



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Editorial

Relación entre resistencia y virulencia en bacterias de interés clínico

Relationship between resistance and virulence in bacteria of clinical interest

Germán Bou

Servicio de Microbiología, Hospital Universitario A Coruña, La Coruña, Spain



La relación entre resistencia y virulencia en el mundo microbiano no puede reducirse a una simple consideración que englobe conclusiones globales y generales. De hecho, cuando se profundiza en el análisis de esta relación hay que tener en cuenta todos los factores posibles, que incluyen principalmente la propia especie bacteriana implicada, el mecanismo de resistencia y virulencia que se considera, el nicho ecológico y el propio huésped que sufre la infección. Todo esto ha sido discutido y revisado en profundidad de manera reciente por Beceiro et al.¹. Si bien, con algunos antibióticos y patógenos concretos, el impacto de la resistencia sobre la virulencia es claro y prácticamente inequívoco. Tal es el caso de la resistencia a la penicilina del neumococo² y su impacto disminuyendo o atenuando su virulencia sobre el huésped; en otros, que son la mayoría, esta relación es más compleja y obliga a abordarla de otro modo.

Citemos algunos ejemplos significativos. Mecanismos de resistencia a los antibióticos muy similares desde un punto de vista mecanístico causan efectos distintos, incluso algunas veces antagónicos en la virulencia o en el coste biológico de la bacteria. Valgan los experimentos realizados por Fernández et al.³, que demuestran que el efecto que distintas β -lactamasas causan sobre el coste biológico en un mismo huésped (en condiciones isogénicas) es distinto según la clase molecular del enzima (clase A, B, C o D), a pesar de su similitud funcional, que es conferir resistencia a los β -lactámicos. En otras palabras, no todas las β -lactamasas tienen un impacto idéntico sobre la virulencia (medido como coste biológico) de la bacteria en las condiciones ensayadas. Otro ejemplo son los sistemas de expulsión activa o bombas de extrusión que pertenecen a los sistemas transportadores de la familia RND. Estos sistemas pueden expulsar no solo antibióticos, sino también compuestos antimicrobianos producidos por el huésped, tal y como ácidos biliares, ácidos grasos, detergentes, péptidos antimicrobianos, etc., que ayudan al microorganismo a defenderse durante el proceso de colonización e infección. Así, la eliminación del sistema AcrAB-TolC en *Enterobacter cloacae* no solo disminuye la resistencia a los antimicrobianos de la propia bacteria sino que también atenúa la virulencia de la misma cuando se ensaya en un modelo de infección sistémica murino⁴. Sin

embargo, la eliminación del mismo sistema AcrAB-TolC en *Yersinia pestis* no se observa que cause un efecto en la virulencia bacteriana medida como impacto en la colonización sobre los tejidos del huésped⁵.

En definitiva, son 2 ejemplos que demuestran como prácticamente idénticos mecanismos de resistencia a antibióticos (desde un punto de vista funcional) pueden tener consecuencias distintas sobre el coste biológico o la virulencia bacteriana, bien sea a través del mismo o distinto huésped en los 2 ejemplos comentados. Ello obliga, tal y como he comentado anteriormente, a estudiar la relación resistencia-virulencia (el impacto de un evento sobre el otro) en el mundo microbiano, como una red más compleja de interacciones donde habrá que considerar no solo el tipo de mecanismo de resistencia y virulencia en cuestión, sino también la especie bacteriana, el nicho ecológico y el huésped.

Mención especial merecen los llamados clones de alto riesgo (*high-risk-clones* [HRC]), descritos recientemente y diseminados a lo largo del mundo. Estarían considerados como clones derivados bien de animales bien de humanos, resistentes a diversos antibióticos y que portarían distintos factores de virulencia. Serían prototipos de relación directa y positiva entre resistencia y virulencia, en definitiva, «clones exitosos» seleccionados y diseminados entre la población mundial. De manera simplista, podríamos catalogarlos como clones bacterianos resistentes, virulentos y, posiblemente, epidémicos o con alta capacidad de supervivencia. Citamos como ejemplos, entre muchos otros, el *Enterococcus faecium* complejo clonal 17 (CC17)⁶, asociado a la mayoría de los brotes hospitalarios, resistente a ampicilina y quinolonas y caracterizado por la presencia de una posible isla de patogenicidad; o el clon *Escherichia coli* ST131 (O25:H4) productor de CTX-M diseminado a lo largo del mundo y con genes de virulencia en plásmidos del grupo IncFII (pEK499)⁷; o el ribotipo NAP1/027 de *Clostridium difficile* hipervirulento y resistente a quinolonas que hiperproduce una serie de toxinas entre varios otros factores de virulencia⁸.

