

**Mesa redonda 4**  
**Mecanismos moleculares de resistencia bacteriana**  
**y su relación con la patogenicidad**

# Ponencia

## Bases genéticas de la relación entre patogenicidad y resistencia a los antibióticos en grampositivos

R. Gómez Lus

Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Zaragoza

En bacterias gram-positivas la relación entre determinantes de patogenicidad y la sensibilidad a los antibióticos la hemos analizado estudiando las bases genéticas de la resistencia en las cepas invasivas. Este planteamiento nos ha permitido demostrar la presencia de aislamientos clínicos invasivos, pertenecientes a los géneros *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Enterococcus*, con resistencia a antibióticos de la familia MLS<sub>B</sub>, cloranfenicol, tetraciclina y kanamicina, determinada por los genes *erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)*, *mef(A/E)*, *msr(A)*, *cat*<sub>pC194</sub>, *tet(M)* y *aph(3')*-III. En el género *Streptococcus* hemos comparado las especies *S.pneumoniae*, *S.pyogenes* y *S.agalactiae*, con patógenos oportunistas como estreptococos del grupo viridans(EGV): *S.mitis*, *S.oralis* y *S.salivarius*. En las cepas de *S.pneumoniae* resistentes a eritromicina, es prevalente el gen *erm(B)*, que codifica para metiltransferasas y puede expresar el fenotipo MLS<sub>B</sub> constitutivo (MM 14-15, 16, lincosamidas y estreptogramina B), o el MLS<sub>B</sub> inducible (MM 14-15), mientras que el resto de los aislamientos, presentan el fenotipo M determinado por el gen *mef(A/E)*; en nuestro laboratorio M.Canales ha encontrado en 137 cepas de neumococos resistentes a eritromicina, un 18,7% que portaban el gen *mef(A/E)*. En contraste, al estudiar 18 cepas de *S.mitis* con fenotipo M, aisladas en hemocultivo entre 1990 y 1998, detectamos en todas el gen *mef(A/E)*. Los genes *mef(A)* y *mef(E)* poseen una homología del 90%, por lo que la nueva terminología se refiere a ellos solamente como *mef(A)*, pero pueden diferenciarse con el consiguiente valor epidemiológico, ya que al hacer la digestión con la enzima *BamHI*, sólo el *mef(A)* tiene un punto de corte obteniéndose dos fragmentos de 283 y 64 pb, en tanto que el *mef(E)* da un fragmento de 347 pb. Por ello, P.Cerdá estudió 156 cepas de estreptococos del grupo viridans(EGV), resistentes a eritromicina, dado que el 57,7% de los aislamientos tenían el fenotipo M, el 31,4% el fenotipo MLS<sub>B</sub> constitutivo, y el 9%, MLS<sub>B</sub> inducible. Todos los aislamientos con fenotipo MLS<sub>B</sub> portaban el gen *erm(B)*, y los del fenotipo M, el gen *mef(A/E)*. Se procedió a la diferenciación de la subclase empleando la enzima *BamHI*, hallando el *mef(E)* en el 98,7% y el *mef(A)* en el 3,6%. Todas las cepas con fenotipo MLS<sub>B</sub> tenían el gen *erm(B)*, siendo destacable que el 43,7% poseían también el gen *mef(E)*. Los vectores del gen *erm(B)* son transposones conjugativos de la familia Tn1545/Tn916, lo que se ha demostrado en cepas de *S.pneumoniae* primero por C.Seral et al(1), y posteriormente por M.Canales, mediante detección del gen de la integrasa (*intTn*) necesario para la transposición y conjugación. En cepas de SGV, P.Cerdá ha confirmado la presencia del gen *intTn* en cepas con el gen *erm(B)*, así como en las que portaban los genes *cat*<sub>pC194</sub>, *tet(M)* y *aph(3')*-III. Los vehículos de los genes *mef(A)* y *mef(E)* no son transposones conjugativos, y han sido descritos por Santagati et al (2) y por Gay et al(3). El primero es el denominado Tn1702.1, y se considera un transposón defectivo de 7,244 pb que posee 8 marcos de lectura abiertos(orf), entre ellos el orf2(homólogo de la recombinasa sitio-específica de *S.aureus* y *C.perfringens*), el orf5 es idéntico al gen *mef(A)*, el orf5 es homólogo del *msr(A)*, y los orf6 y orf7, homólogos de genes del Tn2552 pero sin función conocida, mientras que el orf8 homólogo del gen *umuC*, del precitado Tn, que confiere resistencia a la luz UV. El vector del *mef(E)* descrito por Gay et al se encuentra formando parte del elemento de inserción **mega**(macrolide efflux genetic assembly), flanqueado por 2 secuencias cromosómicas. La secuencia 5' de **mega** (944pb) no corresponde a ningún orf o nucleótido registrado. Sin embargo, la región que precede al gen *mef(E)* era idéntica a la situada en la misma posición en el Tn1207.1, delante del gen *mef(A)* en *S.pneumoniae* y

