

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS CLÍNICAS



TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DE LA RESISTENCIA ENZIMÁTICA A AMINOGLICOSIDOS
EN AISLADOS CLÍNICOS DEL GÉNERO *STAPHYLOCOCCUS***

M^a MILAGROS TORRES GARCÍA

Las Palmas de Gran Canaria, Marzo de 1992

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS

FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS Y DE LA SALUD

Departamento de Ciencias Clínicas

**ESTUDIO DE LA RESISTENCIA ENZIMATICA A AMINOGLICOSIDOS
EN AISLADOS CLINICOS DEL GENERO *STAPHYLOCOCCUS***

**Memoria presentada para optar al grado de
Doctor por la Lda. en Farmacia
M^a MILAGROS TORRES GARCIA**

Las Palmas, Marzo 1992

ZOILO GONZALEZ LAMA, Profesor Titular de Microbiología y Director del Departamento de Ciencias Clínicas de la Universidad de Las Palmas,

CERTIFICA:

Que el trabajo que titulado "Estudios sobre la resistencia enzimática a aminoglicósidos en aislados clínicos del género *Staphylococcus*", para optar al Grado de Doctor, ha sido realizado por la Lda. en Farmacia, María Milagros Torres García, bajo mi dirección en el Departamento de Ciencias Clínicas (Microbiología) de la Facultad de Ciencias Médicas y de la Salud de la Universidad de Las Palmas, considerando que reúne los requisitos necesarios para su presentación y se ajusta a la legislación vigente en estos casos.

Y para que así conste, expido y firmo el presente certificado en Las Palmas de G.C., Marzo de 1992.

INDICE.-

INTRODUCCION	1
REVISION Y ANTECEDENTES	6
CAPITULO I.- TAXONOMIA	7
1.1.- Divisiones entre la familia <i>Micrococcaceae</i> .	
1.2.- Características generales de los <i>Staphylococcus</i> .	
1.3.- Clasificación.	
1.4.- <i>Staphylococcus aureus</i> .	
1.5.- Estafilococos coagulasa negativos.	
CAPITULO II.- ANTIBIOTICOS AMINOGLICOSIDOS	28
2.1.- Historia.	
2.2.- Estructura química y clasificación.	
2.3.- Espectro de actividad.	
2.4.- Mecanismo de acción.	
2.5.- Toxicidad de los aminoglicósidos.	
CAPITULO III.- MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS AMINOGLICOSIDOS	47
3.1.- Resistencia ribosómica.	
3.2.- Resistencia por alteración en el transporte.	
3.3.- Resistencia por modificación enzimática del aminoglicósido.	

3.4.- Inhibidores y nuevos antibióticos aminoglicósidos.

CAPITULO IV.- ENZIMAS MODIFICADORAS DE AMINOGLICOSIDOS 57

4.1.- Introducción.

4.2.- Origen y evolución de las enzimas modificadoras de aminoglicósidos.

4.3.- Fosfotransferasas.

4.4.- Nucleotidiltransferasas.

4.5.- Acetiltransferasas.

4.6.- Métodos de detección de las enzimas modificadoras.

CAPITULO V.- BASES GENETICAS DE LA RESISTENCIA

105

ANTIMICROBIANA

5.1.- Plásmidos de resistencia.

5.2.- Clasificación de los plásmidos en *Staphylococcus*.

5.3.- Transposones.

5.4.- Conjugación.

5.5.- Movilización.

5.6.- Transducción.

5.7.- Transformación.

5.8.- Curación.

5.9.- Incompatibilidad.

5.10.- Otros tipos de plásmidos.

MATERIAL Y METODOS.-	118
CAPITULO VI.- PRUEBAS ESPECIFICAS PARA STAPHYLOCOCCUS	119
6.1.- Prueba de la coagulasa.	
6.2.- Prueba de la producción de limo.	
CAPITULO VII.- IDENTIFICACION BIOQUIMICA	121
CAPITULO VIII.- MEDIOS DE CULTIVOS	123
8.1.- Medios de aislamiento.	
8.2.- Medios de propagación.	
8.3.- Medios para la conservación de las cepas.	
8.4.- Medios para el estudio de la sensibilidad a antibióticos.	
8.5.- Medios para la extracción del ADN plasmídico.	
8.6.- Medio para conjugación.	
8.7.- Medios para transformación.	
8.8.- Medio para la identificación por API-STAPH.	
CAPITULO IX.- ESTUDIO DE LA SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS	130
9.1.- Antibiograma.	
9.2.- Método de dilución en agar.	
CAPITULO X.- OBTENCION DE EXTRACTOS ENZIMATICOS	134

CAPITULO XI.- ENSAYO DE ENZIMAS MODIFICADORAS DE AMINOGLICOSIDOS	136
11.1.- Técnica.	
11.2.- Reactivos.	
CAPITULO XII.- DETERMINACION DEL CONTENIDO PROTEICO	143
12.1.- Método de Lowry.	
CAPITULO XIII.- TRANSFERENCIA DEL MATERIAL GENETICO	146
13.1.- Transferencia conjugativa.	
13.2.- Transformación.	
13.3.- Curación de plásmidos.	
CAPITULO XIV.- ANALISIS DEL ADN PLASMIDICO	150
14.1.- Extracción del ADN plasmídico.	
14.2.- Electroforesis de ADN en gel de agarosa.	
14.3.- Reactivos para el análisis de ADN plasmídico.	
RESULTADOS Y DISCUSION	157
ANEXO	238
CONCLUSIONES	280
BIBLIOGRAFIA	285

INTRODUCCION

INTRODUCCION.-

La aplicación terapéutica de la penicilina en los años cuarenta, permitió que las infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* pudieran tratarse eficazmente. Este período tuvo una vida breve, ya que a mediados de esa década aparecieron las primeras resistencias a ese fármaco, de modo que en 1946 se estimaba que aproximadamente el 60% de los aislados clínicos de *Staphylococcus aureus* en el Reino Unido eran resistentes a la penicilina (122). Esta resistencia estaba causada por una enzima que se denominó penicilinasas, que catalizaba la hidrólisis del anillo β -lactámico de la penicilina dando lugar a un compuesto inactivo.

En los años sesenta, el problema terapéutico originado por la producción de penicilinasas, se vio aliviado gracias a la introducción de las penicilinas resistentes a penicilinasas, tales como metecilina y oxacilina. No obstante, una década más tarde se describían cepas resistentes a estos antibióticos en diversos puntos geográficos (122).

Este comportamiento se repetía tras la introducción de cada fármaco en la terapéutica, de modo que tras el uso del cloranfenicol, eritromicina, sulfamidas, tetraciclina, aparecían las resistencias a cada uno de ellos.

La resistencia a los aminoglicósidos no fue una excepción; así, las primeras resistencias en describirse fueron las causadas a estreptomina, neomicina y aminoglicósidos relacionados, tales como paromomicina y kanamicina; posteriormente, se describieron las resistencias a gentamicina conjuntamente con tobramicina, kanamicina, estreptomina, originando verdaderas situaciones epidémicas, tanto en Europa, como en Australia ó en Norteamérica (183).

En los últimos años, se ha producido un incremento en la incidencia de las infecciones nosocomiales causadas tanto por cepas de *Staphylococcus aureus* como de *Staphylococcus epidermidis* resistentes a antibióticos aminoglicósidos.

A pesar de que los aminoglicósidos no constituyen una terapia de primera línea para el tratamiento de las infecciones causadas por estafilococos, es este rápido incremento en la aparición de cepas resistentes a estos agentes lo que hace que sea importante su estudio. Por otro lado, la resistencia a aminoglicósidos con frecuencia va asociada a la resistencia a otros antibióticos usados en el tratamiento de infecciones estafilocócicas, tales como meticilina y oxacilina, cefalosporinas, lincosamidas, macrólidos y cloranfenicol. Esto nos deja como alternativa para el tratamiento de infecciones graves, agentes como la vancomicina, teicoplanina y rifampicina.

La modificación enzimática es desde el punto de vista clínico el tipo más importante de resistencia a los aminoglicósidos. Los mecanismos bioquímicos de modificación pueden ser de tres tipos: O-fosforilación, N-acetilación y O-nucleotidilación. Las enzimas fosforilasas catalizan la transferencia de un grupo fosforilo a un hidroxilo diana; las enzimas acetilasas, la transferencia del acetato del Acetil-Coenzima A a un grupo amino; mientras que las nucleotidasas utilizan el trifosfato de adenosina u otros nucleótidos como sustratos para modificar grupos hidroxilos de los aminoglicósidos.

Generalmente, en *Staphylococcus*, los caracteres genéticos que codifican estas enzimas se encuentran en plásmidos. Estos pueden residir en cepas de *Staphylococcus epidermidis* consideradas habitualmente como avirulentas y colonizadoras de la piel de enfermos y personal hospitalario. Tanto es así, que hasta hace pocos años, los estafilococos coagulasa negativos aislados en líquidos estériles se consideraban contaminantes, indicando

una recogida inapropiada de muestra; no obstante, el uso cada vez más frecuente de antibióticos de amplio espectro en el tratamiento de enfermedades infecciosas han elevado a estos gérmenes al rango de verdaderos patógenos (115).

Esta no es la única causa de su importancia. Los aislados de *Staphylococcus epidermidis* multirresistentes se presentan en número de tres a cinco veces mayor que los aislados de *Staphylococcus aureus* multirresistentes. Esto puede reflejar el hecho de que estos microorganismos están sujetos a una presión selectiva de antimicrobianos mayor que los *Staphylococcus aureus* (3).

Por otra parte, se ha demostrado que los genes que codifican las enzimas modificadoras de aminoglicósidos se transfieren por contacto directo entre *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus* (especie más virulenta y de mayor importancia clínica), así como de *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus aureus*, mediante un mecanismo similar a la conjugación de las bacterias gram negativas.

Esta transferencia se ha demostrado tanto *in vitro* (en filtros) (4,21,52,55,91,128,194,196), como *in vivo* (en la piel humana) (133). Se han encontrado plásmidos conjugativos idénticos en *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* aislados del mismo ambiente y de la piel de los mismos pacientes (4). Estos plásmidos de resistencia pueden movilizar y cotransferir otros plásmidos individuales que codifican resistencias a otros fármacos (133). Esto es de especial importancia ya que el uso de un tipo de antibiótico puede seleccionar la resistencia a otro, aunque los mecanismos sean diferentes. Además la resistencia a los aminoglicósidos permite que los estafilococos puedan sobrevivir en áreas del hospital donde el uso de estos antibióticos es frecuente.

Por todo esto, consideramos interesante escoger una población de *Staphylococcus* tanto *aureus* como *epidermidis* procedentes de muestras clínicas del Hospital Insular que sean resistentes a uno ó más aminoglicósidos. Identificaremos a continuación las diferentes enzimas modificadoras que causan resistencia a estos antibióticos; determinaremos los patrones enzimáticos; caracterizaremos los plásmidos que codifican estas enzimas y confirmaremos si transfieren esta resistencia a *Staphylococcus aureus* por conjugación. Especificaremos los patrones de resistencia que contienen estos plásmidos y los que se transmiten por conjugación.

REVISION Y ANTECEDENTES

CAPITULO I.-

TAXONOMIA.-

Los estafilococos fueron observados por primera vez por Koch en 1878; en 1880 Pasteur los cultivó en medio líquido y fue posteriormente Ogston en 1881 quien demostró su frecuente presencia en abscesos agudos y crónicos. Rosenbach (1884) realizó un estudio de los estafilococos aislándolos de cultivos puros y los denominó genéricamente *Staphylococcus*, nombre propuesto por Ogston (1881). Se llegó a la división en dos especies, *Staphylococcus pyogenes aureus* y *Staphylococcus pyogenes albus*. Posteriormente, Winslow y sus colaboradores (1906, 1908), realizaron una amplia clasificación basada en organismos procedentes de origen animal ó del medio ambiente.

Posteriormente veremos las clasificaciones más actuales y cómo han ido evolucionando en base a su morfología y características bioquímicas.

1.1.- DIVISIONES ENTRE LA FAMILIA *MICROCOCCACEAE* (168).-

En este estudio, hemos elegido aislados clínicos del género *Staphylococcus*.

Este género, está englobado junto con los géneros *Micrococcus*, *Stomatococcus* y *Planococcus* en la familia *Micrococcaceae*, que se caracteriza por la presencia de catalasas y citocromos, si bien algunos miembros del género *Stomatococcus* carecen de citocromos y la actividad catalasa es bastante débil.

La familia *Micrococcaceae* constituye un grupo filogenético poco coherente,

puesto que miembros del género *Micrococcus* están estrechamente relacionados con determinados corineformes. No obstante, los estafilococos sí constituyen un grupo coherente de microorganismos; incluso las especies menos relacionadas muestran una elevada homología en su ADN con el resto de las especies. La composición de la pared celular y el bajo contenido de guanina y citosina en la composición del ADN en general, serían suficientes como marcadores quimiotaxonómicos para separar estafilococos de otros géneros de cocos catalasa positivos.

Algunas especies de *Staphylococcus*, como *Staphylococcus saccharolyticus* y *Staphylococcus aureus sub. anaerobius* no son productoras de catalasa y además crecen en condiciones anaerobias. No obstante, poseen otras características, como es la composición de la pared celular típica de los estafilococos, que nos permite clasificarlas con el resto de los mismos.

En resumen las características que nos permiten diferenciar el género *Staphylococcus* del género *Micrococcus* son principalmente que las cepas de *Staphylococcus* crecen en anaerobiosis, fermentan la glucosa, son resistentes a la lisostafina y producen ácido en anaerobiosis a partir del glicerol en un medio con eritromicina (0,4 mg/l). Estas diferencias las vemos esquemáticamente en la tabla 1.

1.2.- CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS STAPHYLOCOCCUS (47,103,154,168).-

Los *Staphylococcus* son cocos gram positivos. Su tamaño oscila entre 0,5-1,5 μm de diámetro. Los podemos encontrar aislados, o bien agrupados en parejas, tétradas, formando cadenas cortas (de tres o cuatro células) ó formando racimos. Son inmóviles, no

Tabla 1.- Familia *Micrococcaceae* (caracteres diferenciales).-

Caracteres	<i>G. Staphylococcus</i>	<i>G. Micrococcus</i>
Cocos gram +, catalasa +	+	+
Agrupación en racimo	+	+
Agrupación en tétradas	-	±
Crecimiento en anaerobiosis	+	-
Fermentación de la glucosa	+	-
Resistencia a la lisostafina	-	+
Producción de ácido en aerobiosis a partir del glicerol en un medio con eritromicina (0,4 µg/ml)	+	-

forman esporas, son habitualmente catalasa positivos y generalmente no tienen cápsula, si bien en algunas cepas de *Staphylococcus aureus* se observan microscópicamente cápsulas visibles.

La mayoría de las especies son aerobias facultativas y crecen bien entre 18-40 horas en presencia de cloruro sódico al 10%. Algunas especies menos frecuentes, suelen requerir la presencia de CO₂ para su crecimiento. La mayoría de los *Staphylococcus* crecen bien en medios no inhibitorios.

La pared celular de los *Staphylococcus* contiene peptidoglicanos y ácido teicóico. El diaminocácido presente en el peptidoglicano es L-lisina. Los estafilococos son susceptibles a la lisis con lisostafina, que actúa rompiendo las uniones Glicina-Glicina presente en los puentes interpeptídicos del peptidoglicano. Por otro lado son resistentes a la lisis con la muramidasa lisozima. Estas características son, como vimos anteriormente, diferenciadoras entre el género *Micrococcus* y el género *Staphylococcus*.

La mayoría de los estafilococos son habitantes comunes de la piel, de las membranas, mucosas y glándulas de la piel, mostrando algunas especies hábitos preferentes y muy concretos. Así tenemos *Staphylococcus capitis* que se encuentra en la cabeza, sobretodo cuando las glándulas sebáceas son numerosas y bien desarrolladas; *Staphylococcus auricularis* tiene preferencia por el conducto auditivo externo. *Staphylococcus hominis* y *Staphylococcus haemolyticus* aparecen generalmente en zonas de la piel con numerosas glándulas apocrinas, tales como las axilas y el pubis.

Por último, reseñar en estas características generales de los estafilococos que la relación guanina-citosina presente en su ADN es de 30-39 moles %.

1.3.- CLASIFICACION (153,154,168).-

Se han encontrado diecinueve especies de *Staphylococcus*. El género *Staphylococcus* se subdivide al menos en cuatro grupo de especies en base a su caracterización fenotípica y la relación ADN/ADN (tabla 2). Las especies que constituyen el grupo *Staphylococcus epidermidis* son *S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. warneri*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. saccharolyticus*. El grupo de *Staphylococcus saprophyticus* está compuesto por las siguientes especies: *S. saprophyticus*, *S. cohnii* y *S. xylosus*. El grupo de especies de *Staphylococcus sciuri* son *S. sciuri* y *S. lentus*. Por último el grupo de *Staphylococcus simulans* está compuesto por *S. simulans* y por *S. carnosus*. Las especies *Staphylococcus aureus*, *S. auricularis*, *S. intermedius*, *S. hyicus* y *S. caseolyticus* no se pueden englobar en ninguno de los grupos anteriores, y también están lo suficientemente distante como para constituir entre ellos un solo grupo.

1.4.- STAPHYLOCOCCUS AUREUS.-

1.4.1.- Características generales (103,168).-

Los *Staphylococcus aureus* son esféricos, de 0,5-1,0 μm de diámetro, se agrupan formando racimos irregulares. Algunas células, poco frecuentes presentan cápsulas y suelen ser más virulentas que las cepas no capsuladas.

Las colonias son suaves, redondas y translúcidas y en un medio no selectivo pueden alcanzar de 6-8 mm de diámetro. El pigmento de la colonia es variable adquiriendo tonalidades que van desde el amarillo al naranja. Los pigmentos son carotenoides triterpénicos ó derivados que se encuentran localizados en la membrana celular. Pueden

Tabla 2.- Clasificación de los *Staphylococcus* coagulasa negativos en cuatro grupos de especies.-

GRUPOS DE ESPECIES	ESPECIES
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>
	<i>S. capitis</i>
	<i>S. warneri</i>
	<i>S. haemolyticus</i>
	<i>S. hominis</i>
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>S. saprophyticus</i>
	<i>S. cohnii</i>
	<i>S. xylosus</i>
<i>Staphylococcus sciuri</i>	<i>S. sciuri</i>
	<i>S. lentus</i>
<i>Staphylococcus simulans</i>	<i>S. simulans</i>
	<i>S. carnosus</i>

existir colonias de *Staphylococcus aureus* que sean de color blanco, ya que la cantidad de pigmento es mucho menor.

Staphylococcus aureus es anaerobio facultativo pero crece mejor en condiciones aerobias. El crecimiento se ve favorecido por altas concentraciones de cloruro sódico, por encima del 10% en el medio. La mayoría de las cepas crecen entre 10 y 45° C y a un pH óptimo de 7,0-7,5.

1.4.2.- Características bioquímicas (103,168).-

Staphylococcus aureus puede producir ácido tanto de forma aeróbica como anaeróbica a partir de los siguientes carbohidratos: glucosa, lactosa, maltosa y manitol; sólo aeróbicamente a partir de fructosa, galactosa, manosa, ribosa, sacarosa, trehalosa, turanosa y glicerol. En algunos casos no se detecta bien la producción de ácidos a partir de lactosa, turanosa, galactosa y manitol; en ningún caso se produce ácido a partir de arabinosa, xilosa, xilitol, sorbitol, inositol, arabitol, rafinosa, melobiosa, rahmnosa ó dextrina entre otros.

Los nitratos son reducidos a nitritos por medio de una nitrato reductasa, con la formación de amoniaco. Produciéndose también amoniaco a partir de la arginina por la acción de arginina dihidrolasa y de la urea por la ureasa.

La producción de acetofna a partir de la glucosa ó del piruvato de sodio , es una caracterfstica alternativa para distinguir *Staphylococcus aureus* de otros estafilococos coagulasa positivos.

1.4.3.- Producción de coagulasa (41,103,154,168).-

La detección de la coagulasa es muy importante en la rutina de investigación de *Staphylococcus aureus*.

La coagulasa es un profermento que en presencia de protrombina y/o de un cofactor del plasma sanguíneo (CRF), forma un complejo de actividad proteolítica, que transforma el fibrinógeno en fibrina y produce coagulación del plasma sanguíneo. Desde siempre se ha considerado la producción de coagulasa con la virulencia de la cepa. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el poder patógeno de *Staphylococcus aureus* no depende exclusivamente de esto, sino también de otros factores.

Los *Staphylococcus aureus* producen también otra serie de enzimas extracelulares, como son las estafiloquinasas, que transforman el plasminógeno en plasmina, la hialuronidasa, lipasa, ADNasa, fosfatasas, desoxirribonucleasas termoestables. Las penicilinasas, son β -lactamasas inducibles, secretadas por las cepas resistentes que inactivan la penicilina por apertura de su anillo beta-lactámico. Generalmente son de origen plasmídico.

1.4.4.- Estructura antigénica (41,154,168).-

La estructura antigénica de *Staphylococcus aureus* es compleja y mal conocida. Se han demostrado más de treinta antígenos en la pared celular, donde destacamos de dentro a fuera :

* **Polisacárido A**, que es específico de esta especie. Está constituido por

ácidos teicóicos, polímeros de fosfato de ribitol, unidos a su vez al peptidoglicano por enlaces covalentes. Tienen carácter antigénico e inducen a la formación de anticuerpos.

* **Proteína A**, es también específica de esta especie y se encuentra en la pared celular pudiéndose liberar al medio. Es una proteína básica de pequeño tamaño (PM 13.000) que posee la propiedad de reaccionar con los fragmentos Fc de las moléculas de IgG de la mayoría de los sueros mamíferos. Se pueden unir también a la extremidad F(ab)₂ de las IgG específicas, así como activar el complemento. Como consecuencia de esto último, provocan la formación de factores quimiotácticos que explicarían en parte la característica purulencia de las lesiones estafilocócicas.

* **Antígenos capsulares**, tan sólo han sido caracterizados dos de estos antígenos producidos por las cepas mucoides de *Staphylococcus aureus*. El de la cepa de Wiley, un polipéptido formado por ácido glutámico, lisina, alanina y glicina en proporción de 1:1:2:5; y el de la cepa de Smith, un polímero de ácido 2-amino-2-desoxi-D-glucurónico.

* **Otros antígenos**, existen en la pared celular un número indeterminado de proteínas responsables de la tipospecificidad.

Atendiendo a los antígenos específicos de *Staphylococcus aureus*, se ha podido dividir en tipos siguiendo dos criterios :

a) En serotipos: mediante el empleo de sueros específicos se han clasificado 18 serotipos. La tipificación serológica es difícil ya que los fenómenos de aglutinación son confusos debido a las aglutinaciones falsas, además de la dificultad de preparar antisueros específicos. La tipificación serológica de cepas tiene un valor limitado en los estudios

epidemiológicos. Esto hace que en la actualidad no exista uniformidad internacional en lo referente al tema.

b) En fagotipos o lisotipos: por el estudio de la sensibilidad de la cepa frente a un grupo de fagos seleccionados. Se conocen más de 100 fagotipos, que se han reunido en cuatro grupos y un grupo no clasificado, (tabla 3). Desde el punto de vista epidemiológico es enormemente útil, sobretudo en ambientes hospitalarios. Está establecido internacionalmente.

1.4.5.- *Toxinas de Staphylococcus aureus* (41,154,168).-

Cuando *Staphylococcus aureus* se desarrolla en medios adecuados, puede producir diversas toxinas, que se encuentran en relación con estados de lisogenia o asociadas a la presencia de plásmidos. Las más importantes son :

* **Hemolisinas.** Son exotoxinas protéicas termolábiles que presentan una acción lítica sobre los hematíes y una acción tóxica sobre otras células. Son por tanto citolíticas ó citotóxicas. Existen cuatro tipos de hemolisinas, alfa, beta, gamma y delta-hemolisinas.

* **Leucocidinas.** Además de las asociadas a las hemolisinas, existen leucocidinas no hemolíticas, compuestas por dos subunidades F y S que se fijan a los fosfolípidos de la membrana de los polimorfonucleados y macrófagos, produciendo alteraciones y muerte de los fagocitos.

Tabla 3.- *Staphylococcus aureus*. Clasificación en fagogrupos y listas de fagos seleccionados para la fagotipia.-

Grupo	Fago									
I	29	52	52A	79	80					
II	3A	3B	3C	55	71					
III	6	7	42E	47	53	54	75	77	83A	
IV	42D									
No clasificados			81	187						

* **Exfoliatinas.** En su mayoría pertenecen al fagogrupo II. Producen una lesión local seguida de una exfoliación más o menos intensa.

* **Enterotoxinas.** Son de naturaleza protéica y resisten el calor y la acción de los jugos gástricos. Se conocen siete tipos, (A, B, C₁, C₂, C₃, D y E) y se identifican por inmunodifusión. Las A, B y D son las más conocidas. Las enterotoxinas A y D producen la mayoría de cuadros de intoxicación alimentaria y la B está asociada a cuadros de enterocolitis.

1.4.6.- *Hábitat de Staphylococcus aureus* (154,168).-

Forma parte generalmente de la flora normal de las personas sanas y se halla en la mucosa nasal del 20-40%, en la piel del 10-20%, en manos y perineo. El número de portadores nasales puede aumentar considerablemente en caso de una hospitalización prolongada.

No obstante *Staphylococcus aureus*, es un germen potencialmente patógeno, causante de un amplio grupo de infecciones, tales como forúnculos, carbunco, impétigo, necrosis tóxicas, neumonía, osteomielitis, meningitis, mastitis, bacteriemia, abscesos, intoxicaciones alimentarias, enterocolitis, infecciones genito-urinarias y síndrome del shock tóxico.

1.5.- ESTAFILOCOCOS COAGULASA NEGATIVOS.-

1.5.1.- Clasificación taxonómica (153,168).-

La clasificación taxonómica de los estafilococos coagulasa negativos ha sido siempre bastante complicada. Anteriormente, hemos clasificado el género *Staphylococcus* en cuatro grupos de especies, siguiendo los criterios considerados por Kloos y Schleifer (1981), pero queremos hacer un breve recorrido por las distintas clasificaciones de las que han sido objeto.

Los estafilococos coagulasa negativos fueron considerados por primera vez en la 7ª edición del Manual de Bergey en 1957, donde *Staphylococcus aureus* se agrupó aparte por tener características patógenas y los coagulasa negativos no.

Posteriormente, en la 8ª edición del Manual de Bergey (1974) se diferenciaban dos especies dentro de los estafilococos coagulasa negativos, que se denominaron *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus saprophyticus*.

El gran mérito se debió a Baird-Parker, que en 1963, inició la búsqueda de un sistema de clasificación de *Staphylococcus* y *Micrococcus*. Utilizando marcadores bioquímicos, dividió al género *Staphylococcus* en seis subgrupos (I-VI) y al género *Micrococcus* en ocho (1-8). Los subgrupos II-VI representaban a los estafilococos coagulasa negativos. El inconveniente de esta clasificación fue que un gran número de aislados clínicos no pudieron englobarse aquí, ya que fue pensada para estafilococos de origen animal. Esta clasificación, la podemos ver en la tabla 4.

Tabla 4.- Sistema de clasificación de Baird-Parker.-

<i>Staphylococcus</i>	Subgrupos					
	I	II	III	IV	V	VI
Coagulasa	+	-	-	-	-	-
Fosfatasa	+	+	+	-	-	-
Fermentación de						
Manitol (aerobia)	+*	-	-	-	-	+
Manitol (anaerobia)	+*	-	-	-	-	-
Acetofina	+	+	-	+	+	+
Fermentación de						
Lactosa	+*	+*	v	-	+	v
Maltosa	+	+	-	v	+	v
Crecimiento a 10°C	+*	-	-	-	-	-

<i>Micrococcus</i>	Subgrupos							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Fermentación de								
Glucosa (aerobia)	+	+	+	+	+	+	-	-
Fosfatasa	-	-	-	-	-	+	-	-
Acetofina	+	+	+	+	-	-	-	-
pH Final	4,6	5,1	5,0	5,2	5,5	5,3	6,5	6,2
Fermentación de								
Arabinosa	-	-	-	+	v	+	-	-
Lactosa	-	+	v	+	+*	+	-	-
Maltosa	v	+	+*	+	+*	+	-	-
Manitol	-	-	+	+	+*	+	-	-
Lipólisis	v	+	+	-	-	+*	v	-
Hidrólisis Tween	-	-	v	-	-	+	v	v
Crecimiento a 10°C	-	+*	+*	+	+*	+	+*	+
Pigmento rojo	-	-	-	-	-	-	-	+

v: resultados variables

*: reacción habitual

Tras la clasificación aparecida en la 8ª edición del Manual de Bergey (1974), Kloos y Schleifer propusieron dividir a los estafilococos coagulasa negativos en nueve especies: *Staphylococcus epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. haemolyticus*, *S. xylosus*, *S. cohnii*, *S. warneri*, *S. capitis*, *S. hominis* y *S. simulans*. Posteriormente, se añadieron las siguientes especies: *S. auricularis*, *S. saccharolyticus*, *S. sciuri*, *S. lentus*, *S. gallinarum*, *S. caprae*, *S. carnosus*, *S. staphylolyticus*, *S. caseolyticus*, *S. n.spec*, *S. arlettae*, *S. equorum* y *S. kloosii*. Las primeras diez especies son de origen humano, las otras raramente se han encontrado en el hombre.

Posteriormente, surgió un criterio bastante poderoso para la clasificación de los estafilococos coagulasa negativos, que fue la relación ADN/ADN. Esta fue introducida por Pulverer y colaboradores en 1978, y permitía asociar a los estafilococos en diferentes grupos homólogos. En base a esto y aplicando estudios inmunológicos en *Staphylococcus* coagulasa negativos, Schleifer y colaboradores propusieron dividirlos en los cuatro grupos de especies anteriormente mencionados.

1.5.2.- *Staphylococcus epidermidis* (103,143,147,153,154,168).-

Se caracterizan por ser esféricos, con un diámetro de 0,5-1,5 μm . Se agrupan generalmente en pares ó tétradas. Algunas cepas son productoras de un polisacárido mucoso, que permite a las bacterias adherirse a las superficies de los catéteres, prótesis, sondas, etc.; además protege al microorganismo de los mecanismos de defensa del huésped, especialmente de la opsonización y fagocitosis. También se cree en la relación existente entre esta característica y la múltiple resistencia antimicrobiana. La cantidad de sustancia mucoide, limo ó "slime" producida es variable, y depende de la composición del medio donde el estafilococo crece.

Habitualmente no se detecta la formación de pigmento. Las colonias suelen ser de color pardo o blanco-grisáceo. Crece mejor en condiciones aerobias y en concentraciones de cloruro sódico por encima de 7,5 %.

Entre sus caracteres estructurales y biológicos destacan la presencia en su pared celular de ácidos teicóicos constituidos por polímeros de fosfato de glicerol. Produce ácido aeróbica y anaeróbicamente a partir de la glucosa. Produce ácido también a partir de fructosa, maltosa, sacarosa y glicerol, el 70-90% a partir de lactosa, galactosa, manosa y/o turanosa. Menos del 90% de las cepas fermenta la ribosa, y prácticamente ninguna utiliza la trehalosa. No hay producción de ácido a partir de manitol, rhamnosa, xilosa, xilitol, arabinosa, celobiosa, sorbitol, inositol, dulcitol, arabitol, rafinosa y melobiosa entre otros.

La mayoría de las cepas reducen el nitrato a nitrito y producen fosfatasa alcalina, así como demuestran tener actividad arginina dihidrolasa y ureasa, produciendo amoníaco a partir de la arginina y de la urea respectivamente.

A diferencia con *Staphylococcus aureus*, la tipificación por fagos tiene un éxito un tanto limitado y da mejores resultados en situaciones epidémicas que en situaciones endémicas. En cuanto a la tipificación serológica, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus* comparten una serie de antígenos. A pesar de ello, se ha demostrado por medio de estudios de absorción cruzada que *Staphylococcus epidermidis* posee su propio tipo de aglutinógenos.

La aplicación de la tipificación molecular, es decir análisis de patrones de plásmidos, estudios de digestión de ADN cromosómico y ADN plasmídico con endonucleasas de restricción e hibridación del ADN, son un importante proyecto para la

identificación de cepas de estafilococos, sobretodo en *Staphylococcus epidermidis*, ya que un alto porcentaje de esta especie presenta al menos un plásmido, y con frecuencia varios. El uso de la tipificación molecular para la identificación de estafilococos, es un instrumento útil a la hora de diferenciar contaminantes de agentes productores de septicemias, infecciones del tracto urinario, osteomielitis, etc. Esta técnica tiene también sus inconvenientes, derivados sobretodo de los distintos procedimientos de extracción del ADN plasmídico, de la pérdida de los plásmidos que albergan factores de resistencia, transferencia conjugativa de plásmidos, etc.

La mayoría de las cepas son sensibles a la novobiocina, característica que le permite diferenciarse de *Staphylococcus saprophyticus*, especie novobiocina-resistente, pero al igual que *Staphylococcus epidermidis* fermentador de la sacarosa.

El hábitat donde se encuentra mayoritariamente *Staphylococcus epidermidis* es en la piel humana, especialmente en lugares húmedos y zonas de transición del epitelio cutaneomucoso. Ocasionalmente lo podemos encontrar en la piel de otros mamíferos, sobretodo los que están en contacto con el hombre.

Staphylococcus epidermidis se considera como un patógeno oportunista, que puede colonizar válvulas cardiacas, sondas cerebroespinales, prótesis ortopédicas y catéteres intravasculares entre otros. Esta especie puede ser además la responsable de infecciones postoperatorias en pacientes procedentes de cirugía cardiaca; peritonitis en pacientes sometidos a diálisis continua; infecciones del tracto urinario, otitis media y un largo etcétera. Los pacientes inmunodeprimidos, así como los que están sometidos a terapias inmunosupresoras son particularmente susceptibles a este tipo de infecciones.

1.5.3.- *Staphylococcus saprophyticus* (103,147,153,154,168).-

A continuación citamos las características más importantes de esta especie por ser considerada como patógeno habitual. En la tabla 5, vemos esquemáticamente la identificación de las especies de *Staphylococcus* coagulasa negativos que se aíslan en el hombre.

Staphylococcus saprophyticus es un estafilococo saprófito del medio ambiente, que puede encontrarse también en piel y mucosas.

La pared celular se diferencia en la composición de sus ácidos teicóicos, que son polímeros de fosfato de ribitol.

Sus colonias son convexas, circulares, grandes (5-8 mm de diámetro). Su pigmentación es variable, tanto pueden presentarla, como carecer de ella. Crece mejor en condiciones aeróbicas, aunque también lo hace en medio de tioglicolato semisólido. Crece bien en concentraciones altas de cloruro sódico (por encima del 10%).

Fermenta la glucosa, maltosa, sacarosa, turanosa y glicerol aeróbicamente. La mayoría de las especies, fermentan manitol, fructosa, trehalosa, lactosa y xilitol (con frecuencia débilmente). No se observa producción de ácidos a partir de manosa, ramnosa, xilosa, arabinosa, ribosa, sorbitol, inositol, rafinosa, entre otros. Sólo algunas especies fermentan la galactosa, ribosa o gentibiosa.

No reducen el nitrato a nitrito, y generalmente no producen fosfatasa alcalina. Son, por supuesto, coagulasa negativos. No se detecta hemólisis. La producción

Tabla 5.- Identificación de las especies de *Staphylococcus coagulasa* negativos que se aislan en el hombre.-

	Pigmento	Crecimiento en anaerobiosis	Reducción de los nitratos	Fosfatasa alcalina	Utilización de la arginina	Producción de ureasa	Hemólisis	Resistencia a la novobiocina	Formación de ácido en aerobiosis a partir de									
									Maltosa	Trehalosa	Mantol	Xilosa	Celobiosa	Sacarosa	Xilitol	Rafinosa	Manosa	
<i>S. epidermidis</i>	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>S. hominis</i>	d	-	d	-	d	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+
<i>S. haemolyticus</i>	d	(+)	d	-	-	+	(+)	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>S. wameri</i>	d	+	-	-	d	+	(d)	-	+	+	d	-	-	-	+	-	-	-
<i>S. capitis</i>	-	(+)	d	-	d	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>S. auricularis</i>	-	(H)	(d)	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-
<i>S. saprophyticus</i>	d	(+)	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	d	-	-	-
<i>S. cohnii</i>	-	d	-	-	-	+	-	-	+	+	d	-	-	-	+	-	-	-
<i>S. xilosus</i>	d	d	d	-	-	+	-	-	+	+	d	-	-	-	+	-	-	-
<i>S. simulans</i>	-	+	+	(d)	+	+	(d)	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
<i>S. saccharolyticus</i>	-	+	+	d	+	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

de amoniaco a partir de la arginina es débil, pero no así a partir de la urea.

La característica más notable es la resistencia a la novobiocina, que permite diferenciarlo de otras especies con importancia clínica. En la tabla 6, podemos ver las diferencias más importantes entre las especies *S. aureus*, *S. epidermidis* y *S. saprophyticus*.

Staphylococcus saprophyticus se aísla ocasionalmente en la piel del hombre o de otros mamíferos. Generalmente está asociado a infecciones del tracto urinario. Está por lo tanto implicado en cuadros como cistitis, uretritis, pielonefritis, que van acompañadas con abundante bacteriuria. *Staphylococcus saprophyticus*, es el germen que causa con más frecuencia infecciones del tracto urinario en mujeres jóvenes adultas. Está implicado también en casos de prostatitis. Estas especies tienen una capacidad especial para adherirse a las células uroepiteliales más que a las células de la piel. Esto las diferencia de otros estafilococos coagulasa negativos.

