

CATEDRA DE MEDICINA PREVENTIVA Y SOCIAL, HIGIENE Y SANIDAD AMBIENTAL.

“ESTUDIO DE LAS RESISTENCIAS A AMINOGLICOSIDOS EN ENTEROBACTERIAS DE ORIGEN HOSPITALARIO”.

Mariscal Larrubia, A., Pérez López, J.A., Espigares García, D., Jurado Chacón, D. y Gálvez Vargas, R.

RESUMEN

Se estudia la presencia de enzimas modificantes de antibióticos aminoglicósidos y su origen genético en 97 cepas de enterobacterias resistentes a diversos aminoglicósidos y aisladas en el Hospital Universitario de Granada. La presencia de tales enzimas se detectó en 82 cepas (84,5%) cuyos determinantes génicos se localizaron en 74 casos (90,2 %) sobre plásmidos conjugativos, y en 8 (9,8 %) en plásmidos que únicamente se pudieron transferir mediante transformación. Se identificaron 4 tipos de enzimas, APH(3'), AAC(3), AAC(6') y ANT(2'') respectivamente según su frecuencia de aparición. Los resultados obtenidos indican la existencia de un estado de resistencia endémica, acentuado en el caso de aquellos antibióticos cuyo uso prácticamente no se controla, y aportan la base de conocimientos necesaria para la determinación de la evolución de las mismas en nuestro hospital con fines epidemiológicos.

SUMMARY

The aminoglycoside antibiotics modifying enzymes and their genetic properties from 97 enterobacteria strains resistant to several aminoglycoside antibiotics isolated at the University Hospital of Granada were studied. These enzymes were detected in 82 strains (84,5 %) and their genetics determinants were localized in 74 strains (90,2 %) on conjugative plasmids. 8 strains (9,8 %) had their genetics determinant on plasmid transferred only by transformation. Four types of enzymes were found, APH(3'), AAC(3), AAC(6') and ANT(2'') in this strains. Our results show a situation of endemic resistance towards those antibiotics without control in this hospital.

INTRODUCCION

Los enzimas modificantes de antibióticos aminoglicósidos (AGAC) juegan un papel fundamental, aunque no exclusivo en la resistencia de las cepas de origen nosocomial a este grupo de antibióticos (1). Se conocen actualmente tres mecanismos por los cuales estos enzimas pueden inactivar distintos tipos de antibióticos AGAC y que se conocen como O-fosforitransferasas, N-acetil transferasas y O-nucleotidil transferasas, según fosforilen, acetilen o nucleotiden respectivamente los correspondientes antibióticos (2).

En este estudio se analiza el contenido de enzimas modificantes de antibióticos aminoglicósidos y su origen genético, en 97 cepas de enterobacterias resistentes a AGAC aisladas a partir de muestras patológicas recibidas en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario de Granada para su análisis correspondiente.

MATERIAL Y METODOS

Cepas bacterianas y medios de cultivo.

Las 97 cepas resistentes a aminoglicósidos se aislaron en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario de Granada a partir de diferentes muestras procedentes de pacientes hospitalizados en distintos Servicios. Como cepa receptora se utilizó *Escherichia coli* K12 J62 *nal* y en la transformación *Escherichia coli* HB101. Como medios de cultivo se utilizaron en conjugación y transformación caldo de Luria-Bertani de la siguiente composición: 0,5 g de extracto de levadura (Difco), 1 g de triptona y 1 g de NaCl; una vez esterilizado dicho medio se le añadieron 10 ml de CaCl_2 0,25M y 5 ml de una solución al 20 % de glucosa, previamente filtrados. El antibiograma se llevó a cabo en agar Müller-Hinton (Difco). La obtención de suspensiones celulares para los ensayos enzimáticos se realizó en BHI (Difco). Para la selección de transconjugantes y transformantes resistentes a AGAC se utilizó agar McConkey (Pro-nadisa) conteniendo los antibióticos adecuados para la selección de los mismos.

