

Original

Implicación de los genes *ermX* en la resistencia a los macrólidos y la telitromicina de *Corynebacterium jeikeium* y *Corynebacterium amycolatum*

G. Yagüe Guirao^{1,2}, B. Mora Peris², M.C. Martínez-Toldos¹, T. Rodríguez González^{1,2}, P.L. Valero Guillén² y M. Segovia Hernández^{1,2}

¹Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia;

²Departamento de Genética y Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia

RESUMEN

Se ha estudiado la actividad de siete macrólidos, clindamicina y telitromicina frente a aislamientos clínicos del género *Corynebacterium*. De éstos, 36 pertenecían a la especie *C. jeikeium* y 57 a *C. amycolatum*. Todos los macrólidos estudiados y la clindamicina presentaron escasa actividad, con $\text{CMI}_{90} > 256 \text{ mg/l}$. La telitromicina presentó mejor actividad, siendo sensibles un 52,3% de *C. amycolatum* y un 70% de *C. jeikeium* resistentes a la eritromicina. El fenotipo de resistencia fue de tipo *MLSb* constitutivo en todos los aislamientos. El gen *ermX* fue detectado en el 100% de las cepas resistentes a eritromicina, presentando una homología, en el caso de *C. amycolatum*, de un 100% con el de *C. striatum* y *C. diphtheriae*.

Palabras clave: *Corynebacterium* - Resistencia a macrólidos - Telitromicina

Implication of *ermX* genes in macrolide- and telithromycin-resistance in *Corynebacterium jeikeium* and *Corynebacterium amycolatum*

SUMMARY

The activity of seven macrolides, clindamycin and telithromycin against clinical isolates of *Corynebacterium* spp. was studied. Of these, 36 isolates were identified as *C. jeikeium* and 57 as *C. amycolatum*. The frequency of resistance to erythromycin and other macrolides as well as clindamycin was high, with $\text{CMI}_{90} > 256 \mu\text{g/ml}$. Telithromycin showed the best activity, with 52.3% of *C. amycolatum* and 70% of *C. jeikeium* erythromycin-resistant strains susceptible to this ketolide. All strains had the *MLSb* constitutive phenotype. The *ermX* gene was present in all erythromycin-resistant strains, and in *C. amycolatum* was 100% homologous with that of *C. striatum* and *C. diphtheriae*.

Key words: *Corynebacterium* - Macrolide-resistance - Telithromycin

INTRODUCCIÓN

La multirresistencia es una característica común a tres de las especies del género *Corynebacterium* reconocidas en la actualidad como patógenos oportunistas importantes: *C. jeikeium*, *C. amycolatum* y *C. urealyticum* (1, 2). Recientemente, otra nueva especie multirresistente ha sido descrita en la literatura como causante de infecciones graves (3).

En *C. jeikeium* y *C. urealyticum* la multirresistencia está bien documentada desde hace años (4). Por el contrario, los datos de sensibilidad de *C. amycolatum* han sido confusos, y no se incluyó dentro de las especies multirresistentes hasta su correcta identificación. Tras la reidentificación de algunos aislamientos de *C. striatum*, *C. minutissimum* y *C. xerosis* como *C. amycolatum*, se incluyó a las tres primeras dentro de las especies sensibles del género *Corynebacterium*, y a *C. amycolatum* dentro del grupo de las multirresistentes (1, 5).

En general, se puede afirmar que la mayoría de los aislamientos de *C. amycolatum* y de *C. jeikeium* son resistentes a los betalactámicos, los macrólidos, la clindamicina, los aminoglucósidos y las quinolonas, por lo que clásicamente se ha considerado a los glucopéptidos como los agentes de elección en el tratamiento de las infecciones graves por especies de este género, como bacteriemias, meningitis, endocarditis, etc. (1). Esta situación puede cambiar, pues nuevos antimicrobianos como linezolid o quinupristina-dalfopristina han mostrado una excelente actividad *in vitro* frente a estas bacterias y podrían resultar una alternativa válida a los glucopéptidos en el tratamiento de dichas infecciones (2). Junto a éstos, ante el aumento constante de la resistencia a los macrólidos en diferentes especies de grampositivos, se ha desarrollado otro nuevo grupo de antimicrobianos, los cetólidos (6), que aun con mecanismo de acción similar a los macrólidos, por su elevada actividad *in vitro* y su perfil farmacocinético se han consolidado como tratamiento alternativo en infecciones causadas por microorganismos resistentes a la eritromicina, y han permitido que los macrólidos vuelvan a ser considerados en el tratamiento de las infecciones por corinebacterias (2).