*S.pyogenes*, que incluye una región promotora. La secuencia 3' inmediata al gen *mef(A)* contiene un orf de 1464 pb, en la misma orientación, designada *mel*, que codifica una proteína homóloga del gen *msr(A)*, que pertenece a la familia ABC(ATP binding cassette). Existe una región intergénica de 119 pb con una secuencia Shine-Dalgarno, a la izquierda del gen *mel*. Los genes *mef(E)* y *mel* se co-transcriben. En nuestras cepas de *S.pneumoniae* y en el 96.73% de los aislamientos de SGV con fenotipo M, todas portando el gen *mef(E)*, se detectó también el gen *mel*. Sin embargo, dos cepas de *S.mitis* y una de *S.sanguinis*, poseían el gen *mef(E)* pero no el *mel*, lo que sugiere la existencia de otro elemento genético alternativo. El mismo patrón presentaban 2 cepas de *S.oralis*, es decir *mef(E)/X*, hallando también el par *mef(E)/mel*. De otra parte, en 6 cepas de SGV se encontró el gen *mef(A)* con el *mel*, demostrando el intercambio y la reorganización de genes en estas bacterias. No obstante, ninguno de los elementos citados, Tn 1207.1 y *mega*, se transfieren por conjugación, siendo la transformación el mecanismo, lo que se ha logrado en nuestro laboratorio utilizando como receptor la cepa R6 de neumococo y el factor de competencia, proporcionados por R.López y E.García. Las donadoras han sido aislamientos de *S.pneumoniae*, *S.mitis*, *S.oralis* y *S.salivarius*, transfiriéndose los genes *mef(E)/mel*. La elevada frecuencia de estos genes en SGV en comparación con la observada en *S.pneumoniae*, y la capacidad transformante de los neumococos, parecen confirmar su papel como reservorio de genes *mef(E)/mel*. En el género *Staphylococcus*, tanto en cepas de *S.aureus* como en especies coagulasa-negativas, L.Millán ha logrado transferir mediante conjugación los genes prevalentes *erm(C)* y *erm(A)*, utilizando como receptora la cepa de *S.aureus* RN4220, aportada por P.Courvalin. Esta revisión de resultados y de la información bibliográfica, demuestran que en los elementos genéticos portadores de los determinantes de resistencia examinados, no se encuentran genes de virulencia. Asimismo, los genes de resistencia estudiados se transfieren entre patógenos como *S.pneumoniae* y oportunistas como *S.mitis*, *S.oralis* o *S.salivarius*. Al comparar el patrón de resistencia de las cepas invasivas de *S.pneumoniae*, aisladas de hemocultivos en el Hospital Clínico Universitario "Lozano Blesa" (2001-2002), se observa que son más sensibles que las procedentes de otras muestras clínicas, según los datos aportados por E.Durán. Así los porcentajes de cepas sensibles son 73% para eritromicina, 70% para penicilina, y 67% para cloranfenicol y cotrimoxazol.

#### **Bibliografía**

- 1.Seral C, et al. Distribution of resistance genes *tet(M)*, *aph3'-III*, *cat<sub>PC194</sub>* and the integrase gene of Tn1545 in clinical *Streptococcus pneumoniae* harbouring *erm(B)* and *mef(A)* genes in Spain. J Antimicrob Chemother 2001; 47:863-866.
- 2.Santagati M, et al. Characterization of a genetic element carrying the macrolide efflux gene *mef(A)* in *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 2000;44:2585-2587.
- 3.Gay K, et al. Structure and dissemination of a chromosomal insertion encoding macrolide efflux in *Streptococcus pneumoniae*. J Infect Dis 2001;184:56-65.