Tabla 6.- Género *Staphylococcus* (caracteres diferenciales).-

Caracteres	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. saprophyticus</i>
Coagulasa	+	-	-
Fermentación manitol	+	-	-
Toxina alfa	+	-	-
ADNasas termoestables	+	-	-
Proteína A	+	-	-
Acidos teicóicos			
Fosfato de ribitol	+	-	+
Fosfato de glicerol	-	+	±
Sensibilidad a novobiocina	+	+	-

CAPITULO II.-

ANTIBIOTICOS AMINOGLICOSIDOS.-

2.1.- HISTORIA (35,50,51).-

El primer producto aislado de este grupo de antibióticos fue la ESTREPTOMICINA, descubierta por Waksman y colaboradores en 1944 a partir de una cepa de *Streptomyces griseus* aislada de la garganta de un pollo. Este microorganismo había sido descrito por Krainsky en 1914, y dos años después por Waksman y por Curtis. El cultivo original no elaboraba antibiótico y fue mutado mediante irradiaciones por Waksman y Lechevalier (1953). Su descubrimiento respondió a un programa seriado de búsqueda de antibióticos a partir de microorganismos del suelo y fue, así mismo el primer antimicrobiano activo frente a *Mycobacterium tuberculosis*; este trabajo sirvió para que Waksman obtuviera el Premio Nobel.

Posteriormente en 1949, independientemente Waksman y Lechevalier, y Umezawa y colaboradores aislaron la NEOMICINA de una cepa de *Streptomyces fradiae*. El extracto enzimático contenía dos componentes activos químicamente muy similares, que han sido denominados NEOMICINA B y C. La primitiva NEOMICINA A se demostró posteriormente que era un producto de degradación de los dos anteriores que se conoce con el nombre de NEAMINA.

En 1953, Decaris obtuvo la FRAMICETINA (químicamente análoga a la NEOMICINA C) a partir de una cepa de *Streptomyces lavendulae*.

La KANAMICINA fue aislada en Japón en 1957 por Umezawa y colaboradores de una cepa de *Streptomyces kanamyceticus*. La preparación original era un extracto enzimático que contenía tres productos: KANAMICINA A, B y C.

La PAROMOMICINA fue desarrollada por investigadores del grupo Parke Davis en 1959, fue aislada de *Streptomyces rimosus var. paromomicinus* en Colombia.

En 1961, el grupo Upjohn aporta la ESPECTINOMICINA a partir de *Streptomyces spectabilis*.

A partir del descubrimiento de la KANAMICINA, se intentaron modificaciones químicas en los aminoglicósidos sin mucho éxito al principio. El equipo de investigación de Schering Corporation tomó la decisión de estudiar un grupo poco conocido de microorganismos, las micromonosporas, como fuente de nuevos antibióticos. Fruto de este trabajo fue el aislamiento de la GENTAMICINA de *Micromonospora purpurea* por Weinstein y colaboradores en 1963. La GENTAMICINA resultó ser un complejo integrado por al menos cinco productos (A, B, C₁, C_{1a} y C₂). En clínica se emplea un preparado sin los dos primeros.

En 1967, se describe el complejo NEBRAMICINA, a partir de una serie de especies de *Streptomyces tenebrarius*. De los distintos componentes de que constaba éste, el factor 6 resultó ser el más activo, se purificó y se registró con el nombre de TOBRAMICINA.

SISOMICINA se obtuvo de *Micromonospora inyoensis* en 1970. Inicialmente se llamó RICKAMICINA.

Las LIVIDOMICINAS A y B fueron aisladas en 1971, a partir de *Streptomyces lividus*.

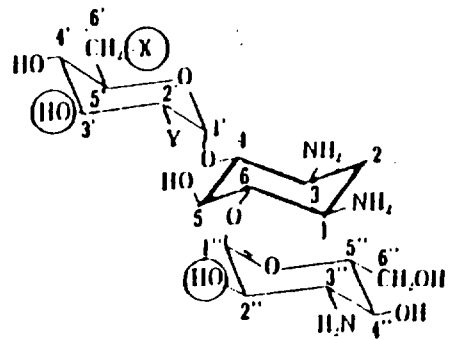
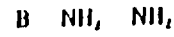
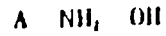
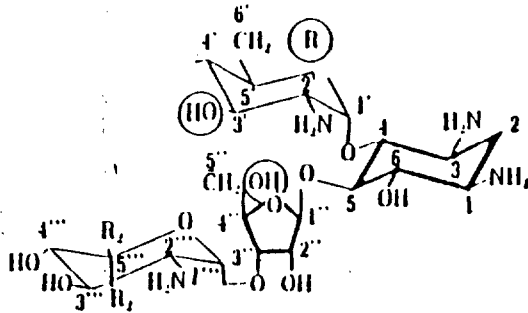
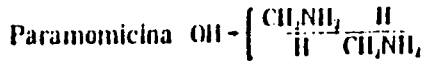
La RIBOSTAMICINA fue obtenida de *Streptomyces ribosidoficus*. Las BUTIROSINAS A y B no son producidas por hongos sino por *Bacillus circulans* (1971).

En la actualidad existen una gran cantidad de antibióticos aminoglicósidos casi siempre derivados de las moléculas originales. Así tenemos la DIBEKACINA, derivado de la KANAMICINA B. Derivado semisintético de la KANAMICINA A, tenemos la AMIKACINA. La NETILMICINA es la 1-N-etilsisomicina, derivado de la SISOMICINA. Uno de los últimos derivados semisintéticos es la ISEPAMICINA que es la 1-N-(S-3-amino-2-hidroxiopropionil) GENTAMICINA B.

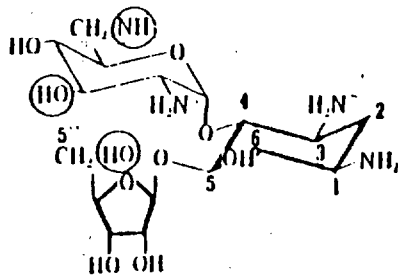
2.2.- ESTRUCTURA QUIMICA Y CLASIFICACION (35,66).-

Los aminoglicósidos son alcoholes cíclicos aminosustituídos (aminociclitolos) unidos glicosídicamente a uno o varios aminoazúcares. Los enlaces glicosídicos son puentes de oxígeno, consecuencia de la reacción entre el grupo hidroxilo (OH) del aminociclitol y el grupo OH de un átomo de carbono de un azúcar. En la figura 1, podemos observar las estructuras de diferentes aminoglicósidos.

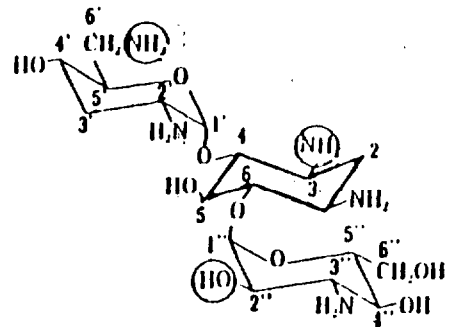
La ESTREPTOMICINA y la TROSPECTOMICINA carecen de aminoazúcares y están caracterizados por el aminociclitol actinamina. Hemos encontrado distintas clasificaciones, pero seguiremos aquella que divide a los aminoglicósidos en pseudodisacáridos, pseudotrisacáridos y pseudotetrasacáridos dependiendo del número de aminoazúcares unidos al aminociclitol.



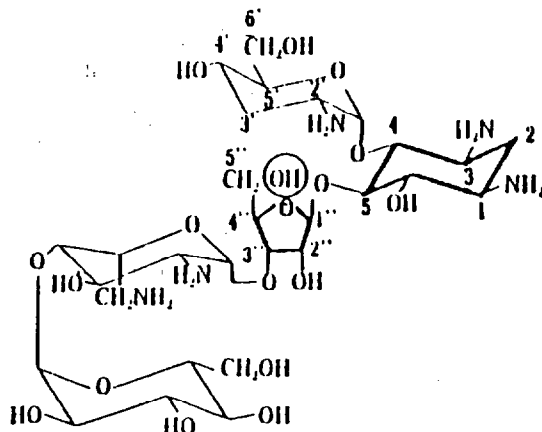
Ribostamicina



Tobramicina



Lividomicina A



Gentamicinas

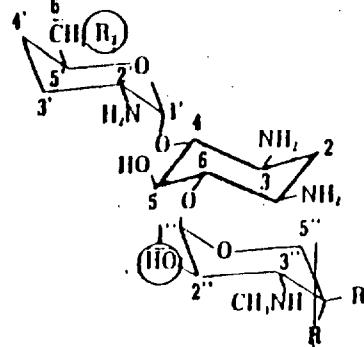
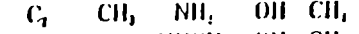
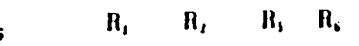


Figura 1.- Estructuras de diferentes aminoglicósidos.-

PSEUDODISACARIDOS: Están constituidos por el aminociclitol fortamina unido a un aminoazúcar en posición 6. Se les denomina grupo de la fortamicina. Incluye antibióticos tales como FORTAMICINA A (astromicina) (figura 2), C y D, ESPORAMICINA A, ISTAMICINAS A y B, y DACTIMICINA (2"-formidoil-astromicina).

PSEUDOTRISACARIDOS: Están constituidos por un aminociclitol unidos a dos aminoazúcares. Según sea el aminociclitol, tendremos:

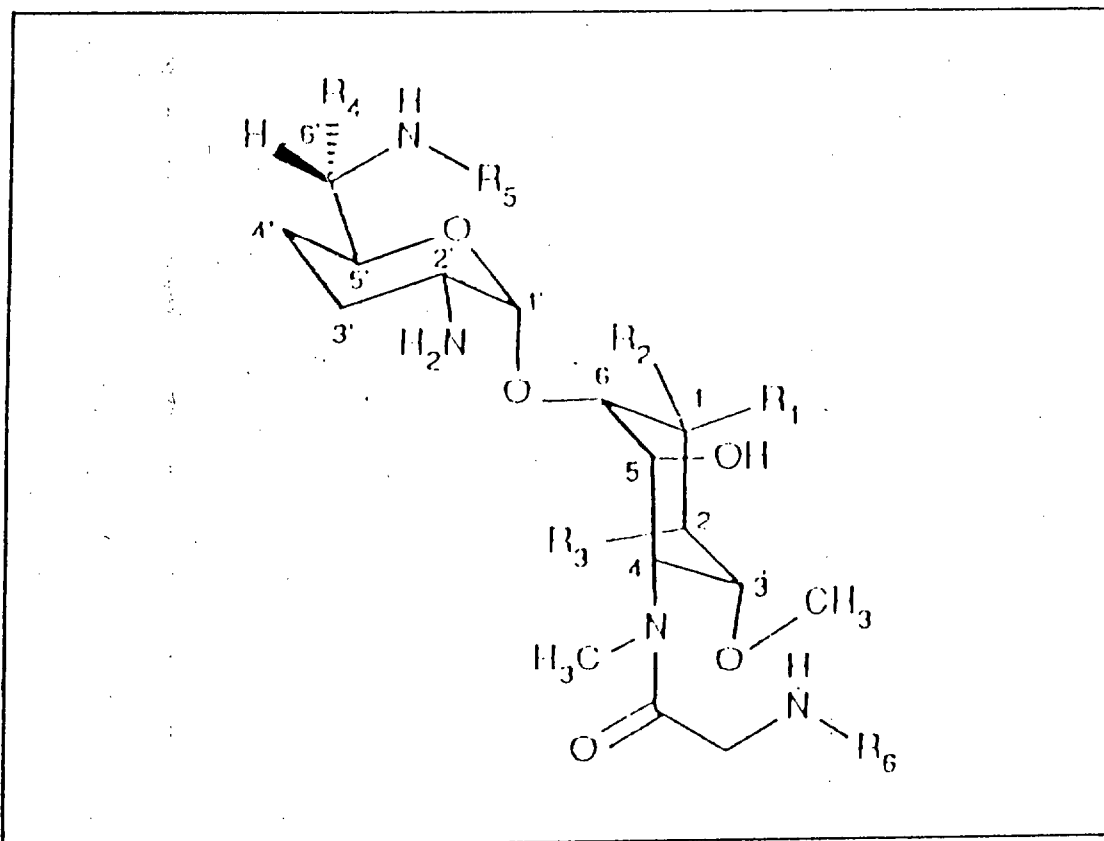
a) Aminociclitol estreptidina, donde incluimos la ESTREPTOMICINA, formada por la estreptidina unida a una hexosa y una pentosa.

b) Aminociclitol 2-desoxiestreptamina, de donde derivan tres subclases de aminoglicósidos: los monosustituidos en posición 4 (grupo APRAMICINA) (figura 3); los 4,5-disustituidos (grupo BUTIROSINA y RIBOSTAMICINA); los 4,6-disustituidos (grupo KANAMICINA y grupo GENTAMICINA).

PSEUDOTETRASACARIDOS: Se caracterizan porque presentan tres azúcares. EL aminociclitol es la 2-desoxiestreptamina, disustituido en posición 4,5. A este grupo pertenecen NEOMICINA, LIVIDOMICINA, PAROMOMICINA.

En la figura 4, podemos observar las estructuras de otros aminoglicósidos.

Existen otras clasificaciones de los aminoglicósidos. Así tenemos la que los divide en dos clases; los que contienen estreptidina, y los que contienen desoxiestreptamina. En el primer grupo encontramos ESTREPTOMICINA, DIHIDROESTREPTOMICINA e HIDROESTREPTOMICINA. El otro grupo se divide en dos subclases, aquellas en los que el sustituyente están enlazados en posiciones adyacentes (4,5), donde tendremos a NEOMICINA, LIVIDOMICINA, PAROMOMICINA, BUTIROSINA y RIBOSTAMICINA;



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
Fortimicina A	NH ₂	H	OH	CH ₃	H	H
Fortimicina C	NH ₂	H	OH	CH ₃	H	CONH ₂
Fortimicina D	NH ₂	H	OH	H	H	H
Esporaricina A	H	NH ₂	H	CH ₃	H	H
Istamicina A (Sannamicina A)	NH ₂	H	H	H	CH ₃	H
Istamicina B	H	NH ₂	H	H	CH ₃	H
Dactimicina	NH ₂	H	OH	CH ₃	H	CH=NH

Figura 2.- Estructura de las fortamicinas.-

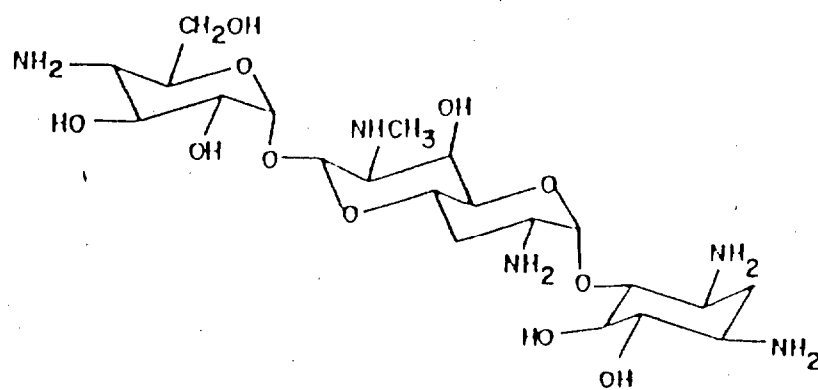


Figura 3.- Estructura de la apramicina.-

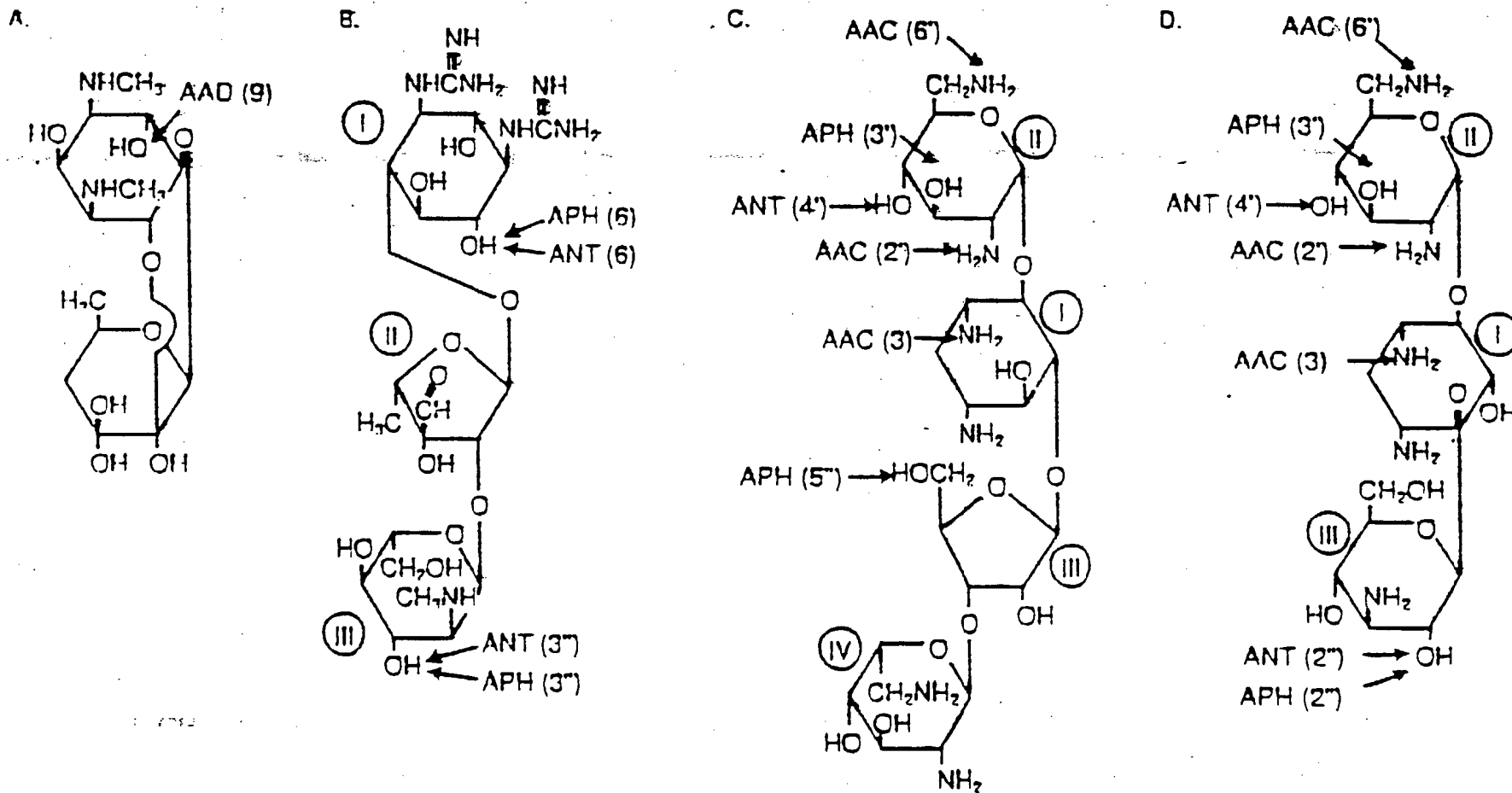


Figura 4.- Estructuras de aminoglicósidos y lugares de modificación enzimática.

A: espectinomina; B: estreptomina; C: neomicina; D: kanamicina B.

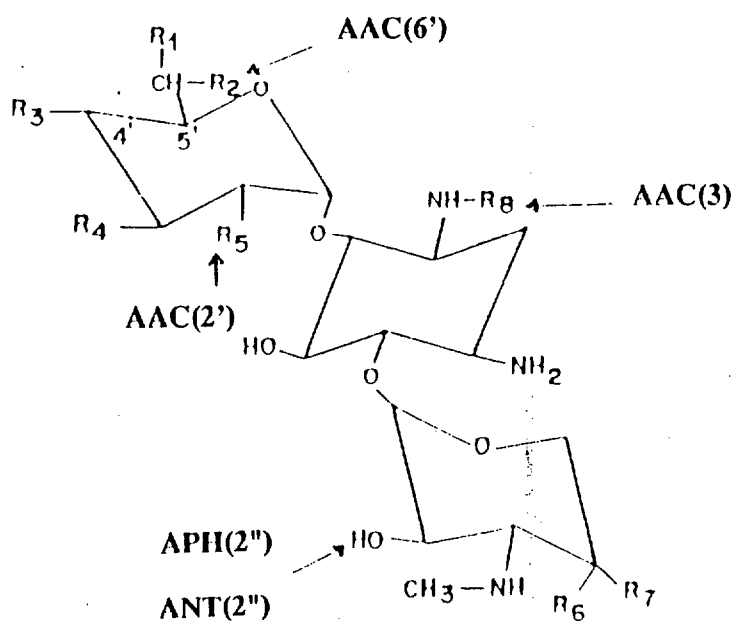
Amikacina, gentamicina y tobramicina están relacionados estructuralmente con kanamicina B.

y la subclase en la que los sustituyentes están enlazados a grupos hidroxilos no adyacentes (4,6) donde se incluirían KANAMICINA, GENTAMICINA (figura 5), AMIKACINA, SISOMICINA, TOBRAMICINA, DIBEKACINA y NETILMICINA entre otros. Por último tendríamos una tercera subclase donde encontraríamos antibióticos como HIGROMICINA, APRAMICINA y ESPECTINOMICINA.

Dentro de las propiedades físico-químicas tenemos que los aminoglicósidos se presentan como polvos blancos ó amarillentos, inodoros y sumamente higroscópicos, pero estables en solución y resistentes a los cambios de pH (2 a 14); son solubles en agua pero poco en disolventes orgánicos. Los productos básicos tienen un pH fuertemente alcalino, mientras que los sulfatos tienden a ser ligeramente ácidos.

En conjunto, todos estos antibióticos comparten numerosas propiedades comunes, entre las que destacamos (50,150):

- Carácter básico.
- Su espectro de actividad.
- Su mecanismo de acción.
- Su efecto bactericida que es poco afectado por el inóculo.
- Su farmacocinética: No absorción intestinal. Eliminación por filtración glomerular.
- Sinergismo con antibióticos β -lactámicos y otros antibióticos que actúan sobre la pared bacteriana.
- Ototoxicidad.
- Nefrotoxicidad.



	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6	R_7	R_8	R_9
Gentamicina A	H	OH	OH	OH	NH ₂	H	OH	OH	H
Gentamicina B	H	NH ₂	H	OH	OH	OH	OH	CH ₃	H
Gentamicina C _{1a}	H	NH ₂	H	H	NH ₂	OH	CH ₃	H	H
Gentamicina C ₂	CH ₃	NH ₂	H	H	NH ₂	OH	CH ₃	H	H
Gentamicina C ₁	CH ₃	NH-CH ₃	H	H	NH ₂	OH	CH ₃	H	H
Sisomicina	Igual a gentamicina C _{1a} con doble enlace C=C entre los C 4'-5'								
Netilmicina	Igual a sisomicina excepto R ₈ CH ₂ -CH ₃								

Figura 5.- Estructura del grupo de la gentamicina.

2.3.- ESPECTRO DE ACTIVIDAD (35,50,59).-

Los antibióticos aminoglicósidos son de amplio espectro, eficaces frente a la mayoría de los gérmenes aerobios. La actividad frente a gérmenes gram positivos está limitada excepto en el caso de los estafilococos y los bacilos gram positivos como *Listeria monocytogenes*.

Los bacilos gram negativos aerobios, incluyendo *Enterobacterias*, *Pseudomonas* y otros bacilos gram negativos no fermentadores suelen ser sensibles a la acción de los aminoglicósidos de uso clínico como la gentamicina, tobramicina, amikacina y netilmicina.

La estreptomomicina, kanamicina y amikacina son activos frente a bacilos ácido alcohol resistentes como *Mycobacterium tuberculosis*. La amikacina también es eficaz en el tratamiento de infecciones por *Micobacterias*.

La estreptomomicina muestra una acción importante frente a distintas especies de *Pasteurella*, *Brucella*, algunas cepas de *Nocardia sp.* y *Listeria*.

La paromomicina presenta actividad antiparasitaria frente a *Entamoeba histolytica*, *Taenia saginata* e *Hymenolepis nana*.

La espectinomomicina es particularmente activa *in vitro* frente a las *Neisserias* patógenas, fundamentalmente el gonococo.

2.4.- MECANISMO DE ACCION .-

Es importante conocer el modo de acción de los aminoglicósidos para comprender el mecanismo de resistencia. El punto de acción de estos antibióticos es el ribosoma, por lo que es necesario que el antimicrobiano se adhiera a la superficie externa de la bacteria, atraviese la pared y la membrana citoplasmática, llegue al interior de la célula y por último alcance las subunidades ribosómicas.

2.4.1.- Penetración en la célula microbiana.-

La penetración en la célula pasa por tres etapas (15,56,173):

1ª ETAPA (EPI).- En esta etapa inicial el antibiótico atraviesa la pared celular y las capas extracelulares. Los aminoglicósidos son policationes con cargas positivas (de tres a seis cargas) a pH neutro. Se fijan a diferentes puntos aniónicos de la superficie celular. Esta fase es muy rápida y no consume energía. Los sitios de unión son principalmente lipopolisacáridos y cabezas polares de los fosfolípidos. En bacterias gram negativas posiblemente sean también proteínas de la membrana externa, mientras que en gram positivas sean ácido teicóico y fosfolípidos.

El mecanismo más importante por el cual los aminoglicósidos alcanzan el periplasma y posteriormente el citoplasma en bacterias gram negativas es el transporte por difusión hidrofílica a través de poros formados por porinas en la membrana externa de la célula (134). El aminoglicósido difunde a través de estos poros rápidamente, a pesar de que el peso molecular es bastante considerable. No obstante la alta carga catiónica y el carácter hidrofílico de los antibióticos, permite que el poro se agrande y facilite el paso de los

mismos. Esto implica que éste no sea un paso en el que la velocidad de difusión esté limitada. Sin embargo, la susceptibilidad *in vitro* a los aminoglicósidos en cepas mutantes productoras de sólo un 3-4% de porinas no difería de las cepas no mutantes. Parece ser que el antibiótico difunde sin problemas a través de los poros (134).

En bacterias gram positivas la difusión se realiza a través de los intersticios llenos de agua que forman la capa de peptidoglicano.

En *Pseudomonas aeruginosa*, se ha descrito otro mecanismo de entrada. Los lipopolisacáridos de *P. aeruginosa* son bastante ricos en residuos de fosfatos que se encuentran estabilizados por iones Mg^{2+} . Los aminoglicósidos pueden desplazar estos iones uniéndose a los residuos de fosfatos y desorganizando la membrana externa. Esta desorganización permitirá la entrada directa del antibiótico u otras moléculas, tales como lisozima, a las capas más profundas de la pared celular y la membrana citoplasmática. Este mecanismo se denomina autopromotor ó "self-promoted" (66).

Debido al gran tamaño de los aminoglicósidos (aproximadamente $1,8 \times 1 \times 1$ nm) en comparación con el tamaño de los canales de porina ompF (aproximadamente 1,16 nm), cabría pensar que los antibióticos atravesarían lentamente estos canales. No obstante los canales ompF son de tres a seis veces más selectivos para el catión K^+ que para el Cl^- . Esta selectividad y el flujo resultante de iones a través del canal está fuertemente influenciado por el tamaño del catión, por lo que algunos autores proponen que el mecanismo de autopromotor es el más importante en la entrada de los aminoglicósidos a través de la membrana externa en cepas de *Escherichia coli* (81). Para estos autores, el paso a través de la membrana externa tiene una velocidad limitante para la acción bactericida del aminoglicósido puesto que se produce un aumento en los valores de CMI en aquellas cepas

que presentan mutación en los residuos fosfatos de los lipopolisacáridos. Los iones Mg^{2+} aumentan los niveles de CMI y bloquean el mecanismo de autopromotor, tal como ocurre en *Pseudomonas aeruginosa* (82). Además se ha comprobado que estas porinas contienen dentro de sus canales un sitio de fijación con una K_d de 10 a 18 μM para los policationes (81).

Otras estructuras celulares, tales como la cápsula ó glicocálix pueden tener algún efecto menor en la entrada del aminoglicósido. La mayoría de estas estructuras son polisacáridos aniónicos que actúan uniéndose al aminoglicósido. La importancia de esta unión dependerá de las condiciones de pH y fuerza iónica bajo las cuales se encuentran el antibiótico y el polisacárido. Bajo condiciones fisiológicas parece probable que estas uniones produzcan un retraso sin importancia en la difusión del antibiótico.

2ª ETAPA (EDP-I).- Esta segunda etapa tiene lugar cuando el aminoglicósido atraviesa la membrana citoplasmática, determinante esencial en la acción del antibiótico. Parece que ocurre del mismo modo en bacterias gram negativas, positivas y probablemente en *Mycoplasma* (15).

Los aminoglicósidos policatiónicos conservando su carga positiva, se unen a un transportador aniónico no saturable y son empujados a través de la membrana citoplasmática por la diferencia de potencial creada por las cargas negativas, al interior de la célula. Este proceso es dependiente de energía (15,125). Es probable que se necesite un nivel umbral mínimo de diferencia de potencial para que se lleve a cabo el transporte; el mínimo de diferencia de potencial puede depender de la concentración del antibiótico (17). También depende de ello la duración de la fase. Existe una relación directa entre la magnitud de la diferencia de potencial y la velocidad de entrada y acción bactericida de los antibióticos

(56). Las células permanecen viables durante esta fase y la síntesis de polipéptidos continúa.

La naturaleza del transportador de membrana no se conoce bien. Muchos autores han propuestos quinonas respiratorias que participan en la cadena transportadora de electrones (15,17,19), citocromos (18), nitrato reductasa (16,18), ya que mutaciones en algunos de estos sistemas afectan al transporte. No obstante para otros autores la entrada del antibiótico se debe únicamente a la diferencia de potencial creada a través de la membrana (36).

3ª ETAPA (EDP-II).- Al igual que la etapa anterior, es dependiente de energía. Esta etapa se inicia cuando la cantidad de antibiótico presente en el citoplasma es suficiente para unirse a todas las partículas ribosomales. Cesa la síntesis proteica y comienza la letalidad de las bacterias.

Los aminoglicósidos se transfieren desde el transportador citoplasmático a sitios específicos del ribosoma. Su inicio requiere ribosomas susceptibles que estén interviniendo en la síntesis proteica (56). Una vez que los antibióticos interaccionan con los ribosomas, se produce una disgregación de los polisomas y la acumulación de complejos de iniciación aberrantes de ARNm y ribosomas 70S que conducen a la inhibición de la síntesis proteica.

Desde que se produce la inhibición de la síntesis de proteínas, aumenta la velocidad de acumulación de los aminoglicósidos. Esto no es debido a un aumento de la diferencia de potencial celular, sino parece ser que se debe a la unión de los aminoglicósidos con los ribosomas 70S procedentes de la degradación de los polisomas. Esto hace que se cree un gradiente de antibiótico entre el exterior y el interior de la célula (17). Otra causa

de este aumento de velocidad puede ser una alteración de la permeabilidad de la membrana (56).

2.4.2.- Acción de los aminoglicósidos sobre el ribosoma diana.-

Los aminoglicósidos actúan uniéndose al ribosoma bacteriano, modifican la transcripción de la información contenida en el ARNm con la incorporación de péptidos aberrantes no funcionales que originan la muerte bacteriana. Son por tanto antibióticos bactericidas.

Se ha comprobado que los grupos aminos juegan un papel primordial en la actividad antibacteriana (51,66). La unión del antibiótico al ribosoma se lleva a cabo por medio de estos aminogrupos (51).

En un principio, se pensaba que el sitio de unión de los antibióticos era la subunidad 30S (148,149), no obstante se ha visto que los aminoglicósidos se pueden unir tanto a la subunidad 30S como a la 50S por medio de las proteínas (58) ó del ARNr (172). Esta unión produce una alteración del ribosoma que afecta al reconocimiento del aminoacil-ARNt, a la traslocación, a la liberación de los polipéptidos y causa errores en la lectura.

El mecanismo de acción más ampliamente estudiado es el de la estreptomicina. Este aminoglicósido se une a la subunidad 30S. Para que sea efectivo, el ribosoma debe estar en plena lectura del ARNm. Esta unión requiere la presencia de las proteínas S3, S5 y S12, mientras que las proteínas S9 y S14 (S10) estimulan la unión (58). La estreptomicina no impide la formación del complejo de iniciación (30S-ARNm-f-met-ARNt) pero provoca la liberación del f-met-ARNt. Promueve la unión arbitraria del

aminoacil-ARNt e inhibe la liberación del ARNt desacilado. La estreptomicina no sólo afecta a aspectos de las distintas fases de la síntesis protéica, sino que también causa falsas lecturas que traen consigo la producción de proteínas no funcionales, lo que ha sido achacado a una deformación del sitio aceptor de la propia subunidad 30S, con confusión de los tripletes leídos sobre el ARNm.

El resto de los aminoglicósidos actúan de forma similar, con puntos de unión diferentes, ó bien variando la fase de la síntesis protéica sobre la que actúan. Tenemos que la amikacina se fija a la subunidad 50S.

La alteración de la proteína L6 de la subunidad 50S causa resistencia a la gentamicina (1). La resistencia a la kanamicina está asociada con la metilación del ARNr 16S (172).

La espectinomicina se une a la proteína 4, y a diferencia de los aminoglicósidos propiamente dichos, no causa falsa lectura en la síntesis de los polinucleótidos de la bacteria, aunque interfiere, al igual que ellos, en la función de la subunidad 30S del ribosoma (35).

La resistencia a la neamina está relacionada con mutantes de las proteínas S17, S5 y S2 (58).

Algunos antibióticos como higromicina B además pueden actuar sobre ribosomas eucariotas e inhibir la síntesis de proteínas (58).

Sin embargo, muchos autores han demostrado que la acción bactericida de

los aminoglicósidos no sólo se explica con el efecto sobre los ribosomas y síntesis protéica. Así tenemos que se ha descrito en distintas ocasiones el efecto de los aminoglicósidos sobre las membranas celulares (40,208); se ha propuesto como explicación a este proceso el hecho que una falsa proteína se incorpore a la membrana provocando el escape de pequeñas moléculas, interfiriendo con la secreción de proteínas de la membrana ó bien dañando su integridad (40). Matsunaga y colaboradores (127), han demostrado que los aminoglicósidos pueden inhibir la iniciación de la replicación del ADN probablemente por la interrupción de la unión del ADN a la membrana.

Esta multiplicidad de efectos ó pleiotropismo (bloqueo de ribosomas, alteración en la traslocación, efecto sobre la membrana y entrada irreversible del antibiótico), hace que aún se desconozca cuál es el verdadero mecanismo de acción de los aminoglicósidos, aunque probablemente el resultado de estos fenómenos provoque el efecto bactericida.

2.5.- TOXICIDAD DE LOS AMINOGLICOSIDOS (35,50).-

Una característica común a todos los antibióticos aminoglicósidos es la toxicología específica y perfectamente delimitada. Destacan tres síntomas con claridad: los producidos en el oído interno, en el riñón y en la placa neuromuscular. El mecanismo por el cual se producen estos efectos tóxicos no se conoce bien. Se han barajado causas como la interacción del antibiótico con los fosfolípidos, ATPasa, fosfolipasa lisosomal (24), con el metabolismo oxidativo de los neutrófilos (167), etc.

En la nefrotoxicidad, la explicación del daño debe buscarse en las elevadas concentraciones alcanzadas por estos antibióticos, tanto en la orina como en la corteza renal.

La nefrotoxicidad va a depender de la velocidad y cantidad con que se realicen los procesos de absorción, distribución y eliminación. Por lo tanto dependerá de la situación fisiopatológica del paciente en lo referente al volumen de agua corporal y capacidad de funcionamiento renal. La velocidad de eliminación y el comportamiento distributivo de los fármacos están alterados en los neonatos, por lo que hay que tener en cuenta estos factores a la hora de establecer pautas de dosificación (53).

El aminoglicósido tras ser filtrado por el glomérulo es captado por las células del epitelio tubular renal. Esta captación consiste en la unión por fuerzas electrostáticas al fosfatidilinositol de la membrana. La nefrotoxicidad inicial es tubular, aunque pueden darse casos de glomerulosis secundarias (59). Más llamativa es la alteración debida a la acumulación de cuerpos mieloides en los lisosomas de las células del túbulo proximal (24).

La ototoxicidad se manifiesta tanto en la porción coclear como en la vestibular. Los ataques a la rama coclear suelen ser leves, pasando inadvertidos en los tonos normales de conversación; afecta a las frecuencias más altas, pero si continúa el tratamiento resultan afectados los tonos de baja frecuencia, llegando a sordera completa. La afectación de la rama vestibular puede ser irreversible aunque interrumpiendo el tratamiento se puede conseguir una recuperación al cabo de dos meses.

El bloqueo neuromuscular es menos frecuente que los cuadros anteriores y reviste menor gravedad. Se ha presentado en pacientes con insuficiencia renal previa ó afectos de miastenia gravis, en hipoxia ó en los que se empleen sedantes, anestésicos ó curarizantes. Se manifiesta con una parálisis respiratoria.

CAPITULO III.-

MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS AMINOGLICOSIDOS.-

Se han identificado al menos, tres tipos de mecanismos de resistencia: resistencia ribosómica, alteración en el sistema de transporte y modificación enzimática del antibiótico.

3.1.- RESISTENCIA RIBOSOMICA.-

Las proteínas de las subunidades que se combinan con los aminoglicósidos, están codificadas por un gen del cromosoma bacteriano. Una mutación de este gen puede originar un defecto en la afinidad del ribosoma por el antibiótico, y por tanto la ineficacia de éste último.