Sensibilidad a antibióticos.

El antibiograma se realizó según el método de Kirby-Bauer (3) y los discos de antibióticos (amikacina, aminosidina, dibekacina, getamicina, kanamicina, nalidíxico, neomicina, sisomicina y tobramicina) se obtuvieron de BBL. El polvo valorado de los mismos antibióticos, obtenido de Sigma, fue utilizado en la selección de las cepas receptoras de plásmidos.

Transferencia de las resistencias.

La transferencia se realizó por conjugación en medio líquido y por transformación únicamente con aquellas cepas de las que previamente no se pudie-

ron obtener transconjugantes. Las técnicas utilizadas se realizaron según se ha descrito previamente (4). Los transconjugantes se seleccionaron en agar McConkey conteniendo 250 μ g/ml de ácido nalidixico y el antibiótico cuya resistencia se quisiera transferir según las siguientes concentraciones: aminosidina, gentamicina, kanamidina, o neomicina, 30 μ g/ml; amikacina, dibekacina o tobramicina, 10 μ g/ml. Los transformantes se obtuvieron del mismo modo, pero sin añadir ácido nalidixico al medio selector.

Ensayos enzimáticos.

Los extractos celulares se obtuvieron por sonicación en un Sonicator Cell Disruptor Mod. W135 a 100 W, 4,5 min. en impulsos de 50 % de segundo. El contenido de enzimas modificantes de AGAC se detectó mediante la utilización de cosustratos radiactivos ($8-^{14}C$) adenosina 5'-trifosfato, adenosina 5'-($r-^{32}p$) trifosfato y ($1-^{14}C$) acetil-Coenzima A, obtenidos de Radiochemical Center Amersham, Inglaterra) siguiendo un método radioenzimático (1).

Aislamiento de DNA plasmídico.

El DNA plasmídico para la transformación y correspondiente visualización en electroforesis horizontal en gel de agarosa al 0,75 %, se extrajo según la técnica de lisis alcalina descrita por Casse y cols. (5).

RESULTADOS

Los microorganismos aislados resistentes a AGAC según el método de difusión en disco-placa se recogen en la tabla 1. Los enzimas modificantes de AGAC detectados en los transconjugantes o transformantes, se indican en la tabla 2.

TABLA 1. Distribución de patrones de resistencia a AGAC en cepas de origen nosocomial.

Microorg.	Número de cepas resistentes a AGAC que se indican:											Total cepas
	G	K	AG	DK	GK	GT	KT	AKG	GKT	DGK	DGKT	
<i>E. coli</i>	2	33		2	4		1		1	1		44
<i>K. pneumoniae</i>	2	7			2				3		1	15
<i>Proteus. sp.</i>	2					1			1			4
<i>M. Morganii</i>					1							1
<i>E. aerogenes</i>					4							4
<i>E. cloacae</i>									2			2
<i>Serratia. sp.</i>	2		5		2			2				11
<i>Salmonella. sp.</i>		7										7
<i>S. sonnei</i>		8										8
<i>C. intermedius</i>		1										1
TOTAL	8	56	5	2	13	1	1	2	7	1	1	97

A: amikacina; D: dibekacina; G: gentamicina; K: kanamicina; T: tobramicina.

TABLA 2. Distribución de enzimas modificantes de AGAC determinados por plásmidos en las cepas aisladas.

Microorg.	Enzimas modificantes de AGAC:						Total	
	APH(3')	AAC(3)	AAC(6')	ANT(2'')	APH(3') AAC(3)	APH(3') ANT(2'')		AAC(3) AAC(6')
Escherichia	23	1		1	4		1	30
Klebsiella	7	2			4	1	1	15
Serratia		2	5		2		2	11
Shigella	8							8
Enterobacter		1			5			6
Salmonella	6							6
Proteus		3			1			4
Citrobacter	1							1
Morganella		1						1
TABLA	45	10	5	1	16	1	4	82

AGAC: aminoglicósidos; APH(3'): 3'-fosforilasa; AAC(3): 3-acetiltransferasa; AAC(6'): 6'-acetiltransferasa; ANT(2''): 2"-nucleotidiltransferasa.