# Ponencia

## Adaptación global de *Pseudomonas aeruginosa*: Temas comunes en resistencia a antibióticos y patogenicidad

F. Baquero, R. Cantón, M. García del Castillo, M.R. Baquero, A. Oliver y J. Blázquez

*Servicio de Microbiología, Hospital Ramón y Cajal, Madrid*

Las estrategias de adaptación de las bacterias se basan en el desarrollo de mecanismos de resistencia a los agentes nocivos que puedan destruirlas, o bien de mecanismos de supervivencia para enfrentarse a situaciones en que no se dan condiciones para la obtención de energía y por tanto para la replicación celular. El desarrollo de estos mecanismos podría estar facilitado por un tipo de señales comunes de estrés global. Así, el efecto neto de la disminución de la tasa de crecimiento bacteriano por antibióticos podría no distinguirse del que resulta de un aporte limitado de factores esenciales para el crecimiento. Las técnicas que valoran la respuesta global de la expresión génica frente a distintos estímulos mediante el uso de microarreglos (*microarrays*) van a ofrecer la respuesta a esta cuestión. En una reciente publicación (*Nature* 2002, 416: 740) se ha sugerido que una proteína reguladora de dos componentes, PvrR, en *Pseudomonas aeruginosa*, actuaría de forma común, bajo determinadas condiciones ambientales, induciendo una conversión fenotípica (tipo cambio de fase) de la población bacteriana que afectaría tanto a la resistencia a antibióticos como a la formación de *biofilms* en enfermos con fibrosis quística. Si bien esta publicación contiene algunos elementos discutibles, el concepto de señales reguladoras que afectan a virulencia y resistencia a antibióticos es sin duda importante. La exposición de *biofilms* de *P. aeruginosa* a tobramicina induce cambios en la expresión de al menos 20 genes (Whiteley y cols., 2001). Es muy probable que otros muchos genes alteren su expresión en el ambiente pulmonar de la fibrosis quística a través de alteraciones en el superenrollamiento de DNA. El crecimiento en condiciones anaerobias (y por tanto energéticamente restrictivas) de *P. aeruginosa* induce la formación del exopolímero alginato y una forma de vida sésil (*biofilm*), que probablemente es una forma de supervivencia en condiciones críticas. En estas condiciones, estudios con microarreglos han mostrado que unos 50 genes bacterianos pueden alterar su expresión; se ha confirmado que el regulador AlgR, implicado en esta transición, al menos altera la expresión de 47 proteínas bacterianas (Lizewski y cols., 2002), alguna de las cuales puede estar implicada en la sensibilidad a los antibióticos. La mutación en factores anti-sigma (como *mucA*) y la activación de factores sigma alternativos (AlgU) influyen en la producción de alginato, pero también en muchas otras funciones potencialmente patogénicas (Firoved y Deretic, 2003). Las proteínas OprF y el circuito *rhl* son necesarios para el mantenimiento del *biofilm*. Por otra parte, la síntesis de alginato provoca obstrucción pulmonar y probablemente un estado inflamatorio en el pulmón del paciente con fibrosis quística. El alginato reduce la entrada de oxígeno, manteniendo una baja tasa de crecimiento bacteriano, y creemos que es a la vez una reserva de agua y energía para la supervivencia. De hecho, el alginato puede ser utilizado por *P. aeruginosa* como única fuente de carbono (experimentos de nuestro laboratorio). Con bajo crecimiento, anaerobiosis y la barrera del polímero, esta forma de supervivencia produce también una reducción en la actividad de muchos antibióticos, y probablemente obstaculiza la eficacia de la respuesta inmunitaria. Además, no es imposible que, por el efecto de inducción de DNA polimerasas proclives a errores en presencia de concentraciones reducidas de antibióticos, esta situación ofrezca condiciones adecuadas para la aparición de variación genética, incluyendo mutantes hipermutadores. Una reevaluación de nuestros datos sobre frecuencias de mutación de *P. aeruginosa* en fibrosis quística (enfermedad dominada patogénicamente por la creación de