Entre múltiples causas, un aspecto facilitador que explicaría la emergencia de estos HRC sería el fenómeno de co-selección de plásmidos híbridos que portan genes de resistencia y virulencia de manera concomitante. Como ejemplo, el género *Salmonella*. Algunos plásmidos de virulencia, que son muy frecuentes en infecciones humanas, tal y como pSEV en *S. enterica* serovar Enteritidis o pLST y pSTV en *S. enterica* serovar Typhimurium, portan una región

Correos electrónicos: German.Bou@usc.es, German.Bou.Arevalo@sergas.es

conservada de 7,8 kb con los genes *spv* (*Salmonella plasmid virulence*) y otros genes de virulencia. Se ha demostrado que entre el 7-8% de los aislados resistentes a ampicilina de *S. enterica* serovar Typhimurium en el Reino Unido y en España portan el plásmido híbrido de resistencia y virulencia pUO-StVR2, el cual es un derivado del plásmido pSTV tras la adquisición de una región de 45 kb incluyendo el integrón de clase I *lnH* con genes de resistencia al menos a 5 familias distintas de antimicrobianos⁹. Sería pues otro ejemplo donde resistencia y virulencia se relacionan entre sí de manera directa y positiva, en este caso en *Salmonella*.

S. enterica sigue siendo una de las primeras causas de brotes de toxiinfección alimentaria. Enteriditis y Typhimurium son las serovariedades de *S. enterica* subespecie *enterica* (*S. Enteriditis* y *S. Typhimurium*, respectivamente) más prevalentes en el ámbito clínico, representando más del 80% de los aislados obtenidos.

En el presente número de EIMC, María de Toro et al. analizan la resistencia a antibióticos y factores de virulencia en aislados clínicos de *S. enterica*. Los investigadores estudiaron 114 casos (uno por paciente) de *S. enterica* (período 2009-2010) aislados de 7.606 coprocultivos procesados en el Laboratorio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza. Los aislados se identificaron mediante pruebas bioquímicas y el serotipado mediante el estudio del antígeno somático O (lipopolisacárido) y de los antígenos flagelares H (proteínas) siguiendo el esquema de Kauffmann y White. Estudiaron la sensibilidad a 20 antibióticos, así como la detección molecular de genes de resistencia implicados en resistencia a β -lactámicos, tetraciclina, aminoglucósidos, sulfamidas, trimetoprim, cloranfenicol y quinolonas. También el entorno genético de los genes *sul2* y *sul3* mediante PCR y secuenciación. Finalmente, realizaron la caracterización de integrones, la detección y caracterización de la Isla Genómica de *Salmonella* (SGI1), así como de 29 genes de virulencia.

Entre los 114 aislados de *Salmonella* estudiados se identificaron 113 aislados de *S. enterica* subesp. *enterica*, siendo los serotipos Typhimurium (n = 70) y Enteriditis (n = 18) los mayoritarios. El resto fueron serotipos diversos minoritarios. Observaron un alto porcentaje de resistencia a sulfamidas (68%), tetraciclina (58%), ampicilina (AMP) (55%) y estreptomycin (46%) en los 114 aislados, siendo los mayores porcentajes de resistencia entre los aislados del serotipo Typhimurium con la excepción del ácido nalidíxico, cuya resistencia era mayor en el serotipo Enteriditis. De manera concreta, considerando únicamente los 63 aislados AMP^R, se encontraron altos porcentajes de co-resistencia a sulfamidas (94%), tetraciclina (90%) y estreptomycin (76%) así como a cloranfenicol y amoxicilina-clavulánico (38%). Se detectó el fenotipo ACSSuT (resistencia a ampicilina, cloranfenicol, estreptomycin, sulfamidas, y tetraciclina) en el 30% de los aislados de *S. enterica* AMP^R, y no se detectaron los fenotipos BLEE y/o AmpC en toda la colección. Todos los aislados permanecieron sensibles a cefoxitina, cefotaxima, ceftazidima, cefepima, amikacina, y ciprofloxacino.

