

Hablemos de...

Mecanismos de evolución y resistencias bacterianas

RAFAEL GÓMEZ-LUS Y CARMEN RUBIO CALVO

Unidad de Microbiología. Departamento de Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública. Universidad de Zaragoza. Zaragoza. España.

La evolución de las bacterias hacia la resistencia a los antibióticos, e incluso a la multiresistencia, es inevitable porque los genes que la codifican ya existen en la naturaleza. Un ejemplo clásico es la identificación de una cepa de *Escherichia coli*, productora de betalactamasa, antes de que la penicilina se hubiera utilizado clínicamente¹. Es un aspecto particular de la evolución general de las células procariotas que preocupa a *Homo sapiens*, pero que no puede detenerlo ninguna fuerza. En consecuencia, lo mejor que podemos lograr es retrasar la emergencia y la diseminación subsecuente de las bacterias resistentes o de los genes de resistencia. Por eso, el fenómeno de la resistencia puede surgir por mutacio-

nes de genes estructurales o reguladores. Alternativamente, puede resultar de la adquisición horizontal de información genética exógena. Ambos mecanismos no son mutuamente exclusivos y pueden asociarse en la emergencia y en una diseminación más eficiente de la resistencia.

Una visión ampliada de los factores de virulencia para comprender mejor la infección y su tratamiento, incluidos elementos situados fuera del ser humano, nos llevan a una interpretación más ecológica. Una ventaja de esta perspectiva es situar a la biología de la resistencia y su evolución en el centro del problema.

Resistencia a los antibióticos y su diseminación

En el fenómeno de la resistencia cruzada, un mecanismo bioquímico único confiere resistencia a una clase de antimicrobianos. Estos agentes están químicamente relacionados, comparten la misma diana de acción y, por lo tanto, se produce la resistencia cruzada. A la inversa, los antibióticos de diferentes clases son estructuralmente distintos, las dianas son diversas y, por tanto, no hay resistencia cruzada. Sin embargo, puede producirse resistencia cruzada a antibióticos poco relacionados cuando se traslapan las dianas, como sucede con los macrólidos, las lincosamidas y la estreptogramina B (MLS_B). También es posible que los mecanismos de eflujo, conocidos más recientemente, causen una resistencia múltiple, ya que al actuar determinadas bombas son capaces de expulsar un amplio espectro de antibióticos: betalactámicos, aminoglucósidos, clase MLS_B, cloranfenicol, tetraciclinas, sulfamidas, trimetoprima e incluso fluoroquinolonas.

En contraste con la resistencia cruzada, la corresponsencia se debe a la presencia en la misma bacteria huésped de varios mecanismos, cada uno confiriendo resistencia a una clase de antimicrobiano. Los genes causantes se encuentran con frecuencia situados adyacentes, ligados físicamente, y se expresan de un modo coordinado.

Los estudios de genética molecular establecen 3 grados de diseminación de la resistencia a los antibióticos:

1. Epidemias de bacterias resistentes entre los humanos y, en general, entre los mamíferos.
2. Epidemias de plásmidos de resistencia entre las bacterias.
3. Epidemias de genes de resistencia entre las bacterias.

Puntos clave

- Los pacientes se suelen infectar en el hospital con bacterias y éstas con plásmidos, transposones e integrones portadores de genes de resistencia, que las protegen frente a los antibióticos.
- La diseminación clonal se debe a la replicación del cromosoma, la conjugación plasmídica a la transferencia replicativa y la migración de genes a la transposición replicativa.
- Los elementos genéticos de resistencia y sus vectores desempeñan un papel central en la evolución y aportan mecanismos que generan diversidad, a lo que contribuye la promiscuidad de las bacterias.
- En los bacilos gramnegativos, la resistencia es sobre todo plasmídica, y los transposones y los integrones son vehículos de los genes, mientras que en los cocos grampositivos, los transposones conjugativos, cromosómicos, son fundamentales para la resistencia múltiple.
- Es posible tratar de descifrar los modos de resistencia que nos lleve a conocer los “proyectos genómicos procarióticos”, por lo que es preciso que la investigación se haga no sólo con carácter retrospectivo, sino también examinando el proceso mientras está sucediendo para sorprender el tráfico de plásmidos R, transposones, integrones y casetes génicas.