Continúa →

*biofilms* en las *Pseudomonas* situadas en el bronquio) indica que, además de las bacterias fuertemente mutadoras ( $100 \times$  la tasa de mutación normal), muy fuertemente correlacionadas con resistencia a antibióticos, se da una gran frecuencia de organismos con bajos incrementos en la tasa de mutación ( $5-10 \times$ ), que podrían también aumentar la adaptabilidad microbiana. Resultados recientes de nuestro laboratorio indican que, sin embargo, en estudios de competición *in vitro* en condiciones de *biofilm* entre variantes mutadores y no mutadores en medio mínimo glucosa o medio mínimo alginato, las poblaciones no mutadoras tienden a ser seleccionadas. La consecuencia de estas observaciones es que mejorar la oxigenación (Worlitzsch y cols., 2002) y mantener periodos libres de antibióticos podrían reducir la frecuencia de la resistencia en esta enfermedad. Fármacos que inhibiesen la adaptación anaeróbica de *P. aeruginosa* podrían ser de interés en el control de la formación de *biofilms* (Hassett y cols., 2002). Por otra parte, es importante conocer los efectos de los antibióticos sobre la producción de alginato; los macrólidos de 14 átomos son capaces de reducir la actividad enzimática relacionada con la formación de alginato (Nagino y cols., 1997) y sería interesante estudiar cepas resistentes a este tipo de acción de los macrólidos. Por otra parte, es muy esperable que una antibioticoterapia eficaz, reduciendo la densidad de las poblaciones bacterianas, pudiese modificar la expresión de los cientos de genes que se han revelado dependientes de *quorum sensing* en estudios con microarreglos (Wagner y cols., 2003); la resistencia a antibióticos (o el mantenimiento de *biofilms*) aseguraría el efecto contrario. En suma, los mecanismos de virulencia y de resistencia a los antibióticos se producen como respuestas adaptativas de las poblaciones microbianas; por ello es esencial realizar un enfoque ecológico y evolutivo común en la explicación de estos fenómenos de crucial importancia para la salud humana.

# Ponencia

## Emergencia de plásmidos híbridos de virulencia y resistencia a antimicrobianos en *Salmonella*

M.C. Mendoza<sup>1</sup>, B. Guerra<sup>1,2</sup> y S. Soto<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Área de Microbiología, Departamento de Biología Funcional, Universidad de Oviedo;

<sup>2</sup>Federal Institute for Risk Assessment, National Salmonella Reference Laboratory, Berlin, Alemania

En determinados serotipos de *Salmonella* la capacidad de originar infecciones sistémicas en modelos animales depende de la presencia de plásmidos de virulencia, cuyo tamaño es variable (50-94 kb) y característico de serotipo. Todos ellos comparten una región de 7,8 kb, denominada *spv*, que incluye cinco pautas abiertas de lectura designadas *spvR*, *spvA*, *spvB*, *spvC* y *spvD*. Esta región es la causa del aumento de la tasa de crecimiento de *Salmonella* durante la fase sistémica de la enfermedad en los hospedadores específicos de cada serovariedad. El plásmido de la cepa tipo *Typhimurium* LT2 (pLT90) tiene un tamaño de 94 kb y contiene otros *loci* de virulencia que incluyen el operón *pef*, para la biosíntesis de fimbrias implicadas en la adherencia a epitelio intestinal en ratones, y el gen *rck*, que codifica una proteína de membrana que confiere a la bacteria resistencia frente a la actuación del complemento. En este plásmido se ha detectado, además, un origen de transferencia (OriT) y una región *tra*, similar al de plásmidos F conjugativos, así como los genes *repA* (de RepFIIA), operón *par* e *incR*, de plásmidos del grupo de incompatibilidad IncFII.

En las últimas dos décadas se ha registrado la emergencia de clones o grupos genómicos de *Salmonella* que han adquirido multiresistencia a antimicrobianos de amplio uso en la actualidad, o en el pasado reciente, en clínica humana y veterinaria. Ahora bien, esta emergencia se ha asociado al uso de antimicrobianos como profilácticos y promotores de crecimiento animal, y las cepas multiresistentes llegan al hombre a través de alimentos de origen animal contaminados. Entre estos clones predomina uno definido como serotipo *Typhimurium*, fago tipo DT104 y resistente a ampicilina-cloranfenicol-estreptomicina-sulfamidas-tetraciclina [ACSSuT], asociado al ganado como principal reservorio y que tiene carácter pandémico. En este clon, los cinco genes-R [*pse1*, *floR*, *aadA2*, *sul1* y *tet(G)*] están localizados en una isla-R cromosómica con dos integrones de clase 1 que portan las casetes génicas [*pse1*] y [*aadA2*]. En España, además, en algún momento de la pasada década han aparecido otros dos clones de *Typhimurium*, asociados al cerdo como reservorio, en los cuales la multiresistencia es mediada por plásmidos híbridos de virulencia-resistencia. Dichos plásmidos han sido descubiertos y están siendo estudiados molecularmente en nuestro laboratorio.