El mecanismo más común de resistencia a los macrólidos en las bacterias con importancia clínica es la dimetilación del nucleótido A2058 del 23S RNAr (7). Esta forma de resistencia está codificada por la expresión de los genes *erm* y confiere resistencia cruzada a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas B (MLS_B) (8). La resistencia a estos agentes también se adquiere por la expresión de otros sistemas que incluyen bombas de flujo (por ejemplo genes *mefA* y *mrsA*) y enzimas inactivantes (por ejemplo genes *ere* y *mph*), aunque estos sistemas alternativos producen resistencia a sólo uno o dos de los agentes MLS (8).

A pesar de que las bases moleculares de la multirresistencia de las corinebacterias es bastante desconocida y sólo recientemente está comenzando a estudiarse para algunos antibióticos, como las quinolonas (9), la presencia de los genes *erm* y *mef* es un hecho conocido en este género desde hace años (10). Además de la importancia clínica de detectar la presencia de estos determinantes de resistencia en los aislamientos clínicos de bacterias corineformes, fundamentalmente para establecer su influencia en la actividad de los nuevos antimicrobianos como telitromicina, tal y como se ha realizado con otros patógenos importantes (11), el estudio de los mecanismos de resistencia a los macrólidos en estas especies del género *Corynebacterium*, al ser claramente un fenotipo adquirido, puede implicar un primer paso en el estudio de la base molecular y genética de la multirresistencia de estas bacterias, y puede ayudar definir el papel que estos microorganismos pueden tener como reservorios ambientales y nosocomiales de genes de resistencia (12).

El objetivo de nuestro estudio ha sido determinar la actividad *in vitro* de siete macrólidos y otros antibióticos como la clindamicina y la telitromicina frente a aislamientos clínicos de *C. jeikeium* y *C. amycolatum*, así como caracterizar los mecanismos de resistencia a los macrólidos, fenotípicos y genotípicos, y comprobar su influencia sobre la actividad de los nuevos antimicrobianos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Microorganismos

Se han estudiado 57 aislamientos de *C. amycolatum* y 36 de *C. jeikeium*, obtenidos de diferentes muestras clínicas procedentes de los Servicios de Microbiología del Hospital General Universitario de Murcia y del Hospital Clínico Universitario de Salamanca. Como cepa control en los estudios de sensibilidad *in vitro* se utilizó *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Las cepas fueron identificadas mediante sistemas bioquímicos comerciales (*Api Coryne*®, Bio-Mérieux, Inc., La balme Les Grottes, France) y análisis lipídico de fosfolípidos y ácidos micólicos mediante cromatografía de capa fina y gases (13).

En un estudio previo, un grupo de 30 cepas de *C. amycolatum* habían sido clasificadas como multirresistentes, ya que sólo se mostraban sensibles a los glucopéptidos y la rifampicina.

Antimicrobianos

Los antimicrobianos estudiados fueron eritromicina (Sigma-Aldrich Chie), claritromicina (Abbott Laboratories), ro-

xitromicina (Sanofi-Aventis), diritromicina (Lilly), azitromicina (Pfizer), josamicina (Sigma-Aldrich Chie), D-midecamicina (Menarini), clindamicina (Sanofi-Aventis) y telitromicina (Sanofi-Aventis).

Estudio de sensibilidad

Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) para los diferentes antimicrobianos se determinaron por el método de referencia estándar de dilución en agar para bacterias aerobias (14).

