

MUTAÇÕES NO GENE RRNA 23S ASSOCIADAS COM A RESISTÊNCIA À LINEZOLIDA EM *STAPHYLOCOCCUS SPP*¹

MUTATIONS IN 23S RRNA GENE ASSOCIATED WITH RESISTANCE TO LINEZOLID IN *STAPHYLOCOCCUS SPP*

LAS MUTACIONES EN EL GEN 23S RRNA ASOCIADAS CON RESISTENCIA A LINEZOLID EN *STAPHYLOCOCCUS SPP*

Lara Mendes de Almeida¹, Elsa Masae Mamizuka²

RESUMO

Linezolida, primeira oxazolidinona aprovada para o uso clínico, é potencialmente ativa contra importantes patógenos bacterianos, incluindo *Staphylococcus* spp. multi-resistentes. Esta nova oxazolidinona inibe a síntese protéica por se ligar ao centro peptidil-transferase (PTC) da subunidade 50S do ribossomo bacteriano. Embora a resistência à linezolida possa ser mediada pela metilação do rRNA 23S na posição A2503 promovida pelo gene *cfr* ou por mutações nas proteínas ribossômicas L3, L4 e L22, o mecanismo de resistência mais comum deve-se a mutações no domínio V do gene rRNA 23S, sendo G2576T a mutação identificada com maior frequência em isolados clínicos de diferentes gêneros resistentes ao

fármaco. O propósito dessa revisão é apresentar as principais mutações identificadas no rRNA 23S associadas com a resistência à linezolida e discutir a relação entre a posição dos nucleotídeos mutados, o número de alelos do gene rRNA 23S que contém essas mutações e os níveis de resistência apresentados por isolados de *Staphylococcus* spp resistentes ao fármaco.

Palavras-chave: linezolida; resistência; *Staphylococcus*spp.

ABSTRACT

Linezolid, the first agent of the oxazolidinone class to be introduced clinically, is potentially active against important bacterial pathogens, including multi-resistant *Staphylococcus* spp. This new oxazolidinone inhibits protein biosynthesis by binding to the peptidyl transferase center (PTC) of the 50S subunit of the bacterial ribosome. Although linezolid resistance can be mediated by the *cfr*-encoded product or by mutations in the ribosomal proteins

¹ Aluna de pós-doutorado do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP)

² Prof. Dra. do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP)

L3, L4 and L22, the most common cause of resistance is due to mutations in the central loop of domain V of the 23S rRNA gene, being G2576T reported more frequently in linezolid-resistant clinical isolates. The focus of this review is to present the identified mutations in the 23S rRNA associated with resistance to linezolid and discuss the relation between the position of the mutated nucleotides, the number of 23S rRNA alleles containing these mutations and the resistance levels displayed by multidrug-resistant *Staphylococcus* spp.

Descriptors:linezolid; resistance; *Staphylococcus*spp.

RESUMEN

Linezolida, la primera oxazolidinona aprobada para uso clínico, es potencialmente activa contra importantes patógenos bacterianos, incluyendo *Staphylococcus* spp. multi-resistentes. Esta nueva oxazolidinona inhibe la síntesis de proteínas al unirse al centro peptidil transferase (PTC) de la subunidad 50S del ribosoma bacteriano. Aunque la resistencia a linezolida puede ser mediada por la metilación del rRNA 23S en la posición A2503 promovido por el gen *cfr* o por mutaciones en proteínas ribosomales

L3, L4 y L22, el mecanismo más común se debe a mutaciones en el dominio V de el gen rRNA 23S, siendo G2576T la mutación de mayor frecuencia en aislados clínicos resistentes al fármaco. El objetivo de este artículo es identificar las principales mutaciones en el gen rRNA 23S asociadas con la resistencia a linezolida y relacionar sitios de mutación, número de alelos mutados del gene rRNA 23S y los niveles de resistencia presentados por cepas de *Staphylococcus* spp resistentes a linezolida.

Palabras-clave: linezolida, resistencia, *Staphylococcus* spp.

INTRODUÇÃO

Linezolida (Zyvox; Zyvoxid; Zyvoxam) foi o primeiro fármaco de uma nova classe de antimicrobianos a ser aprovado para o uso clínico⁽¹⁾. Essa nova oxazolidinona é totalmente sintética e potencialmente ativa contra cepas multi-resistentes de importantes patógenos Gram-positivos, incluindo *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA), estafilococos coagulase-negativos (SCNs), *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* resistentes à vancomicina (VRE), *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus* spp. do grupo viridans e

sorogrupos de estreptococos β -hemolíticos^(2,3). Aprovada em abril de 2000 pelo Food and Drug Administration (FDA)⁽⁴⁾ para o tratamento de infecções de pele e do trato respiratório causadas por esses patógenos, o uso de linezolida foi inicialmente permitido para adultos e em 2005 para o uso pediátrico.

O uso de linezolida para o tratamento de infecções causadas por patógenos multi-resistentes, especialmente em UTIs, aumentou muito nos últimos anos. O desenvolvimento da resistência a essa oxazolidinona tem sido associado principalmente à prévia administração do antimicrobiano, embora alguns casos de infecção ou colonização por *Staphylococcus* spp. resistentes à linezolida em pacientes que não fizeram uso do fármaco já tenham sido relatados⁽⁵⁻⁸⁾.

A resistência à linezolida permanece pouco frequente desde a introdução do fármaco na prática clínica em 2000. No entanto, o número de relatos de isolados resistentes a essa nova opção terapêutica têm vindo crescendo em diferentes países, inclusive no Brasil⁽⁹⁻²²⁾.

Dados dos principais programas de monitoramento da sensibilidade a antimicrobianos como o SENTRY

(*Antimicrobial Surveillance Program*), ZAAPS (*Zyvox® Annual Appraisal of Potency and Spectrum program*) e LEADER (*Linezolid Experience and Accurate Determination of Resistance*) ainda mostram excelente atividade da linezolida em bactérias Gram-positivas isoladas em hospitais de todo o mundo⁽²³⁻²⁹⁾. Ao longo do período de 2004 a 2009, embora não se tenha detectado um aumento significativo da resistência à linezolida, novos mecanismos de resistência foram identificados, especialmente em estafilococos⁽²⁷⁾.

Basicamente, três mecanismos têm sido associados com a resistência à linezolida em cocos Gram-positivos⁽³⁰⁾: mutações na região central do domínio V do gene rRNA 23S^(9-18, 20-22), metilação do rRNA 23S na posição A2503 promovida pelo gene *cfr*(31-44) e mutações nos genes *rplC*, *rplD* e *rplV*, codificadores das proteínas ribossômicas L3, L4 e L22, respectivamente^(13, 45-47). Mais recentemente, alguns estudos tem atribuído à resistência à linezolida outros mecanismos diferentes da alteração do sítio de ligação do fármaco⁽⁴⁸⁻⁵¹⁾.