Uno de los nuevos clones de *Typhimurium* incluye cepas recogidas en el Principado de Asturias entre 1993 y 2000; presumiblemente podría estar extendido por todo el país, pero el estudio epidemiológico está pendiente de realización. Las cepas estudiadas pertenecen a diferentes fagotipos y generan perfiles de bandas de DNA bien definidos por PFGE con *XbaI*. Su perfil de virulencia es típico de *Typhimurium* e incluye las cinco islas de patogenicidad, los genes *ent* (enterotoxina), *slyA* (salmolisina), *phoP/Q* (implicado en resistencia a macrófagos) e *iro* (regulador del operón-*fur*), y carece del gen *agf* (síntesis de fimbrias agregativas); presentan fenotipo-MR [ACSSuT] codificado por los genes *tem1*, *catA*, *aadA1*, *sul1* y *tet(B)*. La multiresistencia está localizada en un plásmido (pUO-St-VR2) de tamaño cercano a 140 kb, conjugativo y que, al igual que el plásmido de virulencia típico de *Typhimurium*, pSLT90, pertenece al grupo IncFII. Este plásmido híbrido porta los genes de virulencia *spvA-C* y *rck* (pero no *pef*), y los de resistencia *catA1* (cloranfenicol acetiltransferasa, probablemente en el transposón Tn9), *tet(B)* (proteína/bomba de expulsión TET(B)), el operón *mer* (resistencia a mercurio y desinfectantes derivados) y un integrón de clase 1 con los genes *qacEΔ1/sul1* (resistencia a antisép-

Continúa →

ticos de amonio cuaternario y a sulfadiazina) en la región constante 3' y la configuración de casetes génicas *oxa1-aadA1* (OXA- $\beta$ -lactamasa y estreptomycin-adeniltransferasa) en la región variable. Este integrón y el operón *mer* han sido asociados al transposón Tn2603 y a plásmidos-R del grupo IncFI en cepas de *Typhimurium* aisladas en Italia.

El Centro Nacional de Microbiología comunicó la emergencia, en 1997, de una variante monofásica de *Typhimurium* [4,5,12:i:-] que carece del gen *fljB*, adscrita al fagotipo DT U302, y multirresistente: ACGSSuTp  $\pm$  T. Nosotros describimos que esta variante genera perfiles PFGE-*XbaI* y de genes V (carece de los genes *agf* e *iro*) característicos, y que la multirresistencia es codificada por los genes *tem1*, *cmlA1*, *aac(3)-IV*, *aadA2*, *dfrA12*  $\pm$  *tetA*. En este caso, los genes de resistencia a Su, S y Tp (trimetoprima por producción de una dihidrofolato reductasa de tipo 12) están contenidos en un integrón de clase 1, insertado probablemente en un transposón de la familia del Tn21 (dato apoyado por la presencia de los genes *tnpA*, *tnpR* y *merA*). Este integrón presenta una configuración de casetes característica, *dfrA12-aadA2*, descrita también en plásmidos epidémicos de otras enterobacterias y *Vibrio cholerae*. Además, tanto el integrón como el resto de los genes R están contenidos en plásmidos no conjugativos del grupo de incompatibilidad IncN, con dos tamaños diferentes, pUO-*St*-R4 de 120 kb (que carece de genes de virulencia) y pUO-*St*-VR3 de 140 kb, que contiene los genes *spvA-C* (pero no *rck* y *pef*). Aunque los plásmidos R del grupo IncN son frecuentes en las bacterias, ésta es la primera vez que se relacionan con los genes *spv* típicos de plásmidos V de *Salmonella*.

Ante estos datos podemos asumir que nos encontramos frente a dos ejemplos diferentes de selección y evolución de plásmidos híbridos de virulencia-resistencia en *Salmonella*, presumiblemente en los animales reservorio debido a que se han generado ambientes con fuerte presión antibiótica. Mientras que pUO-*St*-VR2 parece proceder de un plásmido V que consiguió adquirir genes R, el origen de pUO-*St*-VR3 parece estar en un plásmido R (pUO-*St*-R4) que ha adquirido la región *spv* a partir de un plásmido V. Además, estamos ante ejemplos de dispersión de genes R en integrones, integrones en transposones e integrones-transposones en plásmidos.