Se han aislado a partir de especímenes clínicos distintos tipos de mutantes resistentes a diferentes aminoglicósidos.

Las cepas con altos niveles de resistencia a estreptomicina poseen mutaciones a nivel del gen *rpsL*. Estas mutaciones se producen por alteraciones de las proteínas S12, S3 y S5 (15,58). La resistencia ribosómica a la estreptomicina se ha encontrado en distintos aislados, así tenemos *Neisseria gonorrhoeae*, *Enterococcus*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* (56,122).

Alteraciones en la proteína S5 provocan aumento en los niveles de resistencia a la espectinomicina (15). Mutaciones en los genes que codifican las proteínas S5 y S12, y

modificaciones en la S17, causan resistencia a la neamina (15,58).

Se ha descrito resistencia a gentamicina debida a una mutación de la proteína L6 transformada (1).

La resistencia a kanamicina está relacionada con la metilación del ARNr 16S en *Streptomyces tenebrarius* (172); también se ha visto resistencia a nebramicina e istamicina (15). No se han obtenido mutantes resistentes a los antibióticos que contienen desoxiestreptamina; parece ser que estos derivados poseen numerosos lugares de fijación en los ribosomas, por lo que si se produce la mutación en una sola proteína no se traduce en resistencia, excepto si una segunda modificación reduce significativamente los mecanismos de transporte (15,56,66).

La resistencia ribosómica sólo tiene importancia clínica como mecanismo de resistencia para aminoglicósidos tales como estreptomina y quizás espectinomicina. Se han descrito aislados de *Neisseria gonorrhoeae* resistentes a espectinomicina a nivel del ribosoma (15).

Para reconocer este mecanismo de resistencia, se procede a estudiar *in vitro*, la síntesis de proteínas ribosómicas. Para ello se ponen en presencia del extracto celular de una cepa sensible a estreptomina, ribosomas, ARNm y aminoácidos marcados con ^{14}C y se mide inmediatamente la incorporación de radioactividad en la porción de material soluble en el ácido tricloroacético, es decir las proteínas. Al añadirle estreptomina se inhibe la incorporación de material marcado en las cepas sensibles, mientras que en las cepas resistentes no hay variaciones.

Las alteraciones ribosómicas son sucesos mutacionales que ocurren raramente por lo que tienen poca importancia desde el punto de vista clínico. No obstante se ha visto que organismos productores de aminoglicósidos presentan como mecanismo de defensa ribosomas resistentes, por lo que hay que considerar la importancia de este mecanismo de resistencia (172).

3.2.- RESISTENCIA POR ALTERACION EN EL TRANSPORTE.-

Este mecanismo provee de un bajo nivel de resistencia cruzada entre la mayoría de los aminoglicósidos. Generalmente los distintos autores se refieren a él como impermeabilidad consecuencia de mutaciones que afectan a la generación de energía en la membrana celular.

La difusión pasiva a través de la membrana interna requiere aporte de energía en sus dos últimas fases (EDP-I y EDP-II). Esta energía es proporcionada por el sistema respiratorio aerobio (fosforilación oxidativa). Cualquier alteración que afecte a la producción de esta energía podrá causar resistencia a los aminoglicósidos.

Se han encontrado mutantes resistentes que presentan deficiencias en el sistema de transporte de energía; por ejemplo: en el citocromo d (16), citocromo c552 (16), nitrato-reductasa (18), quinonas (17,19), etc.

Así mismo, condiciones anaeróbicas (125) que disminuyen la diferencia de potencial a través de la membrana ó el pH ácido y cambios en la osmolaridad (36) hacen que se produzca una disminución en la eficacia de los aminoglicósidos. La glucosa como fuente de carbono disminuye la diferencia de potencial y aumenta la resistencia al disminuir los

niveles de AMP cíclico (15).

Ciertos gérmenes tales como *Pseudomonas* y *Staphylococcus*, presentan una membrana impermeable por la existencia de cationes divalentes (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+}) que parecen disminuir la sensibilidad a estos antibióticos.

De este modo se explica que los gérmenes anaerobios facultativos, como los estreptococos, con una cadena incompleta de transportadores de electrones, sean resistentes de forma natural a los aminoglicósidos (66).

Se ha informado de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a determinados aminoglicósidos codificados por plásmidos conjugativos, pero que no estaban asociados a enzimas modificadores de aminoglicósidos, ni ribosomas resistentes a estos antibióticos (15,37). El mecanismo de resistencia parece que es debido a una carencia de acumulación del antibiótico, pero las bases aún se desconocen (15).

Para demostrar una resistencia de este tipo, hace falta incubar los microorganismos con el antibiótico marcado. A intervalos regulares de tiempo, se hace pasar el medio de cultivo por filtros que retienen las bacterias y se mide la radioactividad en dichos filtros; ésta reflejará la cantidad de aminoglicósido que ha entrado en las células.

Se ha detectado en bacterias gram negativas y gram positivas la selección de colonias resistentes a aminoglicósidos usando bajos niveles de antibiótico. En algunos casos esta resistencia es estable y en otros es inestable y revierte rápidamente (15).

Daikos y colaboradores (34) han caracterizado este tipo de resistencia que

viene dado por una regulación en la entrada del antibiótico en la fase dependiente de energía (EDP-II). El motivo por el cual se produce esta regulación en la entrada del antibiótico no se conoce bien, pero podría estar ocasionada por la existencia de lipopolisacáridos anormales, depleción de una proteína transportadora ó colapso en el potencial eléctrico (88).

3.3.- RESISTENCIA POR MODIFICACION ENZIMATICA DEL AMINOGLICOSIDO.-

Desde el punto de vista clínico, las resistencias causadas por las enzimas modificadoras de aminoglicósidos son las que revisten mayor interés. El antibiótico modificado no se une a los ribosomas y de este modo no se inhibe la síntesis de proteínas (56). Así mismo se observa una reducción en el transporte de los aminoglicósidos al interior de la célula (17). La síntesis de estas enzimas parece ser constitutiva por lo que en principio es independiente de la presencia del antibiótico.

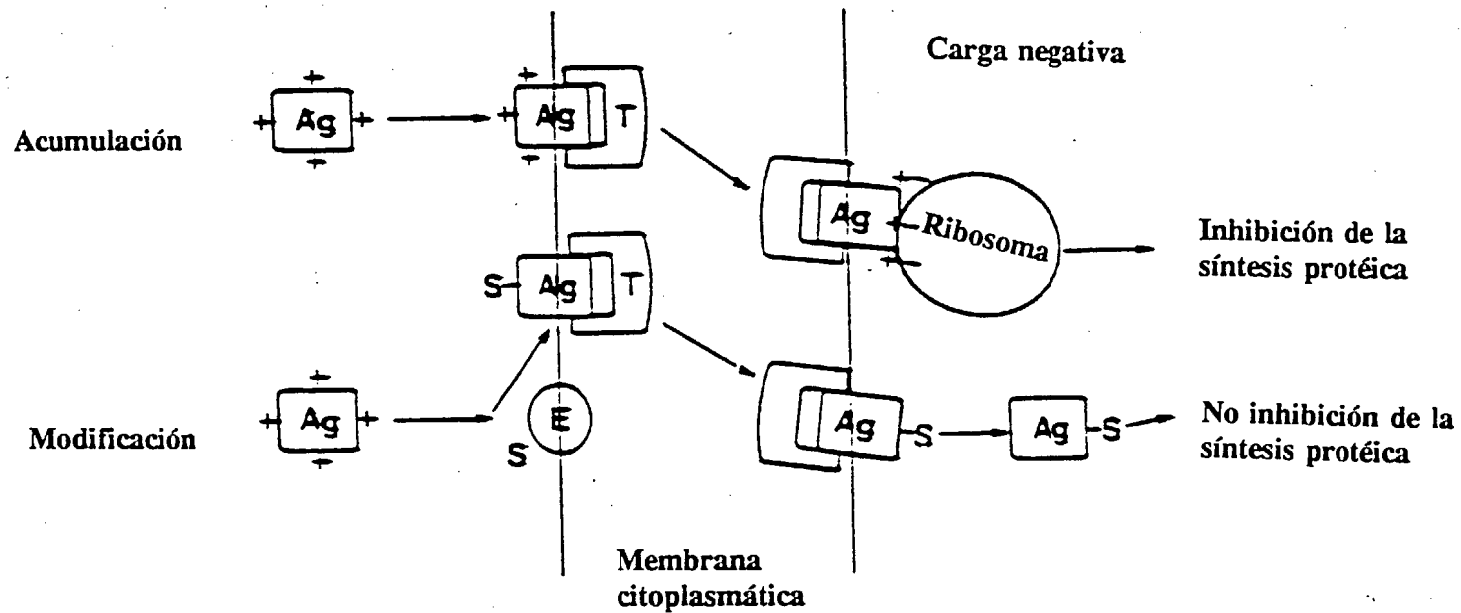
El mecanismo por el cual la modificación enzimática causa resistencia a los aminoglicósidos no se conoce con exactitud. Algunos autores (39) proponían que los aminoglicósidos modificados bloqueaban la entrada del resto de los antibióticos al interior de la célula. Pero posteriormente se vió que la modificación no era efectiva en la inhibición de la síntesis de proteínas al no unirse al ribosoma y además estas enzimas modificadoras de aminoglicósidos no parecían impedir la entrada de los antibióticos en la 2ª etapa (EDP-I), por lo que se propuso que el mecanismo era una inactivación (169).

No obstante la resistencia no se debe únicamente a una inactivación del antibiótico, a pesar de que exista una correlación entre la resistencia a un antimicrobiano dado y la presencia de enzimas modificadoras. Algunos autores han llegado a esta conclusión

observando que sólo una pequeña proporción de antibiótico es modificado en el medio extracelular por bacterias productoras de enzimas modificadoras de aminoglicósidos; la modificación ocurre en el interior, lo que excluye la detoxificación del medio como mecanismo de resistencia (56). Además se ha demostrado que algunas enzimas modificadoras se encuentran en la cara interna ó en la cara externa de la membrana citoplasmática.

Otros autores han correlacionado la presencia de enzimas modificadoras con una disminución del transporte de los aminoglicósidos (17). Las bacterias resistentes a los aminoglicósidos por este mecanismo muestran sólo las etapas 1ª (EPI) y 2ª (EDP-I) de transporte del antibiótico. La 3ª etapa (EDP-II) es la que disminuye (17). El antibiótico que logra penetrar en el citoplasma durante la 2ª fase es inactivado por lo que la 3ª fase no se produce. De este modo, la resistencia vendrá determinada por la competencia entre la velocidad de entrada (EDP-I) y la modificación del antibiótico. El factor más determinante en este proceso es la afinidad de la enzima por el sustrato, de manera que si tiene gran afinidad la modificación del antibiótico comienza a bajas concentraciones del mismo y podrá superar la velocidad de entrada por lo que la bacteria sería resistente al no inhibir la síntesis protéica. Por el contrario, si la enzima tiene poca afinidad, la cantidad de antibiótico que entra superará a la velocidad de modificación, la cantidad de antibiótico sin modificar será suficiente para entrar en el citoplasma, unirse a los ribosomas y ejercer su efecto bactericida. Esto explicaría que algunas cepas que son fenotípicamente sensibles a determinados aminoglicósidos, sean a la vez productoras de enzimas modificadoras (15,56,148,204). (Figura 6).

Se han detectado mutantes con un incremento en la actividad enzimática producida por un aumento del número de copias del plásmido que codifica dicha enzima (11). Estos mutantes se muestran resistentes a aminoglicósidos a los que la cepa original era



Ag: aminoglicósido; S-Ag: aminoglicósido modificado; E: enzima modificadora; T: transportador.

Figura 6.- Resistencia a aminoglicósidos mediada por la competitividad entre la modificación enzimática y la acumulación del antibiótico.-

sensible. También se han detectado mutantes con altos niveles enzimáticos codificados genéticamente por cromosomas (174).

El uso de inhibidores competitivos de la actividad enzimática tales como la 7-hidroxitropolona, inhibidor de la ANT(2"), puede inhibir la inactivación causando disminución en los niveles de resistencia, haciendo que la bacteria se transforme en sensible. No obstante más adelante hablaremos de los distintos inhibidores estudiados.

La localización de las enzimas modificadoras de aminoglicósidos es un poco confusa. Inicialmente, se sugirió que estaban localizadas en el espacio periplásmico de las bacterias gram negativas porque se liberaban grandes cantidades tras choques osmóticos. No obstante es difícil imaginar cómo enzimas que requieren cofactores altamente energéticos como ATP ó Acetil-Coenzima A puedan ser activas en el periplasma. Experimentos posteriores con APH(3') en *Escherichia coli* realizados por Perlin y colaboradores (145), mostraban que las enzimas estaban localizadas en el citoplasma. Estos autores concluyeron que las enzimas se encontraban en la cara interna de la membrana citoplasmática, pero formando parte de una proteína de membrana, puesto que fracciones purificadas de la membrana de cepas resistentes mostraban actividad.

Este mecanismo de resistencia es muy eficaz para la bacteria productora de dichas enzimas, pues sólo necesita inactivar el antibiótico que penetra en la célula, no el presente en el medio. Por ésto, el crecimiento de las cepas resistentes a los aminoglicósidos presentan poco ó ningún efecto inóculo (37).

Las enzimas modificadoras de aminoglicósidos se encuentran generalmente codificadas por genes de naturaleza plasmídica ó por transposones, lo que al contrario de los

otros mecanismos de resistencia puede originar una transmisión epidémica. También se han localizado estos genes en el cromosoma bacteriano.

3.4.- INHIBIDORES Y NUEVOS ANTIBIOTICOS AMINOGLICOSIDOS.-

Uno de los modos de eludir la resistencia enzimática a los aminoglicósidos ha sido la modificación estructural de los antibióticos, dando lugar a derivados que ya no eran sustratos de las enzimas. La deoxigenación, acetilación ó alquilación de grupos sujetos al ataque enzimático (ó de grupos capaces de prevenir o reducir el ataque enzimático) ha supuesto la aparición de agentes efectivos con una sensibilidad reducida a las enzimas modificadoras.

Así surgieron amikacina (1-N-aminohidroxitiril-kanamicina A); netilmicina (1-N-etil-sisomicina); habekacina (1-N-aminohidroxitiril-dibekacina) e isepamicina (1-N-aminohidroxipropionil-gentamicina B). Estos derivados semisintéticos adquirieron el carácter de no modificables al quedar protegidos determinados radicales diana.

No obstante, en algunos casos mientras aumenta la resistencia a las enzimas modificadoras se produce una disminución en la actividad intrínseca del agente.

También se ha utilizado eliminar algunos radicales y proteger otros, como el BB-K311, que es el 4'-deoxi-6'-N-metilamikacina, que logra la estabilidad frente a enzimas ANT(4')(4") y AAC(6'), que inactivan la AN (66).

Otra alternativa para superar la inactivación enzimática es la inhibición de las enzimas. La aportación más destacada ha sido la de Allen y col. (66), que demostraron

la propiedad de la 7-hidroxitropolona (7-HT) de inhibir la nucleotidasa ANT(2"). La 7-HT es un producto natural elaborado por *Streptomyces neyagawaensis* que potencia la actividad de antibióticos aminoglicósidos frente a cepas bacterianas resistentes por un mecanismo de 2"-O-nucleotidilación. La inhibición se produce por la competencia de la 7-HT con el ATP por la enzima, aunque sería preferible que compitiera con el aminoglicósido. De este modo sería un mejor potenciador ya que la K_M para el antibiótico aumenta, retrasando su inactivación. A pesar de esto, la combinación de TM y 7-HT ha sido eficaz en el tratamiento de infecciones experimentales en ratón causadas por una cepa de *Klebsiella pneumoniae* productora de ANT(2"). Además la 7-HT facilita la penetración de TM, que al no estar modificada interacciona con el ribosoma e incrementa la captación por la bacteria de nuevas moléculas de antibióticos. Por el contrario, la ausencia de 7-HT condiciona que sólo llegue a los ribosomas adenilato de TM porque la captación del antibiótico es pobre.

La 7-HT compete con el ATP, pero no es eficaz frente a las fosfotransferasas, que utilizan el ATP como donador de fosfato.

Se han propuesto otros compuestos como inhibidores, pero no se han usado hasta ahora; por ejemplo, 3"-N-metil derivados como inhibidores de la AAD(3"); compuestos 3'-deoxiderivados, inhibidores de APH(3') y 6-hidroxiderivados, inhibidores de la AAC(6') (15).

La amplia variedad de enzimas exigiría inhibidores de amplio espectro, lo que no se ha logrado ni parece factible.

CAPITULO IV.-

ENZIMAS MODIFICADORAS DE AMINOGLICOSIDOS.-

4.1.- INTRODUCCION.-

Las enzimas modificadoras constituyen el mecanismo más frecuente de resistencia a los antibióticos aminoglicósidos.

Como hemos visto en el capítulo anterior, la presencia de una enzima modificadora no implica necesariamente la elevación de la concentración mínima inhibitoria y la consiguiente resistencia, ya que va a depender del balance entre la tasa de inactivación enzimática por un lado y la tasa de transporte por otro.

Los mecanismos bioquímicos de modificación enzimática de los aminoglicósidos son de tres tipos: N-acetilación, O-nucleotidilación y O-fosforilación. Para cada una de estas reacciones existen distintos grupos de enzimas que atacan grupos aminos ó hidroxilos específicos.

Las enzimas que acetilan se denominan acetilasas o acetiltransferasas siendo sus siglas AAC; las que nucleotidilan se llaman nucleotidiltransferasas ó nucleotidasas ó adenilasas, sus siglas son ANT ó AAD. Por último, las que fosforilan, reciben el nombre de fosforilasas ó fosfotransferasas, siendo sus siglas APH.

El sitio de modificación se indica por un número colocado entre paréntesis

después de las siglas de la enzima. En general las posiciones del 1 al 6 corresponden al anillo aminociclitol. Las del aminoazúcar en la posición 4 del aminociclitol, vienen dado por números del 1' al 6'; las del aminoazúcar en posición 5 ó 6 del aminociclitol, del 1" al 6".

En algunos casos nos podemos encontrar a continuación de las siglas de la enzima números romanos, por ejemplo APH(3')-I, que fosforila a la lividomicina pero no a la butirosina; así como la APH(3')-II que fosforila a la butirosina pero no a la lividomicina. Se tratan de formas moleculares de la misma enzima denominadas aloenzimas ó isoenzimas que difieren en sus características físico-químicas y en su especificidad de sustrato, aunque la reacción que catalizan es idéntica. Algunos de estas isoenzimas están muy relacionadas, debido a que los cambios genéticos que las distinguen son mínimos, como el de un par de bases suficientes para alterar las propiedades de las mismas.

Algunas enzimas pueden modificar dos posiciones distintas. Por ejemplo, la ANT(4')(4"), que modifica a la dibekacina en posición 4" si su configuración es ecuatorial, ya que este antibiótico no posee grupo OH en 4', sino en 4".

4.2.- ORIGEN Y EVOLUCION DE LAS ENZIMAS MODIFICADORAS DE AMINOGLICOSIDOS.-

Poco se conoce sobre el origen de las enzimas modificadoras de aminoglicósidos y la relación existente entre ellas.

Los eficientes mecanismos de resistencia a aminoglicósidos que presentan las distintas especies bacterianas y sobretodo el producido por la modificación enzimática, han planteado el por qué de su origen.

Lo más probable es que los determinantes de resistencia ya existieran, pero la misma función tenía otra aplicación distinta, y al cambiar de microorganismo huésped pasara por ejemplo, de la biosíntesis de antibióticos a causar resistencia a los mismos. Esta hipótesis nos lleva a considerar a los microorganismos productores de aminoglicósidos y los determinantes plasmídicos de resistencia como fuentes potenciales para las bacterias patógenas. Es evidente que los microorganismos deben poseer mecanismos protectores frente a los propios antibióticos que elaboran para así evitar el suicidio.

En los organismos productores de aminoglicósidos se encuentran mecanismos de resistencia de las cepas clínicas y viceversa, aunque existen excepciones (tabla 7). Un ejemplo de estas excepciones son las nucleotidasas, que se han encontrado en aislados clínicos gram positivos y gram negativos y nunca se han detectado en microorganismos productores de aminoglicósidos. Es importante señalar que la nucleotidilación, es una modificación de elevado gasto energético, consumiéndose ATP. La procedencia real de las nucleotidasas podría ser fosfotransferasas mutadas ó bien antiguos restos de una forma reversible de activación ó inactivación de una molécula glicosídica de función desconocida (66).

El papel que desempeñan las enzimas modificadoras en estreptomicetos productores de aminoglicósidos, como hemos dicho, puede ser de tipo protector, modificando su propio ARN ribosomal ó las moléculas de antibióticos que sintetizan. Es más útil la modificación que la inactivación, ya que el antibiótico conserva capacidad para destruir otros microorganismos. De hecho, los genes que codifican las enzimas modificadoras son parte integrante de los racimos de genes biosintéticos. Posiblemente las AACs y APHs actúan regulando las rutas biosintéticas. Ha sido una prueba inequívoca que la clonación de genes de resistencia en organismos productores de aminoglicósidos mejorase

Tabla 7.- Microorganismos productores de aminoglicósidos y mecanismos de resistencia frente al antibiótico sintetizado.-

ORGANISMO	ANTIBIOTICO	MECANISMO
<i>Streptomyces fradiae</i>	Neomicina B	Fosforilación (APH) Acetilación (AAC)
<i>Micromonospora purpurea</i>	Gentamicinas	Modificación 16S RNA
<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	Kanamicina A	Acetilación (AAC) Alteración ribosomal
<i>Streptomyces griseus</i>	Estreptomicina	Fosforilación (APH)
<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Higromicina B	Fosforilación (APH)
<i>Bacillus circulans</i>	Butirosina	Fosforilación (APH)

el rendimiento en la obtención de antibióticos (66).

Las fosfotransferasas APH(3') se han elegido habitualmente como modelo para estudiar la evolución y la transferencia genética de la resistencia a los aminoglicósidos en condiciones naturales (190). Comparando la secuencia de aminoácidos de las enzimas APH(3')-I del transposón Tn903 y APH(3')-II del Tn5, detectadas en gérmenes gram negativos con la APH(3')-III de *Staphylococcus* y *Streptococcus*; con la APH(3')-IV de *Bacillus circulans* (productor de la butirosina) y con la APH(3')-V de *Streptomyces fradiae* (productor de neomicina), observamos que han derivado de un antecesor común (190).

No obstante, la secuencia de aminoácidos del gen *aphA-7* que codifica la APH(3')-VII aislada en *Campylobacter jejuni* sugiere que los *Campylobacter* poseen determinantes de resistencia endémicos, los cuales han derivado previamente de otras APH(3')s. Es posible que estos genes evolucionaran a partir de genes de otras enzimas celulares en vez de ser adquiridos de fuentes exógenas, tal como podría ser un microorganismo productor de antibiótico (179).

Sin embargo, el gen que codifica la APH(3')-III en *Campylobacter* es idéntico al de *Streptococcus*, constituyendo una evidencia de transferencia de ADN entre gram positivos y gram negativos.

Los microorganismos productores de antibióticos constituyen una fuente característica de plásmidos de resistencia; queda por dilucidar cómo se han formado. Los mecanismos de transposición ofrecen la explicación más coherente, a lo que contribuye también la gran variedad de transferencia genética intergenérica e interespecífica. El flujo genético parece iniciarse en los estreptomicetos productores de antibióticos, propagándose

luego a otros gérmenes gram positivos y gram negativos. Apoya esta hipótesis el hallazgo de genes idénticos en gram positivos (estafilococos y estreptococos) y gram negativos (*Campylobacter spp.*) (8,187,190).

Recientemente se ha descrito la aparición de la ANT(4') en cepas de *Enterobacterias* y *Enterococcus* (23,90,100), siendo esta enzima típica de *Staphylococcus*. Este hecho refuerza la hipótesis de que bajo condiciones naturales los marcadores genéticos de bacterias gram positivas se pueden transferir a *Enterobacterias*.

4.3.- FOSFOTRANSFERASAS.-

Estas enzimas catalizan la transferencia de un grupo fosforilo a un hidroxilo diana. Puede utilizar como cofactores los nucleótidos trifosfato de adenosina (ATP), de citosina (CTP), guanosina (GTP) ó uridina (UTP), ya que las enzimas APH, en realidad son fosfoquinasas, toman un fosforilo y lo transfieren al aminoglicósido. Las fosforilasas pueden modificar las posiciones 3', 2", 3", 5", 6 y 4.

4.3.1.- APH(3').-

Catalizan la transferencia de un grupo fosforilo a un grupo hidroxilo (OH) en posición 3' de la aminohexosa de la kanamicina y aminoglicósidos relacionados estructuralmente y al hidroxilo en posición 5" de la lividomicina. Distinguimos siete tipos de APH(3') según su especificidad de sustrato y su secuencia genética.

APH(3')-I: Umezawa y col. (201) determinaron esta enzima por primera vez en *E. coli* que portaba un plásmido de resistencia de *Shigella sonnei*. Las cepas

productoras de esta enzima se mostraban resistentes a KM, NEO, PM, RM y LM. Fosforila el hidroxilo en posición 3' de la KM, NEO, PM y RM y en 5" el OH de la LM. No fosforila el OH en 3' de la BT ni de la ISE (69).

La APH(3')-I se ha encontrado en diferentes microorganismos, así tenemos *Enterobacterias* (15,87,137,201); en *Pseudomonas aeruginosa* (15,126); *Campylobacter* (139); *Haemophilus* (163) y *Acinetobacter* (43), no encontrándose en gérmenes gram positivos (59).

Matsunami y col. (126), encontraron en enzimas de diferentes fuentes algunas discrepancias en cuanto al peso molecular, pH óptimo y afinidades por el ATP, KM y LM. Determinaron el peso molecular de la APH(3')-I en *E.coli* y encontraron un valor de 54 Md, y en dos cepas de *P. aeruginosa* que eran de 27 y 62 Md.

Philips y col. (148) aislaron de *Haemophilus parainfluenzae* una variante de APH(3')-I a la que denominaron APH(3')-Ib, puesto que la KM era un sustrato más débil.

El gen que codifica esta enzima se encuentra en plásmidos y transposones, hasta siete diferentes Tn6, Tn602, Tn903, Tn1521, Tn1699, Tn2350 y Tn1525 (43,188,189,212). Así mismo se ha demostrado que existe una diversidad de genes que codifican esta enzima (212).

APH(3')-II: Yagisawa y col. y Brzezinska y col. (200) independientemente, describieron una fosforilasa a la que denominaron APH(3')-II (51). Esta enzima fosforila el OH en posición 3' de la KM, RM, PM, NEO y BT, pero no modifica el OH en 5" de la LM, ni tampoco a la ISE (69).

Los microorganismos que presentan esta enzima son resistentes a KM, PM, RM, NEO y BT, y sensibles a la LM.

La APH(3')-II se ha encontrado en *P.aeruginosa* (65,126,138), en *Enterobacterias* (51,65,146), *Acinetobacter* (131) y en *Bacillus circulans* (microorganismo productor de la butirosina) (22).

Kayser y col. (96) detectaron una fosforilasa APH(3') en una cepa de *Staphylococcus epidermidis* y en una cepa de *Staphylococcus aureus* que modificaba a NEO B y C, PM, GM A, KM A, B y C y BT. Pensaron que se trataba de una APH(3')-II, pero abandonaron esta idea al ver que la AN era débilmente fosforilada en estas cepas. Dedujeron que se trataba de otra isoenzima.

No obstante, se encontró una APH(3')-II que fosforilaba a la AN sin provocar resistencia (146). Bongaerts y col. (11), observaron que cepas mutantes resistentes a AN, mostraban una elevada actividad enzimática debido a un aumento del número de copias del plásmido que codificaba la enzima. Esto está en concordancia con lo observado por Martínez y col. (124) que argumentan la importancia que puede tener la dosis génica en la resistencia a antibióticos mediada por enzimas modificadoras.

El gen que codifica esta enzima se ha encontrado en plásmidos (11,146) y en transposones Tn5 (15,126).

El peso molecular de la enzima varía entre 25000 y 27000 daltons, y el pH óptimo se ha determinado en 8,4 (15,126). Los valores obtenidos de enzimas procedentes de *Enterobacterias* no difieren de las procedentes de *Pseudomonas*. Las APH(3')-II de

diferentes fuentes muestran propiedades similares (126,148).

Para diferenciar por el método radioenzimático la actividad APH(3')-I de la APH(3')-II nos basamos en la diferencia de incorporación del cofactor radioactivo en la BT ó en la LM. Cuando esta incorporación de radioactividad (cpm) en la LM es cinco veces mayor que en la BT se dice que se trata de una APH(3')-I. Si es al revés, la APH(3')-II es la causante de la modificación. Por medio de sondas genéticas se han comprobado los resultados obtenidos mediante este criterio y concuerdan (212). Cuando el nivel era similar, se pensaba que las dos enzimas estaban presentes, pero al comprobarlo mediante sondas genéticas sólo se consiguió la hibridación del ADN de la bacteria con la sonda de la APH(3')-I. Se planteó la posibilidad de que existiera más de un tipo génico que codificara a la APH(3')-II, pero parecía improbable, ya que sólo se había encontrado en un transposón Tn5. La resistencia a LM y BT es causada por la APH(3')-III que no se ha encontrado en *Enterobacterias*. Por otro lado, en *Enterobacterias* la presencia de la APH(3')-II se ha asociado con la resistencia a la bleomicina (Bleo) (67). El fenotipo Bleo^R puede facilitarnos la detección de la APH(3')-II en cepas resistentes a BT y LM.

APH(3')-III: Esta enzima se encontró por primera vez en una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* que fosforilaba a la KM, PM, BT, RM y LM, causando resistencia a los mismos antibióticos (202). Posteriormente se ha detectado este tipo de actividad en gram positivos, como *Staphylococcus* (49,174) y *Streptococcus* (26,29). No obstante esta enzima no es exclusiva de gérmenes gram positivos, encontrándose también en gram negativos como *Campylobacter* (177,190), donde se observó que los genes que codificaban la APH(3')-III eran idénticos en *Streptococcus* y en *Campylobacter coli*, sugiriéndose una transferencia *in vivo* de ADN entre las bacterias gram negativas y gram positivas (190). También se ha encontrado en *Branhamella catarrhalis* (160).

Courvalin y col. (31) encontraron que la APH(3')-III en *Staphylococcus aureus* modificaba también a la AN sin inactivar el antibiótico, por lo que la cepa permanecía sensible al mismo. Esto era debido a que la K_M para la AN tenía una magnitud mayor que la de la KM, a la que sí causaba resistencia. En otros casos (49), la fosforilación de la AN conlleva inactivación del mismo.

El gen *aphA-3* se ha encontrado en el cromosoma (26,49,174), en plásmidos (31,48,209), en cepas de *S. aureus* en plásmidos conjugativos (213) y en transposones, tanto de aislados de *Streptococcus pneumoniae* (Tn1545) (29), como en *S. aureus* (Tn3854) (197).

Se han realizado numerosos estudios para determinar el peso molecular, el punto isoeléctrico (pI) y el pH óptimo de esta enzima. Umezawa y col. (202) analizaron la enzima de *Pseudomonas aeruginosa* y encontraron que el pH óptimo variaba entre 5 y 8 dependiendo del sustrato, y el peso molecular era de 25000 daltons.

Courvalin y col. (30) determinaron el peso molecular de la APH(3')-III de una cepa de *S. aureus* mediante filtración y encontraron un valor de 22000 daltons y observaron que no difería mucho del encontrado previamente por Le Goffic y col. (30) en otra cepa de *S. aureus*, que era de 29000 daltons.

Collatz y col. (26,27) estudiaron la APH(3')-III de *Streptococcus* y observaron que no había dependencia del pH entre 5 y 9. El pI aparecía mostrando dos señales, una en 4,8 ($\pm 0,1$) y 5,1 ($\pm 0,2$). Para determinar el peso molecular de la enzima utilizaron distintos procedimientos y observaron que variaba en función del mismo. Utilizando filtración a través de Sephadex G.200 el peso molecular era de 22500 y si usaban Sephadex G.100 era de 32500.

Por otro lado, Ubukata y col. (192) realizaron un estudio exhaustivo para determinar el peso molecular y el pI de las enzimas APH(3')-III de *S.aureus* y *S.epidermidis*, encontrando un peso molecular de 31000 daltons y un pI de 4,1, valores que no difieren mucho de los hallados por Collatz y col. (26,27).

Trieu-Cuot y Courvalin (188) determinaron la secuencia génica de la APH(3')-III de *Streptococcus faecalis*. El producto correspondía a una proteína de peso molecular 29000 daltons. Compararon la secuencia de aminoácidos con los de las APH(3')-I y APH(3')-II obteniendo una relación estructural entre las enzimas estudiadas. El grado de homología nos indica que los genes que codifican la APH(3')-I y APH(3')-III derivan de una fuente común, mientras que los que codifican la APH(3')-II aparecieron posteriormente.

APH(3')-IV: Herbert y col. (187) aislaron una APH(3') de *Bacillus circulans* que fosforilaba a la KM y BT pero no a la LM. Cabría pensar que se trataba de la APH(3')-II, pero no es así, porque ésta, al igual que la APH(3')-I y APH(3')-III fosforilaba a la GM A+B sin causar resistencia y la fosforilasa producida por el *Bacillus circulans* no lo hacía. A esta fosforilasa se le llamó APH(3')-IV. Esta enzima sólo se ha aislado en gérmenes gram positivos. Se han encontrado en plásmidos (45) y en el cromosoma (159).

Para muchos autores, y así queda reflejado en la bibliografía (159,173) la APH(3') que causa resistencia a la AN es la APH(3')-IV. No obstante se ha descrito la APH(3')-IV en cepas de *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus* sensibles a la AN pero capaces de modificar a dicho antibiótico (44). La isepamicina no es modificada por esta enzima (83).

APH(3')-V: Esta enzima se aisló por primera vez de una cepa de *Streptomyces fradiae*, organismo productor de la neomicina (190). Se caracteriza porque sólo tiene actividad con la NEO y la KM, y no tiene actividad con la LM ni BT (187,190). Sólo se ha encontrado en bacterias gram positivas.

Trieu-Cuot y col. (190), compararon la secuencia génica de estos cinco tipos de APH(3'). La homología es baja a nivel de nucleótidos. Pero al observar la secuencia de aminoácidos se ve una relación estructural. Así el grado de homología entre las cinco proteínas varía del 33% al 42%. Este grado, combinado con el hecho de tener tamaños casi idénticos, actividades enzimáticas similares y peso moleculares casi iguales indican que derivan de un antecesor común.

APH(3')-VI: Esta enzima fue descrita por Lambert (104) que observó la inactivación de AN por una APH(3') que denominó APH(3')-VI en cepas de *Acinetobacter spp.* Posteriormente, Martín y col. (179) secuenciaron el gen *aphA-6* de una fosforilasa de *Acinetobacter baumannii*, cuyo peso molecular era de 30319 daltons. Los sustratos típicos de esta enzima son NEO, KM, BT y AN.

La enzima está codificada por genes que se han encontrado en plásmidos conjugativos en cepas de *Acinetobacter* (104).

APH(3')-VII: Tenover y col. (179) encontraron en *Campylobacter jejuni* una fosfotransferasa a la que denominaron APH(3')-VII. El gen *aphA-7* codifica una proteína de 251 aminoácidos y de peso molecular 29691 daltons. El estudio de homología con los genes de otras APH(3') reveló una identidad del 45,6% con el gen *aphA-3* aislado de *Streptococcus faecalis*.

4.3.2.- APH(2").-

Esta enzima fue aislada por Dowding y col. (46) en cepas de *Staphylococcus* resistentes a la GM.

La APH(2") cataliza la fosforilación del grupo hidroxilo en posición 2 del anillo III de la aminohexosa de la GM, TM y KM. Actuando también sobre la SIS, AN y NET (44,48,165), causando a veces resistencia a los mismos (165). La APH(2") inactiva también a la dactimicina, un nuevo aminoglicósido pseudodisacárido y parece ser la causa de resistencia a dicho antibiótico (77). No parece actuar sobre la ISE (83).

Se ha encontrado este tipo de actividad en cepas de *Staphylococcus aureus* (4,46), en *Staphylococcus epidermidis* (159,182) y en distintas especies del género *Streptococcus* (30,54). No se ha encontrado en gérmenes gram negativos.

La actividad APH(2") siempre va acompañada de actividad acetilasa tipo AAC(6'). Esta enzima se denomina bifuncional y es capaz de fosforilar en el grupo OH en 2" y acetilar en el grupo amino en 6'.

Muchos han sido los esfuerzos por intentar separar los dos tipos de actividades. Dowding y col. (46) consiguieron separar por electroforesis en geles de poliacrilamidas las dos actividades. En un principio, Le Goffic y col. (109), pensaron que las enzimas halladas en las cepas de *Staphylococcus aureus* eran distintas. Encontraron un pI de 5,7 para la AAC(6') y 5,8 para APH(2") siendo los pesos moleculares iguales y con un valor de 28000 daltons. Más adelante, Le Goffic y col. (107) sugirieron la posibilidad de que se tratara de una proteína oligomérica, ya que no se podía filtrar a través de

membranas de Amicon XM100, corroborando el peso molecular de 28000 daltons. Para verificar el efecto del ATP y del Acetil-Coenzima A en la actividad acetilante y fosforilante, llevaron a cabo experimentos de inhibición, observando que la acetilación de la neamina era inhibida por el ATP y la fosforilación de GM C₁ con Acetil-Co A. De este modo demostraron que las actividades son indisociables y que no son independientes, puesto que cada una de ellas es inhibida por el cofactor de la otra.