OBJETIVOS

Essa revisão sumariza os principais estudos que determinaram o sítio e o mecanismo de ação da linezolida no ribossomo bacteriano e apresenta as principais mutações no domínio V do gene rRNA 23S associadas com a resistência a essa oxazolidinona. Faz-se uma discussão sobre a relação entre a posição dos nucleotídeos mutados, o número de alelos portadores dessas mutações e os níveis de resistência apresentados por isolados clínicos de *Staphylococcus* spp. Alguns casos clínicos relacionados ao desenvolvimento de mutações ao longo de processos terapêuticos com linezolida serão mencionados.

METODOLOGIA

A metodologia empregada, por se tratar de uma revisão bibliográfica, foi a pesquisa em diferentes bibliotecas e sítios eletrônicos com o intuito de selecionar elementos para discutir especificamente o principal mecanismo de resistência à linezolida em *Staphylococcus* spp, a ocorrência de mutações nos múltiplos alelos do gene rRNA 23S presentes nas diferentes espécies do gênero desse importante patógeno bacteriano. A pesquisa não teve como critério a delimitação de um período para a seleção dos artigos.

REVISÃO DA LITERATURA

Sítio e mecanismo de ação da linezolida

O sítio de atuação e o mecanismo de ação dessa nova classe de antimicrobianos sintéticos não estavam totalmente esclarecidos na década de 1990, especialmente em relação à etapa da síntese proteica que poderia ser o alvo das oxazolidinonas⁽⁵²⁻⁵⁴⁾.

Em 1999, o mapeamento do operon rRNA de mutantes *Halobacterium halobium* selecionados com linezolida permitiu a identificação de sete mutações que alteravam seis posições de uma região central do domínio V do gene rRNA 23S, sugerindo que esse segmento do rRNA seria o sítio de ligação primário da linezolida nos ribossomos procariontes. O fato de esse sítio ser parte do centro peptidil-transferase (PTC) da subunidade ribossômica 50S permitiu inferir que a linezolida inibe a incorporação de fMet-tRNA ao complexo de pré-iniciação no processo da síntese proteica. Além disso, a análise dos efeitos da linezolida sobre a atividade da peptidil-transferase dos ribossomos de *H. halobium* excluiu a hipótese de que a linezolida e,

provavelmente outras oxazolidinonas, poderiam inibir a tradução por interferência direta na catálise da ligação peptídica, como ocorre com outros inibidores da síntese proteica⁽⁵⁵⁾.

Anos depois, um estudo com base em cristalografia de linezolida ligada à subunidade 50S do ribossomo de *Haloarcula marismortui* forneceu novos elementos para a compreensão do modo de ação desse fármaco no ribossomo bacteriano. Essa importante pesquisa mostrou que a linezolida se liga por meio de pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas a uma área localizada dentro do PTC. O anel oxazolidinona, que confere o nome ao grupo, mostrou-se posicionado na base U2539 de *H. marismortui* (correspondente à posição 2504 de *E. coli*) e tanto esse anel como a acetamida C-5 interagiram com uma parte específica da superfície do sítio A. A acetamida NH da linezolida formava uma ponte de hidrogênio com o grupo fosfato de G2540 (correspondente à posição 2505 de *E. coli*), enquanto a fração fluorofenil, supostamente, se acomodava em uma fenda formada pelos resíduos A2486 e C2487 (correspondentes, respectivamente, às posições 2451 e 2452 de *E. coli*) do PTC se envolvendo simultaneamente em interações com essas duas bases.

Este local, conhecido como fenda do sítio A, também é alvo de atuação de outros antimicrobianos e, possivelmente, local onde as cadeias laterais dos aminoácidos dos aminoacil-tRNAs se ligam⁽⁵⁶⁾.

Ainda no estudo de Ippolito et al.⁽⁵⁶⁾, foi observado que a ligação da linezolida induz algumas alterações significativas de conformação dentro do PTC. O antimicrobiano promove um giro das bases C2487 (correspondente à posição 2452 de *E. coli*) e U2539 (correspondente à posição 2504 de *E. coli*), permitindo a formação de importantes interações. C2487 oscila em direção à linezolida aparentemente para otimizar sua interação com o anel fluorofenil e a rotação de U2539, também induzida pela ligação da linezolida, resulta na acomodação desta base com o anel oxazolidinona. Este movimento altera a posição do grupo fosfato da base G2540, permitindo a formação de pontes de hidrogênio com a acetamida da linezolida. Essa análise permitiu inferir que, pelo fato de se sobrepor à parte aminoacil de um tRNA ligado ao sítio A, seria provável que a linezolida pudesse competir com os substratos que se ligam a esse sítio. No entanto, essa forma particular de ligação ao sítio A não explicava o modo como a linezolida poderia bloquear a ligação de

fMet-tRNA^{fMet} com o sítio P durante a etapa de iniciação da síntese protéica, como proposto por outros pesquisadores⁽⁵⁷⁾. Para essa outra suposta forma de interferência da linezolida, Wilson et al.⁽⁵⁸⁾ sugeriram uma atuação indireta do antimicrobiano na ligação de fMet-tRNA ao sítio P. A presença da linezolida no sítio A afetaria a ligação ou o posicionamento do peptidil iniciador, provavelmente induzindo uma alteração na conformação da base U2585 com a qual ela estabelece pontos de ligação. Como U2585 é essencial para o correto posicionamento do P-tRNA no sítio P, essa nova conformação não seria produtiva para a formação da ligação peptídica, acentuando a ação inibitória da linezolida.

Breve histórico dos relatos de casos de resistência à linezolida associados a mutações no domínio V do gene rRNA 23S

Diferentes mutações na região central do domínio V dos alelos rRNA 23S estão sendo associadas com a resistência à linezolida e os níveis de resistência ao fármaco dependem da posição dos nucleotídeos mutados e do número de alelos rRNA 23S portadores dessas bases alteradas. Dentre as mutações descritas até o momento,

G2576T é a substituição identificada com maior frequência em isolados clínicos resistentes à linezolida de diferentes gêneros de bactérias Gram-positivas.

Logo após a introdução da linezolida na prática clínica, os poucos casos de resistência a essa nova oxazolidinona ocorreram principalmente durante o tratamento de infecções mais complicadas causadas por VRE. O primeiro relato de resistência à linezolida em estafilococos foi feito por Tsiodras et al.⁽⁹⁾. Uma cepa MRSA (CIM > 32µg/ml de linezolida) isolada do fluido peritoneal de um paciente com 85 anos de idade com peritonite e outras três cepas resistentes à linezolida isoladas do fluido de diálise peritoneal apresentaram a mutação G2576T no domínio V do gene rRNA 23S. Um ano depois, a estabilidade do fenótipo resistente mediado por G2576T foi analisada por Pillai et al.⁽⁵⁹⁾. Os autores submeteram o isolado clínico MRSA previamente descrito por Tsiodras et al.⁽⁹⁾ a uma série de 15 passagens em meio sem linezolida ou qualquer outro antimicrobiano e observaram G2576T em cinco dos seis alelos rRNA 23S desse isolado, sem redução da CIM de linezolida (CIM de 64 µg/ml). Nenhuma diferença significativa em relação à taxa

de crescimento foi observada entre o isolado MRSA resistente à linezolida e outro sensível(ATCC 33591), o que levou os autores a inferir que a mutação G2576T não prejudicaria o metabolismo da bactéria e, portanto, não promoveria qualquer desvantagem seletiva.