# Ponencia

## ¿Son las cepas de *Escherichia coli* uropatógenas resistentes a quinolonas menos virulentas?

J. Vila

Servicio de Microbiología, Hospital Clínic, Barcelona

**Introducción.** Las infecciones del tracto urinario, incluyendo cistitis y pielonefritis son una de las infecciones más frecuentes tanto en el ámbito hospitalario como en la comunidad. *Escherichia coli* es el microorganismo que con mayor frecuencia causa infecciones del tracto urinario, representado un 90% de las infecciones del tracto urinario en la comunidad y aproximadamente un 50% de las infecciones del tracto urinario en el hospital. Diversos factores de virulencia se han descrito en cepas de *E.coli* causantes de infecciones del tracto urinario. Entre estos debemos destacar diversos tipos de fimbrias (fimbria tipo 1, fimbria pap, fimbria prs), factor necrotizante citotóxico (CNF-1), hemolisina (Hly), proteína de invasión (Ibe), aerobactina (aer), receptor de sideroforo (Ire). La mayoría de estos factores de virulencia están localizados en grandes plásmidos o en regiones particulares del cromosoma denominadas islas de patogenicidad. En nuestro hospital el 23% de los aislamientos clínicos de *E.coli* causantes de infecciones del tracto urinario eran resistentes a fluoroquinolonas. Sin embargo, cuando este porcentaje se desdoblaba en cepas de *E.coli* causantes de pielonefritis y cistitis los valores eran del 8% y 25% respectivamente.

**Objetivo.** El objetivo de nuestro estudio fue investigar la prevalencia de 25 potenciales factores de virulencia de *E.coli* causantes de infecciones del tracto urinario y correlacionar la presencia de estos factores de virulencia con la sensibilidad a ampicilina, gentamicina, cotrimoxazol, ácido nalidixico y ciprofloxacino.

**Materiales y Métodos.** El estudio se llevó a cabo con 51 cepas de *E.coli* causantes de cistitis y 32 cepas causantes de pielonefritis. Mediante PCRs múltiples se detectaron 25 factores de virulencia potencialmente asociados a *E.coli* causantes de infecciones del tracto urinario. La expresión de la hemolisina se determinó mediante crecimiento en placas de agar sangre preparadas con 5% de sangre de carnero y la expresión de la fimbria tipo 1 se determinó mediante aglutinación de *Saccharomyces cerevisiae*. La sensibilidad a los agentes antimicrobianos descritos anteriormente se realizó mediante el método de difusión en disco. En las cepas resistentes a quinolonas se determinaron los mecanismos de resistencia a estos agentes antimicrobianos utilizando la técnica de PCR para amplificar la región determinante de la resistencia a quinolonas de los genes *gyrA* y *parC* y posterior secuenciación.

**Resultados.** De los 25 potenciales factores de virulencia analizados en 15 (60%) la prevalencia era superior al 35%. Cuando se correlacionó la presencia de los genes que codifican factores de virulencia con la sensibilidad o resistencia a diversos agentes antimicrobianos se observó que no había diferencia significativa cuando se correlacionaban con ampicilina o gentamicina, pero sí la había cuando la correlación se realizaba con ácido nalidixico, ciprofloxacino o cotrimoxazol. Entre las cepas de *E.coli* estudiadas se observaba una menor expresión de la fimbria tipo 1 en las cepas resistentes al ácido nalidixico que en las sensibles. Además, se observaba una menor prevalencia de los genes *sfa* (Fimbria S), *hly* (hemolisina), *cnf* (factor necrotizante citotóxico), *fyu* (Yersiniabactina), *kpsII* (síntesis polisacárido capsular), *omp* (Proteasa), PAI (isla de patogenicidad) y *ibeA* (proteína de invasión). Sin embargo, la mayoría de cepas resistentes a quinolonas lo eran también a cotrimoxazol.

Para ello se tomaron dos subpoblaciones de cepas de *E.coli* con los siguientes fenotipos  $Nal^R$ ,  $Sxt^S$  y  $Nal^S$ ,  $Sxt^R$ , comparandose con una subpoblación  $Nal^S$ ,  $Sxt^S$ . El análisis estadístico de los datos demostró una significancia entre el contenido y/o expresión de los genes citados a continuación entre las cepas de *E.coli* resistentes al ácido nalidixico versus las cepas sensibles, sin embargo esta significancia estadística no se observó cuando las cepas eran  $Nal^S$ ,  $Sxt^R$ . Estos genes eran: Sfa (Fimbria S), Hly (hemolisina), Cnf (factor necrotizante citotóxico).