Courvalin y col. (30) intentaron separar las dos actividades en *Staphylococcus aureus* mediante filtración en gel, determinando el peso molecular en 31000. El pI que hallaron fue de 5,3. El pH óptimo para la actividad acetilasa fue de 7, mientras que para la actividad fosforilasa fue de 5 el pI y 8 el pH. Courvalin (30) comparó sus resultados con los obtenidos por Le Goffic (107) y atribuyó las pequeñas discrepancias del pH y pI a la variación metodológica más que a verdaderas diferencias entre las proteínas.

Se han llevado a cabo posteriores purificaciones de la enzima. Ubukata y col. (192) caracterizaron la APH(2'')+AAC(6') procedente de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. Determinaron el peso molecular de la enzima bifuncional en 56000 daltons, mientras que el pI era de 4,1. Este peso molecular difiere de los comentados anteriormente, ya que es aproximadamente el doble del promedio de los pesos moleculares de las acetilasas y fosforilasas estudiadas, que está alrededor de 30000 daltons. Esta observación, sugirió la hipótesis de que los determinantes de resistencia evolucionaron a partir de dos genes individuales.

La confirmación de esta hipótesis se logró al clonar el gen de *Streptococcus faecalis* que codifica la APH(2'')+AAC(6') en *E. coli* (54). La secuencia de nucleótidos codifica una proteína de 479 aminoácidos y de peso molecular 56850. La secuencia de

aminoácidos presenta dos regiones homólogas con otras proteínas estudiadas. La región N-terminal muestra homología con una secuencia de la acetiltransferasa de *Bacillus pumilus* y la C-terminal posee homología con una región de la fosfotransferasa de *Streptomyces fradiae*. Mediante subclonado se han obtenido dos fragmentos independientes que codifican las actividades fosforilasas y acetilasas, lo que sugiere que el gen que codifica la enzima bifuncional es el resultado de una fusión de los genes individuales *aacA* y *aphD*.

El Sohl y col. (49) clonaron el gen que codificaba la enzima bifuncional de *Staphylococcus aureus* en cepas de *E. coli* y *Bacillus subtilis*, observando que las enzimas sintetizadas por estas cepas eran indistinguibles de las producidas por *Staphylococcus aureus*. Los fragmentos clonados se usaron como sondas para localizar secuencias de nucleótidos homólogos en el ADN de cepas de *Staphylococcus aureus*, encontrando que los genes *aphA* estaban localizados en la misma posición mientras que los *aacA* se podían localizar en distintas posiciones dentro del cromosoma.

Posteriormente, Rouch y col. (161), clonaron también el gen *aacA-aphD* en *E. coli* expresando resistencia a GM, TM y KM. El análisis de la secuencia de nucleótidos mostró que podía determinar una proteína de 479 aminoácidos y de peso molecular 56,9 Kdal.

Bialkowska-Hobrzanska y col. (9) aislaron el gen que codifica la APH(2'') + AAC(6') de *Staphylococcus epidermidis* y lo clonaron en *E. coli* C y *E. coli* K12. Ensayos enzimáticos usando como sustratos NET, SIS, AN, GM (C₁ y C₂) y DKB mostraban actividad AAC(6') diez veces mayor y APH(2'') sesenta veces mayor en extractos de *E. coli* C que en *E. coli* K12, siendo el número de copias del plásmido similar en ambas cepas. La idea de que la regulación de la expresión del gen que codifica la enzima

bifuncional ocurre después de la transcripción está aún por aclarar.

El gen que codifica la enzima bifuncional se ha encontrado en el cromosoma de *Staphylococcus aureus* (49,94,119) y de *Staphylococcus epidermidis* (159). Se ha encontrado en plásmidos, tanto en estafilococos (75,112), como en estreptococos (48). Así como en plásmidos conjugativos en *Staphylococcus aureus* y en *Staphylococcus epidermidis* (4,55,64,128) y *Enterococcus faecalis* (85).

Así mismo, el gen *aacA-aphD* se ha encontrado en transposones, hecho que se descubrió a raíz del aislamiento de cepas portadoras de genes cromosómicos que mostraban patrones de resistencia idénticos a los plasmídicos (120).

Este hecho fue confirmado posteriormente por Lyon y col. (118,121) quienes describieron un transposón de 4,5 Kbases en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas en Australia, denominándole Tn4001. Posteriormente se ha visto que en otras partes del mundo muestras clínicas de *Staphylococcus aureus* contienen transposones similares al Tn4001 (174). No obstante, los genes que codifican la enzima bifuncional se han encontrado en transposones diferentes a los anteriores, en cepas de *Staphylococcus epidermidis* en Estados Unidos. Estos transposones, han sido denominado como Tn4031 (182).

Byrne y col. (20) han encontrado homología entre los transposones Tn4031 aislados en cromosomas de *S. epidermidis* de Estados Unidos y los Tn4001 de *S. aureus* australianos. A pesar de esta homología los determinantes de resistencia a GM en Estados Unidos en aislados de *S. aureus* no son móviles.

Recientemente se ha caracterizado un transposón que contiene los

determinantes genéticos que codifican la enzima bifuncional en *Enterococcus faecalis* (Tn5281). Los estudios basados en análisis con endonucleasas de restricción e hibridación del ADN han demostrado que este transposón es similar al Tn4031 encontrado en *S. epidermidis* de Estados Unidos y al Tn4001 de los *S. aureus* australianos (210).

4.3.3.- APH(3").-

Esta enzima fosforila el grupo hidroxilo en posición 3" de la estreptomicina. Fue puesta de manifiesto por Ozanne y col. (200), que la denominaron APH(3").

Los sustratos de esta enzima son la estreptomicina y derivados. No es sustrato la espectinomicina ni ningún otro aminoglicósido.

Se ha encontrado en gram negativos, gram positivos y *Micobacterias*. El gen que codifica la APH(3") se ha encontrado en plásmidos (80,160) y transposones (Tn5) (60).

4.3.4.- APH(5").-

Se trata de una enzima aún no bien caracterizada. Se denomina APH(5") a la enzima capaz de fosforilar el grupo hidroxilo en posición 5" de la ribosa de la RM (151).

Se encontró por primera vez en *Pseudomonas aeruginosa* aunque también fosforilaba a la RM en posición 3' (102), pero lo hacía preferentemente en 5". Sólo se ha detectado en gérmenes gram negativos.

4.3.5.- APH(6).-

Inicialmente esta enzima recibió el nombre de estreptomicin-6-kinasa, fosforilando a la estreptomicina y dihidroestreptomicina (148,149).

Kida y col. (102) informaron de una fosforilasa que actuaba sobre el grupo OH en posición 6 del anillo de estreptidina de la estreptomicina. Se encontró en *Pseudomonas aeruginosa* y se denominó APH(6). El pH óptimo era de 8,0 y su pI de 4,7. La APH(6) no se ha aislado de *Enterobacterias*. No se ha establecido relación entre la APH(6) y la estreptomicin-6-kinasa de *Streptomyces spp.* que fue purificada y caracterizada por Sugiyama y col. (175). Su peso molecular era de 36000 y 38000 daltons, y el pI de 6,6.

4.3.6.- APH(4).-

Esta enzima fue aislada por primera vez de *Streptomyces hygroscopicus* (155), fosforilando a la higromicina B.

La APH(4) modifica exclusivamente la higromicina B, el lugar de acción es el OH en posición 4 de la hiosamina (ciclitol), y sus derivados como destomicina, que es un 1-N-metil isómero. Rao y col. (155) aislaron esta enzima de *E. coli*.

Las dos enzimas aisladas tenían un perfil de sustrato similar, no obstante el peso molecular difería, siendo 60000 daltons el de *Streptomyces* y 41500 el de *E. coli*.

La higromicina B es un aminoglicósido que se ha usado como antihelmíntico en cerdos, lo que la resistencia a este antibiótico, apoyaría el origen animal de las cepas

portadoras de la enzima.

No obstante en España, se han encontrado en cepas de *Enterobacterias* de origen humano (66,70).

El gen que codifica la APH(4) en *E. coli* es plasmídico (155), teniendo en cepas de *Serratia marcescens* propiedades conjugativas (70).

4.4.- NUCLEOTIDILTRANSFERASAS.-

Las nucleotidiltransferasas ó adenilasas catalizan la transferencia de un nucleótido del ATP u otros nucleótidos a un grupo hidroxilo del aminoglicósido. Las posiciones donde puede producirse dicha reacción son las siguientes: 2", 3", 6, 9 y 4'.

4.4.1.- ANT(2").-

En una cepa de *E.coli* resistente a GM, TM y KM y sensible a NEO y AN (148), se detectó actividad adenilasa que modificaba a los antibióticos GM C_{1a}, GM C₂ y GM C₁ y a la KM (200). Esta cepa de *E. coli* portaba un plásmido de resistencia de *Klebsiella*.

Esta enzima adenila los grupos hidroxilos en posición 2 del anillo III de la GM, SIS, TM y NET (figura 7). No modifica a la ISE (62,83), a pesar de tener un grupo OH en 2". Utiliza como cofactores ATP, GTP, CTP ó UTP, de ahí la denominación de nucleotidiltransferasas ANT(2") (148).

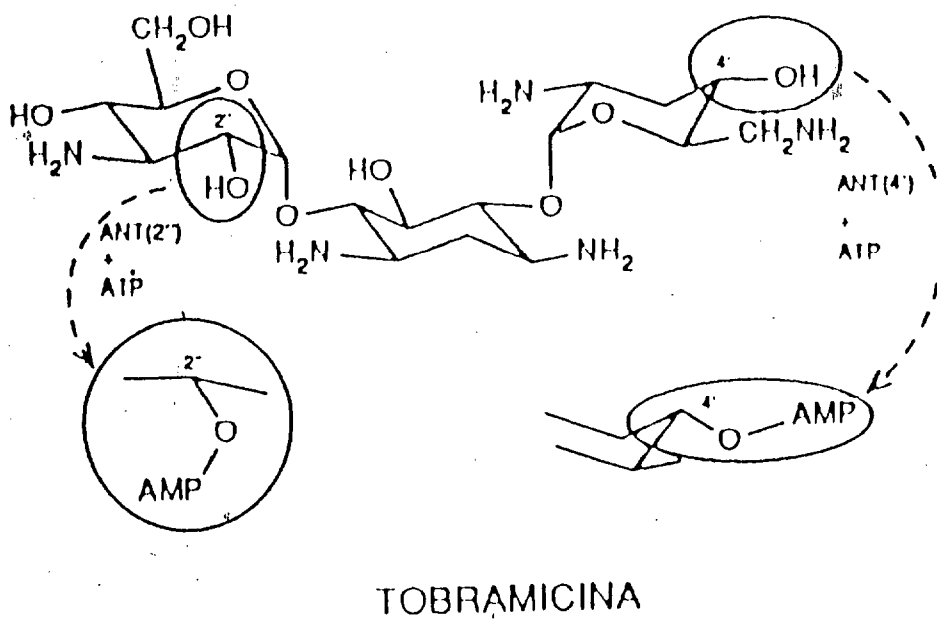


Figura 7.- Adenilación de la tobramicina por las enzimas ANT(2'') y ANT(4').-

Las cepas productoras de esta enzima son resistentes a la GM, KM, SIS, TM y DKB, pero sensibles a la NET, aunque sea sustrato de la misma (44,73). Esto puede ser debido a varios factores, cantidad de enzima presente en la célula bacteriana, constante cinética y actividad antibacteriana de los aminoglicósidos modificados (44).

Smith y col. (39) llevaron a cabo la purificación de la enzima, encontrando un peso molecular de 35000 daltons.

Se han encontrado adenilasas del tipo ANT(2") que modifican a la AN. Primero fueron Coombe y col. (28), quienes hallaron una ANT(2") que además de actuar sobre los sustratos típicos, adenilaba a AN. Purificaron la enzima y obtuvieron un peso molecular de 29000 daltons y un pH óptimo de 7,8-8. El determinante genético de la enzima se encontraba en un plásmido conjugativo y la denominaron ANT(2")-II. No se pudo encontrar este tipo de actividad sólo sino que estaba siempre acompañada por una APH(3')-I.

Posteriormente se encontró otro tipo de ANT(2") que modificaba a la AN y causaba su resistencia (2). Lee y col. (106) detectaron una ANT(2") en cepas de *E. coli* que modificaba la AN, pero difería de la hallada por Coombe (28) en que ésta también modificaba la GM C_{1a} y la de Coombe no tenía esta propiedad.

La ANT(2") se ha detectado en *Enterobacterias* (2,44) y en *Pseudomonas* (44). Gray y col. (75) encontraron un aislado de *Staphylococcus aureus* que expresaba una actividad adenilasa que modificaba a la GM, TM y KM, sospechando de una ANT(2"), que no se había detectado en *S. aureus* previamente. Aunque en 1978, Scott y col. (165) estudiaron que sus cepas de *S. aureus* poseían cierta actividad que adenilaba a la GM, y también a la AN, pero no determinaron de que enzima se trataba.

El gen que codifica esta enzima se ha encontrado en plásmidos (106) y posiblemente en transposones Tn1700, Tn732 (15,76).

Lee y col. (106) mediante estudios de homología de los genes que codifican la ANT(2") encontraron que existe heterogeneidad en sus secuencias codificadoras. Este hecho es de interés a la hora de utilizar métodos de hibridación del ADN para tipar los genes de resistencia a aminoglicósidos como rutina en el laboratorio clínico.

4.4.2.- AAD(3").-

La AAD(3") es capaz de modificar el grupo hidroxilo en posición 3" de la SM (39). También actúa sobre la espectinomicina, pero sobre el OH en posición 9; por esa razón se denomina AAD(3")(9), ya que inactiva la SM y SP (200).

Esta enzima fue descrita por primera vez por Umezawa y col. (200).

Se ha detectado en gérmenes gram negativos (43) y en *Staphylococcus* (31,140).

El gen que codifica a la AAD(3")(9), *aadA*, se ha localizado en plásmidos (73) y también en numerosos transposones Tn4 (39), Tn21, Tn2424, Tn2411 (129) y Tn7 (105).

4.4.3.- AAD(9).-

Esta enzima se detectó por primera vez en *Staphylococcus aureus* (39); adenila la SP en el hidroxilo situado en posición 9, pero no a la SM.

La AAD(9) no sólo se encuentra en *Staphylococcus*, sino que también se ha detectado en *Pseudomonas* (157) y más recientemente en *Enterococcus faecalis* (105).

Le Blanc y col. (105) estudiaron con detalle la AAD(9) de *Enterococcus*. Tras la purificación de la enzima, observaron que constaba de 250 aminoácidos y tenía un peso molecular de 28000 daltons. Compararon la secuencia de aminoácidos de la AAD(9) de *Streptococcus* con la de *Staphylococcus* y encontraron que compartían un 39% de identidad. Estudiaron también la relación existente entre la AAD(9) de *Streptococcus* con la AAD(3")(9) de *E. coli* encontrando una identidad del 27%. Esto parece indicar un origen común.

Los determinantes genéticos de esta enzima se han localizado en cepas de *S. aureus* en transposones Tn554 (105) y en plásmidos (97), y en *Enterococcus faecalis* en plásmidos conjugativos (105).

4.4.4.- AAD(6).-

Esta enzima es capaz de adenilar a la SM pero no a la SP. En un principio se pensó que la resistencia a la SP y SM en *Staphylococcus* estaba causada por la misma enzima. No obstante Kawabe y col. (97) encontraron que la resistencia a la SM y SP estaba codificada por distintos plásmidos en cepas de *Staphylococcus aureus*. Los dos antibióticos

eran adenilados, pero en distinta posición. Posteriormente se demostró que el grupo afectado era el hidroxilo en posición 6 (39). Se denominó AAD(6). Se ha encontrado en *Staphylococcus* (97) y en *Enterococcus* (140).

4.4.5.- ANT(4').-

Kayser y col. (96) encontraron que una cepa de *Staphylococcus epidermidis*, que no poseía ningún otro tipo de actividad, era capaz de adenilar a antibióticos tales como KM, NEO, TM, BT, PM y más débilmente a la AN, mientras que no adenilaba a la GM, SIS, SM ó SP. Esta cepa se mostraba resistente a KM, TM, NEO, BT, PM y medianamente resistente a AN, siendo sensible a GM y SIS. Denominaron esta enzima como tobramicín-adenil-transferasa. Esta enzima se mostraba más activa a pH 5,5, no obstante se observaba actividad a pH por encima de 8. El ditiotreitol estabilizaba la enzima y la temperatura óptima de reacción era 35°C. Estos autores observaron los antibióticos usados como sustratos y sugirieron que el hidroxilo en posición 4' del anillo I era el adenilado, ya que dichos antibióticos poseían ese grupo y los no sustratos carecían de él. Los determinantes genéticos que codificaban la enzima se encontraban en plásmidos.

Al mismo tiempo, Le Goffic y col. (108) observaron que una cepa clínica de *Staphylococcus aureus* adenilaba una amplia gama de aminoglicósidos, de los cuales quedaban excluidos el grupo de la GM. Esta cepa se mostraba resistente a la BT, NEO, PM, KM, TM y ligeramente resistente a AN y LM. Los sustratos fueron los siguientes antibióticos: KM, AN, TM, NEO, LM, BT y RM. No modificaba a la GM, SIS ó APRA. El estudio de los antibióticos modificados, demostró que la posición adenilada era la 4', y ya que podía utilizar tanto ATP, GTP y UTP como donadores de nucleótidos le asignaron el nombre de ANT(4')-I. La actividad óptima variaba según el sustrato, así para la AN, era

a un pH de 6, mientras que con TM a pH 4,5. El pI se determinó en 5,1. El gen que codificaba esta enzima en *Staphylococcus aureus* era de origen plasmídico.

Santanam y col. (164) también encontraron esta enzima en cepas de *Staphylococcus epidermidis* y observaron la capacidad de la ANT(4') de adenilar la 4'-deoxikanamicina, pero no a la 4'-deoxibutirosina, por lo que sugirieron la posibilidad de que esta enzima pudiera actuar también sobre el hidroxilo en 4".

Posteriormente Le Goffic y col. (111) observaron que la DKB a pesar de carecer de grupo OH en 4' era modificada por una ANT(4'). Consideraron que la estructura de la TM y de la DKB con un giro de 180° eran similares, estando los hidroxilos 4' y 2" de la TM y DKB respectivamente en la misma situación estérica. Propusieron por tanto, que el OH en 2" de la DKB era el modificado. Compararon la estructura de la DKB modificada por la ANT(4') con la DKB modificada por la ANT(2") (107), los resultados eran similares y corroboraban la modificación en 2" por la ANT(4'). El problema que se presentaba en esta hipótesis (111) era por qué la TM que poseía grupos OH en 4' y 2" era modificada solamente en 4'. Explicaron esta paradoja argumentando que la relación $K_M/V_{máx}$ para el OH en 4' era menor (10^5) que la $K_M/V_{máx}$ para el OH en 2" de la DKB (26×10^5). Esto explicaría que la adenilación sea más específica en el OH 4' que en 2"; además de que la DKB se comportara como inhibidor reversible para la adenilación de la TM (107,111).

No obstante, Le Goffic y col. (107), en estudios inmediatamente posteriores por medio de resonancia magnética nuclear encontraron que la ANT(4') de *Staphylococcus aureus* adenilaba a la DKB en posición 4" y no en posición 2".

Por lo tanto, esta enzima denominada ahora ANT(4')(4") adenila los

sustratos con OH en posición 4' y también los 4", pero no los OH polares en 4". Otra posibilidad es la posición 2". Los sustratos de esta enzima son KM, AN, DKB, LM, BT, RM y NEO, pero no son sustratos GM, SIS, NET, APRA ni ISE (83). Las cepas productoras de esta enzima se muestran resistentes a KM, TM, BT, RM y NEO y ligeramente resistentes a DKB, LM y AN (44,108,192); en algunos casos se muestran resistentes a la AN (67).

Se han realizado estudios para determinar las características físico-químicas de la enzima encontrándose un peso molecular de 22000 daltons y un pI 5,1 (107).

Ubukata y col. (192), purificaron y caracterizaron la enzima hallada en *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. Determinaron un peso molecular de 36000 y pI de 4,7. Estos datos diferían de los descritos por Le Goffic y col. (107,108) y por Santanam y col. (192) que habían determinado el peso molecular en 46770 y el pI en 5,0 de una ANT(4')(4") aislada de *Staphylococcus epidermidis*.

El gen que codifica la ANT(4')(4") en cepas de *Staphylococcus aadD*, se encuentra normalmente localizado en plásmidos (14,57,108,112); también se ha descrito en plásmidos conjugativos conjuntamente con la enzima bifuncional (4,128), en el cromosoma (191) y posiblemente en transposones (112).

En posteriores estudios, Byrne y col. (21) encontraron homología entre el gen aadD cromosómico descrito por Ubukata (191) y el determinante genético aadD hallado en el plásmido conjugativo (pUB110) procedente de cepas de Estados Unidos.

La enzima ANT(4')(4") se ha aislado de *S. aureus* y *S. epidermidis*.

También se ha informado en *Pseudomonas aeruginosa* (66) y *Bacillus brevis* (100).

Recientemente, se ha detectado la enzima ANT(4')(4'') en cepas clínicas de *Enterobacterias*. Kettner y col. (100), encontraron *Serratia marcescens* y *Citrobacter freundii*, capaces de adenilar los aminoglicósidos con grupos hidroxilos en 4' y 4''. Los sustratos usados fueron KM, PM, NEO, BT, siendo peor sustrato la DKB. Las cepas eran resistentes a todos los aminoglicósidos excepto a la AN, pero ésto era debido a que poseían otros tipos de actividad enzimática. Para separar estas enzimas purificaron la ANT(4') hallada en *Serratia marcescens* por medio de cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa y DEAE-biogel. Encontraron un pH óptimo de 7,8-8. La localización de la enzima era plasmídica.

Posteriormente, Jacoby y col. (90) encontraron que aislados clínicos de *Enterobacterias*, tales como *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae* y en *Pseudomonas aeruginosa* y sus correspondientes transconjugantes, producían una enzima con actividad adeniltransferasa cuyos sustratos tenían un grupo hidroxilo en 4', tales como, AN, KM, NEO, TM e ISE. Pero no modificaba a DKB, NET, SIS ó GM. Además esta enzima confería resistencia a la AN en las cepas estudiadas.

Para ver qué relación tenía la enzima con las encontradas en *Staphylococcus*, estos autores (90), realizaron estudios de hibridación entre ambos genes. No se produjo hibridación entre la sonda de *Staphylococcus* y el gen de ANT(4') descrito en este estudio, mientras que el gen que codificaba la ANT(4') en *Pseudomonas aeruginosa* hibridaba con el encontrado en *E. coli*. Este hecho, además de que el perfil de sustrato difería del de *Staphylococcus* en cuanto a la modificación de la DKB, hizo que se denominara a la enzima ANT(4')-II.

Al mismo tiempo, Carlier y col. (23) encontraban una cepa de *Enterococcus faecium* con un patrón de resistencia inusual en *Enterococcus*, KM, NEO, TM y DKB, pero sensible a GM. Esta resistencia era debida a la síntesis de la nucleotidiltransferasa ANT(4')(4'') que modificaba a KM, TM, NEO, BT, siendo peores sustratos DKB, AN, PM y LM. La GM, SIS, NET, APRA y habekacina no fueron adeniladas. El hecho que DKB fuera adenilada y habekacina no, confirmaba que los OH 4' y 4'' eran los modificados.

Carlier y col. (23) encontraron homología entre el ADN plasmídico de estas cepas y una sonda específica para el gen estructural que codifica la ANT(4')(4'') en *Staphylococcus*. Estos resultados sugerían que la aparición de resistencia a la TM y KM en *Enterococcus* era secundaria a la adquisición de la información genética originaria de *Staphylococcus*.

Ounissi y col. (140), corroboraron en cierto modo el alto grado de homogeneidad genética que existe para las enzimas modificadoras de aminoglicósidos en cocos gram positivos, encontrando que las sondas genéticas constituyen un método útil de detección de enzimas modificadoras en estos patógenos humanos. La concordancia entre la hibridación con la sonda ant4' y la determinación por el método radioenzimático en estos aislados (*Staphylococcus* y *Streptococcus*) fue del 100%.

4.5.- ACETILTRANSFERASAS.-

Las enzimas acetilantes catalizan la transferencia de acetato del Acetil-Coenzima A a un grupo amino del antibiótico. Estas acetilasas modifican sólo los aminoglicósidos que contienen el grupo 2-desoxiestreptamina ó fortamina, quedando excluidos la estreptomina y espectinomina. Los grupos susceptibles de acetilación son 3,

2', 6' y 1.

4.5.1.- AAC(6').-

Esta enzima cataliza la acetilación del grupo amino en 6'. Todos los aminoglicósidos con un grupo amino libre en 6' pueden ser sustratos, NEO, KM A, KM B, TM, GM C_{1a}, SIS, NET, DKB, BT, AN y RM (figura 8).

Okamoto y Suzuki (8) informaron en 1965 de una enzima que inactivaba la KM por acetilación. Esta enzima era producida por una *E. coli* K-12 R-5 que portaba un plásmido de resistencia. Posteriormente, en 1965, Umezawa y col. (8) aislaron el producto de la acetilación enzimática de la KM A y demostraron que el grupo modificado era el amino en posición 6 de su anillo 6-amino-6-deoxi-D-glucosa.

Okanishi y col. (8), utilizaron distintos antibióticos relacionados estructuralmente como sustratos de la acetilación y concluyeron que la KM A era inactivada, mientras que la KM C, PM, NEO no eran afectadas.

Benveniste y col. (8) aislaron y purificaron esta enzima de una cepa de *E. coli* con un plásmido R, encontraron que modificaba a la KM A, KM B, NEO B y NEO C, GM C_{1a} y GM C₂, además de las hibrimicinas; la PM y GM A no eran sustratos.

Le Goffic y col. (71) describieron una nueva acetilasa AAC(6') de una cepa de *Moraxella* a la que denominaron AAC(6')-II.

Jacoby (89) encontró una KM-acetiltransferasa en una cepa de *Pseudomonas*

KANAMICINA A

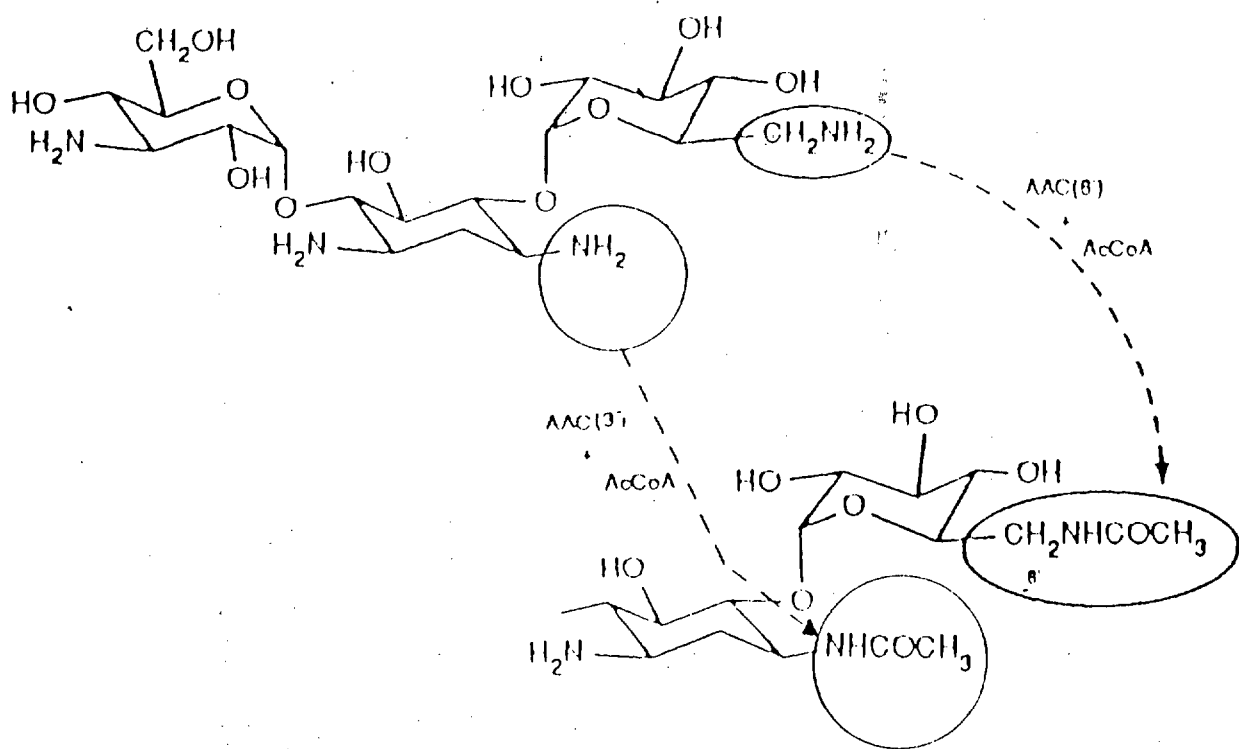


Figura 8.- Acetilación de la kanamicina por las enzimas AAC(6') y AAC(3).-

aeruginosa resistente a AN, BT, KM, TM, SIS y sensible a GM. La enzima estaba codificada por genes localizados en plásmidos conjugativos.

Kawabe y col. (98) describieron una nueva enzima AAC(6') en un plásmido de *Pseudomonas aeruginosa*. La denominaron AAC(6')-III y como sustratos tenía KM A y B, DKB, 6'-Me-DKB, 6'-N-metil-KM B. No modificaba a la KM C, AN y GM C₁. Posteriormente (99) encontrarían una acetilasa 6' en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* que causaba resistencia a AN, DKB y NEO. Casi al mismo tiempo, Haas y col. (78) identificaron otra acetilasa AAC(6') en una cepa de *Pseudomonas aeruginosa*, con un perfil similar al anterior, KM A y B, GM C_{1a}, SIS y NEO B, y con baja actividad hacia BT y AN. No modificaba a la KM C.

Murray y col. (131) informaron de una acetilasa producida por cepas resistentes de *Acinetobacter calcoaceticus subsp. anitratus* que modificaba a los aminoglicósidos con grupos aminos en 6', tales como KM B, GM B y NEO. No acetilaba a los que carecían de ellos, KM C, GM B₁ y PM. Estas cepas eran resistentes a KM, TM, AN, NEO y SIS. Se trataba de una enzima AAC(6').

Basándose en estos hallazgos, se pueden encontrar en la literatura distintas clasificaciones de las AAC(6').

Mitsuhashi y col. (71) clasificaron estas enzimas basándose en su perfil de sustrato, en cuatro categorías: clase I AAC(6')-I.- modifica a la KM A y B y a la NEO; clase II AAC(6')-II.- inactiva a la KM A y B, NEO, GM C_{1a} y C₂; clase III AAC(6')-III.- engloba a los sustratos de las clase I y II más la DKB; clase IV AAC(6')-IV.- que confiere resistencia a todos los antibióticos que son sustratos en la clase III más la AN.

En Europa y Estados Unidos (148) se ha seguido un esquema diferente. Así la AAC(6')-I corresponde a la enzima descrita por Umezawa y col. (8). La AAC(6')-II sería la enzima aislada por Le Goffic en una cepa de *Moraxella* (71). Esta enzima tiene un perfil de sustrato diferente y un pI de 7,6 que difiere del pI 5,4 encontrado para la AAC(6')-I. La AAC(6')-III tiene poca actividad frente a AN. Se encontró en *Pseudomonas* y las cepas productoras se muestran resistentes a GM, NET y TM. Por último la AAC(6')-IV, que sería la que acompaña a la enzima APH(2") en *Staphylococcus*, tiene poca actividad frente a la NEO.

Miller y col. (148) reconocen sólo dos tipos de actividades acetilasas AAC(6'). Las que ellos denominan AAC(6')-II es la que corresponde con la AAC(6')-III del esquema anterior.

Actualmente, si bien existen artículos recientes donde nos encontramos las AAC(6') numeradas del I al IV (77,186), la clasificación que se sigue es la de Meyer y Wiedemann (67,170,181), en la cual las AAC(6') se dividen en dos subclases: 1) la AAC(6')-I que confiere resistencia a AN, TM, DKB, NET, KM y NEO; 2) la AAC(6')-II que determina el patrón de resistencia GM, TM, DKB, NET, NEO y KM, no inactivando a la AN. La AAC(6')-I se correlaciona con la AAC(6')-IV de Mitsuhashi y col. (71) ó la AAC(6')-4 de Tran Van Nhieu (186), mientras que la AAC(6')-II se correlaciona con la AAC(6')-III de Mitsuhashi (71). Ambas subclases causan resistencia a la 5-epi-sisomicina (67). La AAC(6')-I que confiere resistencia a la AN, también puede causar resistencia a la ISE (62,101), mientras que la AAC(6')-II no modifica a la ISE (68,170).

Los genes que codifican a las AAC(6'), *aacA*, se han detectado en plásmidos (86,170), en el cromosoma (70,92) y en transposones Tn2424 (129), Tn1331 (135) y Tn654

(86), éste último muy relacionado estructuralmente con Tn1331.

Se han realizado numerosos estudios intentando secuenciar el gen que codifica las AAC(6').

Tran Van Nhieu y col. (185) determinaron la secuencia de nucleótidos del gen *aacA-4* que codificaba la AAC(6')-4. El gen constaba de 600 pares de bases y estimaron el peso molecular de la enzima en 22,4 Kdaltons, con un pI de 5,35. Posteriormente estos mismos autores (186) realizaron estudios de hidridación del ADN e inmunoensayo para ver la relación existente entre las AAC(6')-4 codificadas por diferentes plásmidos. Encontraron poca homología del ADN y menos del 40% de reactividad inmunológica cruzada. Estos resultados sugerían la existencia de al menos dos genes no homólogos para las AAC(6')-4 que mediaban la resistencia a la AN en bacilos gram negativos.

Nobuta y col. (135) secuenciaron el gen de una AAC(6') codificado en un transposón Tn1331 de una cepa de *Klebsiella pneumoniae*. Determinaron la secuencia de nucleótidos del gen que codificaba la enzima de resistencia a la AN e informaron que correspondía a un polipéptido de 23 Kdaltons.

Shaw y col. (170) realizaron estudios de caracterización del gen que codifica la AAC(6')-II en *Pseudomonas aeruginosa*. Esta enzima confería resistencia a GM, TM y NET, pero no a AN e ISE. Compararon la secuencia con la del gen *aacA-4* determinada por Tran Van Nhieu (185) y observaron un 82% de homología. Especularon que los dos genes podían derivar de un antecesor común y que los procesos de selección y diseminación habían conducido a las diferencias actuales observadas en el espectro de resistencia.

Terán y col. (181) también secuenciaron el gen que codificaba una AAC(6') capaz de modificar la AN en una cepa de *Enterobacter cloacae*. La enzima estaba constituida por un polipéptido de 965 pares de bases y de peso molecular 16021 daltons. Estos autores pusieron a punto el uso de este gen como sonda molecular para realizar estudios epidemiológicos. Sin embargo, la hibridación con sólo algunas cepas clínicas amikacín resistente y productoras de AAC(6')-IV, parecía indicar que la secuencia génica usada no era la única que codificaba una actividad AAC(6')-IV.

Las AAC(6') se han encontrado en gérmenes gram positivos y gram negativos. En *Streptococcus* y *Staphylococcus* aparecen asociadas con la actividad APH(2"), constituyendo la enzima bifuncional APH(2")+AAC(6') como ya vimos al comentar las fosfotransferasas. La actividad acetilasa actúa sobre la KM, TM, GM C_{1a}, AN y NET (48,165) y tiene poca afinidad por la NEO y BT, aunque en algunas ocasiones los modifica (49), pero no le confiere resistencia, debiéndose ésto a la fuerte unión del antibiótico acetilado al ribosoma bacteriano. Los *Staphylococcus* y *Streptococcus* que producen la APH(2")+AAC(6') son resistentes a GM, TM y KM (67), siendo a veces resistentes a AN y NET (165). El grupo amino en 6' de la dactimicina es acetilado por la enzima bifuncional ocasionando resistencia a dicho antibiótico (77).

4.5.2.- AAC(2').-

Cataliza la acetilación del grupo amino en posición 2' de la KM C y B, GM, SIS, NET, TM, DKB, NEO, PM, LM, BT y RM; pero no a la KM A y AN que carecen de este grupo amino (39,67). La presencia de esta enzima causa resistencia a GM, TM, NET y NEO (67), DKB (171), SIS (171) y LM (39,71).

Esta enzima se aisló por primera vez de una cepa de *Providencia stuartii* (148) y está vinculada a cepas de *Providencia* (67,148) y *Proteus* (67,148).

La enzima se purificó parcialmente usando cromatografía en Sephadex G-100 y se mostró como una proteína pequeña (39).

El gen que codifica la AAC(2') no se ha localizado en plásmidos. La AAC(2') se ha encontrado también en cepas de *Streptomyces spectabilis* (148), microorganismo productor de la espectinomicina. Mitsuhashi propuso que esta enzima se denominara AAC(2')-I y la hallada en *Providencia* AAC(2')-II (148).

4.5.3.- AAC(3).-

El grupo de las enzimas AAC(3) catalizan la acetilación del grupo amino en posición 3 del anillo de deoxiestreptamina de los aminoglicósidos. Se subdividen en siete isoenzimas diferentes (207), basándose en sus respectivos perfiles de sustratos y puntos isoeléctricos.