Se utilizaron placas de agar Mueller-Hinton suplementadas con un 5% de sangre desfibrinada de carnero, añadiendo para *C. jeikeium* una concentración del 0,5% de Tween 80 (Merck-Schuchardt), e incorporando los distintos antimicrobianos según un rango de concentraciones entre 256 mg/l y 0,01 mg/l. El inóculo final se obtuvo ajustando una suspensión del microorganismo a una turbidez equivalente al 0,5 de la escala de McFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/ml⁻¹) y diluyendo posteriormente esta suspensión para obtener una concentración final de 1×10^4 UFC/ml. Las placas, conteniendo diluciones dobles seriadas de los diferentes antibióticos ensayados, se inocularon mediante el replicador de Steers y se incubaron a 35 °C durante 48 horas. Se consideró la CMI como la concentración más baja que inhibió el crecimiento del microorganismo, no considerando crecimiento la presencia de una o dos colonias aisladas.

Detección fenotípica de la resistencia a los macrólidos

El fenotipo de resistencia MLSb (macrólidos, lincosamidas, estreptograminas) de las cepas de *Corynebacterium* spp. resistentes a la eritromicina fue determinado por la prueba de doble difusión en disco con eritromicina-clindamicina (15).

Los discos de eritromicina (15 µg) y clindamicina (2 µg) (bioMérieux) se colocaron sobre placas de Mueller-Hinton suplementadas con un 5% de sangre de carnero a una distancia de 15 a 20 mm y se inocularon con una suspensión bacteriana de turbidez equivalente al 0,5 de la escala de McFarland. Tras 24 a 48 horas de incubación a 37 °C, la ausencia de halo de inhibición alrededor de los discos se consideró indicativa de resistencia constitutiva (fenotipo MLSc), el achataamiento del halo de inhibición de la clindamicina en la zona próxima al disco de eritromicina como resistencia inducible (fenotipo MLSi), y la sensibilidad a la clindamicina sin achataamiento del halo de inhibición alrededor del disco de eritromicina indicativa de fenotipo M.

Ante las elevadas CMI encontradas, para comprobar el fenotipo de inducción, cinco cepas de cada una de las especies fueron preincubadas durante cinco horas a 35 °C con concentraciones subinhibitorias de antibióticos pertenecientes al grupo MLSb (eritromicina y clindamicina), así como con otros antibióticos no pertenecientes a este grupo (ciprofloxacino y cefotaxima). Las concentraciones de antibiótico utilizadas para la preincubación fueron de 0,1 y 1 mg/l. Tras la inducción se determinaron de nuevo las CMI de eritromicina para las cepas inducidas, siguiendo el protocolo anteriormente descrito.

Detección del gen *ermX*

El gen *ermX* fue detectado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando secuencias diseñadas según las secuencias publicadas de este gen (12). El DNA cromosómico se extrajo siguiendo el método descrito por Sambrook y cols. (16), y la amplificación se realizó con el sistema *Pure Taq PCR Ready-to-Go*® (Amersham Pharmacia Biotech) en un volumen final de 50 µl, para lo cual a la bolita liofilizada se añadieron los cebadores inicial y final a una concentración de 5 µM, 100 ng de DNA genómico, y se completó con agua destilada estéril hasta 50 µl. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador *Gene Amp PCR System 2400*® (Perkin Elmer) con las siguientes condiciones: desnaturalización a 95 °C durante cinco minutos, amplificación 35 ciclos de 95 °C durante un minuto, 65 °C para *C. jeikeium* y 70 °C para *C. amycolatum* durante un minuto y 72 °C durante dos minutos. El paso final de elongación se realizó durante cinco minutos a 72 °C.

Secuenciación

Los productos de la PCR fueron purificados mediante *Ultra Clean PCR Clean-Up Kit*® (Mobio Laboratories, Inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante. La secuenciación de los amplificados de DNA se realizó de manera automática con el secuenciador *377 DNA Sequencer ABI PRISM*® (Perkin Elmer).

RESULTADOS

Actividad *in vitro* de los macrólidos y otros antimicrobianos frente a *Corynebacterium* spp.

La Tabla 1 muestra la actividad *in vitro* de los diferentes antimicrobianos estudiados frente a las 36 cepas de *C.*

Tabla 1. Actividad *in vitro* de macrólidos, clindamicina y telitromicina frente a aislamientos clínicos de *C. jeikeium*, *C. amycolatum* no multirresistente y *C. amycolatum* multirresistente.