En general nuestros resultados demuestran que las cepas resistentes al ácido nalidixico presentan con menor frecuencia genes tales como *hly*, *cnf*, *sfa* asociados a factores de virulencia y además se observa una disminución en la expresión de las fimbrias tipo 1 en algunas cepas. Para explicar este hecho dedujimos tres posibilidades: i. Pacientes habían adquirido cepas de *E.coli* resistentes a quinolonas que de una manera natural carecían de estos genes y que se había diseminado de una manera clonal. Sin embargo el análisis epidemiológico-molecular de estas cepas mediante PFGE y REP-PCR demostró que no estaban relacionadas epidemiológicamente. ii. Se ha comprobado que mutaciones en el gen *gyrA* de la DNA girasa produce una disminución en el grado de superenrollamiento negativo del DNA. La expresión de algunos genes se ha relacionado al superenrollamiento negativo y este podría ser el caso del gen *fimA* que codifica las fimbrias tipo 1. y iii. Durante el desarrollo de la resistencia a quinolonas en estas cepas, facilitado por la exposición a estos agentes antimicrobianos, estos pueden facilitar la delección y transposición de regiones de ADN (por ejemplo: delección de islas de patogenicidad o transposición de secuencias de inserción). Las islas de patogenicidad comparten estructura con los bacteriófagos y ha sido demostrado que los bacteriófagos se pueden escindir del cromosoma mediante activación del sistema SOS. Ya que las quinolonas activan el sistema SOS, estos agentes antimicrobianos contribuirían a la excisión de las islas de patogenicidad. Las hipótesis 2 y 3 no son excluyentes y ambas podrían ser observadas concomitantemente, de hecho hay cepas de *E.coli* que no expresan fimbrias tipo 1 y que además no poseen los genes *hly* y *cnf* codificados en una isla de patogenicidad.

**Conclusión.** Los resultados sugieren que la adquisición de resistencia a quinolonas por cepas uropatógenas de *E.coli* podría estar asociada con una disminución de la presencia de ciertos factores de patogenicidad, fundamentalmente aquellos que se encuentran localizados en islas de patogenicidad y también con una disminución en la expresión de ciertos factores de patogenicidad como la fimbria tipo 1.

## Sistemas de expulsión de drogas: Mucho más que resistencia a los antibióticos

P. Sánchez, A. Alonso, G. Morales, J.F. Linares, F. Rojo y J.L. Martínez

Centro Nacional de Biotecnología (CSIC), Madrid

Dentro del campo de los antimicrobianos, existe un interés creciente por el análisis de los sistemas de bombeo múltiple de drogas (MDR) y su papel en la resistencia a los antibióticos. Los sistemas MDR se caracterizan por su capacidad de transportar al exterior celular un considerable número de moléculas. Cada uno de ellos es capaz de expulsar antibióticos de distintas familias estructurales y en muchos casos antisépticos, biocidas, compuestos aromáticos y detergentes. Además de su inespecificidad, otra característica relevante de los sistemas MDR es su ubicuidad. Se han encontrado en todas las especies bacterianas analizadas, así como en células eucariotas, pudiendo contribuir en este caso a la resistencia a agentes antitumorales. Otras dos características relevantes de los sistemas MDR son que se encuentran en todas las estirpes de cada especie bacteriana y que una única célula puede tener hasta 20 sistemas MDR distintos (1).