AAC(3)-I.- Aunque Mitsuhashi y col. (200) describieron una enzima en el sobrenadante de *P.aeruginosa* que acetilaba e inactivaba a la GM C_{1a}, C₁ y C₂, esta enzima fue identificada por primera vez por Brezeninska y col. (39,148,200) quienes informaron de una actividad similar en *P. aeruginosa* que acetilaba a la GM.

La AAC(3)-I se ha encontrado en *Pseudomonas* (65,148), *Enterobacterias* (65,68) y *Acinetobacter* (43). Modifica a la GM, SIS y FM ó astromicina. En menor grado modifica a la KM, TM, DKB y NET. No modifica a la ISE (68,69). Las cepas que

contienen esta enzima se muestran resistentes a GM, SIS y FM. Esta enzima y la bifuncional APH(2'') + AAC(6') son las únicas que causan resistencia a la FM y derivados como la dactimicina (77).

La AAC(3)-I modifica a la FM en el grupo amino en posición 1 del anillo de fortamina, ya que en posición 3 no presenta grupo amino (66), cabría pensar que es una AAC(1), pero se ha conservado la terminología AAC(3)-I. No obstante algunos autores van más lejos (66) y dicen que el grupo amino modificado es el 4, pero se debe a una numeración diferente en los carbonos de la fortamina.

Le Goffic y col. (39) intentaron purificar la AAC(3)-I de *E. coli* mediante cromatografía, pero no tuvieron éxito.

No obstante, Williams y Northrop (39) purificaron la enzima. Encontraron un peso molecular de 63000 ± 6300 y observaron que estaba constituida por cuatro subunidades idénticas de 17000 ± 1700 . El pH óptimo variaba de 5,5 a 8,5. La K_M y $V_{máx}$ para la GM C_{1a} era de $0,3 \pm 0,08 \mu M$ y $3,0 \pm 0,15 U/mg$ respectivamente; mientras que para la TM era $2,3 \pm 0,2 \mu M$ y $0,48 \pm 0,02 U/mg$. Esta diferencia explica que siendo la TM sustrato no sea modificada a la suficiente velocidad para impedir su efecto bactericida.

Le Goffic y col. (110) determinaron el pI de la enzima en 7,4. Tenover y col. (178) secuenciaron el gen *aacC-1* que codifica la AAC(3)-I y observaron que estaba constituido por una proteína de 177 aminoácidos que tenía 19388 daltons de peso molecular.

Terán y col. (180) caracterizaron el gen *aacC-1* procedente de una cepa de *Serratia marcescens*. Dicho gen codificaba un polipéptido de 177 aminoácidos y su peso

molecular era de 19392 daltons. La secuencia de nucleótidos del gen *aacC-1* difería de las estudiadas por Tenover y col. (178) en cuatro posiciones; tres de estos cambios no alteraban la secuencia de aminoácidos, mientras que el cuarto consistía en la sustitución de una alanina por una prolina. Estos autores utilizaron el gen caracterizado como sonda molecular, mostrando una gran especificidad.

El término AAC(3)-Ia (148) se usa para el fenotipo GM^R, NET^R, pero TM^S, encontrado en cepas de *P. aeruginosa*. El ADN de esta cepa muestra homología con el gen *aacC-1* secuenciado por Tenover (178).

La enzima AAC(3)-I se ha localizado en plásmidos conjugativos (71,73) y en transposones (43).

AAC(3)-II.- Esta acetilasa fue aislada por primera vez por Le Goffic y col. (110) de una cepa de *Klebsiella sp.* que contenía un plásmido conjugativo. Como su pI era de 6,4 que difería del pI de AAC(3)-I que era 7,4 y su perfil de sustrato también variaba, se le denominó AAC(3)-II.

La AAC(3)-II es activa frente a GM, TM, KM A y B, DKB (207), SIS y NET (44). No modifica a la ISE (68,69). Las cepas que producen esta enzima se muestran resistentes a GM, SIS, KM A, TM, DKB y NET (67,71), permaneciendo sensible a KM B a pesar de ser modificada incluso con más actividad que la KM A (65,71).

La AAC(3)-II se ha aislado principalmente de *Enterobacterias* (2,180,207) y *Pseudomonas* (68). También se ha encontrado en *Mycobacterias* (69).

El gen que codifica esta enzima, aacC-2, se ha encontrado sobretodo en plásmidos conjugativos (2,180).

Vliegthart y col. (205) secuenciaron el gen aacC-2 y observaron que estaba formado por 858 pares de bases que correspondían a un polipéptido de 30,6 Kdaltons.

Terán y col. (180) también han caracterizado este gen, encontrando una secuencia de 858 pares de bases que codifica un polipéptido de 286 aminoácidos y de 31574 de peso molecular. Los resultados son idénticos a los obtenidos por Vliegthart (207). Terán y col. (180) usaron el gen como sonda molecular y comprobaron su gran especificidad con respecto a otros genes aac.

AAC(3)-III.- Esta enzima fue descrita por primera vez en una cepa de *P. aeruginosa* por Biddlecome y col. (10). La denominaron AAC(3)-III y modificaba a la GM, TM, KM, SIS, NEO y PM, pero no tenía actividad con la AN y BT. La cepa se mostraba resistente a GM, TM, KM, SIS y PM. A pesar de que la NEO era sustrato, la cepa aparecía sensible a dicho antibiótico con un valor de CMI: 8 µg/ml. Los valores de CMI para GM y TM eran > 128 µg/ml. Biddlecome y col. (10) sugirieron que la AAC(3)-III pudo surgir a partir de una alteración mutacional de la AAC(3)-I. El gen que codificaba dicha enzima parecía tener origen cromosómico, ya que no se podía transmitir por conjugación.

La AAC(3)-III modifica a la GM, TM, KM A y B, SIS, DKB, NEO, PM y 5-episisomicina; pero no lo hace con respecto a la AN, BT e ISE (68,69,71).

Las bacterias que presentan esta enzima muestran el fenotipo de resistencia GM, TM, KM, DKB, NET, NEO, SIS, PM y 5-episisomicina (67,71), siendo este último

de especial interés para su identificación, ya que este antibiótico es únicamente inactivado por esta subclase de acetiltransferasa (65,67). Las cepas productoras de AAC(3)-III son sensibles a la AN.

La AAC(3)-III se aísla principalmente de *Enterobacterias* (68,178) y *Pseudomonas* (29,65,69). No obstante, Uduo y col. (199) informaron que un aislado clínico de *Mycobacterium fortuitum* producía una acetiltransferasa que modificaba a la GM, KM, LM y PM, causando resistencia a las mismas, pudiendo ser una AAC(3)-III ó IV ya que la apramicina no fue ensayada. La AN mostraba sólo un 50% de modificación a pesar de mostrarse la cepa sensible a la misma.

Vliegthart y col. (205) compararon la secuencia del gen que codifica la AAC(3)-III, aacC-3 secuenciado por Allmansberger y col. (205), con el gen aacC-2 y no encontraron diferencias significativas que justificaran tal discrepancia en los perfiles de sustratos. Estos autores explicaron este hecho basándose en la posibilidad de que Allmansberger y col. (205) hubieran identificado mal la enzima, no incluyendo todos los antibióticos necesarios para determinar su perfil de sustrato. Además dedujeron la actividad enzimática ensayando sólo la GM y completando con el fenotipo de resistencia. Es posible que la cepa estudiada por Allmansberger produjera la AAC(3)-II + APH(3'), y el gen clonado y secuenciado fuera aacC-2 en vez de aacC-3.

Posteriormente Vliegthart y col. (207) secuenciaron el gen aacC-3 que codificaba la AAC(3)-III en cepas de *P. aeruginosa* con resistencia cromosómica a la GM. El gen estaba constituido por dos fragmentos, uno de 642 pares de bases que codificaba una proteína de función desconocida y con 23,9 Kd de peso molecular, y otro de 813 pares de bases que codificaba una proteína de 29,6 Kd. Este fragmento parecía ser el implicado en

la expresión de resistencia. Dicho gen sólo se expresaba en *P. aeruginosa*, mientras que en *E. coli* HB 101 no lo hacía. Según estos autores, la AAC(3)-III sólo se ha encontrado en *Pseudomonas*.

AAC(3)-IV.- Davies y O'Connor (38) informaron de una enzima que acetilaba el antibiótico de uso veterinario apramicina además de los sustratos de la AAC(3)-III. La KM no era tan buen sustrato como la GM, TM, NEO y APRA. Se denominó a esta enzima AAC(3)-IV. La resistencia se transmitía por conjugación, siendo por tanto el gen que la codifica de origen plasmídico. Se encontró en cepas de *Escherichia*, *Klebsiella* y *Arizona*.

Los sustratos de esta enzima son principalmente APRA, TM, NEO, GM C_{1a}, RB y NET. No modifica a la ISE (68,69,83).

Posteriormente, en cepas de *E. coli* procedentes de animales (84), se comprobó la existencia del plásmido R1535, que contenía el transposón Tn800 que codificaba la AAC(3)-IV que confería resistencia a APRA, GM, TM, KM A y NEO.

En Francia, Chasclus-Dancla y col. (32) obtuvieron hallazgos similares en el curso de dos brotes epidémicos de salmonelosis, verificándose la aparición de la AAC(3)-IV en cepas de *E. coli* y *Salmonella typhimorium*. Esta acetilasa mostraba poca actividad con la PM.

Las cepas bacterianas que presentaban esta enzima se mostraban resistentes a GM, TM, SIS, NET, DKB y APRA (67,171).

En un principio las bacterias que presentaban AAC(3)-IV eran de origen

animal, pero también se ha encontrado esta enzima en *Enterobacterias* de origen humano (70,71,171).

El gen que codifica la AAC(3)-IV se encuentra localizado generalmente en plásmidos conjugativos (93,211) y transposones (84).

La AAC(3)-IV sólo se ha aislado de *Enterobacterias*. Uduo y col. (199) encontraron que *Mycobacterium fortuitum* sintetizaba una AAC(3) cuyo perfil era el de una AAC(3)-IV. No obstante, se han encontrado *Acinetobacter* resistentes a APRA (93) si bien su ADN no hibridaba con sondas específicas para AAC(3)-IV.

Chasclus-Danca y col. (33) han estudiado la relación existente entre plásmidos de origen animal y humano que codifican la AAC(3)-IV. Estos autores encontraron una fuerte homología entre dichos plásmidos al ser cortados con diferentes enzimas de restricción.

AAC(3)-V.- Gómez-Lus y col. (71,74) citaron esta enzima por primera vez para definir una acetilasa que modificaba a GM, TM, SIS, DKB, y NET, causando resistencia a todos. Se diferenciaba de la AAC(3)-II porque no producía resistencia a KM. Difería de la AAC(3)-IV porque no tenía actividad con la APRA. No se trataba de una AAC(3)-III porque la NEO, PM, LM y RM no eran sustratos.

La AAC(3)-V posee un espectro que ocupa una posición intermedia entre la AAC(3)-I y la AAC(3)-II. Las cepas productoras de esta enzima muestran un fenotipo de resistencia GM, TM, DKB, SIS y NET. El gen que codifica la enzima, *aacC-5*, se ha encontrado en plásmidos conjugativos (7,73) y en transposones Tn2922, Tn1699 (7).

La AAC(3)-V se ha detectado en diferentes géneros de *Enterobacterias*, *Pseudomonas* (171) y *Acinetobacter* (68).

Barg (7) construyó una sonda para el gen *aacC-5*, obteniendo resultados negativos en estudios de hibridación con el ADN de microorganismos productores de ANT(2"), AAC(3)-I, II, III y IV, ANT(4"), AAC(6')-I, APH(3')-I y IV y AAC(2').

AAC(3)-VI.- Papanicolau y col. (142) detectaron en nueve cepas gentamicín-resistentes de *Enterobacterias* una enzima capaz de acetilar la SIS además de la GM en el grupo amino en posición 3. Esta enzima fue denominada AAC(3)-VI. Las cepas productoras de la misma eran resistentes a GM y SIS, moderadamente resistentes a TM y NET, y sensibles a AN, ISE, 5-episisomicina, FM y APRA.

Ninguna de estas cepas hibridaba con sondas para AAC(3)-I ó AAC(3)-V. La AAC(3)-VI sólo modificaba significativamente a la GM y SIS. El determinante genético de esta enzima se hallaba en un plásmido conjugativo. También se ha detectado en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (207).

AAC(3)-VII.- Pérez-González y col. (144) estudiando una cepa de *Streptomyces rimosus forma paromomycinus*, microorganismo productor de la PM, encontraron una acetilasa que modificaba la PM, NEO B y C, LM A, KM A y B, GM C_{1a} y C_{1b}, TM, SIS, NET y G-418. La AN, BT, higromicina B, kasugamicina, RM, SM y SP no eran modificadas. La llamaron AAC(3)-VII, pero el perfil de sustrato era característico de una AAC(3)-III.

López-Cabrera y col. (116) secuenciaron el gen que codificaba esta enzima,

aacC-7. Dicho gen constaba de 1495 pares de bases. El gen aacC-7 estaba localizado en un fragmento de 864 pb que correspondía a un polipéptido de 31070 daltons de peso molecular que correlacionaba con el peso molecular de 32000 daltons de la enzima obtenido por medios físico-químicos. Estos autores realizaron estudios de hibridación del ADN con los genes de la AAC(3)-III y AAC(3)-IV, mostrando una homología del 59% y 41% respectivamente. No se detectó homología con la AAC(3)-I. La estrecha similitud entre la AAC(3)-III y la AAC(3)-VII (59%) correlaciona bien con los casi indistinguibles perfiles de sustratos.

4.5.4.- AAC(I).-

Esta enzima constituye un nuevo grupo de acetiltransferasa. Fue descrito por Lovering y col. (66). Modifica la apramicina en posición 1-N y la NEO y RM doblemente en 1 y 6'.

Previamente Hedges y col. (84) habían detectado una acetiltransferasa que producía resistencia a NEO, PM y APRA (CMI 32-64 $\mu\text{g/ml}$), en cepas de *E. coli* aisladas de cerdos. No lograron determinar el grupo funcional diana. La síntesis estaba dirigida por un gen cromosómico.

Sales y Cunliffe (162) describieron una acetiltransferasa de *Micromonospora inyoensis*. Sus sustratos eran NEO, y APRA, mientras que la GM y KM no lo eran. Estos autores no excluyeron la posibilidad de que se tratara de una enzima que actuara sobre el grupo amino en posición 1 del anillo II.

En la tabla 8, podemos observar la distribución de las enzimas modificadoras

Tabla 8.- Distribución de enzimas modificadoras de aminoglicósidos en bacterias gram positivas y gram negativas.-

ENZIMA	GRAM POSITIVAS		GRAM NEGATIVAS
	<i>Staphylococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	
FOSFOTRANSFERASAS			
APH(3')	+	+	+
APH(3'')	+	-	+
APH(5'')	-	-	+
APH(6)	-	-	+
ACETILTRANSFERASAS			
AAC(3)	(+)	-	+
AAC(2')	-	-	+
AAC(6')	-	-	+
NUCLEOTIDILTRANSFERASAS			
ANT(2'')	(+)	-	+
ANT(4')(4'')	+	+	+
AAD(3'')(9)	+	+	+
AAD(6)	+	+	-
BIFUNCIONAL			
APH(2'')+AAC(6')	+	+	-

(+): Enzimas pendientes de caracterización

en bacterias gram positivas y gram negativas.

4.6.- METODOS DE DETECCION DE LAS ENZIMAS MODIFICADORAS.-

Existen tres métodos principales para detectar e identificar las enzimas modificadoras de aminoglicósidos:

4.6.1.- Método Microbiológico ó Bioensayo.-

Es un ensayo simple para detectar este tipo de enzimas. Se basa en la reducción de los halos de inhibición de los aminoglicósidos causada por el extracto enzimático de la bacteria productora.

Se colocan diferentes cantidades de extracto enzimático sobre los discos de antibiótico que se hallan sobre un césped formado por una bacteria sensible. Dependiendo de la reducción del halo de inhibición de los distintos antibióticos ensayados podremos averiguar el perfil y qué tipo de enzima es.

Una modificación consiste en incubar el extracto en presencia del disco de antibiótico, el cofactor adecuado (Acetil-Coenzima A ó ATP) y el tampón durante 30 minutos a 37° C. Algunos problemas que pueden surgir es que los resultados pueden tardar 24 a 48 horas y que la modificación no siempre implica inactivación.

Una limitación de este método es que no nos permite distinguir entre adenilación y fosforilación ya que ambas enzimas usan ATP como cofactor.

4.6.2.- Método Radioactivo.-

Este método se basa en la fuerte unión de los aminoglicósidos modificados o no al papel de fosfocelulosa debido a la carga positiva del antibiótico. El ensayo se puede usar para detectar los tres tipos de actividad y nos mide la transferencia de acetato del Acetil-Co A marcado con ^{14}C , grupo adenilo del ATP marcado con ^{14}C ó fosfato del ATP marcado con ^{32}P al antibiótico.

La reacción se lleva a cabo mezclando el extracto enzimático, el cofactor marcado radioactivamente, tampón y antibióticos e incubando a 30°C durante 30 minutos. De cada mezcla se toma una cantidad y se pone en unos cuadrados de papel que se introducen en agua a 80°C con el fin de detener la reacción enzimática. Los cofactores que no han reaccionado se lavan, permaneciendo adheridos los antibióticos hayan reaccionado ó no. Una vez seco el papel, se determina la radioactividad. Según el cofactor usado y el perfil de los antibióticos marcados podemos identificar las clases y las subclases de enzimas.

Bongaerts y Vliegenthart (13) argumentan que el estudio de los efectos de la concentración de los sustratos sobre las velocidades de reacción da más información que el perfil típico obtenido con una sólo concentración de sustrato.

El único problema se presenta cuando existen en una misma cepa varios enzimas cuyos perfiles se solapan.

4.6.3.- Método Genético.-

Se basa en la hibridación del ADN de la cepa a estudiar con sondas genéticas

específicas para una enzima. Muchas han sido las sondas que se han construido a partir de los genes que codifican las enzimas modificadoras, tal como hemos citado a lo largo de la revisión de las mismas. La hibridación positiva del ADN plasmídico ó total de la cepa a estudiar con una sonda determinada, nos indica la presencia del gen que codifica la enzima, por lo tanto nos confirmaría la presencia de la misma.

Es un método específico y en combinación con el método radioenzimático permite una identificación precisa de las distintas enzimas.

Sin embargo tiene una limitación, como puede ser la existencia de distintos genes homólogos ó no que codifican una misma enzima (106,186).

4.6.4.- Otros Métodos.-

Se han desarrollado otros métodos para detectar enzimas modificadoras de aminoglicósidos. Así Gómez-Lus (72) recientemente ha puesto a punto un método basado en electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) usando un sustrato marcado para el estudio de fosfotransferasas.

Otro método usado es el denominado PCR que corresponde a las siglas inglesas de reacción en cadena de la polimerasa (206). Esta técnica comienza con la hibridación de un corto oligonucleótido sintético (10-20 bases) que se denomina "primer" a una secuencia específica de ADN que flanquea la secuencia diana de interés, permitiendo a una ADN polimerasa termoestable hacer copias de la secuencia elegida (extensión). La repetición cíclica de hibridación y extensión permite un gran aumento en el número de copias del ADN diana. El ADN amplificado se detecta mediante la hibridación con una

sonda oligonucleótida marcada radioactivamente seguida de electroforesis en gel de poliacrilamida y autorradiografía.

La ventaja de este método es que puede ser utilizado en lugar de las técnicas de hibridación que son más laboriosas. Otra ventaja es que se puede detectar de una sola reacción combinaciones de distintas enzimas modificadoras de aminoglicósidos en una misma cepa. La detección de estas combinaciones no eran fáciles por los métodos tradicionales.

CAPITULO V.-

BASES GENETICAS DE LA RESISTENCIA ANTIMICROBIANA.-

5.1.- PLASMIDOS DE RESISTENCIA (35,41,122,184).-

La aparición de bacterias resistentes a antibióticos en las últimas décadas, ha sido considerada como una consecuencia genética a la presión selectiva ejercida por la terapia antimicrobiana. Esta rápida aparición de resistencia que seguía a la introducción de un determinado antimicrobiano en el ámbito hospitalario, mostraba la gran capacidad de la población microbiana a adaptarse a los cambios del ambiente.

Los avances en el campo de la genética bacteriana han aclarado muchos factores genéticos fundamentales que han derivado de la emergencia de estas bacterias resistentes a los antimicrobianos.

Cuando se detectó por primera vez la resistencia bacteriana se pensó que se trataba de mutaciones. Sin embargo, la frecuencia de mutación no justificaba la rapidez con la que aparecían las bacterias multirresistentes. El papel que juegan estas mutaciones espontáneas en la repentina incidencia de la resistencia a los antibióticos, se confirmó a través de la transferencia genética y con la demostración de que la bacteria puede adquirir un material genético adicional bajo la forma de ADN plasmídico ó ADN cromosómico. Los plásmidos son moléculas de ADN bicatenario que se multiplican independientemente en las células donde se alojan, y se heredan con regularidad al dividirse.

Durante las dos últimas décadas se ha demostrado este mecanismo de transferencia en distintos géneros bacterianos, tales como estafilococos y bacterias gram negativas y gram positivas en general, de modo que muchas resistencias a antibióticos se deben a la presencia de plásmidos que portan los determinantes genéticos de resistencia.

Se cree que son varios los factores que han contribuido a que los plásmidos de resistencia jueguen un papel importante en la evolución de las bacterias. La presencia de los genes de resistencia en plásmidos, los cuales generalmente no son esenciales para la supervivencia del microorganismo, provee a la población bacteriana de un mínimo de células capaces de mantener la diversidad genética de la población. Los genes plasmídicos pueden sufrir cambios evolutivos más radicales sin afectar a la viabilidad de la célula.

Los plásmidos constituyen sólo una pequeña parte del genoma celular, del 1 al 3 %. El ADN es de 100 a 1000 veces más pequeño que el cromosoma. Esto explica que en una bacteria puedan coexistir varios plásmidos. Su estructura es helicoidal y superenrollada, aparece como si los dos extremos de la doble hélice estuvieran retorcidos antes de ser engarzados covalentemente. Esta conformación se denomina "circuito cerrado covalente" (ccc) de ADN.

Los plásmidos, no obstante, pueden contribuir al desarrollo de la resistencia cromosómica de dos formas:

1) Los plásmidos, ya sea una parte ó su totalidad, pueden integrarse en el cromosoma bacteriano. En el caso de las bacterias gram negativas se debe a la presencia de segmentos cortos de ADN, denominados secuencias de inserción (IS) que residen tanto en los plásmidos como en el cromosoma.

2) Los plásmidos junto con los bacteriófagos pueden actuar como vectores

pára ADN transponible ó transposones. Hablaremos de ellos con más detalle.

5.2.- CLASIFICACION DE LOS PLASMIDOS EN *STAPHYLOCOCCUS* (136).-

Desde el descubrimiento de los plásmidos en *Staphylococcus* en los años sesenta hasta ahora se han considerado tres clases de plásmidos:

Clase I: son de pequeño tamaño y presentan un número de copias elevado (10-50 copias por célula). Codifican generalmente resistencia a antibióticos y están presentes en numerosas especies de *Staphylococcus*. Las resistencias más frecuentes son a tetraciclina, neomicina, cloranfenicol, eritromicina y estreptomina.

Clase II: son los primeros que se describieron; codifican β -lactamasas y producen resistencia a iones inorgánicos. Aparecen en *S. aureus* y en otras especies tales como *S. xylosum* y *S. simulans*. Son de tamaño mediano.

Clase III: ha surgido recientemente. Son de alto peso molecular (40-60 Kb) y portan resistencia a múltiples antibióticos. La mayoría confiere resistencia a la GM y son conjugativos.

Clase IV: se podría constituir una cuarta clase donde se englobarían plásmidos de tamaño intermedio que causarían resistencia a penicilina, metales pesados, aminoglicósidos y ácido fusídico.

5.3.- TRANSPOSONES.-

Como hemos dicho anteriormente, los plásmidos dentro de la célula tienen la posibilidad de recombinarse, bien con el ADN cromosómico ó con otros plásmidos. Esta recombinación está controlada por enzimas del tipo de las recombinasas y de las integrasas.

Los fenómenos que rodean a la transposición pueden suceder independientemente del sistema de recombinación general del huésped (rec) por un mecanismo de recombinación específica. Tales genes pueden llegar a ser estables en algunas especies en las cuales las moléculas vectores no pueden replicarse por sí mismas.

Los transposones juegan un papel importante en la evolución de los plásmidos, ya que pueden albergar distintos determinantes de resistencia. Esto explica en muchas ocasiones la rápida diseminación de las bacterias multirresistentes. Incluso, se ha sugerido que la evolución de los plásmidos resistentes a GM fue consecuencia de la transposición de genes en plásmidos no conjugativos (136).

5.4.- CONJUGACION (122,136,184).-

Este proceso engloba la capacidad de transferencia del ADN plasmídico desde unas especies a otras. La conjugación es un fenómeno complejo que implica un número de funciones diferentes. Requiere el contacto entre las paredes celulares de las bacterias donadoras y receptoras, además de las síntesis de pilis sexuales por las bacterias donadoras. La información genética necesaria para que este proceso ocurra se encuentra en el propio plásmido, generalmente de gran tamaño (plásmido conjugativo). Un plásmido es no conjugativo cuando no posee la información necesaria para la transmisión del mismo por

conjugación; son generalmente plásmidos de bajo peso molecular.

Consideraremos aparte el proceso de conjugación que tiene lugar entre las cepas del género *Staphylococcus*.

La conjugación entre *Staphylococcus* fue descrita por primera vez en 1982 por Jaffe y col. (91), quienes observaron que los plásmidos que codificaban la resistencia a la gentamicina tanto en *Staphylococcus aureus* como en *Staphylococcus coagulasa* negativos en un mismo hospital estaban relacionados estructuralmente. Sugirieron por tanto que existía una transferencia de este material genético y que los estafilococos coagulasa negativos servían como reservorio de plásmidos de resistencia y que eran transferidos a los *Staphylococcus aureus*, los cuales originaban auténticas situaciones epidémicas dentro del ámbito hospitalario.

Posteriormente Mc Donnell y col. (128) y Forbes y Schaberg (55) independientemente, caracterizaron el proceso por el cual se llevaba a cabo esta transferencia genética. Concluyeron que se trataba de una transferencia conjugativa similar a las ocurridas en *Enterobacterias*, independiente de la presencia del fago y que podía realizarse *in vitro*. El contacto célula a célula era esencial para la transferencia, puesto que ésta no tenía lugar en medio líquido sino en filtros en medio sólido. El proceso no se veía afectado por la presencia del citrato, suero humano ni ADNasa, por lo que concluyeron que se trataba de una conjugación similar a la que tenía lugar en *Streptococcus*. Mediante este mecanismo se podía transmitir la resistencia a la GM entre la misma especie, de *S. aureus* a *S. aureus*, ó bien entre distintas especies, de *S. epidermidis* a *S. aureus*.

Los plásmidos conjugativos de *Staphylococcus* han sido descritos en diferentes localizaciones geográficas alejadas entre sí (4,5,21,52,64,193,195,196,213). Así mismo, se ha descrito la transferencia de plásmidos que contienen los determinantes genéticos de resistencia a los aminoglicósidos entre *Staphylococcus* en la piel humana y de ratones (133). Estos plásmidos también son capaces de movilizar *in vivo* otros plásmidos de resistencia no transferibles. Esto apoya la hipótesis de que la piel constituye un hábitat de mantenimiento de cepas reservorios de genes de resistencia implicados en la patogenicidad. También se han descrito procesos conjugativos en la indumentaria quirúrgica y en ropa de cama; parece ser que la conjugación se ve favorecida por la presencia de superficies secas absorbentes (122).

Los plásmidos conjugativos de *Staphylococcus* tienen un tamaño que varía de 38 a 57 Kb. La adición de polietilenglicol al medio de cultivo incrementa la agregación celular y consecuentemente la transferencia de plásmidos Tra⁺ (122,193,194,195,196). Como ya hemos visto los plásmidos Tra⁺ son capaces de movilizar y/o cotransferir pequeños plásmidos corresidentes que codifican otras resistencias antimicrobianas y que por sí mismos no son transferibles. Recientemente, se han descrito mecanismos de recombinación en cepas de *S. aureus* entre plásmidos conjugativos y otros plásmidos que no lo son, para dar lugar a nuevos plásmidos conjugativos de resistencia (198). Este proceso es similar al observado en *S. aureus* durante la transducción entre plásmidos compatibles (122,136), pero no se había descrito durante la conjugación.

Los procesos conjugativos entre cepas de *Staphylococcus* en el ámbito hospitalario han cobrado interés en los últimos años, hasta el punto de realizarse estudios sobre la prevalencia de plásmidos conjugativos entre los aislados clínicos de *Staphylococcus* procedentes de distintos hospitales en Estados Unidos (5).

Tipos de plásmidos conjugativos en *Staphylococcus*.- Se han descrito tres tipos de plásmidos conjugativos en cepas de estafilococos:

1) Los que codifican resistencia a GM, KM, NEO y en algunas ocasiones producción de penicilinasas (4,52,55,128). Son capaces de movilizar plásmidos no conjugativos y se encontraron inicialmente en aislados de Estados Unidos, posteriormente aparecieron en Australia, Japón y Europa.

2) Los que producen un pigmento difusible y codifican resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B, y en algunos casos a KM, NEO, SM y SP. Hasta ahora sólo se han encontrado en Australia y no parecen movilizar plásmidos no conjugativos (193).

3) Los plásmidos tipo 3 se describieron a partir de un aislado de Nigeria (193). No poseen fenotipo de resistencia sino que pueden movilizar otros plásmidos no conjugativos.

5.5.- MOVILIZACION.-

Este proceso consiste en que al transferirse el plásmido conjugativo pueda transmitirse otro plásmido que no lo sea. El primero en la mayoría de los casos moviliza al segundo.

Este fenómeno sólo se había descrito en bacterias gram negativas, pero recientemente se ha encontrado también en gram positivas (152,193,194).

Se han establecido dos modelos básicos para intentar explicar la movilización en gérmenes gram negativos con un plásmido conjugativo bien caracterizado y un plásmido no conjugativo movilizable.

1) Un mecanismo sería el de conducción, en este modelo, el plásmido movilizado se combina con el conjugativo por medio de recombinación entre las regiones homólogas durante la transposición. Este modelo predice que en la mayoría de los transconjugantes se encontrarán ambos tipos de plásmidos.

2) El segundo modelo es la movilización por donación. En este modelo el plásmido movilizado codifica una proteína que dará lugar al factor de transferencia (ont). Según este modelo, la cepa transconjugante sólo tendrá copias del plásmido movilizado y sólo será efectivo si la maquinaria conjugativa está codificada por el genoma de un plásmido corresidente.

Projan y col. (152) estudiaron el mecanismo de movilización en cepas de *S. aureus* y encontraron que era análogo a la movilización por donación observada en cepas gram negativas.

En definitiva, este proceso facilita la transferencia de plásmidos que en principio eran incapaces de transferirse. Se ha descrito que el cromosoma bacteriano ó parte de él puede moverse si se integra en un plásmido conjugativo (194).

5.6.- TRANSDUCCION (122,136).-

Es un proceso de transferencia de genes codificados en plásmidos no conjugativos, los cuales se insertan en el genoma del fago que se encuentra en la bacteria donadora. El plásmido es transmitido por el virus cuando infecta a otra bacteria (receptora).

Durante mucho tiempo se pensó que la transducción era el mecanismo por el cual los *Staphylococcus* podían intercambiar su información genética *in vivo*. Para este proceso se requiere la presencia de los iones Ca^{2+} , ya que las partículas del fago los necesitan para la unión con la superficie celular. Por lo tanto agentes quelantes como el citrato pueden inhibir este proceso.

Se ha descartado la cotransducción de pequeños plásmidos en *Staphylococcus* que codifican resistencia a SM y tetraciclina. Se ha sugerido que estos plásmidos llevan a cabo una recombinación durante la formación de la partícula transductora, la cual es reversible en la célula receptora. Los fagos transductores generalizados de *S.aureus*, tal como indica su nombre, son capaces de transferir ADN plasmídico y cromosómico.

La transducción espontánea constituye una manera natural de transferencia de plásmidos que puede suceder en tejidos infectados ó en la superficie de la piel, intra ó interespecíficamente.

5.7.- TRANSFORMACION (114,122,136).-

Consiste en la introducción experimental de plásmidos de una bacteria donadora en una cepa receptora. Para que esto pueda ocurrir la cepa receptora debe ser

"competente", es decir las paredes bacterianas deben estar permeabilizadas para que el ADN pueda atravesarlas y pasar al interior de la célula.

En el proceso de la transformación se puede transferir tanto marcadores cromosómicos como plasmídicos. Existen métodos de transformación específicos para plásmidos, tanto para *Enterobacterias* como para *Staphylococcus aureus* (113).

La frecuencia de transformación en *S. aureus* es generalmente muy baja ($\leq 10^4$ transformantes/ μg de ADN) (136), pero no obstante, este proceso se ha usado en la introducción experimental de plásmidos de *S. aureus* en otras especies de *Staphylococcus* (113,114), *Bacillus subtilis* (54) y en *E. coli* (31) usando el plásmido como vector. Así mismo, *S. aureus* puede ser transformada por ADN aislado de *Bacillus subtilis* y *S. epidermidis*.

Recientemente se ha descrito un método de transformación que difiere de los tradicionales, que son largos y de bajo rendimiento. Este método es la electroporación (156), es una técnica rápida y con un alto rendimiento. Se basa en someter a las células receptoras a campos eléctricos que originan una apertura pasajera y reversible de los poros en la membrana celular, a través de la cual penetrarán las moléculas de ácido nucleico. Se ha detectado una frecuencia de más de 10^9 transformantes/ μg de ADN en cepas gram negativas, mientras que para los gram positivos es más baja, debido a que la entrada de ADN en el citoplasma es impedida por la gruesa pared celular que supone una barrera bastante efectiva a la penetración del ADN a través de la membrana celular.

5.8.- CURACION (6).-

La división de los plásmidos generalmente es paralela a la división celular a la hora de transmitirse de células madres a hijas. En algunas ocasiones puede producirse la pérdida espontánea ó bien provocada del plásmido como resultado de un defecto en la replicación del mismo. Esta pérdida se denomina CURACION. Las pérdidas espontáneas son frecuentes, pero en condiciones experimentales se pueden aumentar.

Este fenómeno es útil a la hora de demostrar si la resistencia a determinado antibiótico es de origen plasmídico ó no, verificando si existe correlación entre la pérdida de resistencia y la desaparición del ADN plasmídico. Esta técnica es particularmente útil en el caso de plásmidos autotransferibles ó no movilizables. Para ello se utilizan sustancias que inhiben la replicación plasmídica y por lo tanto ocasionan simultáneamente la pérdida de resistencia codificada por plásmidos. Se han utilizado como sustancias curantes, el naranja de acridina (96), bromuro de etidio (55), novobiocina (55), mitomicina C, rifampicina (210), acriflavina, duodecil-sulfato-sódico (SDS), temperatura (210). La temperatura es útil en plásmidos de *S. aureus*, ya que los mismos son inestables a 40-45° C. La novobiocina actúa inhibiendo la ADN girasa necesaria para superenrollar las cadenas de ADN.

La eficacia de estos agentes varía en función del plásmido en estudio y la sustancia utilizada. Puesto que el criterio de curación se pone de manifiesto por la pérdida de propiedad fenotípica transferida por el plásmido, es importante eliminar otros fenómenos tales como la mutación; ya que las sustancias empleadas suelen ser mutagénicas, es importante tener en cuenta que la irreversibilidad de la pérdida es un argumento en contra de la mutación.

5.9.- INCOMPATIBILIDAD (122,196).-

La incompatibilidad (Inc) es la incapacidad de dos plásmidos de coexistir en la misma célula de manera estable y en ausencia de presión selectiva.

Los plásmidos son unidades autonómicas autorreplicables. Unos dan lugar a una sólo copia de ADN, mientras otros originan varias. Cada plásmido controla el número de copias que debe haber en cada célula. Para la replicación necesitan unirse a un sitio específico de la membrana citoplasmática. Aquí surge la incompatibilidad al competir plásmidos emparentados por la misma posición en la membrana. La incompatibilidad ocurre entre plásmidos relacionados genéticamente y puede ser debida a que comparten elementos comunes implicados en el control de la replicación de los mismos. Por lo tanto, plásmidos con el mismo control de replicación son incompatibles, mientras que los que tienen diferente control de replicación, generalmente son compatibles.

La incompatibilidad es una propiedad estable hereditaria porque está asociada a la replicación de los genes. Por lo tanto, esta propiedad sirve de base para la clasificación de los plásmidos, siendo más adecuada que las basadas en genes de resistencia, ya que debido a las propiedades de transposición, genes similares de resistencia pueden resultar de plásmidos no relacionados. Se han determinado treinta grupos de incompatibilidades en *Enterobacterias* y quince grupos en *Staphylococcus aureus*. El grupo de incompatibilidad número quince engloba a plásmidos conjugativos sin fenotipo de resistencia descritos en cepas de *S. aureus* (196).

5.10.- OTROS TIPOS DE PLASMIDOS.-

La información que contienen los plásmidos es muy variada. Brevemente expondremos algunos tipos:

Factores F: contienen los genes necesarios para que se lleve a cabo la conjugación. También se denominan factores sexuales.

Factores col.: ó colicinogénicos, que portan la información genética de las bacteriocinas que son proteínas de determinadas bacterias letales para otras del mismo género ó semejantes.