Dois anos depois, no entanto, outro estudo mostrou que a CIM de linezolida de um isolado MRSA portador da mutação G2576T diminuiu de 16 para 8 µg/ml após 30 passagens em meio desprovido de qualquer antimicrobiano e de 8 para 2 µg/ml, depois de outras 30 passagens, correspondendo, respectivamente a 4 (*rrn1*, *rrn2*, *rrn3*, *rrn5*), 2 (*rrn2*, *rrn3*) e apenas 1 (*rrn2*) alelo mutado⁽¹¹⁾. As passagens adicionais até a redução da CIM de linezolida e a presença de um alelo selvagem preservado no isolado clínico *S. aureus* em questão poderiam, segundo os autores, explicar a reversão ao fenótipo sensível na ausência da pressão do antimicrobiano. O alelo selvagem poderia atuar como um *template* no processo de recombinação homóloga, promovendo a reversão à sensibilidade. Outro aspecto interessante apontado pelos autores foi o fato de o isolado ter mantido um gene rRNA mutado mesmo após as 60 passagens, sugerindo que apenas uma

cópia mutada gere pouco custo ao metabolismo da bactéria.

A persistência dos alelos mutados do operon rRNA 23S e sua relação com a re-emergência da resistência à linezolida continuaram a ser investigadas por Tsakris et al.⁽⁶⁰⁾. Os autores também submeteram um isolado clínico *S. aureus* resistente à linezolida (CIM de 16 µg/ml), portador de quatro alelos mutados, a uma série de 60 passagens em meio sem linezolida e obtiveram um isolado sensível à linezolida (CIM de 2 µg/ml), com apenas um alelo rRNA 23S mutado. Com o intuito de verificar a estabilidade do alelo mutado ainda presente no derivado sensível, 40 passagens adicionais foram realizadas gerando outro isolado sensível à linezolida, com a mesma CIM e com o mesmo alelo mutado do anterior. Este novo derivado sensível, quando exposto a concentrações crescentes de linezolida, gerou um mutante com a mesma CIM de linezolida e com os mesmos alelos mutados (*rrn1*, *rrn2*, *rrn3*, *rrn5*) de seu progenitor resistente, mostrando ser possível uma rápida re-emergência da resistência. Os resultados do estudo de Tsakris et al.⁽⁶⁰⁾ reforçaram a hipótese de que a presença de apenas um alelo rRNA 23S com a mutação G2576T poderia servir como *template* para a

recombinação homóloga, o que explicaria a relação entre níveis elevados de resistência à linezolida e o aumento do número de alelos rRNA 23S mutados, assim como entre níveis mais baixos e um menor número de cópias mutadas.

Outro caso clínico envolvendo cepas MRSA resistentes à linezolida no início dos anos 2000 foi descrito por Wilson et al.⁽¹⁰⁾. Onze cepas sensíveis e resistentes à linezolida foram isoladas de diferentes sítios de um paciente ao longo do tratamento com o fármaco, iniciado após uma punção do tórax. A mutação G2576T foi novamente identificada em todos os isolados resistentes à linezolida, sendo sua presença em 2 de 6 alelos rRNA 23S associada à CIM de 8 µg/ml e, em 5 de 6 alelos, à CIM de 32 µg/ml. Os perfis de restrição do DNA genômico gerados por PFGE confirmaram a derivação das cepas MRSA resistentes à linezolida a partir de um progenitor sensível à linezolida.

Alguns estudos têm atribuído ao processo de recombinação homóloga, conhecido como conversão do gene dependente de Rec-A, o papel de balancear os custos e benefícios da manutenção de operons rRNA 23S selvagens e mutados na presença ou ausência da pressão seletiva da

linezolida^(11,61). O processo de conversão do gene, segundo os poucos estudos realizados nessa direção^(11,60), explicaria a reversão ao fenótipo sensível apresentada por isolados *S. aureus* após a suspensão da terapia com linezolida.

Os relatos publicados no final dos anos 2000 mostram, ainda, que a linezolida permanece altamente ativa entre diferentes grupos de patógenos Gram-positivos, mas apontam para a ocorrência de estafilococos coagulase-negativos resistentes à linezolida (28), geralmente, associados a surtos clonais em unidades de terapia intensiva (UTIs)^(5,6,62,16,28).

No Brasil, o primeiro relato de um isolado clínico MRSA resistente à linezolida foi feito por Gales et al. em 2006⁽²⁰⁾. A cepa (CIMs de 16 e 12 µg/ml, respectivamente, pelos métodos de diluição em caldo e E-test) foi isolada de uma cultura de escarro de uma paciente com fibrose cística com recorrentes infecções pulmonares causadas por MRSA. Neste caso, a dose diária prescrita foi reduzida pela metade sem orientação médica. Tal procedimento, associado aos repetidos e prolongados períodos de exposição ao fármaco, segundo os autores, provavelmente, favoreceu a seleção da cepa MRSA portadora da mutação

G2576T, que apresentava um perfil de restrição por PFGE muito similar ao do clone endêmico brasileiro.

Pouco tempo depois, um isolado clínico *S. epidermidis* resistente à linezolida (CIM de 32 µg/ml) foi obtido da cultura de uma ponta de cateter de uma paciente com 75 anos internada em uma UTI de um hospital terciário do Estado de São Paulo. A cepa foi isolada após 21 dias de terapia com linezolida para o tratamento de uma infecção do trato urinário devido à presença de *E. faecium* resistente à vancomicina⁽⁶³⁾. Três anos depois, houve uma disseminação desse clone *S. epidermidis* (ST-2) exibindo altos níveis de resistência à linezolida (CIMs entre 16-64 µg/ml) na mesma instituição e, assim como o primeiro isolado, todos apresentaram a mutação G2576T no gene rRNA 23S⁽²¹⁾.