Microorganismo (nº cepas)	Antimicrobiano	CMI ₅₀ (mg/l)	CMI ₉₀ (mg/l)	Intervalo CMI (mg/l)
<i>C. jeikeium</i> (36)	Eritromicina	>256	>256	0,12->256
	Claritromicina	128	>256	0,01->256
	Roxitromicina	256	>256	0,03->256
	Diritromicina	>256	>256	0,03->256
	Azitromicina	>256	>256	0,12->256
	Josamicina	>256	>256	0,25->256
	D-midecamicina	16	>256	0,25->256
	Telitromicina	0,12	8	0,01-32
<i>C. amycolatum</i> (27) <i>C. amycolatum</i> multirresistente (30)	Clindamicina	>256	>256	0,25->256
	Eritromicina	0,25	>256	0,12->256
		>256	>256	64->256
	Claritromicina	4	>256	0,01->256
		>256	>256	64->256
	Roxitromicina	2	>256	0,03->256
		>256	>256	>256
	Diritromicina	0,5	>256	0,01->256
		>256	>256	>256
	Azitromicina	16	256	0,03->256
		>256	>256	>256
	Josamicina	32	>256	0,06->256
		>256	>256	>256
	D-midecamicina	16	>256	0,06->256
		>256	>256	>256
	Telitromicina	0,03	4	0,01-16
		2	64	0,03-128
	Clindamicina	>256	>256	0,25->256
		>256	>256	>256

jeikeium y 57 de *C. amycolatum*, diferenciándose en esta última especie los valores para las cepas con fenotipo multirresistente (sensibles sólo a glucopéptidos y tetraciclinas) y sensibles. Todos los macrólidos estudiados y la clindamicina presentaron una actividad escasa frente a estas dos especies de corinebacterias, con CMI₅₀ >128 mg/l y CMI₉₀ >256 mg/l, existiendo un porcentaje muy elevado de aislamientos con alto grado de resistencia (CMI >64 mg/l).

Sólo trece cepas de *C. amycolatum* (22,8%) y seis de *C. jeikeium* (16,7%) fueron sensibles a la eritromicina y al resto de los macrólidos estudiados, sin que se encontraran diferencias en la actividad entre los macrólidos de 14, 15 y 16 átomos frente a estas bacterias corineformes. Entre las cepas de *C. amycolatum* multirresistentes no se encontró ninguna sensible a los macrólidos.

La actividad de la telitromicina fue significativamente mejor que la de la eritromicina frente a las dos especies estudiadas, especialmente frente a *C. jeikeium*. Como era de esperar, todas las cepas tanto de *C. amycolatum* como de

C. jeikeium sensibles a la eritromicina lo fueron a la telitromicina, con CMI₅₀ de 0,12 mg/l. Entre los aislamientos de *C. amycolatum* resistentes a la eritromicina (44 cepas), un 52,3% (23 cepas) fueron sensibles y un 18,2% (8 cepas) presentaron sensibilidad intermedia a la telitromicina. El número de aislamientos de *C. jeikeium* resistentes a la eritromicina fue de 30 (83,3%), de las cuales el 70% (21 cepas) fueron sensibles a la telitromicina, el 16,7% (5 cepas) presentaron sensibilidad intermedia y el 13,3% restante (4 cepas) fueron resistentes.

Caracterización fenotípica de las cepas de *Corynebacterium* resistentes a los macrólidos

Un método común para detectar el fenotipo de resistencia a los macrólidos es la caracterización de las zonas de inhibición alrededor de los discos de eritromicina y clindamicina (test de inducción). Entre las cepas resistentes a la

eritromicina comprobamos la ausencia total de halo de inhibición alrededor de ambos discos al realizar la prueba según los protocolos establecidos, por lo que se pudo constatar que todas presentaron un fenotipo MLS_b constitutivo. No se encontró ninguna cepa con fenotipo MLS_b inducible ni con fenotipo M.

Dado el alto grado de resistencia a la eritromicina que presentaron los aislamientos se descartó totalmente la posibilidad de inducción comprobando cambios en las CMI mediante una prueba de microdilución. Para ello se seleccionaron cinco cepas de *C. amycolatum* y cinco de *C. jeikeium*, con alto grado de resistencia a la eritromicina, y se les realizó un test de inducción preincubándolas durante cinco horas con distintas concentraciones de dos antibióticos del grupo MLS_b (eritromicina y clindamicina) y otros dos no pertenecientes a este grupo (ciprofloxacino y cefotaxima), tras lo cual se volvió a determinar la CMI. No se observaron modificaciones en la CMI de la eritromicina tras la incubación con ninguno de los antibióticos utilizados en ninguna de las cepas estudiadas, lo que confirma su caracterización como fenotipo MLS_b de tipo constitutivo.