Determinantes de patogenicidad: son plásmidos que determinan la patogenicidad de ciertas bacterias en los mamíferos. Los "Ent" codifican la síntesis de las enterotoxinas, mientras que los "Inv" son los responsables de la capacidad de penetración en las células epiteliales del intestino de bacterias enteroinvasivas tales como *Shigella* ó *E. coli*.

Factores R: ó de resistencia. Presentan los determinantes genéticos responsables de la resistencia en muchas bacterias. Pueden promover la elaboración de enzimas degradantes ó modificadoras como ya hemos visto: adenilasas, fosforilasas, acetilasas, β -lactamasas, etc. La importancia estriba desde el punto de vista clínico, ya que el uso intensivo e indiscriminado de los antibióticos selecciona la población resistente de la flora normal que puede transferir sus plásmidos de resistencia a microorganismos más patógenos.

MATERIAL Y METODOS

Las cepas de *Staphylococcus* objeto de este estudio fueron obtenidas a partir de cultivos procedentes de muestras de pacientes del Hospital Insular de Las Palmas.

Las muestras que llegaban al laboratorio se sembraban en agar sangre y se incubaban en una estufa a 37° C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se procedía a su identificación bioquímica y al análisis de su sensibilidad a antibióticos. Se eligieron aquellas cepas de *Staphylococcus* que expresaran resistencia a uno ó más aminoglicósidos.

CAPITULO VI.-

PRUEBAS ESPECIFICAS PARA *STAPHYLOCOCCUS*.-

6.1.- PRUEBA DE LA COAGULASA.-

Consiste en poner de manifiesto la enzima coagulasa que poseen algunos *Staphylococcus*. Estos gérmenes, incluidos en la especie *Staphylococcus aureus*, son considerados patógenos. Actualmente se sabe que hay *Staphylococcus* coagulasa negativos virulentos y productores de cuadros clínicos.

Medio de cultivo.- La prueba puede hacerse partiendo directamente de una colonia obtenida en la placa de aislamiento, pero es mejor utilizar un crecimiento de 18-24 horas obtenido de un medio líquido enriquecido, como la infusión cerebro-corazón.

Reactivo.- Se utiliza plasma de conejo.

Método.- Se depositan 0,5 ml de plasma dentro del tubo de hemólisis y se añaden 0,5 ml de un cultivo del germen en infusión cerebro-corazón ó se resuspenden 2-4 colonias con un asa de siembra. Se mezcla suavemente por rotación del tubo, sin agitar. Incubamos a 37° C, preferiblemente en baño de agua, observando el tubo cada treinta minutos, hasta las cuatro horas.

Resultado.- Se considera como prueba positiva la formación de un coágulo, que se manifiesta al inclinar el tubo. Los tubos se leen a las cuatro horas, pero no se da un resultado negativo (ausencia de coágulo) hasta transcurrido veinticuatro horas.

6.2.- PRUEBA DE LA PRODUCCION DE LIMO (147).-

La producción de limo por los estafilococos coagulasa negativos, se asocia con la capacidad que estos microorganismos tienen para adherirse a las superficies de catéteres, sondas, etcétera. Además, para muchos autores, es una propiedad importante para distinguir entre cepas de *Staphylococcus epidermidis* patógenas y no patógenas.

Método.- Se toma de la superficie de una placa de agar sangre, una colonia del microorganismo y se inocular en un tubo de poliestireno que contiene 5-10 ml de TSB, incubándose a continuación a 37° C durante 24-48 horas. Pasado ese tiempo, el contenido del tubo se elimina, se lava con agua destilada y se tiñe con safranina.

Resultado.- La producción de limo se considera positiva si se aprecia una película visible en las paredes del tubo. La formación de un anillo en la interfase líquido-aire no se considera indicativo de producción de limo.

CAPITULO VII.-

IDENTIFICACION BIOQUIMICA.-

La identificación bioquímica se ha realizado utilizando el sistema **API-STAPH**. Este es un sistema de identificación de los *Micrococcaceae* que se basa en 19 caracteres.

Las diferentes pruebas de la galería se presentan de forma deshidratada. Su reconstitución se realiza añadiendo a cada tubo el medio apropiado inoculado con la cepa a estudiar, que previamente se ha debido cultivar en un medio sólido, usándose habitualmente el agar P. La incubación se hace a 35-37° C durante 18 horas (a veces 48 horas). La lectura e interpretación las veremos en la tabla 9. La identificación está basada en la clasificación de Kloos-Schleifer.

Tabla 9.- Lectura e interpretación de las diferentes pruebas del API-STAPH.-

PRUEBA	SUSTRATO	NEGATIVO	POSITIVO
GLU	D-GLUCOSA	ROJO	AMARILLO
FRU	D-FRUCTOSA	ROJO	AMARILLO
MNE	D-MANOSA	ROJO	AMARILLO
MAL	MALTOSA	ROJO	AMARILLO
LAC	LÁCTOSA	ROJO	AMARILLO
TRE	D-TREHALOSA	ROJO	AMARILLO
MAN	D-MANITOL	ROJO	AMARILLO
XLT	XILITOL	ROJO	AMARILLO
MEL	D-MELOBIOSA	ROJO	AMARILLO
NIT	NITRATO DE POTASIO	INCOLORA	ROJO
PAL	β-NAFTIL FOSFATO	AMARILLO	VIOLETA
VP	PIRUVATO DE SODIO	INCOLORA	VIOLETA
RAF	RAFINOSA	ROJO	AMARILLO
XYL	XILOSA	ROJO	AMARILLO
SAC	SACAROSA	ROJO	AMARILLO
MDG	α-METIL D-GLUCOSA	ROJO	AMARILLO
NAG	N-ACETIL D-GLUCOSA	ROJO	AMARILLO
<u>ADH</u>	ARGININA	AMARILLO	ROJO
<u>URE</u>	UREA	AMARILLO	ROJO

CAPITULO VIII.-

MEDIOS DE CULTIVOS.-

8.1.- MEDIOS DE AISLAMIENTO.-

* Agar Salado Manitol (Difco) :

Composición :

Proteosa-Peptona	10,000 g
Extracto de carne	1,000 g
Bacto-D-Manitol	10,000 g
Cloruro sódico	75,000 g
Agar	15,000 g
Rojo fenol	0,025 g
pH (25° C) :	7,4 ± 0,2

Preparación :

Se rehidratan 111 gramos del medio en un litro de agua destilada, calentando hasta su total disolución. Se esteriliza en autoclave a 121° C durante 15 minutos. Se distribuye en placas de Petri de 10 cm de diámetro, las cuales una vez solidificadas, se incuban a 37° C durante 24 horas para asegurar su esterilidad.

* Agar Sangre :

Composición : Como medio base se utilizó Agar con soja tréptica (Difco).

Triptona	15,0 g
Peptona de soja	5,0 g
Cloruro sódico	5,0 g

Agar 15,0 g

pH (25° C) : 7,3

Preparación :

Se rehidratan 40 gramos del medio en un litro de agua, calentando hasta su total disolución. Se esteriliza en autoclave a 121° C durante 15 minutos. Cuando el medio está aproximadamente a 45° C se le añade la sangre en condiciones asépticas. Se dispone el medio en placas de Petri de 10 cm de diámetro y se espera que se solidifique. Las placas se incuban a 37° C durante 24 horas para asegurar su esterilidad.

8.2.- MEDIOS DE PROPAGACION.-

*** Agar de infusión cerebro y corazón (Difco) :**

Composición :

Infusión de cerebro de ternera	200,0 g
Infusión de cerebro de buey	250,0 g
Proteosa-Peptona	10,0 g
Dextrosa	2,0 g
Cloruro sódico	5,0 g
Fosfato disódico	2,5 g
Agar	15,0 g

pH (25° C) : 7,4

Preparación :

Se rehidratan 52 gramos del medio en un litro de agua destilada calentando hasta su total disolución. Se esteriliza en autoclave a 121° C durante 15 minutos. Se distribuye en placas de Petri de 10 cm de diámetro, las cuales una vez solidificadas, se incuban a 37° C durante 24 horas para asegurar su esterilidad.

*** Caldo de infusión cerebro-corazón (Difco) :**

Composición :

Infusión de cerebro de ternera	200,0 g
Infusión de corazón de buey	250,0 g
Proteosa-Peptona	10,0 g
Dextrosa	2,0 g
Cloruro sódico	5,0 g
Fosfato disódico	2,5 g
pH (25° C) :	7,4

Preparación :

Se rehidratan 37 gramos del medio en un litro de agua destilada agitando hasta su total disolución. Se dispensa la cantidad deseada en tubos y se esteriliza en autoclave a 121° C durante 15 minutos. Se incuba a 37° C durante 24 horas para asegurar su esterilidad.

8.3.- MEDIOS PARA LA CONSERVACION DE LAS CEPAS.-

Composición :

Bacto-Peptona (Difco)	10,0 g
Cloruro sódico	5,0 g
Bacto-Agar	10,0 g

Preparación :

Se resuspenden los ingredientes en un litro de agua destilada calentando hasta su total disolución. Se dispensa el medio en tubos pequeños con tapón de rosca. Se esteriliza en autoclave a 121° C durante 15 minutos y se deja solidificar con los tubos inclinados. Se incuban a 37° C durante 24 horas para asegurar su esterilidad.

8.4.- MEDIOS PARA EL ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD A ANTIBIOTICOS.-

* Agar de Mueller-Hinton (Difco) :

Composición :

Infusión de carne	300,0 g
Acidos de Casamino	17,5 g
Almidón	1,5 g
Agar	17,0 g
pH (25° C) :	7,4

Preparación :

Se rehidratan 38 gramos del medio en un litro de agua destilada, calentando hasta su total disolución. Se esteriliza en autoclave a 121° C durante 15 minutos. Se distribuye en placas de Petri de 15 cm de diámetro. Una vez solidificadas las placas, se incuban en estufa a 37° C durante 24 horas para asegurar su esterilidad.

8.5.- MEDIOS PARA LA EXTRACCION DEL ADN PLASMIDICO.-

* Medio LB ("Luria-Bertani") :

Composición :

Bacto-Triptona	10,0 g
Extracto de levadura	5,0 g
Cloruro sódico	5,0 g

Preparación :

Se resuspenden los ingredientes en un litro de agua destilada y se agita la mezcla hasta su total disolución. Se distribuye en tubos y se esteriliza en autoclave a 121° C durante 15 minutos.

8.6.- MEDIO PARA CONJUGACION.-

* Agar infusión cerebro y corazón con antibióticos :

El agar infusión de cerebro y corazón se prepara como vimos anteriormente, pero antes de distribuirlo en placas se deja enfriar hasta 55-60° C. A esta temperatura se le añade las soluciones de antibióticos. Se mezcla bien y se reparte en placas.

El agar infusión de cerebro y corazón con antibióticos se utiliza para seleccionar a los transconjugantes. En la selección de los transconjugantes se utiliza este medio con novobiocina y un aminoglicósido. La concentración de novobiocina en las placas es de 4 mg/l; de gentamicina, neomicina y estreptomina es de 10 mg/l; de tobramicina es de 20 mg/l.

En la selección de las cepas curadas se utiliza este medio con el aminoglicósido sólo, en las concentraciones ya vistas, ó bien usamos penicilina en una concentración de 10 unidades/ml.

8.7.- MEDIOS PARA TRANSFORMACION.-

* Medio de TSB (Difco) :

Composición :

Bacto-Triptona	17,0 g
Bacto-Soitona	3,0 g
Bacto-Dextrosa	2,5 g
Cloruro sódico	5,0 g
Fosfato dipotásico	2,5 g
pH (25° C) : 7,3±0,2	

Preparación :

Se rehidratan 30 gramos del medio en un litro de agua destilada agitando hasta su total disolución. Se dispensa en tubos la cantidad deseada y se esteriliza en autoclave a 121° C durante 15 minutos. Se incuba a 37°C durante 24 horas para asegurar su esterilidad.

*** Medio de TSA (Difco) :**

Composición :

Bacto-Triptona	15 g
Bacto-Soitona	5 g
Cloruro sódico	5 g
Agar	15 g
pH (25° C) :	7,3±0,2

Preparación :

Se rehidratan 40 gramos del medio en un litro de agua destilada calentando hasta su total disolución. Se esteriliza en autoclave a 121° C durante 15 minutos. Se distribuye en placas de Petri de 10 cm de diámetro, las cuales una vez solidificadas, se incuban a 37° C durante 24 horas para asegurar su esterilidad.

*** Agar infusión cerebro y corazón con antibióticos :**

Al igual que vimos anteriormente, este medio se utiliza para seleccionar a los transformantes. En esta selección sólo se utiliza el antibiótico aminoglicósido, en concentraciones de 10 mg/l para la gentamicina, neomicina y estreptomycinina, y 20 mg/l para la tobramicina.

8.8.- MEDIO PARA LA IDENTIFICACION POR API-STAPH.-

* Agar P :

Composición :

Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
Cloruro sódico	5 g
Glucosa	1 g
Agar	15 g

pH (25° C) : 7,2

Preparación :

Se disuelven los componentes del medio en un litro de agua destilada, calentando hasta su total disolución. Se esteriliza en autoclave a 121° C durante 15 minutos. Se distribuye en placas de 10 cm de diámetro, las cuales una vez solidificadas, se incuban a 37° C durante 24 horas para asegurar su esterilidad.

CAPITULO IX.-

ESTUDIO DE LA SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS.-

9.1.- ANTIBIOGRAMA.-

El antibiograma supone el estudio *in vitro* del comportamiento de los antibióticos y quimioterápicos frente a un microorganismo. Determina la sensibilidad o resistencia de una bacteria a los antibacterianos de uso clínico.

Conviene puntualizar que los términos antibiótico, antibacteriano y quimioterápico, se emplean a menudo indistintamente para designar cualquier sustancia de uso médico utilizable en el tratamiento de enfermedades infecciosas.

Con el antibiograma se trata de reproducir *in vitro* la situación en que se encuentra el microorganismo en el huésped humano. El resultado de estas técnicas de determinación de sensibilidades puede estar influenciado por las condiciones y los factores que intervienen en las mismas, por lo que se ha tratado de estandarizar estas variables. Así pues, el procedimiento utilizado es el método de Kirby-Bauer de difusión en placa.

Se emplea agar de Mueller-Hinton (Difco) que carece de ácido para-amino-benzóico, antagonista de las sulfamidas. A partir de una colonia aislada se prepara una suspensión bacteriana en solución salina estéril hasta obtener un inóculo aproximadamente de 10^6 UFC/ml. Con un hisopo estéril humedecido en la solución se impregna uniformemente toda la placa, en forma de barniz continuo. Una vez seca, se colocan los discos de antibióticos. Incubamos a 37° C durante 24 horas y a continuación se miden los

halos de inhibición que se hayan originado alrededor del disco.

Atendiendo a los criterios de interpretación utilizados habitualmente, las bacterias las podemos clasificar en:

Sensibles: Las que son inhibidas fácilmente con las concentraciones de antibióticos que se alcanzan en sangre tras la administración de las dosis que se consideran normales.

Moderadamente sensibles: Son aquellas que se inhiben sólo con las concentraciones que se alcanzan en las zonas donde el antibiótico se concentra ó con concentraciones que se alcanzan en sangre tras la administración de dosis más elevadas de las habituales.

Resistentes: Las que no son inhibidas con las concentraciones alcanzadas en sangre tras la administración de las dosis máximas empleadas en clínica.

9.2.- METODO DE DILUCION EN AGAR.-

La dilución es el método cuantitativo de referencia para la determinación de la sensibilidad y la resistencia de los microorganismos. Su fundamento es la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano, que se encuentra diluido en el medio de cultivo.

La concentración mínima inhibitoria (CMI) para una cepa y un antibiótico dados, se define como la menor concentración del fármaco a la que no hay crecimiento

visible.

El cálculo de CMI se realiza mediante el método de macrodilución en placa usando el replicador de Steer.

Se preparan diluciones seriadas de cada antibiótico, de modo que cada concentración sea la mitad de la anterior.

Estos agentes antimicrobianos en solución se incorporarán a las placas de Mueller-Hinton, en una proporción de 2:18 (ml). La adición del antibiótico se hace a una temperatura no superior a los 50° C. La mezcla se deja solidificar situando las placas en una superficie horizontal. El intervalo de concentraciones usadas varía de 0,06 µg/ml hasta 512 µg/ml.

Por otro lado se preparan suspensiones bacterianas en solución salina estéril hasta obtener una turbidez equivalente a la del patrón McFarland 0,5, que equivale a 10⁸ UFC de *Staphylococcus*. Se rellenan los pocillos del replicador con 500 µl de estas suspensiones, todo ello en condiciones estériles, mojamos el cabezal del replicador en los pocillos e inóculamos la placa.

Las placas se incuban en una estufa a 37° C durante 18-24 horas. Transcurrido este tiempo, la menor concentración de antibiótico a la cual no se observa crecimiento visible es la que se toma como CMI.

Sin embargo, existen problemas que pueden presentarse al llevar a cabo ensayos de sensibilidad con estafilococos resistentes a la meticilina. Esto es debido a la

presencia de microorganismos denominados heterorresistentes, que indican que cada cultivo contiene subpoblaciones sensibles y resistentes. La subpoblación resistente a la meticilina, en general, se desarrolla más lentamente que la subpoblación sensible. Debido a que las células resistentes se multiplican con mayor rapidez a temperatura más baja y con un contenido salino del medio entre 2-5%, se introdujo una modificación en el método de detección (79,174). Así, la temperatura de incubación es de 30° C y el tiempo de incubación de 24 horas. En el caso de *Staphylococcus epidermidis* no se puede dar un resultado negativo hasta transcurrido 48 horas.

El medio de cultivo empleado es Mueller-Hinton suplementado con cationes y con una concentración de cloruro sódico del 2%. El inóculo que consideramos es el equivalente al 0,5 de la escala McFarland. Se ha de observar cuidadosamente la inhibición del crecimiento en los pocillos.

CAPITULO X.-

OBTENCION DE EXTRACTOS ENZIMATICOS.-

Se inoculan 100 ml de caldo de infusión de cerebro y corazón con un cultivo fresco del microorganismo en estudio.

Se incuba durante 24 horas a 37° C con agitación en un agitador orbital (Lab-Line Instrument Inc.). Se recoge en tubos de centrífuga de 200 ml. Se centrifugan durante 10 minutos a 8000 rpm en una centrífuga Sorvall RC5B refrigerada a 4° C. Se desecha el sobrenadante y se lava el sedimento con tampón de sonicado frío (4° C). La centrifugación y el lavado se repiten dos ó tres veces.

Tras la última centrifugación, se resuspende el sedimento en 2 ml de tampón de sonicado frío. Se transfiere a un tubo cónico de vidrio. A continuación, le añadimos lisostafina (Sigma), en una concentración del 1,5 % sobre el volumen final. Dejamos actuar la lisostafina, poniendo los tubos durante dos horas en un baño de agua a 37° C.

Transcurrido este tiempo, se observará un cambio en la transparencia, tomamos los tubos y los ponemos en hielo para llevar a cabo la sonicación. Esta se realiza a una amplitud de 70 watos en un sonicador Lab-Sonic System con microtip (Lab-Line Instrument Inc. EEUU). Se dan pulsos de sonicación de 40 segundos con intervalos de 20 segundos entre dos pulsos, hasta totalizar cinco minutos.

Una vez efectuada la sonicación se transfiere con pipetas Pasteur a los tubos

de centrífuga de 10 ml. Se centrifuga 30 minutos a 20000 rpm. Se recoge el sobrenadante y se reparte en alícuotas. Luego se congela hasta su posterior utilización.

CAPITULO XI.-

ENSAYO DE ENZIMAS MODIFICADORAS DE AMINOGLICOSIDOS.-

La actividad de las enzimas modificadoras se puede detectar por medio de un ensayo de fijación en papel de fosfo celulosa, ideado por Davies y col., el cual mide la transferencia de radioactividad desde un cofactor adecuado al antibiótico.

La mezcla de reacción consta de tampón, cofactor marcado radioactivamente, extracto enzimático y solución de antibiótico. El fundamento es el siguiente: la parte marcada del cofactor pasará al antibiótico por acción de la enzima modificadora; por la presencia de grupos aminos, los aminoglicósidos adquieren carácter básico (pH entre 5 y 9) y además están cargados positivamente; ambas propiedades les permiten enlazarse fácilmente a papel de fosfo celulosa, cargado negativamente. Si impregnamos un papel de fosfo celulosa con la mezcla de reacción después de producida ésta, y lavamos con agua para parar la reacción, la medida de radioactividad nos dará la información que necesitamos. Por lo tanto, si se detecta radioactividad, nos confirma la presencia de una enzima modificadora.

11.1.- TÉCNICA.-

Los componentes del ensayo se mezclan en tubos de 1x7 mm colocados en baños de hielo. Estos componentes varían dependiendo del tipo de actividad que queremos detectar.

*** Ensayo de Fosforilación :**

- 10 μl de tampón de fosforilasa
- 10 μl de la solución de ^{32}P -ATP
- 10 μl de extracto enzimático
- 2 μl de solución de antibiótico de 10 mg/ml

*** Ensayo de Nucleotidilación :**

- 10 μl de tampón de adenilasa
- 10 μl de solución de ^{14}C -ATP
- 10 μl de extracto enzimático
- 2 μl de solución de antibiótico de 1 mg/ml

*** Ensayo de Acetilación :**

- 10 μl de tampón de acetilasa
- 10 μl de solución de ^{14}C -Acetil-Coenzima A
- 10 μl de extracto enzimático
- 2 μl de solución de antibiótico de 1 mg/ml

Se deben colocar en cada serie de ensayos, tubos control en los que se mezclan todos los componentes excepto uno, que bien puede ser el extracto ó el antibiótico.

Agitamos los tubos y los ponemos a incubar en un baño a 30 °C durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, volvemos a colocar los tubos en el baño de hielo y transferimos 20 μl de cada tubo a un cuadrado (1 cm^2) de papel de fosfofelulosa Whatman P-81 (Bolston LTD, England), numerado con lápiz y sujeto con alfileres a un bloque de poliuretano.

Después de 30 segundos a temperatura ambiente, los papeles, con sus correspondientes alfileres, se introducen en un vaso de precipitado con 500 ml aproximadamente de agua destilada a 80 °C durante 3 ó 4 minutos, con el fin de detener la reacción. El líquido, que contiene cofactor marcado y que no ha sido empleado, se desecha. Los papeles se lavan tres o cuatro veces con agua destilada fría y luego se secan con lámpara de rayos infrarrojos.

Los papeles se colocan en viales que contienen 5 ml de la solución de contador de centelleo, y se cuentan (Beckman Liquid Scintillation System, model LS-100C).

El curso de la inactivación con el tiempo se puede determinar por simple aumento de la cantidad de mezcla de reacción y tomando muestras a diferentes tiempos para contarlas. Las variaciones de actividad por cambios de la concentración de sustratos se pueden estudiar realizando el ensayo con diferentes concentraciones de antibióticos.

11.2.- REACTIVOS.-

* **Tampón de sonicado** : Tris-HCl 10mM, MgCl₂ 10mM, NH₄Cl 25mM, β-mercaptoetanol 0,6 mM, pH : 7,6-7,8.

Composición :

Tris-HCl 50mM	200ml
Trizma-HCl	5,72g
Trizma-base	1,66g
Agua destilada csp	1000ml
MgCl ₂ .6H ₂ O	2,0330g
NH ₄ Cl	1,3375g

β -mercaptoetanol(δ :1,1168 g/ml)	0,42ml
Agua destilada csp	1000ml

Preparación :

Mezclar los componentes y disolver bien. Ajustar el pH entre 7,6 y 7,8 con HCl ó con NH₄OH.

*** Tampón de fosforilasa :**

Composición :

Tris-HCl 1M	2,00ml
Trizma-HCl	14,04g
Trizma-base	1,34g
Agua destilada csp	100ml
MgCl ₂ 1M	1,25ml
MgCl ₂ .6H ₂ O	20,33g
Agua destilada csp	100ml
NH ₄ Cl 2M	6,00ml
NH ₄ Cl	10,69ml
Agua destilada csp	100ml
Ditiotreitol 0,5M	0,10ml
DTT	3,86ml
Agua destilada csp	50ml
Agua destilada	15,00ml
Acido maléico 1M	

Preparación :

Se mezclan los componentes y se ajusta el pH a 7,1 (4° C) con ácido maléico 1M. Se completa con agua destilada hasta 30 ml y se vuelve a ajustar el pH. Si es

ácido, se ajusta con amoniaco.

*** Tampón de adenilasa :**

Composición :

Tris-HCl 1M	2,00ml
MgCl ₂ 1M	1,25ml
NH ₄ Cl 2M	6,00ml
Ditiotreitol 0,5M	0,10ml
Agua destilada	15,00ml
Acido maléico	

Preparación :

Mezclar y disolver bien. Ajustar el pH a 8,0 (4° C) con ácido maléico. Completar hasta 30 ml con agua destilada. Ajustar el pH de nuevo. Si es ácido se ajusta con amoniaco.

*** Tampón de acetilasa :**

Composición :

Tris-HCl 1M	25ml
MgCl ₂ 1M	5ml
NH ₄ Cl 1M	10ml
Ditiotreitol 0,5	1ml
Agua desionizada	40ml

Preparación :

Mezclar y disolver bien. Ajustar el pH a 7,1 (30° C) con HCl ó ácido maléico y se completa hasta 100 ml con agua desionizada.

*** Solución de ^{32}P -ATP :**

Composición :

ATP 50mM pH:7,2	15 μl
ATP	0,2756g
Agua destilada	10ml
^{32}P -ATP	10-100 μl

El isótopo de fósforo ^{32}P tiene una vida media muy corta. Pasado un mes de la fecha de marcaje del ATP hay que añadir 10 μl más por cada semana que pase. Sólo se puede llegar hasta 100 μl , ya que pasado ese tiempo el ^{32}P ha perdido su actividad completamente.

Preparación :

Se mezcla cada componente y se mide la actividad de la preparación. Se considera útil una actividad de unas 20000 cpm/ μl de solución. Si da menos debe añadirse más ^{32}P -ATP. Para un ensayo prospectivo se puede utilizar con menos actividad.

*** Solución de ^{14}C -ATP (10 $\mu\text{Ci/ml}$) :**

Composición :

ATP 0,1M	25 μl
ATP	5,072g
Agua	100ml
^{14}C -ATP (25 $\mu\text{Ci/ml}$)	1ml
Agua desionizada	1,475ml

Preparación :

Mezclar y comprobar la actividad.

*** Solución de ^{14}C -Acetil-Coenzima A :**

Composición :

^{14}C -Acetil-Coenzima A (50-60Ci/mol)

Acetil-Co A tritium 3,52mg

Agua desionizada 6ml

Preparación :

El ^{14}C -Acetil-Co A viene liofilizado en envases con 50-60 Ci/mol de actividad. A este envase se le añaden 2 ml de agua y se agita. Pesamos los 3,52 mg de Acetil-Co A sin marcar y lo disolvemos en 4 ml de agua. A continuación se mezclan las dos soluciones y se comprueba la actividad resultante.

*** Solución de antibióticos :**

Ensayo de fosforilasas 10mg/ml

Ensayo de nucleotidasa y acetilasa 1mg/ml

*** Líquido de centelleo :**

Composición :

PPO (2,5-Difeniloxazol) 3,0g

POPOP* 0,1g

*(1,4-bis[2-(5-feniloxazolil)]benzeno)

Tolueno 1000ml

Preparación :

Se mezclan los componentes y se dejan agitando toda la noche.

CAPITULO XII.-

DETERMINACION DEL CONTENIDO PROTEICO.-

12.1.- METODO DE LOWRY.-

El método de Lowry es uno de los métodos colorimétricos más usados para la determinación cuantitativa de proteínas en una solución.

12.1.1.-Técnica.-

La determinación cuantitativa depende de la reacción que transcurre entre el reactivo de fenol de Folin-Ciocalteu y los residuos de tirosina existentes en la proteína desconocida. La intensidad del color se compara con la obtenida por una curva patrón realizada con una proteína estándar, generalmente se usa albúmina bovina.

12.1.2.- Método.-

Se ha de realizar primero una curva patrón de albúmina bovina a concentraciones entre 100 y 700 $\mu\text{g/ml}$.

La solución estándar se prepara con agua destilada y albúmina bovina en concentración de 1 mg/ml. A partir de ésta, se preparan soluciones de 100, 200, 300, 400, 500, 600 y 700 $\mu\text{g/ml}$ de la siguiente forma:

<u>Tubos</u>	<u>ml sol. estándar</u>	<u>ml agua</u>	<u>µg/ml</u>
1	-	1	-
2	0,1	0,9	100
3	0,2	0,8	200
4	0,3	0,7	300
5	0,4	0,6	400
6	0,5	0,5	500
7	0,6	0,4	600
8	0,7	0,3	700

Por último se colocan los tubos correspondientes a la muestras, con un volumen final de 1 ml y realizada la dilución conveniente de tal manera que la concentración protéica quede dentro del margen marcado por la curva patrón.

Se agregan a tiempo cero 5 ml de la solución alcalina de cobre, agitando bien. Transcurridos 10 minutos a temperatura ambiente, se añaden 0,5 ml del reactivo diluido de Folin-Ciocalteu, mezclándose de nuevo con agitación; dejamos que reaccione durante 25 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Una vez a pasado este tiempo, leemos a 630 nm en el espectrofotómetro (SEAC-CH-100).

12.1.3.- *Reactivos.-*

*** Albúmina bovina (Sigma).-**

* **Solución alcalina de cobre.**- Es de preparación extemporánea. Se mezclan 50 ml de solución de carbonato sódico al 2% en NaOH 0,1 N con 1 ml de solución de $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ al 0,5% en tartrato sódico al 1%.

* **Reactivo diluido de Folin.**- Se utiliza el reactivo de fenol de Folin-Ciocalteu, que en el momento de hacer la determinación se diluye al doble con agua destilada.

12.1.4.- *Cálculos.*-

Con las absorbancias obtenidas por las distintas concentraciones de la solución estándar, se construye la curva patrón de albúmina, representando en ordenadas las densidades ópticas y en abscisas las concentraciones protéicas ($\mu\text{g/ml}$) correspondientes. Sobre ella llevamos los valores de densidad óptica de las muestras problemas, deduciéndose por interpolación la concentración protéica final, teniendo en cuenta las diluciones previas que hemos hecho.

CAPITULO XIII.-

TRANSFERENCIA DEL MATERIAL GENETICO.-

13.1.- TRANSFERENCIA CONJUGATIVA.-

El proceso está basado en el de Forbes y Schaberg (55), pero con algunas modificaciones (52). Se inicia inoculando la cepa donadora y la cepa receptora en tubos con 5 ml de caldo cerebro y corazón ó medio LB, los cuales contienen CaCl_2 0,01M. Se incuban en un agitador orbital a 37° C durante 24 horas. Pasado este tiempo, se mezclan ambas soluciones y se pasan a través de un filtro de nitrocelulosa de 0,45 μm de diámetro de poro (Millipore). El filtro se coloca inmediatamente después sobre una placa de medio rico como puede ser agar de infusión cerebro y corazón (Difco), tocando la masa bacteriana la superficie de la placa. Después de incubar a 37° C durante toda una noche, cada filtro se transfiere a 10 ml de solución salina y se agita vigorosamente. De esta suspensión se toman 150 μl y se extienden en una placa de agar de infusión cerebro y corazón que contiene un aminoglicósido y novobiocina. Posteriormente se incuba en estufa durante 24 horas. Igualmente, se extendieron en placas controles, la cepa receptora y la cepa donadora por separado.

Una modificación de este método, es la incubación de los filtros directamente en placas de agar de infusión cerebro y corazón que contiene el antibiótico aminoglicósido y la novobiocina (52).

A las colonias aisladas se les hace un antibiograma y se procede a realizar

su identificación bioquímica por medio del API-STAPH.

La cepa usada como receptora de conjugación es *Staphylococcus aureus ssp. aureus*, procedente de la Colección Española de Cultivos Tipo nº 4146 NCIB 10819, que se caracteriza por ser resistente a la novobiocina.

13.2.- TRANSFORMACION.-

Se ha empleado el método de transformación para *Staphylococcus aureus* ideado por Lindberg (114).

Para el estudio de desarrollo de competencia, la célula receptora se cultiva en una placa de TSA a 37° C durante toda la noche. Posteriormente, se suspende en tubos con 10 ml de TSB y se lleva hasta una densidad óptica de 0,100 a 524 nm. ($DO_{524}:0,100$), la cual equivale a 5×10^7 UFC/ml.

La suspensión celular se diluye diez veces en TSB y se incuba en un agitador orbital a 37° C. Se van tomando muestras a lo largo del crecimiento. Estas se lavan con $CaCl_2$ 0,1 M estéril y frío, en tubos de centrifuga también estériles; se centrifugan a 8000 rpm durante 20 minutos a 4° C y se resuspenden posteriormente en un volumen apropiado de $CaCl_2$ 0,1 M estéril para alcanzar una densidad aproximada de 10^9 UFC/ml, siempre permaneciendo en hielo. La competencia permanece más ó menos al mismo nivel desde una $DO_{524}:0,100$ hasta una $DO_{524}:0,250$.

Las suspensiones se mantienen a 4° C hasta el día siguiente. Ahora ya tenemos la cepa de *Staphylococcus aureus* competente, es decir, ya preparada para poder

adquirir el ADN.

Como cepa receptora, se empleó el *S. aureus ssp. aureus*, procedente de la Colección Española de Cultivos Tipo nº 4146 NCIB 10819.

En los experimentos de transformación se mezclan 0,9 ml de la suspensión celular competente con 0,1 ml de la solución de ADN (en TE ó agua destilada). A continuación esta mezcla se incuba en un baño con agitación a 37° C durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo, se centrifugan las células y se resuspenden en 1 ml de TSB, se incuban 1 ó 2 horas a 37°C. Se toman de cada suspensión 150 µl y se extienden en placas de agar infusión cerebro y corazón con un aminoglicósido. Estas placas se incuban a 37° C durante 24 a 48 horas.

A las colonias que hayan crecido, se les hace un antibiograma y se procede a su identificación bioquímica con el sistema API-STAPH. De este modo se confirma la adquisición de resistencia. Se realiza también una extracción de plásmidos para comprobar si se ha introducido un plásmido, ó si bien la transformación fue de ADN cromosómico.

13.3.- CURACION DE PLASMIDOS.-

Aunque la curación de plásmidos no es un método para la transferencia de material genético, la incluimos en este capítulo, ya que al igual que la conjugación y la transformación nos ayuda a detectar plásmidos que determinan resistencia a antibióticos.

El método que empleamos fue el utilizado por Lyon y colaboradores (120). Se preparan diluciones crecientes del agente curante a emplear en 2 ml de medio LB (Luria-Bertani) a un pH:7,6. El pH es de suma importancia para esta técnica. Se toma un inóculo

de 100 μ l procedente de un cultivo de 18 horas en LB y se distribuye en cada uno de los tubos. Se incuban a 37° C ó bien a 44° C en la oscuridad (a fin de evitar fenómenos de fotorreactivación que conducen a la reparación del ADN y por tanto, a la persistencia del plásmido) durante 18-24 horas. A continuación, tomamos el tubo procedente de la concentración inmediatamente inferior al valor de su concentración mínima inhibitoria y diluimos el cultivo hasta obtener un inóculo de 200-300 colonias.

Extendemos en una placa de agar infusión cerebro-corazón 100 μ l de la dilución procedente de este tubo y de los dos con concentraciones inmediatamente inferior. Incubamos estas placas a 37° C durante toda la noche.

Transcurrido este tiempo, replicamos las colonias crecidas, por medio de terciopelo, a una placa de agar de infusión cerebro-corazón que contiene un antibiótico aminoglicósido ó bien penicilina. Incubamos de nuevo estas placas a 37° C durante 24 horas y observamos que las colonias que no han crecido ahora son las que presentan un cambio en sus resistencias. Posteriormente se realiza una extracción de su ADN plasmídico para comprobar si el cambio fenotípico va acompañado de la ausencia del plásmido.

Como agentes curantes empleamos el Bromuro de Etidio y el Naranja de Acridina; dándonos mejores resultados éste último.

CAPITULO XIV.-

ANALISIS DEL ADN PLASMIDICO.-

14.1.- EXTRACCION DEL ADN PLASMIDICO.-

La extracción del ADN plasmídico, se basa fundamentalmente en el método empleado por Coia y col.(25), si bien se han introducido algunas modificaciones basándonos en otros métodos descritos (95,119,132,176).

Se prepara un cultivo de las cepas en estudio en 5 ml de medio LB y se incuba a 37° C toda la noche.

Se centrifugan 1,5 ml del cultivo en tubos Eppendorf a 14000 rpm durante 5 minutos en una centrífuga Eppendorf 5415 C. Se elimina el sobrenadante y se repite la misma operación hasta haber recogido todas las células del cultivo. Por último se elimina el sobrenadante al vacío.

Se lava el sedimento con 500 μ l de una solución que contiene Tris 50 mM, NaCl 50 mM y EDTA disódico 5 mM, todo ello a pH:8 (TES). Se centrifuga durante 5 minutos.

A continuación, se resuspende el sedimento en 400 μ l de TES que contiene sacarosa 50 mM, y al que se le ha añadido 50 μ l de lisostafina (1 mg/ml) y lisozima (40 mg/ml). Se mezcla por inversión repetida del tubo. Posteriormente se incuba en baño 30

minutos a 37 °C.

Se añade luego 400 μ l de tampón de lisis y se vuelve a incubar otros 30 minutos a 37 °C. Pasado este tiempo, se neutraliza la reacción a pH:8.0 (\pm 0,5) añadiendo 30 μ l de Tris HCl 2M pH:7.