Relatos de isolados *S. haemolyticus* resistentes à linezolida são mais recentes. O primeiro caso foi descrito por Tarazona et al. em 2007⁽⁶⁴⁾, na Espanha. O isolado (CIM de 12 µg/ml) foi obtido de um segmento de cateter femoral após apenas quatro dias de exposição à linezolida. Ainda na Espanha, outro estudo documentou a disseminação de um único clone de *S. haemolyticus* resistente à linezolida (CIM entre 32-128 µg/ml) e à

teicoplanina em um ambiente hospitalar por um período de 18 meses. Esses isolados foram associados com bacteremia relacionada a cateter em pacientes de UTI⁽⁶⁵⁾. Mais recentemente, Mazzariol et al.⁽¹⁷⁾ relataram um surto de *S. haemolyticus* resistentes à linezolida (CIM de 32 µg/ml) em uma UTI na Itália. A mutação G2576T foi identificada em todos esses isolados. No Brasil, uma disseminação clonal de *S. haemolyticus* resistentes à linezolida (CIM entre 32-128 µg/ml) durante o período de 2008 a 2011 em um hospital terciário do Estado de São Paulo também foi associada à presença da mutação G2576T no domínio V do gene rRNA 23S⁽²²⁾.

Relatos de resistência à linezolida em *S. hominis* também são bem incomuns. Em 2011, na Espanha, uma disseminação nosocomial de um único clone de *S. hominis* resistente à linezolida (CIM \geq 96 µg/ml) e à teicoplanina foi relatada por Gopegui et al.⁽⁶⁶⁾. Curiosamente, dos 14 pacientes envolvidos, 3 não foram tratados com linezolida e todos os isolados tinham a mutação G2576T no rRNA 23S. No Brasil, isolados *S. hominis* exibindo CIM de linezolida entre 32-64 µg/ml foram isolados de diferentes pacientes internados em unidades de terapia

intensiva de um hospital terciário no Estado de São Paulo no período de 2008 a 2011. Mutações na proteína L3 desses isolados foram identificadas em associação com G2576T no gene rRNA 23S⁽⁴⁷⁾.

Outras mutações, além de G2576T

A identificação de outras mutações, além de G2576T, apontou para a existência de múltiplos sítios no gene rRNA 23S propensos a alterações capazes de conferir resistência à linezolida em diferentes espécies de *Staphylococcus*.

Em 2004, *S. aureus* isolados de hemoculturas de um mesmo paciente após um período de 20 meses de exposição à linezolida apresentaram uma mutação até então desconhecida, T2500A. Neste período, a perda de um alelo rRNA 23S(*rrn6*) foi observada em 2 dos isolados resistentes que, por sua vez, apresentaram T2500A em 2 ou 3 de seus alelos: *rrn4* e *rrn5* (CIM de 8 µg/ml) e *rrn2*, *rrn4* e *rrn5* (CIM de 16 µg/ml). Sete meses após o término do tratamento, um isolado sensível (CIM de 4 µg/ml), geneticamente relacionado com os isolados resistentes, não apresentava mais T2500A, apenas T2537C, uma mutação que esteve presente na cópia *rrn1* de todos os isolados, independente dos valores de

CIM à linezolida e que, por essa razão, foi considerada pelos autores uma mutação silenciosa sem envolvimento com o fenótipo resistente⁽⁶⁷⁾.

Mais uma vez, foi atribuído ao processo de conversão do gene, dependente de Rec-A, o papel de balancear os custos e benefícios da manutenção de operons selvagens e mutados na presença ou ausência da pressão seletiva, como previamente demonstrado na seleção *in vitro* de *E. faecalis* resistente à linezolida⁽⁶¹⁾. A conversão do gene explicaria a perda da mutação T2500A e a reversão ao fenótipo sensível, apresentada pelo isolado obtido 7 meses após a terapia com linezolida⁽⁶⁷⁾.

Cinco anos após a descoberta de T2500A, Liakopoulos et al.⁽⁵⁰⁾ relataram a ocorrência de outra mutação próxima a esse nucleotídeo, T2504A. Um isolado clínico *S. epidermidis* resistente à linezolida exibindo altos níveis de resistência (CIM de 256 µg/ml) foi obtido da hemocultura de um paciente com bacteremia internado em UTI, após 20 dias de exposição à linezolida. O isolado não era portador do gene *cfr* ou de qualquer mutação na proteína ribossômica L4, porém apresentou T2504A em 5 de seus 6 alelos rRNA23S. Após ser submetido a uma série de 38 passagens em meio sem

linezolida, a CIM desse isolado diminuiu de 256 para 8 µg/ml, com apenas um alelo mutado.

Um ano após esse relato, Liakopoulos et al.⁽¹⁴⁾ descreveram a ocorrência de três mutações em isolados *S. epidermidis* resistentes à linezolida obtidos de amostras de hemocultura e cateter de diferentes pacientes internados em UTIs de quatro hospitais na Grécia, sendo a mutação T2504A identificada em quase 50% dos casos. Assim como o primeiro isolado descrito em 2009, esses também não eram portadores do gene *cfr* nem de qualquer mutação na proteína L4, no entanto, alguns apresentaram simultaneamente T2504A e C2534T no domínio V do gene rRNA 23S. Já a mutação G2576T, também identificada em alguns isolados desta pesquisa, não esteve presente naqueles portadores de T2504A.

A mutação C2534T, na verdade, foi detectada pela primeira vez por Zhu et al.⁽⁶⁹⁾, por pirosequenciamento. A princípio, este método foi adaptado para a pesquisa da mutação G2576T, encontrada em 2 ou 3 dos cinco alelos rRNA 23S dos isolados *S. aureus*. Como G2576T foi identificada em apenas um dos isolados *S. epidermidis*, modificações no ensaio foram necessárias para verificar a presença de outras alterações no gene rRNA 23S

possivelmente envolvidas com a resistência à linezolida. O resultado foi a identificação da nova mutação C2534T, presente em 2 dos 5 alelos desses isolados *S. epidermidis* resistentes à linezolida (CIM de 16-32 µg/ml). Outra mutação detectada devido às modificações no ensaio de pirosequenciamento de Zhu et al.⁽⁶⁹⁾ foi G2447T, presente em todos os alelos rRNA 23S do único isolado *S. epidermidis* (CIM 64 µg/ml) deste estudo que apresentou tal substituição. Até então, G2447T havia sido descrita apenas em um isolado *Mycobacterium smegmatis* resistente à linezolida, quatro anos antes⁽⁷⁰⁾.

Tanto G2447T como T2500A e G2576T foram novamente identificadas em isolados *S. aureus* selecionados *in vitro* com concentrações crescentes de linezolida⁽⁴⁶⁾, reforçando o envolvimento desses sítios ribossômicos com a resistência à linezolida em estafilococos.

