⁰.

A pesar de que ceftarolina o ceftobiprol tiene, como se muestra en las tablas de resultados, óptima actividad contra MRSA, han surgido algunas resistencias y de ahí la mención a la existencia de fenotipos de resistencia y de ineficacia en su uso clínico con MICs de 2 mg/ml a 4 mg/ml^{28,30}. Dos aislados clínicos mostraron dos mutaciones en el sitio alostérico de PBP2a (N146K y E150K) que afectaron en su interacción con el antibiótico; y otra cepa que, además, contiene una tercera mutación, pero fuera del sitio alostérico (H351N). Esta alteración afecta en la propagación de la señal que induce el aumento de volumen del sitio activo de 500 a 1300 Å^{28,30,31}. Además del cambio en uno de los bolsillos de unión, la inhibición por parte de la ceftarolina también podría vencerse interfiriendo en la dimerización

entre PBP2a-PBP2 por mutaciones en dicho dominio de dimerización y pérdida de la actividad transpeptidasa, ya que es dependiente de la actividad transglicolasa de PBP2 nativa³¹.

Hay un número de antibióticos prometedores en desarrollo para el tratamiento de las bacterias gram-positivas²⁵. El avance en la innovación es importante por los variados mecanismos de virulencia y la rápida transmisión de genes de resistencia sobre los beta-lactámicos que presenta MRSA. Por esto, es necesario, además de buscar fármacos dirigidos a viejas dianas terapéuticas, la búsqueda de nuevas clases de antibióticos y contar con la posible combinación entre productos naturales con los antibióticos ya disponibles. Vamos a profundizar en los cinco compuestos ya mencionados en el apartado de resultados.

Según Henslera et al.²⁰, la antracimicina es un nuevo compuesto de origen marino obtenido de la cepa *Streptomyces* con actividad tanto in vitro como in vivo frente a MSSA, MRSA y VRSA. La actividad in vitro se determinó por microdilución en caldo y su eficacia in vivo por su capacidad para proteger a ratones infectados por MRSA de peritonitis. Dichos resultados indican actividad in vitro e in vitro del compuesto además de tolerancia en el organismo. Para complementar los resultados se investigó su mecanismo de acción mediante el ensayo de síntesis macromolecular optimizado. Dicho método consiste en utilizar el incremento progresivo en la dosis del compuesto para evaluar la incorporación de precursores radiomarcados en la síntesis y formación de la pared celular. El aumento de la concentración de antracimicina, llevó a una menor incorporación tanto de H-timidina, H-rdina y H-Leucina. Esto sugiere que su mecanismo de acción está relacionado con la alteración de la síntesis de ADN y ARN de las bacterias aunque se ha confirmado que no es por intercalación. Estos efectos óptimos la posicionan como una molécula base sobre la que actuar químicamente y vencer así las limitaciones que presenta de estabilidad y por falta de conocimiento sobre su acción sobre el sistema inmune.

Otro compuesto que parece tener prometedoras propiedades frente a los patógenos Eskape (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y especies de Enterobacterias) es la arcilla Kisameet, un tipo de arcilla natural que se encuentra en el lago Kisameet en una provincia de Canadá. Es una arcilla con propiedades diferentes por su mayor riqueza en biotita. Se trata de un compuesto cuyo uso ya es histórico para combatir numerosas enfermedades (agente natural antiguo). Se ha utilizado para tratar desde artritis y blebitis a úlceras y quemaduras. En cuanto a su actividad antibacteriana aún no está dilucidada, pero

por técnicas de rayos X y análisis químicos se ha atribuido a los 1000-3000 taxones bacterianos que presenta, entre los que se encuentran las actino-bacterias o actinomicetos pues son productoras de pequeñas moléculas bioactivas. Por no estar evidenciado dicho mecanismo, por la falta de estudios sobre su acción sinérgica con otros antibacterianos y falta de determinación de su citotoxicidad en modelos animales, se considera como una posible opción terapéutica futura aunque no de primera línea²¹.