Se mezcla suavemente el tubo. Se añade a continuación 200 μ l de la solución de acetato potásico 3M pH:4,8. Se mezcla por inversión del tubo. Mantenemos 10 minutos en hielo a los tubos y luego centrifugamos 5 minutos.

Del sobrenadante se cogen 400 μ l evitando tocar el precipitado y se transfiere a un nuevo tubo Eppendorf.

Se añaden ahora 600 μ l de TEK-fenol-cloroformo (1:1) y se agita con el agitador de tubos. Centrifugamos 7 minutos al máximo de revoluciones.

Se recogen 450 μ l de la fase acuosa superior evitando tocar la interfase blanquecina, y se pasa a un nuevo tubo Eppendorf.

Se añaden 800 μ l de Etanol (96%) a -20° C y se mezcla por inversión,. Los tubos se mantienen 10 minutos a -70° C ó 1 hora a -20° C. Hemos obtenido mejores resultados dejándolos a -20° C hasta el día siguiente. Posteriormente se centrifugan 7 minutos a 14000 rpm.

Se elimina con precaución el Etanol, evitando resuspender el precipitado de ADN. Se añaden 500 μ l de Etanol al 70% a temperatura ambiente y se mezcla de nuevo por

inversión. Se centrifuga 5 minutos y se elimina con precaución el Etanol. Para que se evapore completamente el Etanol restante, mantenemos los tubos abiertos en estufa a 45°C durante 10 minutos. Una vez secos, se le añaden de 30 a 50 μ l de agua fría destilada y estéril ó TE. Se disuelve el precipitado y se le da un pulso en la centrífuga.

14.2.- ELECTROFORESIS DE ADN EN GEL DE AGAROSA.-

Los geles se preparan disolviendo la agarosa por calentamiento en tampón Tris-acetato (TAE). La disolución se vierte en una bandeja en la que se ha dispuesto el peine para formar los pocillos en los que irá colocada la muestra. Se utiliza una concentración de agarosa del 0,7%.

La electroforesis se lleva a cabo sumergiendo el gel en una cubeta horizontal que contiene tampón TAE y en cuyos extremos se colocan los electrodos.

El ADN se visualizará en el gel por tinción con Bromuro de Etidio (0,4-1,0 μ g/ml) durante 15-30 minutos, y posterior exposición a la luz ultravioleta con un transiluminador LKB 2011 MACROVUE.

Los geles se fotografan con una cámara Polaroid MP-a y carretes Polaroid 667.

14.3.- REACTIVOS PARA EL ANALISIS DE ADN PLASMIDICO.-

* **TES:** Tampón de Tris-base 50mM, EDTA 5mM y Cloruro Sódico 50mM.

Composición :

Trizma-base	6,05g
EDTA	1,86g
Cloruro Sódico	2,92g
Agua destilada csp	1000ml

Preparación :

Disolver los componentes anteriores y ajustar el pH a 8. Esterilizar en autoclave 15 minutos a 121° C. Se puede conservar a temperatura de laboratorio.

* **TES-sacarosa:** Tampón TES que contiene sacarosa 50 mM.

Composición :

Trizma-base	6,05g
EDTA	1,86g
Cloruro Sódico	2,92g
Sacarosa	17,11g
Agua destilada csp	1000ml

Preparación :

Disolver los componentes de la mezcla y ajustar el pH a 8.

* **Tampón de lisis :**

Composición :

a) SDS al 4% en TE (Tris-base 50mM y EDTA 10mM):

SDS	4g
-----	----

Trizma-base	0,60g
EDTA	0,37g
Agua destilada csp	100ml

b) NaOH 4M:

NaOH	16g
Agua destilada csp	100ml

Preparación :

A 10 ml de la solución base se le añaden 200 μ l de NaOH 4M.

Agitar y ajustar el pH a 12,6. Debe utilizarse inmediatamente.

*** Tampón neutralizante : Tris-HCl 2M pH:7,0.**

Composición :

Trizma-HCl	31,52g
Agua destilada csp	100ml

Preparación :

Se mezclan los componentes y ajustamos el pH a 7,0. Esterilizamos en autoclave 15 minutos a 121° C. Se conserva a 4° C.

*** Solución de Acetato Potásico 3M :**

Composición :

Solución de Acetato potásico 5M	60,0ml
Acetato potásico	49,1g
Agua destilada csp	100ml

Disolver y conservar a 4° C.

Acido acético glacial	11,5ml
Agua destilada	28,5ml

Preparación :

Mezclar y comprobar que el pH sea 4,8, si no, ajustar. Se conserva a 4° C y es utilizable hasta dos semanas después de su preparación.

*** Etanol al 70% :**

Composición :

Etanol al 96%	70ml
Agua destilada	30ml

Preparación :

A los 70ml de Etanol al 96% le añadimos el agua hasta llegar a 100ml.

*** TAE :** Tampón de Tris-acetato 40mM y EDTA 1mM. Este tampón se prepara concentrado 50 veces (TAE 50x).

Composición :

EDTA 0,25M	200ml
EDTA	93,0g
Agua destilada csp	1000ml
Trizma-base	242,0g
Acido acético glacial	57,1ml
Agua destilada csp	1000,0ml

Preparación :

Disolver y ajustar el pH a 8,0. Esterilizar en autoclave 15 minutos a 121° C. Se puede conservar a temperatura de laboratorio.

Para obtener 1 litro de TAE 1x, se mezclan 20 ml de TAE 50x con 980 ml de agua destilada.

*** Fenol :**

El fenol que utilizamos viene en estado sólido (Sigma P. 3653) y lo licuamos en un baño a 68° C. Una vez en estado líquido, le añadimos un volumen igual de Tampón Tris 1M a pH:8. Se mezcla bien y se deja reposar en un embudo de decantación. Una vez que las dos fases estén bien separadas se recoge la inferior.

Se mezcla de nuevo con un volumen igual de Tris 1M a pH:8 y se repite el proceso anterior. Este procedimiento se repetirá todas las veces que sea necesario, hasta que el pH de la fase superior sea mayor de 7,6. Entonces se recoge el fenol que queda en la fase inferior en el recipiente donde se va a guardar y se le añade un poco de Tris 1M a pH:8 de manera que cubra toda la superficie.

*** Cloroformo :**

Se utiliza una mezcla de cloroformo y alcohol isoamílico (24:1 v/v) saturado con Tris 1M a pH:8.

Se le añaden las cantidades necesarias de cloroformo y alcohol isoamílico. Luego se le añade un poco de Tris 1M a pH:8 de manera que cubra toda la superficie y con un grosor de 1 cm. Puede almacenarse a temperatura ambiente en un bote bien cerrado.

*** Tampón de carga :**

Composición :

0,25% azul de bromofenol

40,0% (peso/volumen) de sacarosa en agua.

Se almacena a 4°C.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los objetivos de nuestro trabajo son por un lado, la detección de las enzimas modificadoras de aminoglicósidos que causan resistencia a estos antibióticos, y por otro lado la localización en plásmidos de los genes que codifican esas enzimas; así como estudiar si estos plásmidos se transfieren por conjugación entre los estafilococos aislados de pacientes del Hospital Insular.

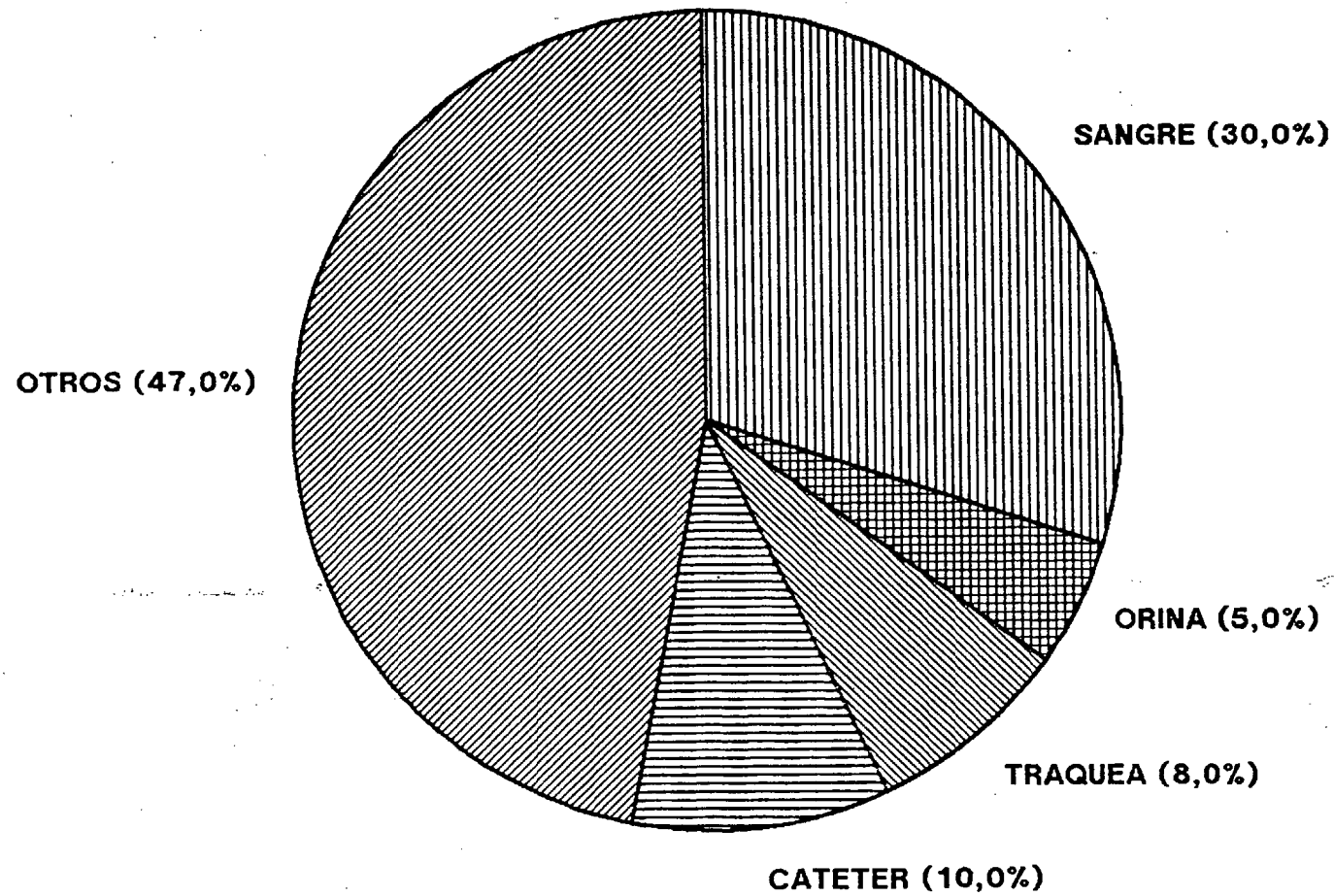
* CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS *STAPHYLOCOCCUS* AISLADOS.-

Aislamos un total de 89 cepas del género *Staphylococcus*, entre las cuales por medio de la prueba de la coagulasa, pudimos detectar 40 *Staphylococcus aureus* ó estafilococos coagulasa positivos y 49 estafilococos que no tenían la propiedad de coagular el plasma, es decir estafilococos coagulasa negativos. En los gráficos 1, 2 y 3 podemos observar la distribución de estos aislados según su procedencia hospitalaria, agrupados en cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y otros *Staphylococcus*.

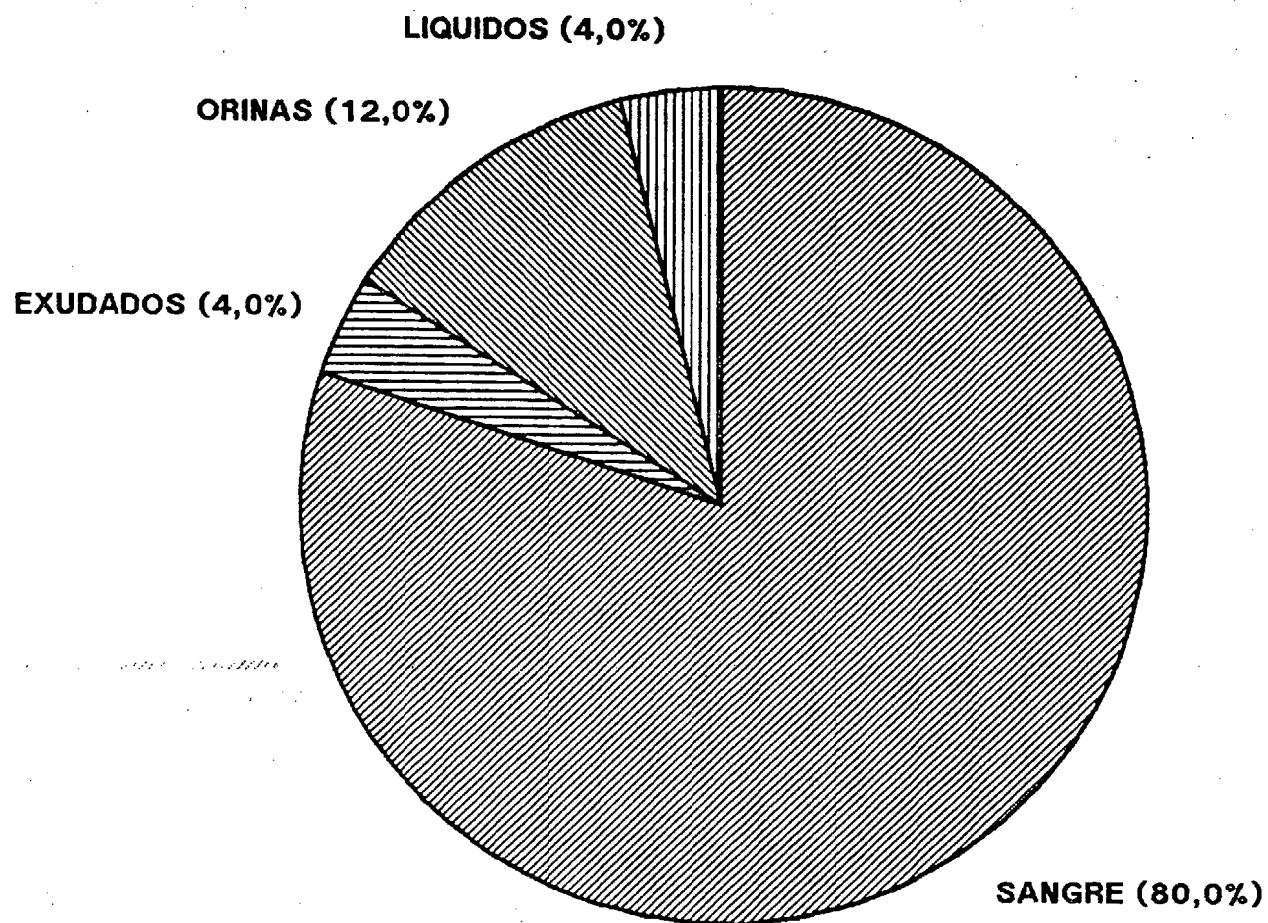
Posteriormente, procedimos a identificarlos utilizando el sistema **API-STAPH**, y encontramos las siguientes especies de *Staphylococcus*: 40 *Staphylococcus aureus*, 25 *Staphylococcus epidermidis*, 5 *Staphylococcus haemolyticus*, 5 *Staphylococcus simulans*, 5 *Staphylococcus warneri*, 3 *Staphylococcus hominis*, 2 *Staphylococcus sciuri*, 2 *Staphylococcus cohnii*, 1 *Staphylococcus saprophyticus* y 1 *Staphylococcus ludgunensis*. En el gráfico 4, observamos la distribución de los *Staphylococcus* de acuerdo a las distintas especies obtenidas.

Estudiamos la sensibilidad de estas estirpes bacterianas a distintos antibióticos usados en clínica, entre ellos destacamos: P, AM, CX, ME, TIC, FOX, CID, CXM, ZOX, CAZ, CTX, NOR, CIP, NA, IPM, GM, TM, DKB, AN, NET, ISE, VA y

**GRAFICO 1.TIPOS DE MUESTRAS CLINICAS
STAPHYLOCOCCUS AUREUS**



**GRAFICO 2.TIPOS DE MUESTRAS CLINICAS
STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS**



**GRAFICO 3.TIPOS DE MUESTRAS CLINICAS
OTROS STAPHYLOCOCCUS**

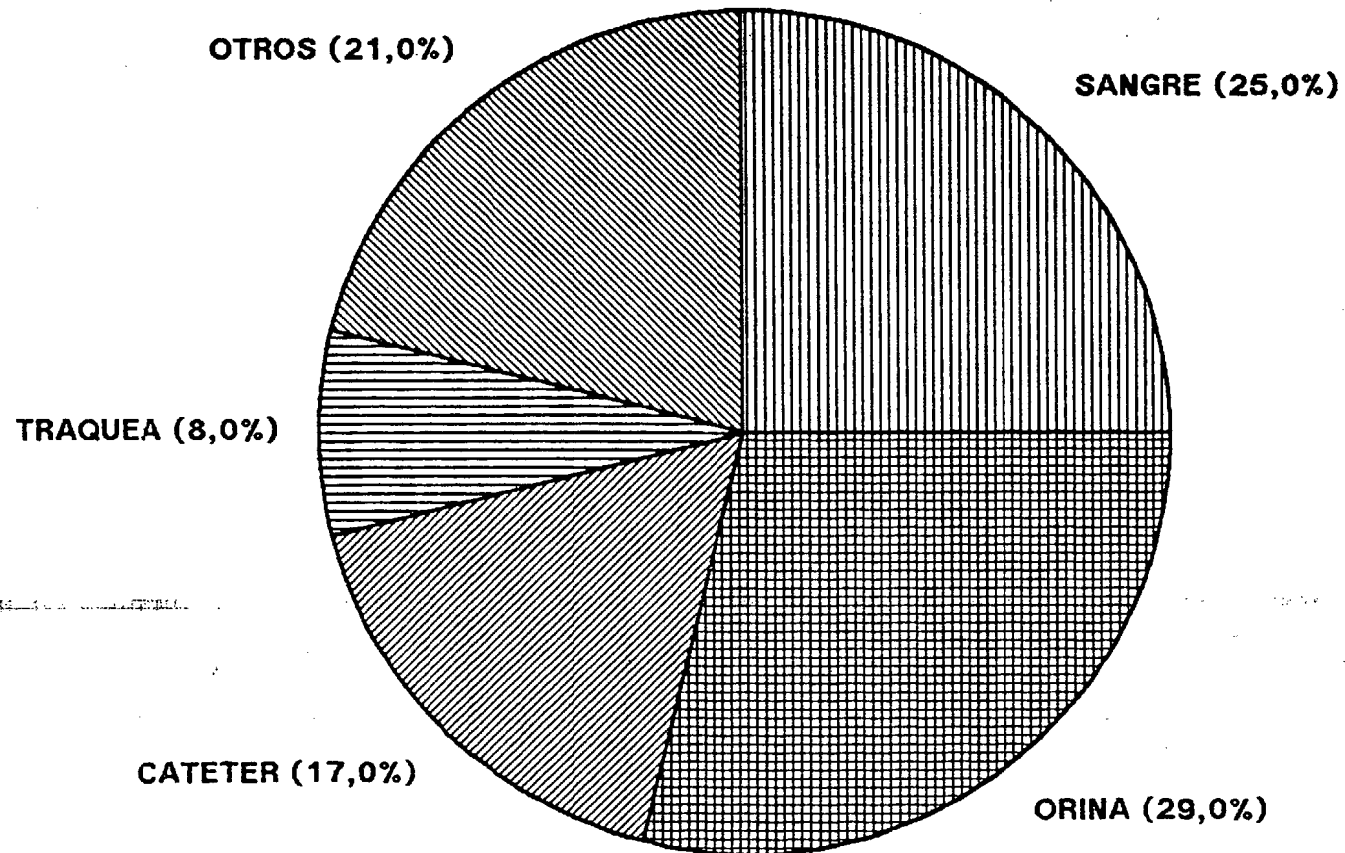
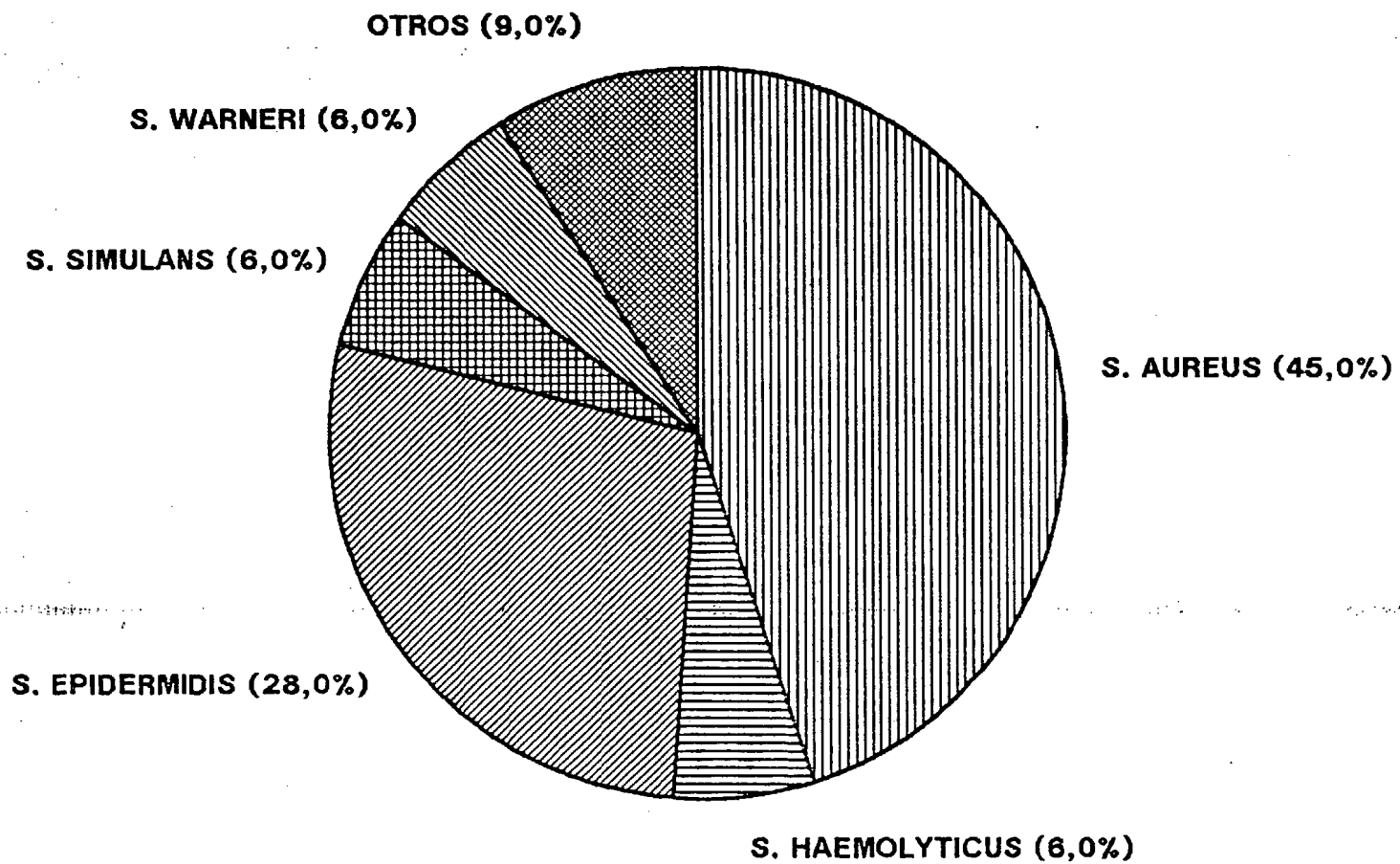


GRAFICO 4.DISTRIBUCION SEGUN ESPECIES



TE. Las CMI's críticas para estos antimicrobianos, se observan en la tabla 10. Los valores de CMI₅₀ y CMI₉₀ de estos antibióticos se pueden observar en la tabla A (anexo).

Como se observa en la tabla A (anexo), los antibióticos que se muestran más eficaces con respecto a las estirpes de *S. aureus* son, la FOX, CXM, ZOX, CTX y NET con una CMI₉₀: 4 µg/ml; AN e ISE muestran una CMI₉₀: 8 µg/ml; IPM, CMI₉₀: 0,12 µg/ml; TE y VA con CMI₉₀ de 1 y 2 µg/ml respectivamente y por último la CIP y NOR con respectivas CMI₉₀ de 0,5 y 2 µg/ml.

Los *Staphylococcus coagulasa* negativos muestran en general una mayor resistencia a los antimicrobianos, siendo los más eficaces para el tratamiento de los *Staphylococcus epidermidis* NOR, CIP dentro de las quinolonas (CMI₉₀ de 4 y 2 µg/ml respectivamente); NET (CMI₉₀: 8 µg/ml), VA y TE con CMI₉₀: 4 µg/ml e IPM con CMI₉₀: 1 µg/ml. El resto de los *Staphylococcus coagulasa* negativos muestran un comportamiento similar y las resistencias más bajas son las observadas para los siguientes antibióticos: NOR, CIP, NET, AN, ISE, VA, IPM y TE.

Como ya vimos en Materiales y Métodos, existe una modificación para el cálculo de la CMI de la ME y CX. Esta consiste en añadir al medio de Mueller-Hinton una concentración de cloruro sódico del 2% e incubar las placas a una temperatura de 30° C. Cuando se trata de cepas de *Staphylococcus epidermidis*, no se considera un resultado negativo hasta transcurridas 48 horas (79,147). Estas modificaciones se basan en la idea de que la resistencia a la meticilina en *Staphylococcus* es una característica heterotípica que requiere que la fracción resistente sea potenciada para hacerse patente *in vitro*.

En base a esta modificación, determinamos las CMIs de la ME y CX en los

Tabla 10.- CMI (en $\mu\text{g/ml}$) críticas para considerar a los *Staphylococcus* resistentes (R) a diferentes antibióticos.-

ANTIBIOTICOS	RESISTENTES
Penicilina (P)	$> 0,125$
Ampicilina (AM)	> 2
Meticilina (ME)	> 2
Cloxacilina (CX)	> 2
Ticarcilina (TIC)	≥ 32
Cefoxitina (FOX)	≥ 32
Cefonicid (CID)	≥ 32
Cefuroxima (CXM)	≥ 32
Ceftizoxima (ZOX)	≥ 32
Ceftazidima (CAZ)	≥ 32
Cefotaxima (CTX)	≥ 32
Norfloxacin (NOR)	≥ 8
Ciprofloxacina (CIP)	≥ 8
Ácido Nalidíxico (NA)	≥ 16
Imipenem (IPM)	≥ 8
Vancomicina (VA)	≥ 8
Tetraciclina (TE)	≥ 8

Entre paréntesis se muestran las abreviaturas empleadas para estos antibióticos.

S. aureus, *S. epidermidis* y resto de los *Staphylococcus*. Observamos que de los 40 *S. aureus*, sólo 3 se mostraban sensibles a la ME, de los 25 *S. epidermidis* 2 eran meticilín sensibles y dentro del resto de las especies 7 no presentaban resistencia a dicho antibiótico.

No obstante, también estudiamos el efecto de la temperatura y el cloruro sódico en la detección de estas resistencias en las cepas de *S. aureus* y *S. epidermidis*. De modo que cuando realizamos la determinación de resistencia a ME incubando las placas a 37° C, 20 *S. aureus* (50%) y 17 *S. epidermidis* (68%) se mostraban resistentes. Para la CX, los resultados fueron similares 18 *S. aureus* (45%) y 8 *S. epidermidis* (32%) aparecían resistentes a este antibiótico.

Cuando modificamos las condiciones del medio, temperatura y tiempo de incubación, los resultados también variaron, de modo que 37 de los 40 *S. aureus* (92%) fueron definitivamente resistentes a la ME y 36 (91%) a la CX; con un tiempo de incubación de 24 horas.

En el caso de los *S. epidermidis* obtuvimos que tras 24 horas de incubación, 23 (92%) se mostraban resistentes a ME y a las 48 horas los resultados no variaron. Con respecto a la CX, transcurridas 24 horas 14 cepas (56%) eran resistentes al mismo, mientras que a las 48 horas 2 estirpes más, 16 (64%), alcanzaron niveles de resistencia a dicho antibiótico.

Esto parece indicar, que al introducir la modificación en la técnica, se ha podido detectar el doble de cepas resistentes a ME y CX, tanto en las estirpes *S. aureus* como *S. epidermidis*. De no haber sido así, probablemente sólo hubiera crecido la subpoblación sensible, de crecimiento más rápido, dándonos falsos resultados de susceptibilidad.

En resumen, hemos pasado de 20 estirpes resistentes a ME a 37 en la especie *S. aureus*, y de 17 a 23 en *S. epidermidis*. En la detección de resistencia a CX, pasamos de 18 cepas de *S. aureus* resistentes a 36, y de 8 a 16 *S. epidermidis* resistentes a la CX. Se observó un comportamiento similar en las estirpes de *S. aureus* y de *S. epidermidis* para cada uno de los antibióticos. Estos resultados los podemos observar mejor en la tabla 11.

Tabla 11.- Efecto de la temperatura y del NaCl en la detección de la resistencia a la meticilina.-

<i>S. aureus</i> (40 cepas)		
	Agar MH 37°C	Agar MH + NaCl 2% 30°C
ME		
(24 horas)	20 (50%)	37 (92%)
CX		
(24 horas)	18 (45%)	36 (91%)
<i>S. epidermidis</i> (25 cepas)		
	Agar MH 37°C	Agar MH + NaCl 2% 30°C
ME		
(24 horas)	17 (68%)	23 (92%)
(48 horas)		23 (92%)
CX		
(24 horas)	8 (32%)	14 (56%)
(48 horas)		16 (64%)

* CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS *STAPHYLOCOCCUS* RESISTENTES A LOS AMINOGLICOSIDOS.-

A partir de estos aislados clínicos, seleccionamos aquellas estirpes bacterianas que fueran resistentes a uno ó más aminoglicósidos. De este modo obtuvimos 22 cepas que reunían esta característica, de las cuales 16 eran *Staphylococcus epidermidis* y 6 eran *Staphylococcus aureus*. A cada uno se le asignó un número de identificación. Además estas cepas se caracterizaban por ser meticilín resistentes y productoras de β -lactamasas, las cuales se determinaron en la célula entera y en los extractos enzimáticos por el método iodimétrico.

A los *Staphylococcus epidermidis*, se les realizó la prueba complementaria de detección de producción de limo, que muchos autores (42,115,147) han considerado como un método simple para distinguir la importancia clínica de los aislados de estafilococos coagulasa negativos. Se ha sugerido que la importancia clínica de un aislamiento de estafilococo coagulasa negativo se debe apoyar en: a) aislamiento repetido del mismo estafilococo coagulasa negativo; b) que los estafilococos tengan el mismo biotipo y antibiograma; c) que produzcan polisacárido extracelular ó limo; d) que posean un patrón de resistencia antimicrobiana múltiple (115). De los 16 *Staphylococcus epidermidis*, 12 nos indicaban producción del polisacárido mucoso, mientras que 4, los aislados SE 217, SE 190, SE 177 y SE 66, arrojaban un resultado negativo, es decir no producían limo ó "slime". No obstante, no hemos desechado estas cepas puesto que presentan un patrón de resistencia muy similar a los otros *Staphylococcus*.

* ESTUDIO DE LA RESISTENCIA A AMINOGLICOSIDOS.-

A continuación procedimos a estudiar este tipo de resistencia, la cual se determinó inicialmente por medio de antibiogramas. Los resultados aparecen en la tabla B (anexo). Los antibióticos empleados fueron: GM, TM, KM, DKB, AN, NET, NEO, SIS, SM; además se emplearon la P, AM, ME, NB, TE, C, CC, VA, E. La cantidad de antibiótico que posee cada disco empleado, la podemos comprobar en la tabla 12.

Para valorar los niveles de resistencia se calcularon las CMI₅₀ de 16 aminoglicósidos: GM, TM, KM, DKB, AN, NET, NEO, PM, RM, SIS, ISE, APRA, SM, SP, BT, LM. También se estudió la concentración mínima inhibitoria de la novobiocina.

Los valores de CMI críticos para considerar a una cepa bacteriana resistente, moderadamente sensible ó sensible a los distintos aminoglicósidos se definen en la tabla 13. Los resultados de las CMIs se muestran en la tabla C (anexo).

Generalmente los valores de CMI se correlacionan con los resultados obtenidos en el antibiograma, excepto para determinados aminoglicósidos como son NET y AN. Cuando los valores de CMI₅₀ para estos antibióticos se encuentran entre 8 y 32 µg/ml es frecuente que las cepas muestren en el antibiograma halos de resistencia que rondan los límites de sensibilidad moderada ó resistencia intermedia. En nuestras cepas de *Staphylococcus* observamos este fenómeno sobretodo para la AN, puesto que la mayoría de las estirpes muestran halos de resistencia y los valores de CMI correspondientes no llegan a 64 µg/ml (nivel de resistencia). En el caso de la NET, sólo 2 *Staphylococcus aureus*, las cepas SA 234 y SA 206, exhiben halos de resistencia, alcanzando unas CMI₅₀ de 8 y 32 µg/ml respectivamente. Una explicación a este fenómeno es que el antibiograma es más

Tabla 12.- Carga de antibiótico contenida en los discos empleados.-

ANTIBIOTICOS	CONTENIDO (μg)
Gentamicina (GM)	10
Tobramicina (TM)	10
Kanamicina (KM)	30
Dibekacina (DKB)	10
Amikacina (AN)	30
Netilmicina (NET)	30
Neomicina (NEO)	30
Sisomicina (SIS)	10
Estreptomicina (SM)	10
Penicilina (P)	10 Unidades
Ampicilina (AM)	10
Meticilina (ME)	5
Novobiocina (NB)	30
Tetraciclina (TE)	30
Cloranfenicol (C)	30
Clindamicina (CC)	2
Vancomicina (VA)	30
Eritromicina (E)	15

Entre paréntesis se muestran las abreviaturas empleadas para estos antibióticos.

Tabla 13.- CMI (en $\mu\text{g/ml}$) críticas para considerar a los *Staphylococcus* sensibles (S), moderadamente sensibles (I) ó resistentes (R) a los aminoglicósidos empleados.-

ANTIBIOTICOS	S	I	R
Gentamicina (GM)	≤ 4	8	≥ 16
Tobramicina (TM)	≤ 4	8	≥ 16
Kanamicina (KM)	≤ 4	8	≥ 16
Dibekacina (DKB)	≤ 4	8	≥ 16
Amikacina (AN)	≤ 16	32	≥ 64
Netilmicina (NET)	≤ 4	8	≥ 16
Neomicina (NEO)	≤ 4	8	≥ 16
Sisomicina (SIS)	≤ 4	8	≥ 16
Paromomicina (PM)	≤ 4	8	≥ 16
Ribostamicina (RM)	≤ 4	8	≥ 16
Isepamicina (ISE)	≤ 8	16	≥ 32
Apramicina (APRA)	< 16	16	> 16
Estreptomicina (SM)	≤ 8	16	≥ 32
Espectinomicina (SP)	≤ 20	40-80	≥ 80
Butirosina (BT)	≤ 4	8	≥ 16
Lividomicina (LM)	≤ 4	8	≥ 16

Entre paréntesis se muestran las abreviaturas empleadas para estos antibióticos.

sensible al efecto inóculo y el espesor de las placas de Mueller-Hinton puede influir. Cuando realizamos las CMI, la concentración de antibiótico es homogénea y al ser los aminoglicósidos antibióticos bactericidas, el efecto inóculo no altera significativamente el valor de la CMI.

Analizamos a continuación, los valores de CMI, de los aminoglicósidos utilizados con más frecuencia en medios hospitalarios, es decir, GM, TM, NET, DKB y AN. Todos nuestros aislados mostraron resistencia a GM, TM y DKB, con valores superiores a 16 $\mu\text{g/ml}$, apareciendo la NET y AN como los antibióticos más eficaces. Sólo un *Staphylococcus aureus*, el aislado SA 206, mostró niveles de resistencia a estos antibióticos, 32 $\mu\text{g/ml}$ para NET y 128 $\mu\text{g/ml}$ para AN. Las restantes estirpes presentan valores de CMI < 64 $\mu\text{g/ml}$ para AN y CMI < 16 $\mu\text{g/ml}$ para NET.

* DETECCION Y TIPIFICACION DE ENZIMAS MODIFICADORAS DE AMINOGLICOSIDOS.-

Una vez analizadas las resistencias nos interesaba determinar si las diferentes cepas bacterianas presentaban actividad enzimática modificadora de aminoglicósidos, es decir queríamos saber si la resistencia a estos antibióticos era de origen enzimático. La detección de enzimas se realizó mediante el ensayo radioenzimático con sólo unos pocos aminoglicósidos que variaban dependiendo del tipo de actividad. Así para fosforilasa se usaron GM, NEO y SM. Para acetilasas se emplearon GM, TM y KM; y para adenilasas, GM, TM, SM y SP. En nuestro estudio todos los *Staphylococcus* estudiados presentaban algún tipo de actividad enzimática, que en algunos casos se correlacionaba con los niveles de resistencia y en otros no.

A continuación procedimos a tipificar las distintas enzimas presentes en cada estirpe. Para ello usamos una gama mayor de antibióticos ó sustratos dependiendo también del tipo de actividad detectada.