Da mesma forma, G2447T, C2534T e G2576T foram novamente associadas ao fenótipo resistente de 46 estafilococos resistentes à linezolida obtidos de diferentes instituições nos Estados Unidos entre 2004 e 2007⁽¹²⁾. Ainda nesse estudo, duas outras mutações menos conhecidas nesse momento foram identificadas, T2504A

e G2631T. A primeira, simultaneamente descrita por Liakopoulos et al.⁽⁵⁰⁾, ocorreu em apenas dois isolados *S. epidermidis* (ST-5), mas foi considerada pelos autores uma boa candidata à produção do fenótipo resistente, uma vez que nenhuma outra mutação no domínio V do gene rRNA 23S ou na proteína L4 desses isolados *cfr*-negativos foi identificada. Além disso, 16 isolados *S. epidermidis* do mesmo ST, sensíveis à linezolida, não apresentaram T2504A. Já a segunda mutação identificada por Wong et al.⁽¹²⁾, G2631T, recebeu pouco crédito pelo fato de ter ocorrido em apenas um isolado *S. epidermidis* (ST-22) que também possuía as mutações C2534T e G2576T.

Relação entre a posição dos nucleotídeos mutados, o número de alelos portadores dessas mutações e os níveis de resistência apresentados por isolados clínicos de *Staphylococcus spp.*

A maioria das mutações no gene rRNA 23S que conferem resistência à linezolida ocorrem em nucleotídeos adjacentes aos que se ligam diretamente ao fármaco. Alterações em bases vizinhas de pontos centrais como U2504, por exemplo, nucleotídeo ao qual o anel oxazolidinona se liga,

podem conferir resistência devido a um efeito alostérico, provavelmente por perturbação do posicionamento desse nucleotídeo central⁽⁵⁸⁾. Já alterações nas bases que se ligam diretamente à linezolida, como U2504, eram consideradas improváveis, pois poderiam causar sérios danos à bactéria⁽⁷¹⁾.

Ao contrário do que se pensava, níveis elevados de CIM de linezolida (1024 µg/ml) já foram associados à presença de T2504A em quatro dos seis alelos rRNA 23S de isolados clínicos *S. epidermidis* resistentes à linezolida⁽¹⁴⁾ e, em outro estudo, em cinco dos seis alelos de um isolado clínico da mesma espécie (CIM de 256 µg/ml)⁽⁶⁸⁾. Nos dois casos, os isolados foram *cfr*-negativos e selvagens para a proteína L4. Alterações nas proteínas L3 e L22, não investigadas, talvez explicassem o fato de os isolados com menor número de alelos mutados terem apresentado níveis mais elevados de CIM. No entanto, esses dados levantam uma questão. Os altos níveis de CIM de linezolida seriam decorrentes da substituição de uma base central do PTC (U2504) que se liga diretamente à linezolida e/ou consequência da presença de múltiplos alelos portadores desse nucleotídeo mutado?

Considerando ainda os dados da pesquisa de Liakopoulos et al.⁽¹⁴⁾, níveis mais baixos de CIM de linezolida (8 µg/ml) foram associados à presença de outra mutação (C2534T) em apenas dois dos seis alelos rRNA 23S de isolados clínicos *S. epidermidis* resistentes à linezolida. Alguns anos antes, CIMs entre 16-32 µg/ml foram apresentadas por isolados clínicos da mesma espécie portadores de C2534T em dois dos cinco alelos rRNA 23S⁽⁶⁹⁾. Nesses casos, níveis mais baixos de CIM de linezolida foram associados a uma mutação em um nucleotídeo que não se liga diretamente ao fármaco e, também, a um número menor de alelos mutados. Logo, esses dados mostram o outro lado da mesma questão. Os níveis mais baixos de CIM de linezolida seriam decorrentes da substituição de uma base mais afastada do sítio de ligação da linezolida ou de um menor número de alelos mutados? Poderia um aumento do número de alelos com C2534T aumentar os níveis de CIM compensando essa distância?

Além de C2534, outros dois pontos que constituem a segunda camada de nucleotídeos que definem a área de ligação da linezolida tem se mostrado propensos a alterações, gerando resistência: U2500 e G2447. Essas bases interagem diretamente com

U2504 no PTC e estão localizadas, respectivamente, a 7.2 Å e 6.2 Å do sítio de ligação com o fármaco⁽⁵⁸⁾.

Uma clara associação entre os níveis de CIM de linezolida e o número de alelos com uma substituição na posição U2500 (T2500A) foi observada por Meka et al.⁽⁶⁷⁾ em isolados clínicos *S. aureus*, embora os demais mecanismos de resistência não tenham sido investigados. O fenótipo resistente foi associado à presença de T2500A em dois de cinco ou seis alelos (CIM de 8 µg/ml) e em dois de cinco ou três de seis alelos (CIM de 16 µg/ml), enquanto o fenótipo sensível (CIM de 4 µg/ml) foi apresentado por um isolado sem T2500A ou qualquer mutação no domínio V de suas seis cópias do rRNA 23S, sete meses após o término do tratamento com linezolida. No caso de mutantes da cepa MSSA 29213 selecionados *in vitro* com concentrações crescentes de linezolida, a presença de T2500A em dois de seis alelos também gerou o fenótipo resistente (CIM de 8 µg/ml), mas a CIM de 4 µg/ml (fenótipo supostamente sensível) foi associada à presença de T2500A em um dos seis alelos⁽⁴⁶⁾. Neste caso, as proteínas L3, L4 e L22 foram analisadas e para esses mutantes se apresentaram selvagens.

Uma relação direta entre os níveis de CIM de linezolida e o número de alelos portadores de G2447T também pode estar ocorrendo. CIMs de 4, 8, 16 e 32 µg/ml foram associadas, respectivamente, à presença de G2447T em um de seis, dois de seis, dois de cinco e três de cinco alelos rRNA 23S de mutantes da cepa MSSA 29213⁽⁴⁶⁾. De acordo com essa progressão, uma CIM de 64 µg/ml foi associada a 100% dos alelos mutados em um isolado clínico *S. epidermidis*⁽⁶⁹⁾. Retomando os dados do estudo *in vitro* de Locke et al.⁽⁴⁶⁾, um maior nível de resistência à linezolida (CIM de 128 µg/ml) envolvendo G2447T foi associado a três ou quatro alelos mutados, porém esses mutantes também tinham uma substituição na proteína L3 (Gly152Asp).

Uma relação mais clara, talvez devido a um número maior de relatos, tem sido observada entre os níveis de CIM de linezolida e o número de alelos portadores de G2576T, a única mutação identificada no domínio V do gene rRNA 23S das cepas de SCNs desse estudo. A base G2576 também está situada na segunda camada de nucleotídeos que definem a área de ligação da linezolida (a 7.9 A° do sítio de ligação) e se liga diretamente à G2505 que, por sua vez, liga-se à acetamida NH da linezolida⁽⁵⁸⁾.

Assim como observado para as demais mutações em nucleotídeos que constituem a segunda camada da área de ligação da linezolida, a presença de G2576T em mais de 50% do total do número de alelos rRNA 23S está associada a níveis de CIM de linezolida acima de 16 µg/ml, exceto em alguns casos em que a presença de apenas um ou dois alelos mutados (em cinco) determinaram CIMs de 16-32 µg/ml tanto em *S. aureus* como em *S. epidermidis*^(69,72,73). Da mesma forma, CIMs de 4-8 µg/ml estão sendo associadas a menos de 50% das cópias rRNA 23S mutadas.