Cada uno de estos fenómenos no solamente es infeccioso, sino exponencial, ya que está asociado a la replicación del ácido desoxirribonucleico (ADN). La diseminación clonal se debe a la replicación del cromosoma; la conjugación plasmídica, a la transferencia replicativa, y la migración de genes, a la transposición replicativa. Hagamos especial énfasis en que la conjugación tiene un rango muy amplio de bacterias huéspedes, por lo que los plásmidos pueden transferirse de forma eficiente entre géneros filogenéticamente remotos, y las barreras para la expresión de genes heterólogos son limitadas, de modo que los determinantes genéticos de resistencia se expresan en procariotas muy diversas.

Estas observaciones conducen al conocimiento de que las bacterias atesoran un fondo de genes de resistencia, ya que están laxamente unidos a sus huéspedes y en condiciones naturales se diseminan con facilidad.

La resistencia a los antibióticos en bacilos gramnegativos y en cocos grampositivos

La resistencia bacteriana a los antibióticos en los bacilos gramnegativos (BGN) suele estar mediada por plásmidos R, y los genes vehiculados, por transposones (Tn), integrones (In) y empaquetados en casetes génicas (tabla 1). En los cocos grampositivos, son fundamentales los Tn conjugativos cromosómicos (TnCC), caracterizados por compartir rasgos con plásmidos R, bacteriófagos y Tn clásicos. Todos estos elementos desempeñan un papel central en la evolución, proporcionan mecanismos para generar diversidad y, con los sistemas de transferencia de ADN, para su diseminación a otras bacterias.

Como analizaremos más adelante, entre las poblaciones bacterianas de BGN, sobre todo en las causantes de infecciones hospitalarias, son fundamentales la intervención de los plásmidos R, de los Tn, de los In y de las casetes génicas, cuyo papel varía de unos a otros determinantes genéticos. Muchos de los genes de resistencia adquiridos son parte de pequeños elementos móviles: las casetes génicas, que al incorporar un pequeño sitio de recombinación (SR, de 59 pb), les confiere movilidad. Es un mecanismo muy eficiente de empaquetar genes y, en cuanto al grado de divergencia entre las casetes génicas, están en el rango existente entre especies como *E. coli* y *Salmonella typhimurium*; es decir, de 10 a 160 millones de años. La SR (secuencia repetida) de 59pb derivan de ancestros comunes, funcionalmente conservadas por muchos años.

Tabla 1. Superfamilias de vectores génicos

Cromosoma: gran replicón
Plásmido: pequeño replicón
Transposón: cromosómico y/o plasmídico
Integrón: vector natural de clonación y expresión
Casetes génicas: vectores "capturables"
Bacteriófago: porta genes en su cápside

Entre los cocos grampositivos, la transferencia de genes de resistencia a macrólidos en *Streptococcus pneumoniae* está mediada por Tn cromosómicos, como el Tn1545², de amplio espectro de huéspedes: géneros *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Enterococcus*.

El origen de los plásmidos de resistencia lo encontramos en microorganismos productores de antibióticos (géneros *Bacillus*, *Micromonospora*, *Streptomyces*, etc.) y forma parte de un mecanismo antisuicidio, con exportación de las sustancias protectoras. Este mecanismo propuesto inicialmente por Watanabe³ y completado por Benveniste y Davies⁴, indicaba que los determinantes R procedían de los cromosomas de los precitados géneros y eran capturados por plásmidos (factores sexuales)⁵. Otra posibilidad es la participación de genes metabólicos cuyos productos intervienen en las funciones procarióticas y son capaces también de modificar, inactivar o expulsar moléculas de antimicrobianos. Además, muchos de los determinantes genéticos de resistencia que ahora se encuentran en plásmidos pueden tener su origen en el cromosoma de otras especies, como ya se ha demostrado.