Estamos acostumbrados a pensar que los genes de resistencia a los antibióticos se adquieren de otros organismos (esencialmente los productores), en los cuales su función es esencialmente conferir resistencia a los antibióticos que sintetizan (2). Sin embargo, las características que se han detallado anteriormente indican que la función esencial de los sistemas MDR ha de ser necesariamente otra. Estos sistemas son muy antiguos desde un punto de vista evolutivo, lo cual indica que no han sido seleccionados por los antibióticos utilizados en los tratamientos. La pregunta que se nos plantea es cuál es la función de los sistemas MDR. El hecho de que alguno de los sistemas MDR estudiados hasta el momento se sobreproduzca en fase estacionaria de crecimiento ha llevado a sugerir que podrían estar implicados en procesos de detoxificación de compuestos acumulados intracelularmente. En el caso del sistema AcrAB de *Escherichia coli* se ha demostrado su implicación en la resistencia a sales biliares (3). Teniendo en cuenta que las sales biliares se encuentran en el ecosistema natural de *E. coli* es fácil pensar que la función de AcrAB puede ser la resistencia a estos compuestos. Se ha descrito también que hay sistemas MDR capaces de expulsar péptidos catiónicos que contribuyen a la defensa natural frente a las infecciones (4). Por último, se ha descrito que algunos sistemas MDR de *Pseudomonas aeruginosa* podrían estar implicados en la respuesta *quorum sensing* de esta especie bacteriana (5). Dado que la respuesta *quorum sensing* es esencial para la virulencia de *P. aeruginosa*, la expresión de sistemas MDR podría afectar a la virulencia de este microorganismo. Los sistemas MDR contribuyen a la resistencia bacteriana intrínseca a los antibióticos, pero también pueden contribuir a la resistencia adquirida. La expresión de estos sistemas de bombeo está habitualmente reprimida, al menos bajo condiciones de trabajo en el laboratorio. Sin embargo, bajo presión selectiva de antibióticos es fácil que aparezcan, tanto *in vivo* como *in vitro*, mutantes que los sobreexpresen. Dado el gran número de compuestos que los sistemas MDR pueden expulsar, y considerando su papel fundamental en distintos aspectos del metabolismo bacteriano, cabe pensar que la sobreexpresión de los sistemas MDR podría tener un cierto efecto en la competitividad ecológica (*fitness*) bacteriana.

A lo largo de los últimos años, tanto nuestro grupo como otros autores, hemos estudiado la relación entre sobreexpresión de sistemas de bombeo múltiple de drogas y la virulencia bacteriana. En particular, hemos estudiado cómo influye la sobreproducción de sistemas MDR en la fisiología bacteriana tomando como modelos *P. aeruginosa* y *Stenotrophomonas maltophilia*.

En el primer caso, hemos determinado que la sobreexpresión de sistemas MDR disminuye la capacidad de *P. aeruginosa* para mantenerse en ambientes naturales (6) y disminuye también su virulencia, tanto en el modelo de *Caenorhabditis elegans* como en el de *Dyctiostelium discoideum* (7). Sin embargo, tras distintos pases en medios de cultivo *in vitro*, es posible recuperar mutantes compensados que continúan siendo resistentes a los antibióticos, pero en los cuales la expresión de factores de virulencia es semejante a la que tiene lugar en estirpes silvestres.

En el caso de *S. maltophilia* hemos visto que la sobreexpresión de sistemas MDR conduce a una seria deficiencia en *fitness* cuando la bacteria se cultiva en medios definidos de laboratorio. Esta deficiencia está asociada a una disminución en el tamaño celular, así como a una restricción en la capacidad de utilización de distintas fuentes de carbono.

A lo largo de nuestra presentación mostraremos datos sobre la relación entre sobreexpresión de sistemas MDR y virulencia bacteriana.

### Bibliografía

1. Saier, M.H., Paulsen, I.T., Sliwinski, M.K., Pao, S.S., Skurray, R.A., Nikaido, H. *Evolutionary origins of multidrug and drug-specific efflux pumps in bacteria*. FASEB J 1998; 12: 265-274.
2. Davies, J. *Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes*. Science 1994; 264: 375-382.
3. Thanassi, D.G., Cheng, L.W., Nikaido, H. *Active efflux of bile salts by Escherichia coli*. J Bacteriol 1997; 179: 2512-2518.
4. Hagman, K.E., Lucas, C.E., Balthazar, J.T., Snyder, L., Nilles, M., Judd, R.C., Shafer, W.M. *The MtrD protein of Neisseria gonorrhoeae is a member of the resistance/nodulation/division protein family constituting part of an efflux system*. Microbiology - UK 1997; 143: 2117-2125.
5. Kohler, T., van Delden, C., Curty, L.K., Hamzehpour, M.M., Pechere, J.C. *Overexpression of the MexEF-OprN multidrug efflux system affects cell-to-cell signaling in Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 2001; 183: 5213-5222.
6. Sánchez, P., Linares, J.F., Ruiz Díez, B., Campanario, E., Navas, A., Baquero, F., Martínez, J.L. *Fitness of in vitro selected Pseudomonas aeruginosa nalB and nfxB multidrug resistant mutants*. J Antimicrob Chemother 2002; 50: 657-664.
7. Cosson, P., Zulianello, L., Join-Lambert, O., Faurisson, F., Gebbie, L., Benghezal, M., Van, D.C., Curty, L.K., Kohler, T. *Pseudomonas aeruginosa virulence analyzed in a Dictyostelium discoideum host system*. J Bacteriol 2002; 184: 3027-3033.