Com base nos níveis de resistência à linezolida detectados, portanto, é possível estimar o número de cópias rRNA 23S mutadas, mas a relação entre os níveis de CIM determinados como *breakpoint* para a linezolida em estafilococos (S, ≤ 4 µg/ml; R, ≥ 8 µg/ml) e o número de alelos mutados permanece indefinida.

Dados referentes a isolados clínicos com CIM de 4 µg/ml são escassos. O único relato existente, salvo engano, foi apresentado por Meka et al.⁽⁶⁷⁾ ao investigar a ocorrência de T2500A em isolados MRSA obtidos de hemoculturas de um paciente submetido a um longo período de exposição à linezolida. Ao apresentar a CIM de 4

$\mu\text{g/ml}$, o isolado não tinha mais T2500A em nenhuma cópia do rRNA 23S, ao contrário dos isolados resistentes que apresentaram essa mutação em pelo menos dois alelos (CIM de 8-16 $\mu\text{g/ml}$). Já no estudo *in vitro* de Locke et al.⁽⁴⁶⁾, a CIM de 4 $\mu\text{g/ml}$ foi associada à presença de T2500A ou G2447T em um dos seis alelos rRNA 23S da cepa MSSA 29231, submetida a um processo de seleção com linezolida.

Apesar do crescente número de relatos envolvendo G2576T, os dados disponíveis até o momento ainda são insuficientes para definir uma relação precisa entre os níveis de CIM de 4-8 $\mu\text{g/ml}$ e o número de alelos rRNA 23S com a mutação G2576T. Em um processo de seleção *in vitro* com linezolida⁽⁴⁶⁾, a CIM de 4 $\mu\text{g/ml}$ foi observada em mutantes da cepa MRSA 33591 portadores de G2576T em um ou dois dos seis alelos rRNA 23S, enquanto em isolados clínicos *S. aureus* a presença de apenas uma cópia com G2576T (em cinco alelos) ou não foi suficiente para conferir o fenótipo resistente (CIM de 2 $\mu\text{g/ml}$)^(11,60) ou foi associada a CIMs de 8 e 16 $\mu\text{g/ml}$ ^(72,73). Ainda em isolados clínicos *S. aureus*, duas cópias com G2576T (em cinco ou seis alelos) foram associadas à CIM de

8 $\mu\text{g/ml}$ ^(10,11,69) e, em quatro ou cinco alelos, à CIM de 16 $\mu\text{g/ml}$ ^(69,72,74).

Considerações finais

A presença de múltiplas cópias do gene rRNA 23S no cromossomo de importantes patógenos Gram-positivos foi, no final da década de 90, uma razão de otimismo em relação à atuação da linezolida. Como a aquisição de resistência a essa oxazolidinona requer mutações nessas múltiplas cópias, presentes em estafilococos e enterococos⁽⁷⁵⁾, a seleção de mutantes resistentes, ao que tudo indica, seria um processo raro. Uma curta experiência clínica ao longo de pouco mais de uma década, no entanto, mostrou o contrário.

Os dados disponíveis até o momento ainda são insuficientes para definir uma relação satisfatória entre os níveis de CIM de linezolida (especialmente entre 4-8 $\mu\text{g/ml}$), a posição dos nucleotídeos propensos a alterações no domínio V do gene rRNA 23S e o número de alelos portadores desses nucleotídeos mutados. A ausência de dados referentes aos demais mecanismos de resistência à linezolida na maioria dos estudos torna essas relações ainda mais imprecisas.

Métodos convencionais de determinação da resistência a antimicrobianos classificam um isolado

portador de um único alelo rRNA 23S mutado como sensível à linezolida. Com que frequência e em quais condições esse isolado poderia se tornar resistente, caso fosse exposto novamente ao antimicrobiano, são questões que permanecem em aberto.

Agradecimentos

Aos membros da banca de defesa da tese que gerou esse artigo de revisão: prof. Dra. Ana Cristina Gales (UNIFESP); prof. Dr. Antônio Carlos Campos Pignatari (UNIFESP); prof. Dra. Anna Sara Shafferman Levin (USP); prof. Dra. Rita de Cássia Café Ferreira (USP); prof. Dra. Elsa Masae Mamizuka (USP).

Ao CNPq e FAPESP.

Referências bibliográficas

1. Moellering RC. Linezolid: the first oxazolidinone antimicrobial. *Ann Intern Med.* 2003;138(2):135-42.
2. Zurenko GE et al. In Vitro Activities of U-100592 and U-100766, Novel Oxazolidinone Antibacterial Agents. 1996;40(4):839-845.
3. Diekema DJ & Jones RN. Oxazolidinone antibiotics. *The Lancet.* 2001; 358:1975-82.
4. http://www.accessdata.fda.gov/drugs_atfda_docs/nda/2000/21130_Zyvox.cfm
5. Potoski BA1, Adams J, Clarke L, Shutt K, Linden PK, Baxter C, Pasculle AW, Capitano B, Peleg AY, Szabo D, Paterson DL. Epidemiological profile of linezolid-resistant coagulase-negative staphylococci. *Clin Infect Dis.* 2006;43(2):165-71.
6. Kelly S. et al. An outbreak of colonization with linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* in an intensive therapy unit. *The Journal of antimicrobial chemotherapy.* 2008; 61(4):901-7.
7. Ikeda-Dantsuji Y1, Hanaki H, Sakai F, Tomono K, Takesue Y, Honda J, et al. Linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from 2006 through 2008 at six hospitals in Japan. *Ik J Infect Chemother.* 2011;17(1):45-51.
8. de Almeida LM, de Paula AICP, Guimarães T, Pavez M, Sacramento AG, Lemos LC, Ito LCS, de Araújo MRE, Iwasaki MF, Gales AC, Nilton Lincopan N, Sampaio JLM, Mamizuka EM. Linezolid-resistant *S. epidermidis* clone ST-2 isolated from a patient who did not receive any course of oxazolidinone therapy – a case report. *Journal of Medical Microbiology – Case Reports.* 2014;
9. Tsiodras S, Gold HS, Sakoulas G, Eliopoulos GM, Wennersten C, Venkataraman L, et al. Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *Lancet.* 2001;358(9277):207-8.
10. Wilson P. Linezolid resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2002;51(1):186-188.