Propagación de plásmidos R entre diferentes cepas en el medio hospitalario

En el Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza, investigamos la diseminación y la evolución de la resistencia antibiótica y estudiamos los plásmidos R conjugativos (*tra*⁺), los elementos transponibles y, en algunos casos, los mecanismos bioquímicos de resistencia. En 1974, de una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* procedente del Centro Regional de Traumatología, caracterizamos el plásmido de 68 kb pUZ1 (fig. 1), grupo de incompatibilidad P transferible a *E. coli* J62 por conjugación y patrón de resistencia que incluía 10 antibióticos y cloruro mercuríco^{6,7}. El plásmido pUZ1 contenía 2 Tn, el Tn3 ya conocido que porta el gen *bla*_{TEM-1}, y uno nuevo, el Tn1696 (fig. 2) vehículo del integrón *In4*, que albergaba 5 de los genes de resistencia.

Cuatro años después, aislamos diferentes cepas de enterobacterias y de *P. aeruginosa* (tabla 2), que portaban plásmidos del mismo grupo P, con idéntico peso molecular, patrón de restricción y producción de enzimas⁸. Estos hallazgos apoyaban la hipótesis de la diseminación de plásmidos R pertenecientes al grupo IncP, capaces de propagarse entre las familias *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonadaceae*.

En 1976, detectamos un plásmido de 73 kb perteneciente al grupo Inc M y, por tanto, transferible solamente a enterobacterias. El patrón de resistencia antibiótica incluía ampicilina, tetraciclina, gentamicina y tobramicina. Posteriormente, se aislaron numerosas cepas de enterobacterias con plásmidos del mismo grupo IncM e idénticas propiedades genotípicas y fenotípicas, encontrando en una cepa clínica de *Proteus vulgaris* la coexistencia de 2 plásmidos, uno del grupo IncM y otro del IncP. Además, como consecuencia de la vigilancia epidemiológica de las cepas portadoras de plásmidos R, pudimos comprobar que algunos inicialmente transferibles (*tra*⁺), dejaban de serlo (*tra*⁻), así como la pérdida de plásmidos, o bien la recombinación de parte de sus genes en el cromosoma, que indicaba mecanismos de transposición. Un ejemplo práctico lo constituye una transconjugante de la cepa de *E. coli* #3644, que perdió el plásmido,

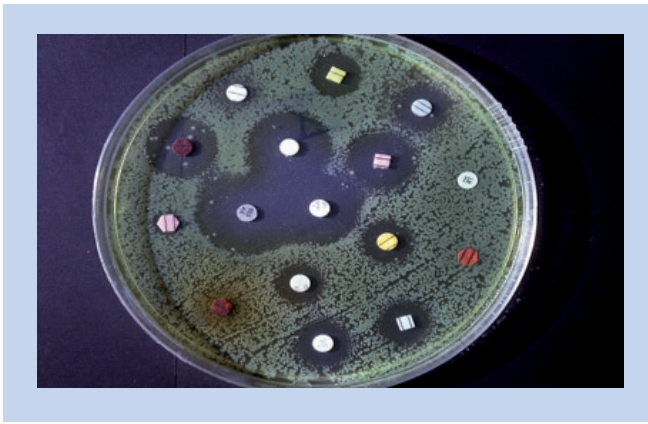


Figura 1. Caracterización del plásmido pUZ1 en una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* en 1974. En los halos de inhibición de diversos antibióticos (Gm, Cm, Carbe, Sul, etc.) colonias resistentes de las que se aisló un plásmido de 68 kb transferible a *Escherichia coli* J62.

pero conservaba su patrón de resistencia⁹. La estrategia de rescate fue la utilización del plásmido pUZ8, carente de elementos transponibles, e introducirlo en la ya citada transconjugante de *E. coli*, con lo que se obtuvo un plásmido, en el que se caracterizó el Tn compuesto Tn2922. Nuestra hipótesis había sido suponer que si el presunto Tn había sido capaz de saltar del plásmido al cromosoma, también podría hacer la transposición reversa del cromosoma al plásmido, lo cual pudimos demostrar.