Identificación del gen *ermX*

El estudio del genotipo de resistencia MLS en aislamientos clínicos de las dos especies de *Corynebacterium* se realizó demostrando, mediante PCR, la presencia del gen de la metilasa *ermX*, caracterizado en cepas resistentes a los macrólidos de otras especies de *Corynebacterium*.

En el 100% de las cepas resistentes de *C. amycolatum* (44) y de *C. jeikeium* (30) se obtuvo un amplificado del tamaño esperado (366 pb). Para comprobar que estos amplificados correspondían realmente al gen *ermX* se seleccionaron y secuenciaron dos correspondientes a dos cepas con alto grado de resistencia a la eritromicina (CMI >256 mg/l): la cepa 15 de *C. amycolatum* y la cepa 2 de *C. jeikeium*.

Las secuencias de este gen se compararon con las descritas en el género *Corynebacterium* en la literatura. La secuencia del amplificado del gen *ermX* de *C. amycolatum* 15 presentó una homología del 100% con el *ermX* de *C. striatum* (GenBank nº de acceso U21300) y con el gen *ermX* descrito en *C. diphtheriae*, mientras que el fragmento amplificado de *C. jeikeium* coincidió en un 100% con el *ermX* descrito en *C. jeikeium* (GenBank nº de acceso AF338706).

La homología entre las secuencias de los 366 pares de bases de las dos cepas seleccionadas con alto grado de resistencia a la eritromicina, *C. amycolatum* 15 y *C. jeikeium* 2, fue del 94,3%.

DISCUSIÓN

Los resultados de sensibilidad a los macrólidos en nuestro trabajo coinciden con otros estudios y confirman la alta incidencia de cepas resistentes a la eritromicina y al resto de los macrólidos entre diferentes especies del género *Corynebacterium* (4, 17). Por tanto, la eritromicina, considerada durante un tiempo tratamiento de elección para las infecciones producidas por estos microorganismos, no puede utilizarse en la actualidad como tratamiento empírico hasta que no se disponga de pruebas de sensibilidad *in vitro* que aseguren su actividad frente a un determinado aislamiento. El resto de los macrólidos y la clindamicina mostraron escasa actividad, muy similar a la de la eritromicina, con CMI₅₀ y CMI₉₀ >256 mg/l y porcentajes de cepas resistentes del 77,2% para *C. amycolatum* y del 83,3% para *C. jeikeium*. La claritromicina, molécula de 14 átomos, aparece en otros estudios como el macrólido con mejor actividad frente a los microorganismos corineformes debido a su mayor actividad intrínseca (4). En nuestro estudio, a pesar de tener un comportamiento global similar al de la eritromicina y el resto de los macrólidos en cuanto al porcentaje final de cepas resistentes, pudimos observar su mayor actividad intrínseca frente a *C. jeikeium*, pero no así frente a aislamientos de *C. amycolatum*, en los cuales las CMI₅₀ para las cepas no multirresistentes fueron hasta cuatro veces superiores a las de eritromicina.

Al igual que ocurre para otros microorganismos gram-positivos, como *Streptococcus pyogenes* (18) y especialmente *Streptococcus pneumoniae* (19), la telitromicina es una alternativa válida para el tratamiento de las infecciones por aislamientos resistentes a la eritromicina. Este hecho es más destacable en el género *Corynebacterium*, en el cual, a pesar del alto porcentaje de cepas resistentes a la eritromicina en las dos especies estudiadas, sólo se detectó resistencia a ambos antibióticos en cuatro aislamientos de *C. jeikeium* y 13 de *C. amycolatum*. Según Soriano y cols. (4), la resistencia a la telitromicina entre cepas resistentes a la eritromicina es más frecuente en especies como *C. striatum* y *C. urealyticum* que en *C. jeikeium* y *C. amycolatum*, aunque las diferencias encontradas pueden deberse, sobre todo en *C. striatum*, a problemas metodológicos que podrían subsanarse con la lectura de las CMI tras 20 horas de incubación, tal y como recomienda el NCCLS para microorganismos no fastidiosos (17).