11. Meka VG, Gold HS, et al. Reversion to susceptibility in a linezolid-resistant clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2004;54(4):818–20.
12. Wong A, Reddy SP, Smyth DS, Aguero-Rosenfeld ME, Sakoulas G, Robinson DA. Polyphyletic emergence of linezolid-resistant staphylococci in the United States. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(2):742-8.
13. Mendes RE, Deshpande LM, et al. Assessment of linezolid resistance mechanisms among *Staphylococcus epidermidis* causing bacteraemia in Rome, Italy. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2010;65(11):2329–35.
14. Liakopoulos A, et al. Dissemination of two international linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* clones in Greek hospitals. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2010;65(5):1070–1.
15. Kosowska-Shick K, et al. Molecular and epidemiologic characteristics of linezolid-resistant coagulase-negative staphylococci at a tertiary care hospital. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2010;68(1):34–9.
16. Mulanovich VE, Huband MD, McCurdy SP, Lemmon MM, Lescoe M, Jiang Y, Rolston KV, LaSala PR. Emergence of linezolid-resistant coagulase-negative *Staphylococcus* in a cancer centre linked to increased linezolid utilization. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65(9):2001-4.
17. Mazzariol et al. Outbreak of linezolid-resistant *Staphylococcus haemolyticus* in an Italian intensive care unit. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 2012;31(4):523–7.
18. Sorlozano, et al. Detection of new mutations conferring resistance to linezolid in glycopeptide-intermediate susceptibility *Staphylococcus hominis* subspecies *hominis* circulating in an intensive care unit. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*. 2010;29(1):73–80.
19. Arias C et al. Multicentre surveillance of antimicrobial resistance in enterococci and staphylococci from Colombian hospitals, 2001-2002. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2002;51(1):59–68.
20. Gales AC et al. Emergence of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* during treatment of pulmonary infection in a patient with cystic fibrosis. *International journal of antimicrobial agents*. 2006;27(4):300–2.
21. de Almeida LM et al. Dissemination of the linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* clone ST2 exhibiting the G2576T mutation in the 23S rRNA gene in a tertiary-care hospital, Brazil. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2012;67(3):768–9.

22. de Almeida LM et al. Clonal dissemination of linezolid-resistant *Staphylococcus haemolyticus* exhibiting the G2576T mutation in the 23S rRNA gene in a tertiary care hospital in Brazil. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012;56(5):2792–3.
23. Mutnick AH, Enne V, Jones RN. Linezolid Resistance Since 2001: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *The Annals of Pharmacotherapy*. 2003;37:769–774.
24. Gales AC et al. Antimicrobial susceptibility of gram-positive bacteria isolated in Brazilian hospitals participating in the SENTRY Program (2005-2008). *The Brazilian journal of infectious diseases: an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*. 2009;13(2):90–8.
25. Jones RN et al. Oxazolidinone susceptibility patterns in 2004: report from the Zyvox Annual Appraisal of Potency and Spectrum (ZAAPS) Program assessing isolates from 16 nations. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2006;57(2):279–87.
26. Farrell DJ et al. Linezolid surveillance program results for 2008 (LEADER Program for 2008). *Diagnostic microbiology and infectious disease* 2009;65(4):392–403.
27. Farrell DJ et al. LEADER Program results for 2009: an activity and spectrum analysis of linezolid using 6,414 clinical isolates from 56 medical centers in the United States. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011;55(8):3684–90.
28. Biedenbach DJ, Farrell DJ, Mendes RE, Ross JE, Jones RN. Stability of linezolid activity in an era of mobile oxazolidinone resistance determinants: results from the 2009 Zyvox® Annual Appraisal of Potency and Spectrum program. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010;68(4):459-67.
29. Mendes RE, Deshpande LM, Jones RN. Linezolid update: stable in vitro activity following more than a decade of clinical use and summary of associated resistance mechanisms. *Drug Resist Updat*. 2014;17(1-2):1-12.
30. Long KS & Vester B. Resistance to linezolid caused by modifications at its binding site on the ribosome. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012;56(2):603–12.
31. LaMarre J, Mendes RE, Szal T, Schwarz S, Jones RN, Mankin AS. The genetic environment of the *cfr* gene and the presence of other mechanisms account for the very high linezolid resistance of *Staphylococcus epidermidis* isolate 426-3147L. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(3):1173-9.
32. Wolter N et al. Novel Mechanism of Resistance to Oxazolidinones, Macrolides, and Chloramphenicol in Ribosomal Protein L4 of the Pneumococcus. 2005;49(8):3554–3557.

33. Arias C et al. Clinical and microbiological aspects of linezolid resistance mediated by the *cfr* gene encoding a 23S rRNA methyltransferase. *Journal of clinical microbiology*. 2008;46(3):892–6.
34. Kehrenberg C et al. A new mechanism for chloramphenicol, florfenicol and clindamycin resistance: methylation of 23S ribosomal RNA at A2503. *Molecular microbiology*. 2005; 57(4):1064–73.
35. Kehrenberg C, Aarestrup FM, Schwarz S. IS21-558 insertion sequences are involved in the mobility of the multiresistance gene *cfr*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007;51(2):483–7.
36. Kehrenberg C, Ojo KK, Schwarz S. Nucleotide sequence and organization of the multiresistance plasmid pSCFS1 from *Staphylococcus sciuri*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2004;54(5):936–9.
37. Kehrenberg C, Schwarz S. Distribution of Florfenicol Resistance Genes *fexA* and *cfr* among Chloramphenicol-Resistant *Staphylococcus* Isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006;50(4):1156–1163.
38. Long KS et al. The Cfr rRNA methyltransferase confers resistance to Phenicol, Lincosamides, Oxazolidinones, Pleuromutilins, and Streptogramin A antibiotics. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006;50(7):2500–5.
39. Mendes RE, et al. First report of Staphylococcal clinical isolates in Mexico with linezolid resistance caused by *cfr*: evidence of in vivo *cfr* mobilization. *Journal of clinical microbiology*. 2010;48(8):3041–3.
40. Mendes RE, et al. First report of *cfr*-mediated resistance to linezolid in human staphylococcal clinical isolates recovered in the United States. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2008;52(6):2244–6.
41. Toh SM, et al. Acquisition of a natural resistance gene renders a clinical strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* resistant to the synthetic antibiotic linezolid. *Molecular microbiology*. 2007;64(6):1506–14.
42. Schwarz S, Werckenthin C, Kehrenberg C. Identification of a plasmid-borne chloramphenicol-florfenicol resistance gene in *Staphylococcus sciuri*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2000;44(9):2530–3.
43. Locke JB et al. Structure-activity relationships of diverse oxazolidinones for linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* strains possessing the *cfr* methyltransferase gene or ribosomal mutations. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010;54(12):5337–43.
44. Gales AC, Deshpande LM, Jones RN, De Souza AG, Pignatari AC, Mendes RE. Fatal pneumonia due to methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* ST398/t034