Se ha mencionado a ceftarolina y ceftobiprol como antibióticos cuya diana es una enzima necesaria para la transpeptidación del peptidoglicano que forma la pared bacteriana, pero no es la única utilizada para interferir en la síntesis de la pared celular pues el propio peptidoglicano o lípido II también lo es. Para actuar en este nivel, se han sintetizado diversas moléculas sintéticas que imitan la interacción natural que existe en el organismo entre el lípido II y las defensinas humanas, péptido humano 1 del neutrófilo (HNP1). El lípido II es un buen objetivo terapéutico por dos propiedades clave: síntesis limitada y rápida tasa de rotación. El principal compuesto fue el BA500127538, una defensina de plomo que fue la que obtuvo la mayor fuerza de unión. Por ello, fue la seleccionada para realizar estudios de actividad anti-bacteriana. En las pruebas de determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) en comparación con otros agentes, demostró una elevada eficacia frente a Gram-positivas, con valores de MIC de 0,5 mg/ml, y acción frente a ciertas Gram-negativas. Este avance es importante, pues el único antibacteriano eficaz aprobado cuya diana sea el lípido II es la vancomicina²².

La PBP2a también puede ser bloqueada por productos naturales como la fracción bioactiva F-10, extraída de las hojas de *Duabanga grandiflora*. No posee efecto anti-MRSA por sí sola, pero los estudios sí han sido concluyentes en su acción sinérgica en combinación con un beta lactámico como lo es la ampicilina. Los estudios de dicha sinergia fueron reportados por Carolina Santiago et al.²³ y se basó en el método del tablero de ajedrez para cuantificar la concentración inhibitoria fraccional (FIC). En este experimento, cepas de MRSA se cultivaron con concentraciones sub-inhedoras de F10 (1/4 x MIC, 1/8 x MIC, 1/16 x MIC y 1/32 x MIC) en combinación de concentraciones sub-inhedoras de ampicilina (1/2x MIC a 1/64x MIC). En los resultados, 10 de los 24 tratamientos probados tuvieron un índice de FIC ≤ 0.5 , lo que indica que existe sinergia entre ambos compuestos. El efecto sinérgico más destacable se obtuvo en la combinación de 1/4x MIC de F-10 con 1/64x MIC de ampicilina. Mediante el análisis de transferencia de Western, se estudió la base farmacológica de dicho tratamiento conjunto y se determinó su relación con la inhibición

completa de PBP2a. F-10 interfiere en los genes implicados en la expresión de mecA cuya expresión está estimulada por la presencia de los antibióticos beta-lactámicos.

La eficacia de un fármaco anti-MRSA no solo depende de su capacidad para detener el crecimiento bacteriano o de su poder bactericida, sino por su acción sobre la formación de biopelículas²⁴. Actualmente, únicamente la daptomicina y la telavancina están aprobados para tratar este tipo de infecciones de *S. aureus*. La daptomicina se incorporó a la terapia en 2003 y la telavancina en 2009. Aun así, en modelos de ratón, se ha observado la ineficacia de la daptomicina en el control de los diversos tipos de infecciones estafilocócicas caracterizadas por biofilms. En la búsqueda de alternativas, uno de estos compuestos a mencionar es el eugenol (4-alil-2-metoxifenol). Es un compuesto activo del aceite de clavo con diversas propiedades beneficiosas para la salud: Antimicrobiano, antioxidante y antiinflamatorio que proporciona una opción para tratar enfermedades en las que *S. aureus* se encuentre organizado en estructuras complejas o biopelículas²⁴.

La actividad del eugenol en la formación de estas biopelículas se estudió tanto por experimentos in vitro como in vivo. Para la actividad in vitro, se utilizó el ensayo de placa de microtitulación para 72 cepas (43 MRSA y 29 MSSA) obtenidas de un hospital de Corea del Sur. Cinco de ellas fueron resistentes, además, a eritromicina, clindamicina y gentamicina. Las placas de microtitulación de 96 pocillos con suspensiones celulares, se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Unas contenían el eugenol y otras la sustancia control DMSO. Tras la incubación, se tiñeron utilizando el violeta cristal para cuantiar por determinación de la absorbancia a 570 nm. Los resultados de este ensayo y el recuento de ufc indicaron que el eugenol inhibe el crecimiento de biofilms tanto en cepas MRSA como en las MSSA de una forma dosis dependiente. Los valores de MIC oscilaban en el rango de 0.01% y 0.04% de eugenol, los de MBC fueron, aproximadamente, 2 x MIC y con una concentración de 0.5 x MIC el tamaño de las biopelículas, tanto en MRSA como en MSSA se redujo en un 50%. Además, su eficacia frente a la colonización in vivo se ensayó en ratas con otitis infectas por la bacteria. En unas se inoculó el eugenol y en otras el DMSO. Los recuentos de ufc para los tratados con DMSO fue de 1.96×10^6 , mientras que las tratadas con eugenol fue de 2.23×10^5 . Se trata, pues, de una disminución significativa ($p < 0.003$) del 88% en la colonización de *S. aureus*²⁴.