Actualmente, según la nomenclatura propuesta por Roberts y cols. (10), a los genes *erm* que codifican las metilasas causantes de la resistencia de las corinebacterias a los macrólidos se les ha denominado genes *erm* de la clase X. Esta clase engloba a los anteriores genes *erm* (CD), *erm*

(A) y *erm* (CX) descritos en *C. diphtheriae*, *C. xerosis* y *C. striatum*, los cuales, al presentar un porcentaje de homología superior al 80%, pueden ser incluidos en la misma clase. Posteriormente se incluyó el gen *erm* (X) *cj* descrito en *C. jeikeium*.

La presencia de este gen fue detectada en todos los aislamiento clínicos resistentes a la eritromicina, tanto de *C. jeikeium* como de *C. amycolatum*. La secuencia del fragmento amplificado en *C. jeikeium* coincidió en un 100% con el *ermX* para esta especie ya descrito en la literatura (13). En *C. amycolatum*, hasta el momento no se ha descrito este gen y comprobamos que la secuencia de DNA de los productos amplificados mostraba una homología del 100% con el *ermX* de *C. striatum* y de *C. diphtheriae*, y del 94,3% con el de *C. jeikeium*.

Previamente al estudio genotípico se realizó el estudio fenotípico de la resistencia a los macrólidos, comprobando que todas las cepas estudiadas presentaban un fenotipo de tipo constitutivo. No encontramos ninguna con fenotipo M que hiciera sospechar la presencia de bombas de flujo activo, uno de los mecanismos de resistencia a los macrólidos descritos para otros microorganismos (20, 21) y asociado, desde el punto de vista génico, con la presencia de los genes *mef*. En algunas especies de corinebacterias se ha detectado un gen con un alto porcentaje de homología con la secuencia depositada en el GeneBank del gen *mefE*, pero no se ha encontrado correlación entre su presencia y las CMI de la eritromicina (22).

En algunos estudios (23) se ha comprobado que la resistencia a la telitromicina es más frecuente en las cepas resistentes a la eritromicina con fenotipo MLS_B constitutivo. En nuestro trabajo, la actividad de la telitromicina no parece estar relacionada con el fenotipo, ya que todas las cepas resistentes a la eritromicina mostraron el mismo fenotipo y genotipo, y entre éstas se encontraron cepas tanto resistentes como sensibles a la telitromicina. Douthwaite y cols. (11) encuentran una situación similar en *S. pyogenes*: algunos aislamientos resistentes a la eritromicina que poseen el gen *ermB* son clínicamente resistentes a los cetólidos, mientras que otros permanecen sensibles. Al estudiar la base molecular de las diferencias entre estas cepas encuentran una relación entre la dimetilación de A2058 y la resistencia a los cetólidos. En las cepas sensibles a los cetólidos, una proporción apreciable del RNAr permanece monometilado, y a medida que aumenta la proporción de A2058 dimetilado se incrementan las CMI de los cetólidos. Este hecho puede explicar la actividad tan variable de la telitromicina en *C. jeikeium* y *C. amycolatum*, con CMI que en las cepas resistentes a la eritromicina varía entre 0,5 y 128 mg/l.