- carrying *cfr* and *erm(B)* genes: first report in Brazil. *J. Antimicrob. Chemother.* 2014.
45. Locke JB, Hilgers M, Shaw K. Mutations in ribosomal protein L3 are associated with oxazolidinone resistance in staphylococci of clinical origin. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2009;53(12):5275–8.
46. Locke JB, Hilgers M, Shaw KJ. Novel ribosomal mutations in *Staphylococcus aureus* strains identified through selection with the oxazolidinones linezolid and torezolid (TR-700). *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(12):5265-74.
47. de Almeida LM, de Araujo MRE, Sacramento AG, Pavez M, de Souza AG, Rodrigues F, Gales AC, Lincopan N, Sampaio JLM, Mamizuka EM. Linezolid resistance in Brazilian *Staphylococcus hominis* strains is associated with L3 and 23S rRNA ribosomal mutations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2013;57:4082-4083.
48. LaMarre JM, Howden BP, Mankin AS. Inactivation of the indigenous methyltransferase RlmN in *Staphylococcus aureus* increases linezolid resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(6):2989-91.
49. Wasserscheid J, et al. Genome sequencing of linezolid-resistant *Streptococcus pneumoniae* mutants reveals novel mechanisms of resistance. 2009;1214–1223.
50. Floyd JL, Smith KP, Kumar SH, Floyd JT, Varela MF. LmrS is a multidrug efflux pump of the major facilitator superfamily from *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010;54:5406–5412.
51. Sierra JM, Ortega M, Tarrago C, Albet C, Vila, J., Terencio, et al. Decreased linezolid uptake in an in vitro-selected linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* mutant. *J. Antimicrob. Chemother.* 2009;64:990–992.
52. Lin H, et al. The oxazolidinone eperzolid binds to the 50S ribosomal subunit and competes with binding of chloramphenicol and lincomycin. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 1997;41(10):2127–31.
53. Swaney SM, et al. The oxazolidinone linezolid inhibits initiation of protein synthesis in bacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 1998;42(12):3251–5.
54. Burghardt H, Schimz KL, Müller M. On the target of a novel class of antibiotics, oxazolidinones, active against multidrug-resistant Gram-positive bacteria. *FEBS Lett.* 1998;20;425(1):40-4.
55. Kloss P, et al. Resistance mutations in 23S rRNA identify the site of action of the protein synthesis inhibitor linezolid in the ribosomal peptidyl transferase center. *Journal of molecular biology.* 1999;294(1):93–101.

56. Ippolito JA, et al. Crystal structure of the oxazolidinone antibiotic linezolid bound to the 50S ribosomal subunit. *Journal of medicinal chemistry*. 2008;51(12):3353–6.
57. Swaney SM, Aoki H, Ganoza MC, Shinabarger DL. The oxazolidinone linezolid inhibits initiation of protein synthesis in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998;42(12):3251-5.
58. Wilson DN, et al. The oxazolidinone antibiotics perturb the ribosomal peptidyl-transferase center and effect tRNA positioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(36):13339–44.
59. Pillai SK, et al. Linezolid resistance in *Staphylococcus aureus*: characterization and stability of resistant phenotype. *The Journal of infectious diseases*. 2002;186(11):1603–7.
60. Tsakris A, et al. Persistence of rRNA operon mutated copies and rapid re-emergence of linezolid resistance in *Staphylococcus aureus*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2007;60(3):649–51. 31 –
61. Lobritz M, et al. Recombination Proficiency Influences Frequency and Locus of Mutational Resistance to Linezolid in *Enterococcus faecalis*. 2003;47(10):3318–3320.
62. Treviño M, Martínez-Lamas L, Romero-Jung PA, Giráldez JM, Alvarez-Escudero J, Regueiro BJ. Endemic linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* in a critical care unit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2009;28(5):527-33.
63. Lincopan N, et al. Linezolid resistance in *Staphylococcus epidermidis* associated with a G2603T mutation in the 23S rRNA gene. *International journal of antimicrobial agents*. 2009;34(3):281–2.
64. Tarazona RE, Padilla TP, Gómez JC, Sánchez JE, Hernandez MS. First report in Spain of linezolid non-susceptibility in a clinical isolate of *Staphylococcus haemolyticus*. *Int J Antimicrob Agents*. 2007;30(3):277-8.
65. Rodríguez-Aranda A, et al. Nosocomial spread of linezolid-resistant *Staphylococcus haemolyticus* infections in an intensive care unit. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2009;63(4):398–402.
66. Gopegui R, et al. Nosocomial spread of linezolid-resistant *Staphylococcus hominis* in two hospitals in Majorca. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 2011;29(5):339–44.
67. Meka VG, Pillai SK, et al. Linezolid resistance in sequential *Staphylococcus aureus* isolates associated with a T2500A mutation in the 23S rRNA gene and loss of a

single copy of rRNA. The Journal of infectious diseases. 2004;190(2):311–7.

68. Liakopoulos A, et al. A T2504A mutation in the 23S rRNA gene responsible for high-level resistance to linezolid of *Staphylococcus epidermidis*. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 2009;64(1):206–7.

69. 69 – Zhu W, et al. Use of pyrosequencing to identify point mutations in domain V of 23S rRNA genes of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology. 2007;26(3):161–5.

70. Sander P, et al. Ribosomal and non-ribosomal resistance to oxazolidinones: species-specific idiosyncrasy of ribosomal alterations. Molecular microbiology. 2002;46(5):1295–304.

71. Davidovich C, Bashan A, Yonath A. Structural basis for cross-resistance to ribosomal PTC antibiotics. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2008;105(52):20665–70.

72. Ikeda-Dantsuji Y, et al. Linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from 2006 through 2008 at six hospitals in Japan. Journal of infection and chemotherapy : official journal of the

Japan Society of Chemotherapy. 2011;17(1):45–51.

73. Endimiani A, et al. Emergence of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* after prolonged treatment of cystic fibrosis patients in Cleveland, Ohio. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2011;55(4):1684–92.

74. Hill RLR, et al. Linezolid-resistant ST36 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with prolonged linezolid treatment in two paediatric cystic fibrosis patients. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 2010;65(3):442–5.

75. Klappenbach J, et al. *rrndb*: the Ribosomal RNA Operon Copy Number Database. Nucleic acids research. 2001;29(1):181–4.

Sources of funding: No
Conflict of interest: No
Date of first submission: 2014-12-01
Last received: 2014-12-01
Accepted: 2015-03-25
Publishing: 2015-05-29

Corresponding Address:

Lara Mendes de Almeida

Endereço para correspondência: Av. Prof. Lineu Prestes, 580 – Butantã – Cidade Universitária; CEP: 05508-000; telefones: 11-30913663/ 11-999261300; email: laramedal@gmail.com ou laramedal@usp.br

ⁱ Artigo de revisão baseado na tese “Caracterização molecular dos mecanismos de resistência à linezolida em estafilococos coagulase-negativos e estudo da estabilidade do fenótipo resistente”, defendida em janeiro de 2013 para obtenção do grau de doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Área de Análises Clínicas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP). Orientadora: Prof. Dra. Elsa Masae Mamizuka.