Cuando analizan de manera más concreta los genes de resistencia detectados en los 63 aislados de *S. enterica* AMP^R, el más frecuente fue *bla*_{TEM-1} (40 aislados, 64%), seguido de *bla*_{PSE-1} (13 aislados, 21%) y *bla*_{OXA-1} (8 aislados, 13%); destacando que en los aislados AMP^R-AMC^{I/R} (n = 24) el gen más frecuentemente detectado fue *bla*_{PSE-1} (13 aislados, 54%) seguido de *bla*_{OXA-1} (8 aislados) y *bla*_{TEM-1} (3 aislados). Acentuar también que se encontraron distintas asociaciones/combinaciones de genes de resistencia asociadas con el fenotipo ACSSuT detectado en 18 aislados de *S. enterica* AMP^R, y que ningún aislado de *S. enterica* analizado amplificó *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qepA*, *oqxAB* ni *aac(6')*-Ib-cr. Respecto a las estructuras que albergaban los genes de resistencia, 30 aislados de *S. enterica* AMP^R (48%) amplificaron el gen *int11*, sin embargo no se detectaron integrones de clase 2 o 3. Se observaron 7 estructuras distintas de integrones de clase 1. Los 13 aislados de *S. Typhimurium* *bla*_{PSE-1}-positivos mostraron 2 integrones, con regiones variables de 1.000 y

1.200 pb, que albergaban los genes *aad2* y *bla*_{PSE-1}, respectivamente. En relación con la resistencia a sulfamidas, un total de 59 aislados (94%) con fenotipo AMP^R presentaron resistencia a sulfamidas, en los que se detectaron los genes de resistencia *sul1*, *sul2*, y *sul3*, así como distintas combinaciones entre ellos.

En relación al estudio de los marcadores de virulencia de los aislados estudiados, los 13 aislados de *S. Typhimurium* *bla*_{PSE-1}-positivos mostraron el fenotipo de multiresistencia ACSSuT asociado con los genes *bla*_{PSE-1}, *floR*, *aadA2*, *sul1* y *tet(G)*, y presentaban el doble integrón de 1.000 y 1.200 pb. Toda esta zona de resistencia se encontró junto con las uniones a cromosoma en la estructura de SGI1, detectada mediante PCR y secuenciación en los 13 aislados. Todos los aislados *bla*_{PSE-1} fueron positivos para: a) los genes albergados en las islas de patogenicidad SPI1-SPI5; b) los genes codificados en el cromosoma (*phoP/Q*, *hin/H2*, *iroB*, *slyA*, *sodC1*, *sopE2* y *bcfC*), y c) para los genes plasmídicos *spvC*, *rck*, *pefA*, *pefB*, *pefC* y *pefD*. Todos los aislados se agruparon en un único perfil de virulencia *avrA-ssaQ-mgtC-spi4D-sopB-sodC1-spvC-bcfC*. Mediante PFGE, los 13 aislados *bla*_{PSE-1}-positivos se clasificaron como cepas clonalmente relacionadas.

Amoxicilina-clavulánico, cefalosporinas de tercera generación y fluoroquinolonas son las opciones terapéuticas para el tratamiento de infecciones graves por *S. enterica*. Por ello, el estudio de los mecanismos de resistencia a estos antimicrobianos son, a priori, más interesantes si se quiere intuir o predecir de cara al futuro la relación entre resistencia y virulencia en esta bacteria de importancia clínica. La resistencia a fluoroquinolonas resulta bastante infrecuente en *S. enterica* debido posiblemente al alto coste biológico para la bacteria¹, por lo que cabría esperar en el futuro una escasa aparición de cepas altamente virulentas y a su vez resistentes a quinolonas. No sería descartable, sin embargo, la aparición de mutaciones compensatorias que de alguna manera favorecieran esta asociación de manera positiva, cambiando el escenario actual a medio plazo.