El perfil de investigación de este trabajo aporta, tanto una línea alternativa y paralela como complementaria, para el tratamiento de infecciones por MRSA además de nociones

básicas para su control. Esta línea de soporte a la línea utilizada en la terapia actual se basa en la explotación de los compuestos que nos pueden ofrecer las fuentes naturales y la síntesis de moléculas dirigidas a nuevas dianas.

CONCLUSIONES

- La persistencia de MRSA como un patógeno y la continua proliferación de sus mecanismos de resistencia a antibióticos, lleva a la necesidad de nuevas estrategias para la incorporación de nuevos antibacterianos al arsenal disponible.
- La investigación sobre las propiedades básicas de PBP2a ha revelado nuevas dianas para la intervención terapéutica.
- La ceftarolina supone la incorporación a la terapia de las infecciones complicadas de la piel y estructuras de la piel, y para la neumonía asociada a la comunidad causada por MRSA de un fármaco con proyección futura por su novedoso mecanismo antibacteriano al presentar afinidad por PBP2a y PBP2x.
- Hasta la fecha, salvo las excepciones mencionadas, no se han detectados casos clínicos de resistencia a la ceftarolina, y múltiples publicaciones han establecido la MIC₅₀ y la MIC₉₀ para cepas MRSA en de 0.5 y 1 µg/ ml, respectivamente. El aumento de los CIM se asocia con una disminución de la afinidad de unión a PBP2a y reflejan alteraciones en PBP2a.
- Hay una gran necesidad de buscar nuevas fuentes para la obtención de agentes anti-MRSA. El mundo marino y el mundo vegetal son los lugares ideales para la obtención de drogas con acción anti-microbiana.

BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organ. Race against time to develop new antibiotics. Bull World Health Organ 2011; 89: 88-89/
doi:10.2471/BLT.11.030211
2. Morell EA, Balkin DM. Methicillin-resistant Staphylococcus Aureus: A Pervasive Pathogen Highlights the need for new Antimicrobial development. Yale Journal of biology and medicine 2010; 83:223-233
3. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. Resistencia bacteriana. Panorama actual del medicamento 2015; 39 (389): 964-992
4. Zervosen A, Sauvage E, Frère JM, Charlier P, Luxen A. Development of New Drugs for an Old Target — The Penicillin Binding Proteins. Biomacromolecules 2012; 17: 12478-12505.
5. Rotger R. Microbiología sanitaria y clínica. Madrid: Síntesis; 1997
6. Rehm SJ, Tice A. Staphylococcus aureus: Methicillin-Susceptible S. aureus to Methicillin-Resistant S. aureus and Vancomycin-Resistant S. aureus. Clin Infect Dis 2010; 61:8176-8182
7. Chua K, Laurent F, Coombs G, Lindsay Grayson M, Howden BP. Not Community-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (CA-MRSA) A Clinician's Guide to Community MRSA - Its Evolving Antimicrobial Resistance and Implications for Therapy. Clin Infect Dis 2011; 52:99-114
8. Harastani HH, Tokajian ST. Community-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Clonal Complex 80 Type IV (CC80-MRSA-IV) Isolated from the Middle East: A Heterogeneous Expanding Clonal Lineage. Plos One 2014; 9(7): e103715
9. Johnson AP. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: the European landscape. J Antimicrob Chemoth 2011; 66 Suppl 4: iv43 – iv48
10. Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, Ito T. The emergence and evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Trends Microbiol 2001; 9 (10): 486 – 493
11. Alekshun MN, Levy SB. Molecular Mechanisms of antibacterial multidrug resistance. Trends Cell Biol 2007; 128: 1037-1050
12. Malachowa N, DeLeo FR. Mobile genetic elements of Staphylococcus aureus. Cell. Mol. Life Sci 2010; 67: 3057 – 3071
13. Van Hal SJ, Steen JA, Espedido BA, Grimmond SM, Cooper MA, Holden MTG et al. In Vivo evolution of antimicrobial resistance in a series of Staphylococcus aureus patient isolates: the entire picture or a cautionary tale? J Antimicrob Chemoth 2014; 69: 363 – 367
14. Sahab Atsgan Sa, Nor Shamsudin M, Thian Lung LT, Sekawi Z, Pei Pei C, Karunanidhi A et al. Genotypically Different Clones of Staphylococcus aureus Are Diverse in the Antimicrobial Susceptibility Patterns and Biofilm Formations. Bio Med Res Int 2013; Article ID515712
15. Rincón S, Panesso D, Díaz L, Carvajall LP, Reyes J, Munita JM, et al. Resistencia a antibióticos de última línea en cocos Gram positivos: la era posterior a la vancomicina. Biomedica 2014; 34(0 1):191–208
16. Poon H, Chang MH, BA, Fung HB. Ceftaroline Fosamil: A Cephalosporin With Activity Against Methicillin-Resistant