Genes de resistencia a los antibióticos vehiculados por bacterias de origen animal que causan infecciones en humanos

En 1989 pudimos comprobar el aislamiento de 2 cepas clínicas (*E. coli* y *Klebsiella pneumoniae*), resistentes a los aminoglucósidos de uso veterinario, apramicina e higromicina, con plásmidos R de 110 kb, que poseían los 2 genes causantes. Posteriormente, se aislaron 4 cepas de enterobacterias con características similares. Al analizar la organización de estos genes, se comprobó que estaban adyacentes y agrupados en la misma orientación que se había demostrado en los aislados de origen animal. Los 2 genes de resistencia a apramicina e higromicina forman un operón, y están asociados con secuencias IS140, lo que implica una estructura transponible¹⁰. Dado que la enzima acetilante AAC(3)-IV

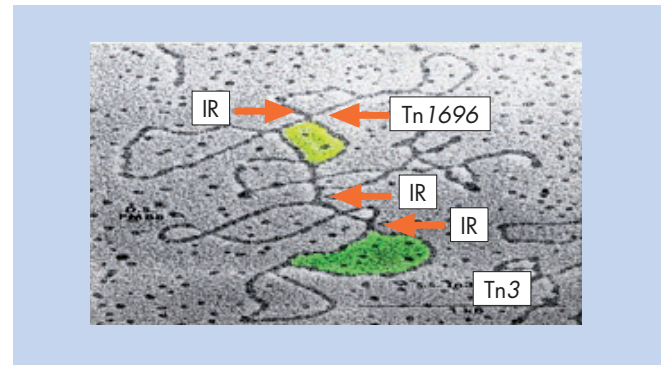


Figura 2. Plásmido pUZ1: transposones Tn3 [amarillo] y Tn1696 [verde], varias repeticiones invertidas [IR].

inactiva, además de apramicina, a gentamicina y tobramicina, es un riesgo potencial para seleccionar resistencias a aminoglucósidos de uso clínico. El problema es más grave si valoramos que las 6 cepas que nosotros aislamos mostraban también resistencia transferible a ampicilina y estreptomina.

Epidemiología de la resistencia a los antibióticos

La epidemiología de la resistencia a los antibióticos puede ser local, nacional e internacional. La mayor parte de los brotes de bacterias resistentes aparecen en un ámbito extremadamente local, afectan a un número limitado de pacientes en una determinada unidad y la prevalencia de la resistencia suele ser la más elevada, ya que coinciden pacientes más vulnerables y un amplio uso de antimicrobianos.

Un segundo ámbito epidemiológico es el nacional, como sucede en Europa, en el que se comprueba que los patrones de resistencia son más altos en los países mediterráneos y más bajos en Escandinavia. En América del Norte las tasas de resistencia son más altas en Estados Unidos que en Canadá.

De otra parte, la epidemiología de la resistencia es parcialmente internacional, porque algunos determinantes genéticos son transferibles y prevalecen en todo el mundo. Pero es realmente internacional cuando algunas cepas resistentes se diseminan entre países y continentes, y alcanza una gran relevancia el problema de los clones españoles de neumococos, por lo que es bien conocida la diseminación intercontinental de un clon multiresistente de *S. pneumoniae* serotipo 23F, de España a Estados Unidos, y la propagación de un clon de neumococo mul-

Tabla 2. Plásmidos del grupo Inc P aislados en el CRT(1974) y en el Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza (1976-1978)

Donadora	Plásmidos Tn3 y Tn1696	Mes/año	Origen	Servicio
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CRT	pUZ1 [R1033]	2/1974	Exudado	Traumatología
<i>Serratia marcescens</i> #965	pUZ7	5/1976	Exudado	Cirugía
<i>Klebsiella pneumoniae</i> #2932	pUZ14	7/1976	Orina	Urología
<i>Serratia marcescens</i> #785	pUZ270	8/1977	LCR	Neurocirugía
<i>Serratia marcescens</i> #1706	pUZ613	3/1978	Aspirado bronquial	UCI/Pediatría

LCR: líquido cefalorraquídeo; UCI: unidad de cuidados intensivos.

tirresistente serotipo 6B, de España a Islandia, del sur al norte de Europa¹¹.

Es comprensible que, en 1997, se crease la Red Epidemiológica Molecular de Neumococos (Pneumococcal Molecular Epidemiology Network), bajo los auspicios de la Unión Internacional de Sociedades de Microbiología, con la finalidad de estandarizar la nomenclatura y la clasificación de los clones de *S. pneumoniae* en el ámbito mundial.