En *S. Typhimurium*, el fenotipo ACSSuT ha sido frecuentemente asociado a la presencia de SGI1, que contiene los genes *bla*_{PSE-1}, *floR*, *aadA2*, *sul1* y *tet(G)*¹⁰, aunque en el trabajo que comentamos solo 13 de 19 aislados con fenotipo ACSSuT presentaron el gen *bla*_{PSE-1}. Es importante destacar también que las 13 cepas de *S. Typhimurium* *bla*_{PSE-1}-positivas estaban clonalmente relacionadas, y sus patrones de PFGE eran coincidentes con los de aislados procedentes de otros hospitales españoles, incluso geográficamente lejanos, y coincidentes con el tipo de secuencia ST19 (complejo clonal CC19)¹¹. Resaltar finalmente que todas ellas mostraron el mismo perfil de virulencia con alta homogeneidad en cuanto a la presencia y la estructura de la SGI1. En estas cepas, la relación entre resistencia y virulencia, directa y positiva en este caso, proviene de la co-selección de estos genes de resistencia y virulencia en la misma isla genómica de *Salmonella* de tipo 1 (SGI1) más que de otra posible consideración biológica.

Nos encontramos, por tanto, con un clon en el que convergen distintos parámetros microbiológicos de interés, como alta clonalidad, baja o nula variación en SGI1, una alta proporción de genes de virulencia y resistencia concomitantes y una posible alta diseminación, al menos en nuestro territorio nacional. Habría que estar pues atento a la posible emergencia y diseminación de un clon de alto riesgo (*high risk clon*) de *S. Typhimurium* en nuestro país.

Bibliografía

1. Beceiro A, Tomás M, Bou G. Antimicrobial resistance and virulence: A successful or deleterious association in the bacterial world? *Clin Microb Rev*. 2013;26:185-230.
2. Briles DE, Crain MJ, Gray BM, Forman C, Yother J. Strong association between capsular type and virulence for mice among human isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*. 1992;60:111-6.
3. Fernández A, Pérez A, Ayala JA, Mallo S, Rumbo-Feal S, Tomás M, et al. Expression of OXA-type and SFO-1 β -lactamases induces changes in

- peptidoglycan composition and affects bacterial fitness. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56:1877–84.
4. Pérez A, Poza M, Fernández A, Fernández MC, Mallo S, Merino M, et al. Involvement of the AcrAB-TolC efflux pump in the resistance, fitness, and virulence of *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56:2084–90.
 5. Lister IM, Raftery C, Meccas J, Levy SB. *Yersinia pestis* AcrAB-TolC in antibiotic resistance and virulence. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56:1120–3.
 6. Galloway-Peña JR, Nallapareddy SR, Arias CA, Eliopoulos GM, Murray BE. Analysis of clonality and antibiotic resistance among early clinical isolates of *Enterococcus faecium* in the United States. *J Infect Dis.* 2009;200:1566–73.
 7. Pitout JD, Gregson DBL, Campbell Laupland KB. Molecular characteristics of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates causing bacteremia in the Calgary Health Region from 2000 to 2007: Emergence of clone ST131 as a cause of community acquired infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:2846–51.
 8. Deneve C, Bouttier SB, Dupuy F, Barbut A, Collignon Janoir C. Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on colonization factor expression by moxifloxacin-susceptible and moxifloxacin resistant *Clostridium difficile* strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:5155–62.
 9. Guerra B, Soto S, Helmuth R, Mendoza MC. Characterization of a self-transferable plasmid from *Salmonella enterica* serotype Typhimurium clinical isolates carrying two integron-borne gene cassettes together with virulence and drug resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46:2977–81.
 10. Boyd D, Peters GA, Cloeckaert A, Boumedine KS, Chaslus-Dancla E, Imberechts H, et al. Complete nucleotide sequence of a 43-kilobase genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 and its identification in phage type DT120 and serovar Agona. *J Bacteriol.* 2001;83:5725–32.
 11. De Toro M, Sáenz Y, Cercenado E, Rojo-Bezares B, García-Campello M, Undabeitia E, et al. High clonality and diversity of virulence determinants among bla(PSE)-positive *Salmonella* Typhimurium isolates recovered in three geographically distant Spanish hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012;74:426–8.