- Staphylococcus Aureus. Clin Ther 2012; 34:743-765
17. Saravolatz LD, Stein GE, Johnson LB. Ceftaroline: A Novel Cephalosporin with Activity against Methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Clin Infect Dis 2011; 52:1156-1163
18. Beresford E, Biek D, Jandourek A, Mawal Y, Riccobene T, Friedland HD. Ceftaroline fosamil for the treatment of acute bacterial skin and skin structure infections. Clin. Pharmacol 2014; 7 (2): 123 – 135
19. Critchley IA, Eckburg PB, Jandourek A, Biek D, Friedland HD, Thye DA. Review of ceftaroline fosamil microbiology: integrated FOCUS studies. J Antimicrob Chemoth 2011; 66 suppl 3: iii 45 – iii 51
20. Hensler ME, Jangc KH, Thienphrapaa W, Vuonga L, Trana DN, Soubiha E, et al. Anthracimycin Activity Against Contemporary Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. J Antibiot. 2014; 67(8): 549–553
21. Behroozian S, Svensson SL, Davies J. Kisameet Clay Exhibits Potent Antibacterial Activity against the ESKAPE Pathogens. mBio 2016; 7(1): e01842-15. doi: 10.1128/mBio.01842-15
22. Varney KM, Bonvin AMJJ, Pazgier M, Malin J, Yu W, Ateh E et al. Turning Defense into Offense: Defensin Mimetics as Novel Antibiotics Targeting Lipid II. PLoS Pathog 2013; 9(11): e1003732
23. Santiago C, Pang EL, Lim KH, Loh HS, Ting KN. Inhibition of penicillin-binding protein 2a (PBP2a) in methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) by combination of ampicillin and a bioactive fraction from Duabanga grandiflora. BMC Complem. Altern. M. 2015; 15(178): DOI 10.1186/s12906-015-0699-z
24. Yadav MK, Chae S-W, Im GJ, Chung J-W, Song J-J. Eugenol: A Phyto-Compound Effective against Methicillin-Resistant and Methicillin-Sensitive Staphylococcus aureus Clinical Strain Biofilms. Plos One 2015; 10(3): e0119564. Doi: 10.1371/ journal.pone.0119564
25. Bassetti M, Merelli M, Temperoni C, Astilean A. New antibiotics for bad bugs: Where are we? Ann. Clin. Microb. Anti 2013; 12(22): 1-15
26. Darpan K, Sudeep R, Ankit J. Ceftaroline: a comprehensive update. Int. J. Animicrob. Ag 2011; 37: 389-395
27. Bush K. Improving known classes of antibiotics: an optimistic approach for the future. Curr. Opin. Pharmacol 2012; 12: 527 – 534
28. Fishovitz J, Jermoso JA, Chang M, Mobashery S. Penicillin-binding Protein 2a of Methicillin-resistant Staphylococcus aureus. IU MBM Life 2014; 66(8): 572-577
29. Kim C, Milheirico C, Gardete S, Holmes MA, Holden M, de Lencastre H, et al. Properties of a Novel PBP2A Protein Homolog from Staphylococcus aureus Strain LGA251 and Its Contribution to the β -Lactam-resistant Phenotype. J. Biol. Chem 2012; 287(44): 36854 – 36863
30. Otero LH, Rojas-Altuve A, Llarrull LI, Carrasco López C, Kumarasiri M, Lastochkin E, et al. How allosteric control of Staphylococcus aureus penicillin binding protein 2a enables methicillin resistance and physiological function. PNAS 2013; 110: 16808–16813.
31. Alm RA, Mclaughlin RE, Kos VN, Sader HS, Iaconis JP, Lahiri SD. Analysis of Staphylococcus aureus clinical isolates with reduced susceptibility to ceftaroline: an epidemiological and structural perspective. J Antimicrob Chemoth 2014; 69: 2065 – 207