Se detectó DNA plasmídico mediante electroforesis en gel de agarosa en todas las cepas que transfirieron sus resistencias a AGAC y en 11 que aunque no transfirieron la resistencia a este tipo de antibióticos, si lo hicieron con respecto a otros antibióticos. En las cepas restantes que no transfirieron sus resistencias, no se detectó la presencia de plásmidos. En la figura 1 se muestra una fotografía de las bandas plasmídicas en electroforesis de gel de agarosa de una de las cepas estudiadas, resistentes a AGAC, así como de los transconjugantes igualmente resistentes a kanamicina.

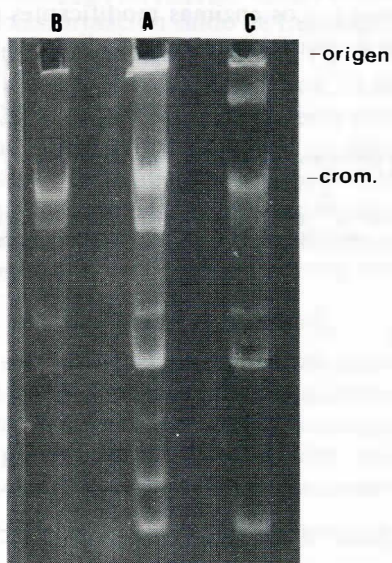


Fig. 1.- Patrón de bandas de DNA plasmídico en electroforesis de gel de agarosa al 0,7 %, perteneciente a una de las cepas de *Shigella sonnei* estudiadas resistente a kanamicina y de los transconjugantes obtenidos a partir de la misma; A: cepa original donadora, B y C: transconjugantes obtenidos a partir de la misma, ambas resistentes a kanamicina.

DISCUSION

En la población de enterobacterias estudiada, el patrón de resistencia a antibióticos AGAC más frecuente fue de kanamicina (59,7 %) según se muestra en la tabla 1. La distribución de este patrón, al igual que los que le siguen en frecuencia, gentamicina-kanamicina (13,4 %) y gentamicina (7,2 %), fue común a la mayoría de las especies estudiadas. Los niveles de resistencias a dibekacina y amikacina observados, aún cuando son realmente bajos, tienen importancia ya que en el período de estudio estos antibióticos no se habían introducido en la antibioterapia del Hospital Universitario de Granada.

La importancia de los plásmidos en la diseminación de las resistencias a los AGAC se ha puesto de manifiesto en numerosas ocasiones (6). La mayoría de las resistencias a AGAC presentes en las cepas aisladas en nuestro hospital estuvieron determinadas genéticamente por plásmidos, principalmente de tipo conjugativo. De las 97 cepas examinadas, 74 presentaron plásmidos conjugativos mientras que 8 únicamente pudieron transferir sus plásmidos de resistencia a AGAC mediante transformación. Nuestros resultados confirman la estrecha relación existente entre los mecanismos de resistencia a AGAC y los enzimas modificantes codificados por plásmidos (7). Al igual que en los estudios de Price y cols. (8), fueron también las cepas de *E. coli* aisladas en nuestro hospital, las que presentaron una mayor proporción de resistencias a AGAC en cuyo mecanismo no estaba implicada la presencia de enzimas modificantes ni plásmidos de resistencia a dichos antibióticos.