BIBLIOGRAFÍA

- Funke, G., Pünter, V., Von Graevenitz, A. *Antimicrobial susceptibility patterns of some recently established coryneform bacteria*. Antimicrob Agents Chemother 1996; 12: 2874-2878.
- Sánchez Hernández, J., Mora Peris, B., Yagüe Guirao, G. y cols. *In vitro activity of newer antibiotics against Corynebacterium jeikeium, Corynebacterium amycolatum and Corynebacterium urealyticum*. Int J Antimicrob Agents 2003; 22: 492-496.
- Otsuka, Y., Kawamura, Y., Koyama, T., Iihara, H., Ohkusu, K., Ezaki, T. *Corynebacterium resistens* spp. nov., a new multidrug-resistant coryneform bacterium isolated from human infections. J Clin Microbiol 2005; 43: 3713-3717.
- Soriano, F., Fernández-Roblas, R., Calvo, R., García-Calvo, G. *In vitro susceptibilities of aerobic and facultative non-spore forming Gram-positive bacilli to HMR 3674 (RU 66647) and other antimicrobials*. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 1028-1033.
- Yagüe Guirao, G., Martínez-Toldos, M.C., Mora Peris, B. y cols. *Actividad de nuevas quinolonas frente a aislamientos clínicos de Corynebacterium spp.* Rev Esp Quimioterap 2000; 13: 267-270.
- Shain, C.S., Amsden, G.W. *Telithromycin: The first of the ketolides*. Ann Pharmacother 2002; 36: 452-464.
- Roberts, M.C., Sutcliffe, J., Courvalin, P., Jensen, L.B., Rood, J., Seppälä, H. *Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants*. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 2823-2830.
- Shhlunzen, F., Zarivach, R., Harms, J. y cols. *Structural basis of the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria*. Nature 2001; 413: 814-821.
- Sierra, J.M., Martínez-Martínez, L., Vázquez, F., Giral, E., Vila, J. *Relationship between mutations in the gyrA gene and quinolone resistance in clinical isolates of Corynebacterium striatum and Corynebacterium amycolatum*. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 1714-1719.
- Roberts, M.C., Leonard, R.B., Briselden, A., Schoenkennecht, F.D., Coyle, M.B. *Characterization of antibiotic-resistant Corynebacterium striatum strains*. J Antimicrob Chemother 1992; 30: 463-474.
- Douthwaite, S., Jalava, J., Jakobsen, L. *Ketolid resistance in Streptococcus pyogenes correlates with the degree of rRNA dimethylation by Erm*. Mol Microbiol 2005; 58: 613-622.
- Rosato, A.E., Lee, B.S., Nash, K.A. *Inducible macrolide resistance in Corynebacterium jeikeium*. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 1982-1989.
- Yagüe Guirao, G., Segovia Hernández, M., Valero-Guillén, P.L. *Acylphosphatidylglycerol: A major phospholipid of Corynebacterium amycolatum*. FEMS-Microbiol Lett 1997; 151: 125-130.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. NCCLS, Document M100-S80, Wayne, Pa, 1998.
- Seppälä, H., Skurnik, M., Soini, H., Roberts, M.C., Huovinen, P. *A novel erythromycin resistance methylase gene (erm TR) in Streptococcus pyogenes*. Antimicrob Agents Chemother 1998; 40: 2562-2566.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York 1989.

17. Martínez-Martínez, L., Pascual, A., Suárez, A.I., Perea, E.J. *In vitro* activities of ketolide HMR 3647, macrolides and clindamycin against coryneform bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 3290-3292.
18. Ritcher, S.S., Heilmann, K.P., Beekman, S.E. y cols. *Macrolide-resistant Streptococcus pyogenes in the United States, 2002-2003*. *Clin Infect Dis* 2005; 41: 599-608.
19. Van Eldere, J., Meekers, E., Lagrou, K. y cols. *Macrolide-resistance mechanisms in Streptococcus pneumoniae isolates from Belgium*. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11: 332-334.
20. Shortridge, V.D., Flamm, R.K., Ramer, N., Beber, J., Tanaka, S.K. *A novel mechanism of macrolide resistance in Streptococcus pneumoniae*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1996; 26: 73-78.
21. Sutcliffe J., Tait-Kamradt, A., Wondrack, L. *Streptococcus pneumoniae and Streptococcus pyogenes resistant to macrolides but sensitive to clindamycin: A common resistance pattern mediated by efflux system*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 1817-1840.
22. Luna, V.A., Coates, P., Eady, E.A., Cove, J.H., Nguyen, T.T.H., Roberts, M.C. *A variety of Gram-positive bacteria carry mobile mef genes*. *J Antimicrob Chemother* 1999; 44: 19-25.
23. Tamayo, J., Pérez-Trallero, E., Gómez-Garcés, J.L., Alós, J.I. *Resistance to macrolides, clindamycin and telithromycin in Streptococcus pyogenes isolated in Spain during 2004*. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56: 780-782.