Es destacable que la vigilancia de la aparición de nuevos mecanismos bacterianos frente a los antimicrobianos ha dado lugar al hallazgo de un nuevo fenotipo de resistencia múltiple mediado por la ARN metiltransferasa Cfr en *S. aureus* y en *E. coli*¹². El fenotipo que se denomina PhLOPSa confiere resistencia a las clases siguientes de antibióticos: fenicoles, lincosamidas, oxazolidinonas, pleuromutilinas (como tiamulina, de uso en veterinaria) y estreptogramina A, siendo la primera vez que se detecta resistencia transferible plasmídica a oxazolidinonas y tiamulina.

Conclusión

La aplicación de los métodos moleculares ha conseguido descubrir la mayoría de las bases genéticas y mecanismos bioquímicos de resistencia, lo que ha contribuido al diseño de nuevas técnicas para la detección in vitro de la resistencia, a la creación de nuevos antimicrobianos, así como al desarrollo de técnicas epidemiológicas sensibles y a la implementación de medidas preventivas. Reiteradamente, se ha demostrado que la emergencia y la diseminación de la resistencia correlaciona con el uso de los antibióticos, pero el problema es mucho más complejo, por lo que la valoración debe hacerse con criterios integradores. Un aspecto importante ha sido la demostración de que la emergencia de la resistencia aparece por azar, puede incrementarse por necesidad procariótica y la presencia de los antimicrobianos en el medio. Como una consecuencia práctica, la vigilancia del consumo de medicamentos es fundamental para la toma de decisiones en

salud pública y, en el caso de los antibióticos, permitirá adoptar medidas que repercutirán en los costes sanitarios y, en especial, en los efectos ecológicos adversos de su utilización, es decir, en la selección de patógenos resistentes.

Bibliografía



●● Muy importante

1. Abraham EP, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*. 1940;146:837.
2. Seral C, Castillo J, García C, Rubio MC, Gómez-Lus R. Distribution of resistance genes *tet(M)*, *aph(3')-III*, *cat_{TC194}* and the integrase of Tn1545 in clinical *Streptococcus pneumoniae* harbouring *erm(B)* and *mef(A)* genes in Spain. *J Antimicrob Chemother*. 2001;47:863-6.
3. ●● Watanabe T. The origin of R factors. *Annals NY Acad Sci*. 1971;182:126-40.
4. ●● Benveniste R, Davies J. Aminoglycoside antibiotic-inactivating enzymes in *Antinomycetes* similar to those present in clinical isolates of antibiotic-resistant bacteria. *Proc Natl Acad Sci (USA)*. 1973;70:2270-80.
5. ●● Hughes VM, Datta N. Conjugative plasmids in bacteria of the "pre-antibiotic" era. *Nature*. 1983;302:725-6.
6. Gómez-Lus R. Evolution of bacterial resistance to antibiotics during the last three decades. *Internatl. Microbiol*. 1998;1:279-84.
7. Smith DJ, Gómez-Lus R, Rubio-Calvo MC, Datta N. Third type of plasmid conferring gentamicin resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1975;8:227-30.
8. Gómez-Lus R, Larrad L, Rubio-Calvo MC, Navarro M, Lasiera MP. AAC(3) and AAC(6) enzymes coded by R plasmid isolated in a general hospital. En: Mitsuhashi S, Rosival L, Krcmery V, editors. *Antibiotic resistance*. Berlin: Springer Verlag; 1980. p. 295-303.
9. Salauze D, Otal I, Gómez-Lus R, Davies J. Aminoglycoside acetyltransferase 3-IV(*aacC4*) and hygromycin 4-I phosphotransferase (*hpbB*) in bacteria isolated from human and animal sources. *Antimicrob Agents Chemother*. 1990;34:1915-20.
10. Muñoz R, Coffey TJ, Daniels M, Hakenbeck R, Tomasz A. Intercontinental spread of a multiresistant clone of serotype 23F *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis*. 1991;164:302-6.
11. Soares S, Kristinsson KG, Musser JM, Tomasz A. Evidence of the introduction of a multiresistant clone of serotype 6B *Streptococcus pneumoniae* from Spain to Iceland in the late 1980s. *J Infect Dis*. 1993;168:158-63.
12. Long KS, Poehlsgaard J, Kehrenberg C, Schwarz S, Vester B. The Cfr rRNA methyltransferase confers resistance to phenicols, lincosamides, oxazolidinones, pleuromutilins, and streptograminA antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50:2500-5.