El enzima más frecuente fue la fosforilasa APH(3') detectada en 66 cepas, 21 de las cuales presentaron otros enzimas, principalmente AAC(3). Como se puede apreciar igualmente en la tabla 2, 30 cepas presentaron la acetilasa AAC(3), 20 de las cuales también poseían otros enzimas en nuestro medio, principales responsables de la resistencia a kanamicina y gentamicina (2). Este estado de las resistencias es un reflejo directo de la terapia seguida y de la contribución de los antibióticos en la selección y mantenimiento de estas resistencias ya observadas en estudios previos (9, 10). La incidencia del tercer enzima más frecuente, AAC(6'), presente en 7 cepas resistentes a la amikacina de *Serratia marcescens*, en una cepa de *E. coli* y una de *Klebsiella*, ambas sensibles fenotípicamente a este antibiótico, fue el resultado de un brote epidémico de cierta importancia en nuestro hospital, ya que se aislaron en un intervalo de tiempo muy corto y debió de suceder por la llegada de una cepa foránea portadora de la resistencia ya que hasta ese momento, no se había detectado dicha resistencia en nuestro medio.

La resistencia a la amikacina, hasta ahora no detectada en nuestro hospital, no se extendió entre otras cepas bacterianas, confirmando las predicciones realizadas por Miller y col. (11) referente a la falta de incremento en las resistencias a este antibiótico entre la población bacteriana aún con el uso de este antibiótico. La presencia de AAC(6') en nuestro hospital, básicamente limitada a microorganismos de la especie *S. marcescens*, posiblemente se deba a la

importancia a nuestra flora autóctona de cepas foráneas similares a las ya detectadas por Gómez-Luz y cols. en el Hospital Universitario de Zaragoza (12).

BIBLIOGRAFIA

- (1) DAVIES, J.E.: Aminoglycoside-aminocyclitol antibiotic and their modifying enzymes. IN V. Lorian (ed.) Antibiotics in laboratory medicine. Williams and Wilkins. Baltimore, (1986).
- (2) DAVIES, J.E. y SMITH, D.I.: Ann. Rev. Microbiol. 32, 469-518, (1978).
- (3) BAUER, A.W., KIRBY, W.M.M., SHERRIS, J.C. y TURCK, M.: Am. J. Clin. Pathol, 45, 493-496, (1966).
- (4) DAVIES, R.W., BOTSTEIN, D. y ROTH, J.R.: Advanced bacterial genetics. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York, D.C., (1980).
- (5) CASSE, F., BOUCHER, C., JULLIOT, J.S., MICHEL, M. y DENAIRE, J.: J. Gen. Microbiol., 113, 229-242, (1979).
- (6) COURVALIN, P. y CARLIER, C.: Antimicrob. Chemother. 8, Suppl. A, 57-69, (1981).
- (7) DAVIES, J. y KAGAN, S.A.: What is the mechanism of R-plasmid-determined resistance to aminoglycoside antibiotics, In Drews and Hogenauer (eds.) R-factors, their properties and possible control. Springers Publishing Co. New York, (1977).
- (8) PRICE, K.E., KRESEL, P.A., FARCHIONE, L.A., SISKIN, S.B. y KARPOW, S.A.: J. Antimicrob. Chemother., 8, Suppl. A., 89-105, (1981).
- (9) CASEWELL, M.W.: The role of multiply resistant coliforms in hospital-acquired infection. In D. Schelessing (ed.) Recent advances in infection 2. Amer. Soc. Microb. Washington, D.C., (1982).
- (10) FOSTER, T.J., KLECNER, N.: Properties of drug resistance transposons, with particular reference to Tn 10. In C. Stuttard and K.R. Rozee (eds.) Plasmid and maintenance mechanism. Academic Press. New York, D.C. (1980).
- (11) MILLER, G.M., SABATELL, F.S., HARE, R.S. y WARTZ, J.A.: Survey of aminoglycoside resistant patterns. In Developments in industrial microbiology. Society for Industrial Microbiology. Arlington. Va. (1980).
- (12) GOMEZ-LUZ, R., LARRAD, L., RUBIO-CALVO, M.C., NAVARRA, M. y LASIERRA, M.P.: AAC(3) and AAC(6') enzymes produced by R plasmids isolated in a general Hospital. In S. Miitsushashi, L. Rosival and Krcmery (eds.). Antibiotics resistance, trasposition and other mechanism. Avicenum Prague and Springer Verlag. Berlin, (1980).