Así, si detectamos actividad fosforilante, para el perfil de sustrato empleamos los siguientes aminoglicósidos: GM (Complejo), TM, KM (Complejo), DKB, AN, NET, NEO, PM, RM, ISE, SM, LM y BT. Por otro lado, si lo que se detectó fue actividad acetilasa los sustratos fueron: GM (Complejo), TM, KM (Complejo), DKB, AN, NET, NEO, PM, RM, SIS, APRA e ISE. Por último, en las cepas con actividad adenilasa, se ensayaron los siguientes sustratos: SM, SP, KM (Complejo), TM, AN, RM, NEO, DKB, GM (Complejo) e ISE.

No fue necesario determinar el perfil de sustrato para las cepas que en la

detección preliminar mostraron actividad enzimática cuando se usaron la SM y SP como sustratos, ya que de esta manera quedaban definidas las enzimas que presentaban.

Los perfiles de sustrato de las cepas con actividad fosforilante se muestran en la tabla D (anexo). Los perfiles acetilasas en la tabla E (anexo) y los perfiles de las cepas con actividad adenilasa en la tabla F (anexo).

Hemos de puntualizar que los valores que aparecen en estas tablas son porcentajes aproximados de actividades. Estos valores se obtienen considerando los centelleos por minutos (cpm) de un determinado antibiótico menos las cpm del blanco como 100. A la actividad del blanco le damos valor cero.

El resto de los valores se calculan por medio de una regla de tres:

B: Actividad del blanco.

A_x: Actividad del aminoglicósido de referencia.

A_y: Actividad del aminoglicósido que vamos a calcular.

$$\% = \frac{A_y - B}{A_x - B}$$

Así el valor de 100 se lo asignamos en los perfiles de acetilasas a KM (Complejo) ó GM (Complejo), en adenilasas a TM y para los perfiles de fosforilasas se tomaron como 100 la GM (Complejo) y la NEO.

A continuación interpretaremos los resultados, tomando como ejemplo los perfiles y actividades enzimáticas encontrados en las distintas cepas de *Staphylococcus*.

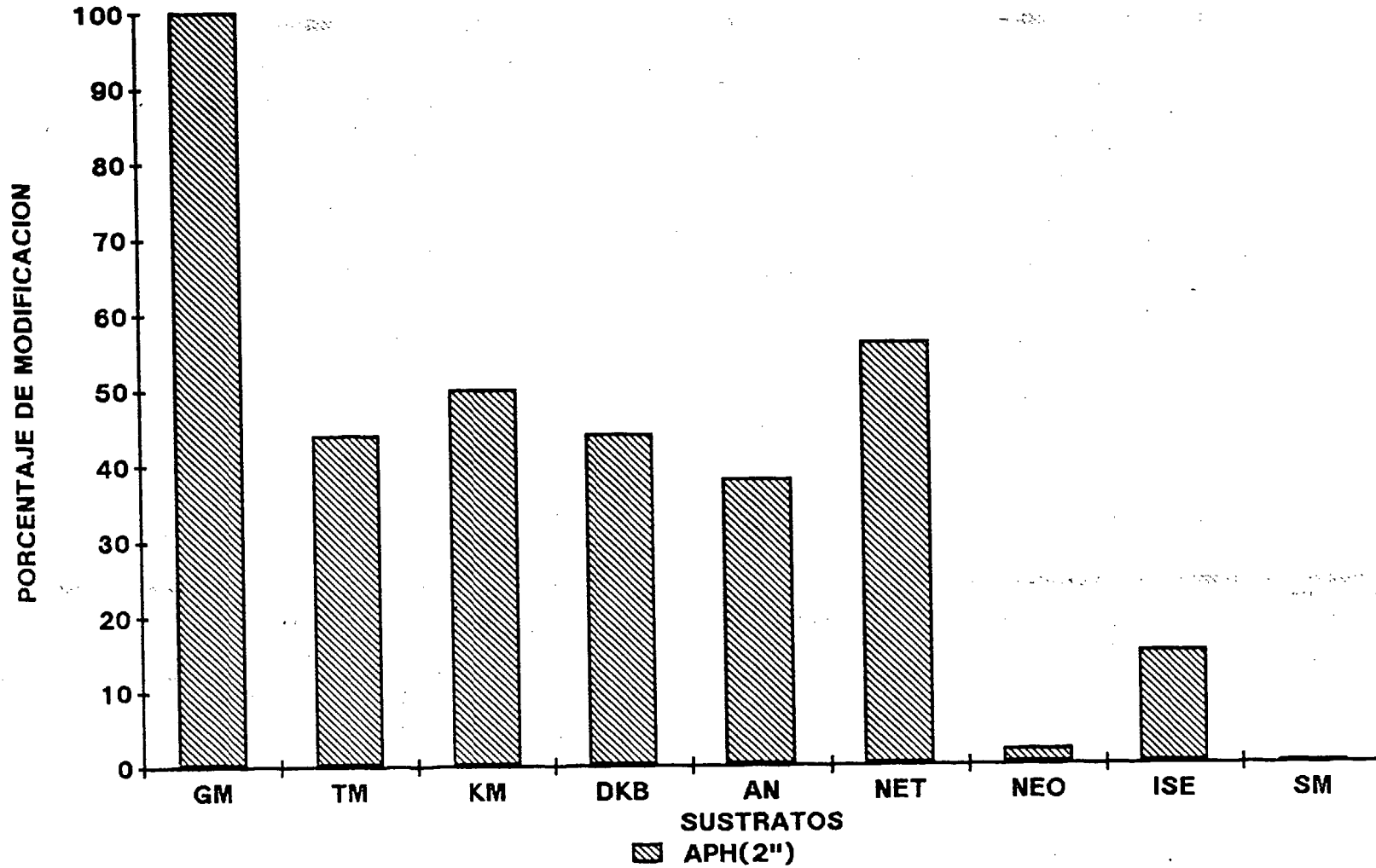
Se detectaron tres tipos diferentes de enzimas con actividad fosforilante, estos fueron la APH(2"), la APH(3')-III y la APH(3"). De las 22 cepas de *Staphylococcus* estudiadas 21 presentaban la APH(2"), mientras que la APH(3') estaba presente en 11 cepas, de las cuales 3 eran *Staphylococcus aureus* y 8 *Staphylococcus epidermidis*, siendo en uno de ellos, la cepa SE 354 la única enzima presente. Por otro lado, la enzima APH(3") se detectó en 3 *Staphylococcus aureus* y en 1 *Staphylococcus epidermidis*, cepa SE 19, en ambos casos acompañando a las dos fosforilasas anteriores.

Utilizamos como ejemplo de actividad fosforilasa distintas cepas, dependiendo de las enzimas encontradas en las mismas. Así, para explicar la actividad enzimática de la fosforilasa APH(2") utilizaremos el aislado SE 213 (gráfico 5). Para explicar la enzima APH(3"), emplearemos la cepa SE 19 (gráfico 6) y para la APH(3'), la estirpe SE 354 (gráfico 7).

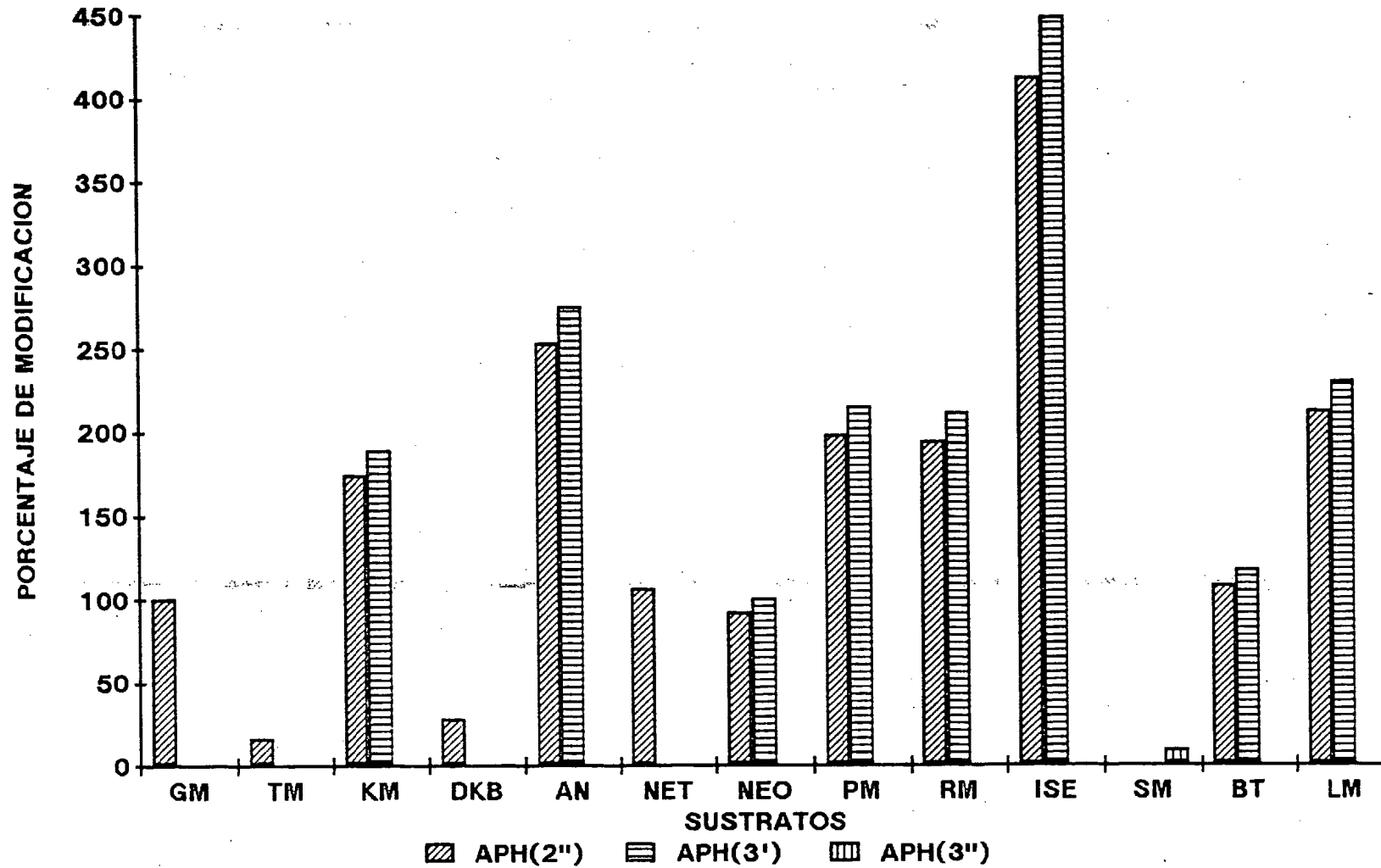
Observamos por tanto, que en la cepa SE 213 los antibióticos con grupo hidroxilo en posición 2", tales como GM, KM y TM son modificados y dan valores altos, mientras que la NEO que no posee en posición 2" un grupo hidroxilo no se ve alterada (1,7% de modificación, 499 cpm). Dedujimos por tanto que se trataba de una APH(2"). La actividad fosforilasa APH(2") siempre va acompañada de actividad acetilasa tipo AAC(6') en las estirpes del género *Staphylococcus*.

Se observa también que la AN, NET e ISE en este aislado presentan modificación enzimática con valores del 38%, 56% y 15% respectivamente. Analizamos los

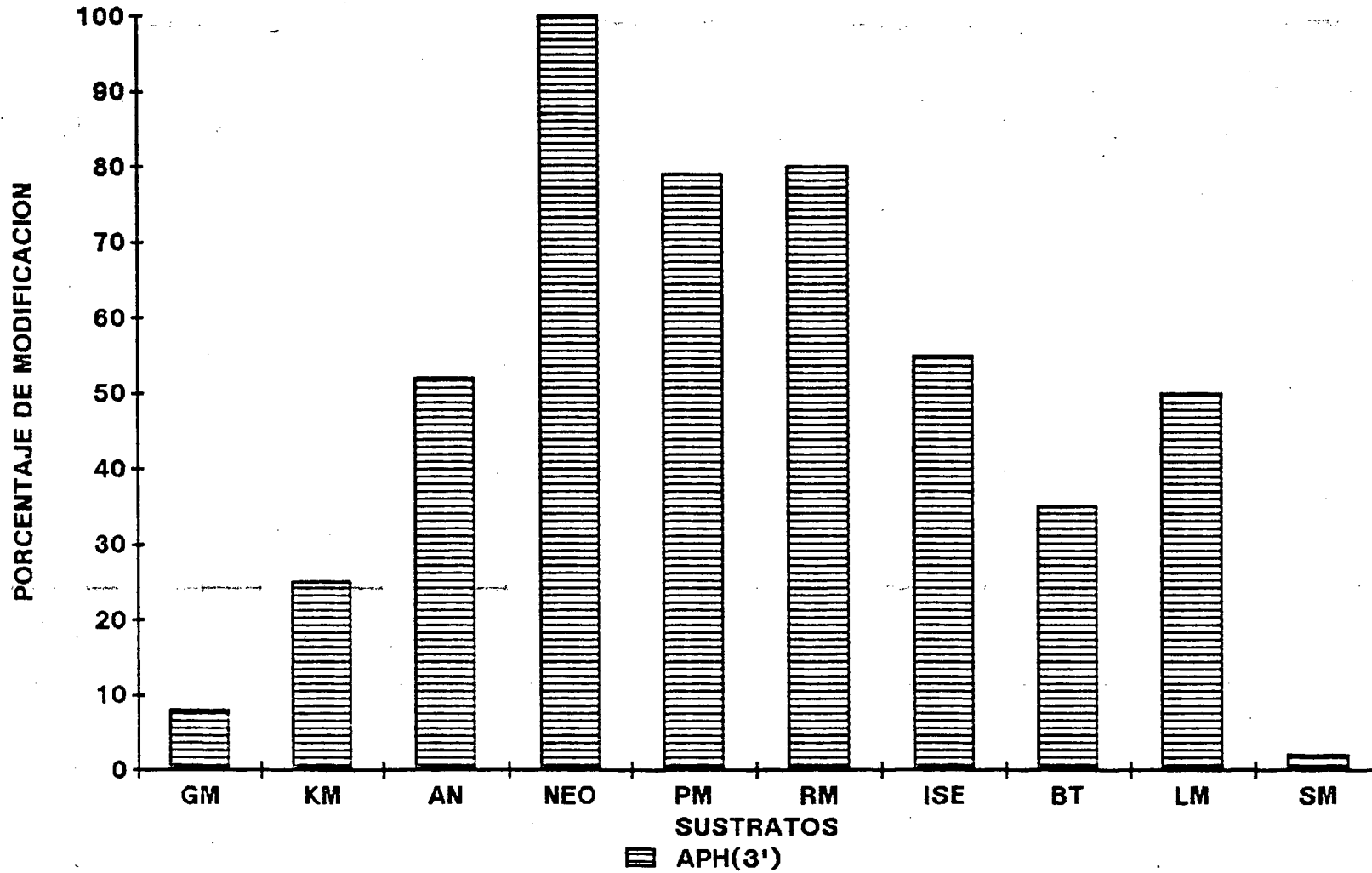
**GRAFICO 5. ENZIMAS FOSFORILASAS
CEPA SE 213**



**GRAFICO 6. ENZIMAS FOSFORILASAS
CEPA SE 19**



**GRAFICO 7. ENZIMAS FOSFORILASAS
CEPA SE 354**



valores de CMI y vemos que esta cepa es sensible a la NET (CMI: 4 $\mu\text{g/ml}$), medianamente sensible a AN (CMI: 32 $\mu\text{g/ml}$) y a ISE (CMI: 16 $\mu\text{g/ml}$). Por lo tanto, observamos que la enzima APH(2") es capaz de modificar estos antibióticos pero no los inactiva y por lo tanto no causa resistencia (48,165).

En todos los aislados donde se detecta este tipo de actividad fosforilasa aparece el fenotipo de resistencia GM, TM, KM, DKB, SIS, por lo que la presencia de la APH(2") está plenamente justificada (49,67,119,120,159).

A continuación, estudiamos el perfil enzimático de la estirpe SE 19. Este aislado presenta además de la modificación en posición 2", fosforilación en la SM que tiene un grupo hidroxilo en posición 3" (907 cpm, 9,3%).

Advertimos que esta actividad enzimática es significativamente menor que la producida por la APH(2"). Por esta razón al calcular el porcentaje con respecto a la GM, el valor nos da bajo. Al comparar con otros sustratos, cabe pensar que la SM no es modificada, pero la consideramos porque nos muestra una actividad superior a 7 u 8 veces el valor del blanco. Además, esta cepa se mostraba resistente a la SM con un valor de CMI: 512 $\mu\text{g/ml}$. Por lo tanto, la cepa SE 19 parece presentar también una fosforilasa APH(3").

Observamos también en la cepa SE 19 que los sustratos con grupo hidroxilo en posición 3' tales como NEO, PM, RM se ven modificados, presentando esta estirpe otra actividad fosforilasa del tipo APH(3'), que vamos a englobar dentro del tipo III, ya que fosforila a la KM, PM, RM, BT y LM, causando resistencia a los mismos. Fosforila a la AN, pero no la inactiva puesto que la cepa es sensible a dicho antibiótico (31,44). Este hecho no sólo se presenta en este aislado, sino en todos los demás que producen este tipo

de enzima, excepto en el *Staphylococcus aureus* SA 206, que presenta un valor de CMI: 128 $\mu\text{g/ml}$ para la AN y una modificación del antibiótico de 40,5 % respecto a la GM. Muchos autores han considerado a la APH(3')-III que fosforila a la AN como una APH(3')-IV; pero esta enzima no modifica a la LM siendo ésta la causa por lo que la consideramos una APH(3')-III.

En este aislado, el porcentaje de modificación a KM, AN e ISE es significativamente mayor (174%, 253% y 412% respectivamente) al encontrado en la cepa SE 213. Esto es debido al efecto causado por los dos tipos de fosforilasas, la APH(2") y la APH(3')-III puesto que actúan sobre el mismo sustrato pero en dos posiciones diferentes.

La Isepamicina es un antibiótico aminoglicósido derivado de la Gm B que está en fase de experimentación. La potencia y el espectro de actividad son similares al de la AN pero es menos modificado que ella (68,130), siendo también bastante estable a enzimas adenilasas tipo AAD(2") ó a acetilasas que modifican a GM (62,63,69).

Se han encontrado cepas resistentes a ISE, justificándose dicha resistencia por problemas de impermeabilidad del antibiótico (62,101), y también por inactivación enzimática por AAC(6')-I ó por la combinación AAC(6')-I + AAC(3) (101).

En nuestras cepas de *Staphylococcus*, podemos observar que la ISE es modificada por la APH(2"), como en el caso de la estirpe SE 213, con porcentajes de modificación aproximado del 15%. En aquellas estirpes con actividad APH(3')-III, la modificación sobre la ISE se ve aumentada. Así, tenemos la cepa SE 19 que nos presenta un 412% de modificación respecto a GM, 448% respecto a NEO y 40100 cpm. Esta circunstancia se repite en todos los aislados con actividad fosforilasa tipo APH(3')-III, pero

para confirmarlo, analizamos la estirpe SE 354 cuya única actividad enzimática es ésta. Esta cepa presenta una modificación baja sobre la GM y SM (8% y 2% respectivamente), mientras que modifica a NEO, KM, PM, RM, AN, ISE, BT y LM causando resistencia a KM, NEO, PM, RM, BT y LM. Respecto a ISE presenta 55% de modificación y 2033 cpm. Este aislado tiene una CMI para este antibiótico de 16 µg/ml, considerada como medianamente sensible ó intermedia. Más adelante, veremos que esta cepa puede adquirir valores de resistencia a través de sucesivos pases en ISE, aumentando también los niveles enzimáticos.

Por último reseñar que de los 22 estafilococos estudiados, sólo una cepa, identificada como *Staphylococcus aureus* SA 206, se mostró resistente a ISE (CMI: 64 µg/ml), mostrando el nivel más alto de modificación enzimática (2339% respecto a GM y 451% respecto a NEO). No se encontró correlación significativa entre la modificación a ISE y la susceptibilidad *in vitro* a este antibiótico. El porcentaje de fosforilación relativa a GM variaba entre 15% a 83% entre las cepas productoras de APH(2"), y sus CMIs entre 4 µg/ml y 16 µg/ml. Mientras que en las cepas productoras de APH(3') variaba entre 155% a 2339% y sus CMIs entre 4 µg/ml y 64 µg/ml.

En conclusión, la presencia de APH(3')-III, produce un alto grado de modificación para la ISE, mayor que el producido por la fosforilasa APH(2"), que también la modifica. Estos resultados discrepan con la estabilidad enzimática a APH(2") + AAC(6') y a APH(3') encontrada por otros autores en cepas de estafilococos (83).

En resumen, las cepas que presentan resistencia a KM, PM, RM, NEO, BT y LM poseen la enzima APH(3')-III. Aquellas con resistencia a SM, presentan la enzima fosforilasa APH(3") y los aislados con perfil de resistencia "GM TM KM SIS DKB", la

fosforilasa APH(2"). Por tanto podemos basarnos en las resistencias para averiguar el mecanismo de inactivación por medio de las distintas enzimas fosforilasas.

A continuación vamos a exponer los resultados obtenidos referentes a la actividad nucleotidasa.

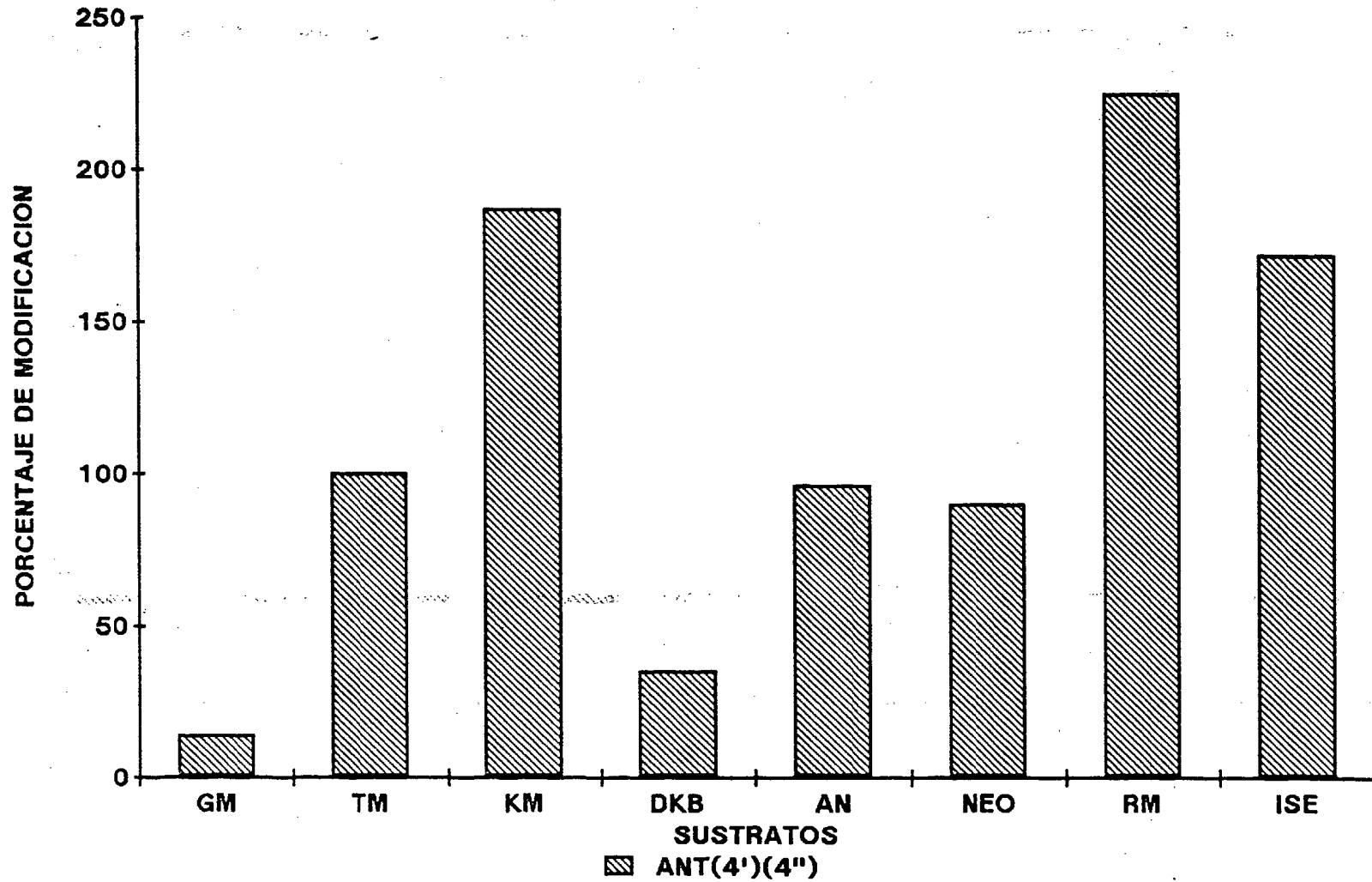
Las enzimas adenilasas son muy inestables *in vitro*, perdiendo rápidamente su actividad. Generalmente la adición al extracto enzimático de ditiotreitól (90) consigue mejorar los resultados en cepas de bacterias gram negativas; de hecho el ditiotreitól estabiliza significativamente esta enzima (96). Se ha visto también que la actividad nucleotidasa parece incrementarse con una purificación parcial. Es probable que se eliminen contaminantes y otras enzimas modificadoras de aminoglicósidos que puedan interferir (15). Por lo tanto, detectar este tipo de actividad enzimática resulta una tarea dificultosa, obteniéndose unos valores de cpm bastante bajos (105,165).

Como ejemplo para explicar la actividad adenilasa seleccionamos la estirpe SE 224 (gráfico 8). En un principio intentamos detectar este tipo de actividad realizando el ensayo enzimático tal como lo habíamos hecho para la detección de fosforilasas ó como veremos más adelante para las acetilasas, pero este método resultó infructuoso, ya que de las 22 cepas ensayadas, ninguna expresó este tipo de actividad y los antibióticos supuestamente adenilados mostraban unas cpm bastante bajas.

Así tenemos en la cepa SE 224, la TM mostraba 294 cpm, la GM 109 cpm, la SM 29 cpm y la SP 18 cpm, que eran valores incluso inferiores al valor del blanco.

A continuación procedimos a elaborar nuevos extractos enzimáticos y

**GRAFICO 8. ENZIMAS NUCLEOTIDASAS
CEPA SE 224**



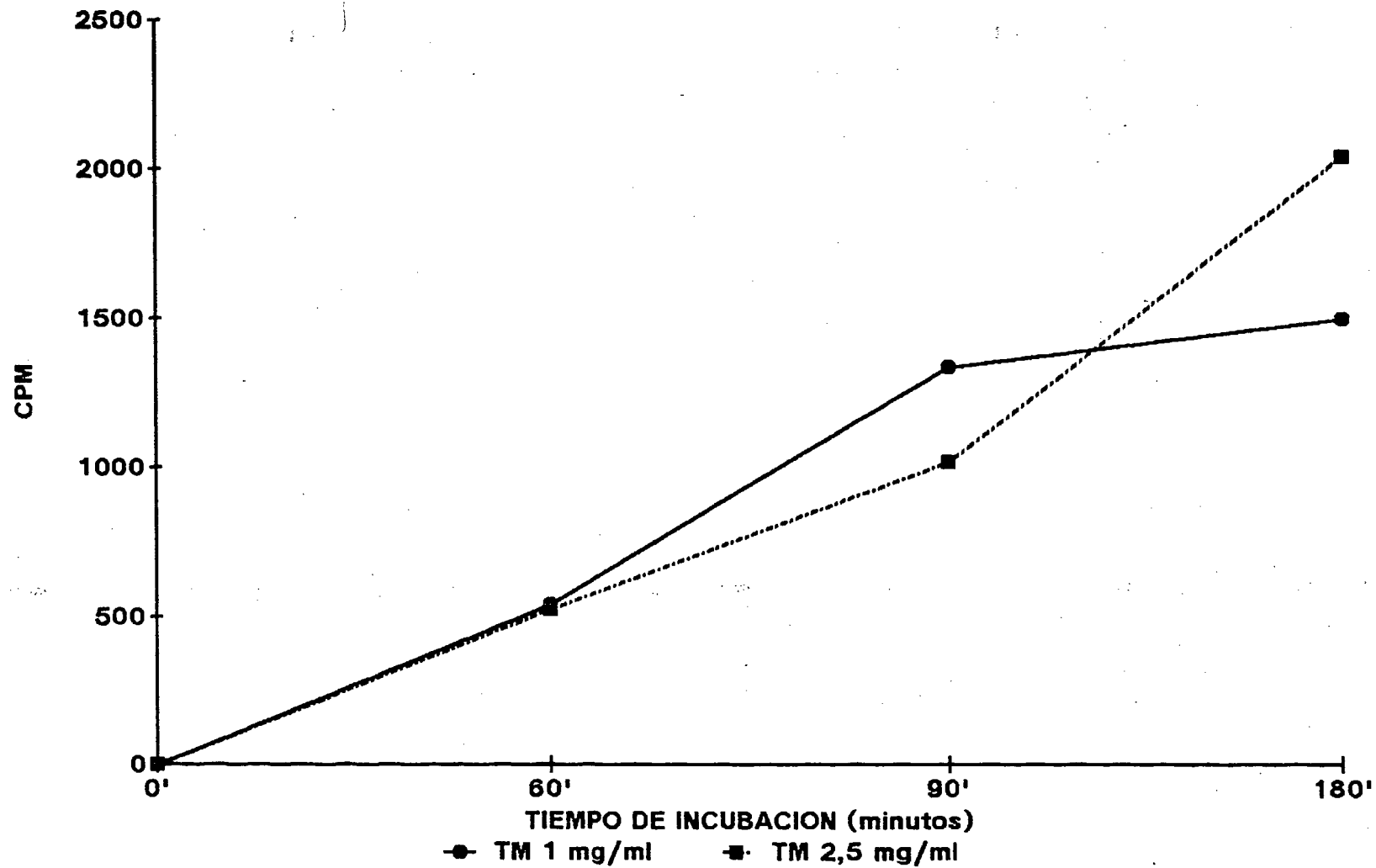
añadirle a los mismos ditiotreitol a una concentración de 0,1 M. Los resultados obtenidos en esta ocasión no eran nada alentadores, puesto que ningún extracto mostraba actividad nucleotidasa. En esta ocasión en la estirpe SE 224, la TM exhibía 182 cpm, la GM 207 cpm, 23 cpm la SM y 29 cpm la SP. Estos resultados apenas diferían del experimento anterior.

Posteriormente nos decidimos variar las condiciones del método de detección basándonos en el ensayo enzimático para adenilasas puesto a punto por Mederski-Samoraj (105), en el cual variaban el tiempo y temperatura de incubación que aumentaban a 60 minutos y 32° C respectivamente. Para otros autores la temperatura óptima de reacción para estas enzimas está en 35° C (96). Pensamos que estas modificaciones podrían ser una buena idea puesto que a lo mejor no sólo se trataba de la inestabilidad que presentaba la enzima, sino que quizás la cantidad de adenilasa producida fuese tan baja que no la podíamos detectar en 30 minutos y necesitáramos más tiempo de reacción.

Teniendo en cuenta estos argumentos, procedimos a realizar un ensayo enzimático con la estirpe SE 224, utilizando únicamente TM como sustrato, pero en concentraciones de 1 mg/ml y 2,5 mg/ml. Tomamos muestras de 20 µl a los 60, 90 y 180 minutos. El resto del ensayo permanecía igual que el empleado habitualmente. Obtuvimos los siguientes resultados. Cuando la concentración de sustrato era 1 mg/ml, transcurridos 60' de reacción el antibiótico mostraba 541 cpm; a los 90', 1336 cpm; y finalmente a los 180', la TM exhibía 1499 cpm.

Cuando la concentración del antibiótico fue de 2,5 mg/ml, a los 60' mostraba 526 cpm; a los 90', 1016 cpm y a los 180' la TM adenilada mostraba 2041 cpm. Estos resultados los podemos observar en el gráfico 9.

GRAFICO 9.ADENILASAS DE SE 224
Modificación según el tiempo



Por lo que se observa no aparecían diferencias significativas al usar las dos concentraciones diferentes de antibiótico ó sustrato. No obstante, se apreció una relación directa en cuanto al incremento de centelleos por minuto exhibidos por el antibiótico adenilado y el tiempo de incubación, ya que a medida que aumentaba el tiempo de incubación se observaba un aumento en las cpm y por lo tanto se detectaba de esta manera cierta actividad nucleotidasa.

A continuación, procedimos a realizar bajo las siguientes condiciones los ensayos a las restantes cepas en estudio : 180' de tiempo, 32° C de temperatura de incubación y empleando el antibiótico a una concentración de 1 mg/ml como sustrato.

Se tomó como ejemplo el extracto enzimático de la estirpe SE 224, que ahora era capaz de modificar a antibióticos tales como TM, KM, DKB, AN, NEO, RM e ISE (exhibiendo unos centelleos por minuto considerables), los cuales tienen en común la característica de poseer grupos hidroxilos en posición 4'. Antibióticos tales como GM (107 cpm y 14% de modificación respecto a la TM), SM y SP no fueron sustratos, y carecían de grupo hidroxilo en 4'. Dadas estas circunstancias, sospechamos que la estirpe SE 224 producía una enzima nucleotidasa ANT(4')(4"), ya que además era capaz de modificar a la DKB (35% de modificación respecto a la TM), que posee un grupo hidroxilo ecuatorial en posición 4". Esta enzima difiere de la ANT(4')-II que producen los gérmenes gram negativos y *Bacillus brevis* porque esta última no presenta actividad con la DKB (90,100). No puede ser una ANT(2") porque la GM es débilmente modificada (107 cpm y 14% de modificación).

Hemos observado que la ISE es modificada por la adenilasa producida por la estirpe SE 224, con unos valores de 1235 cpm y 172 % de modificación respecto a la

TM. Estos resultados contrastan con la estabilidad que la ISE presenta a la ANT(4') en estudios realizados por otros autores en cepas de *Staphylococcus* (83).

No obstante, la ANT(4')-II descrita en patógenos gram negativos, sí es capaz de modificar a la ISE, inactivándola y por tanto originando resistencia a la misma (90).

Si observamos el perfil de sustrato de la estirpe SE 224, podemos ver que la AN y NEO, al igual que la ISE son modificadas (96%, 90% y 172% de modificación respectivamente), pero la cepa se muestra sensible a tales antibióticos con una CMI: 8 µg/ml en cada caso.

Estos hechos concuerdan con los descritos por otros autores, de modo que la AN sufre una modificación causada por la enzima ANT(4')(4'') producida por una cepa de *S. aureus* (108,165); ó bien por la producida por cepas de *Enterococcus* (23). En ambos casos las estirpes se muestran sensibles ó moderadamente sensibles a la AN, pero en ningún caso resistentes.

Le Goffic (108), explica este hecho argumentando que el valor de la CMI de un antibiótico no sólo depende de la velocidad de inactivación enzimática y de la susceptibilidad del sustrato, sino que también depende de la velocidad de acumulación del antibiótico en la célula bacteriana.

Un comportamiento similar ocurre con las enzimas ANT(2'') de las *Enterobacterias* con respecto a la modificación de la NET, la cual es modificada pero no inactivada, mostrándose las estirpes productoras sensibles a dicho antibiótico. Bongaerts y Molendijk (12) explicaron este hecho basándose en la relación $V_{m\acute{a}x}/K_M$ de la enzima con

la NET. Esta relación es una medida relativa de la eficacia fisiológica de la modificación enzimática del antibiótico. Cuando compararon la relación de la NET con la de otros sustratos, observaron que era muy baja y por lo tanto se justificaba la sensibilidad de las bacterias al antibiótico.

Las restantes cepas en donde se detectó la enzima ANT(4')(4"), mostraban igual comportamiento para la NEO e ISE, excepto para la AN, ya que las estirpes SE 213 y SE 180 mostraban una CMI: 32 µg/ml para dicho antibiótico.

El extracto enzimático de la cepa SE 19 adenilaba a la SM (585 cpm), mostrándose la estirpe resistente a dicho aminoglicósido, con una CMI: 512 µg/ml. Dedujimos la presencia de una AAD(6) en dicho extracto, quedando por tanto justificada la resistencia a la SM. No fue necesario determinar el perfil de sustrato, ya que esta enzima sólo modifica a la SM (39,97).

En resumen, de los 16 *S. epidermidis* estudiados, sólo 4, las estirpes SE 224, SE 223, SE 213 y SE 180 mostraban actividad nucleotidasa ANT(4')(4"). Sólo en un *S. epidermidis*, la cepa SE 19 se detectó la enzima AAD(6). Ningún *S. aureus* parecía tener actividad adenilasa, al menos fue imposible detectar este tipo de enzimas en esta especies.

Las cepas productoras de la enzima ANT(4')(4") se mostraban resistentes a TM, KM, DKB, PM y BT; pero eran sensibles a NEO, hecho que contrasta con lo observado por otros autores (44,108,192). Estas estirpes se mostraban también resistentes a otros aminoglicósidos tales como GM, SIS y RM. Esto era debido a la presencia de la enzima bifuncional APH(2")+AAC(6'), por lo que nos resultó imposible predecir la presencia de la ANT(4')(4") basándonos en el patrón de resistencia dado que los perfiles de

sustratos GM, TM, KM, DKB, RM, SIS se superponían con los de la enzima bifuncional APH(2") + AAC(6') (112,140).

Hemos encontrado entre las cepas estudiadas, cuatro que se muestran resistentes a SM. El aislado SE 19, como hemos dicho anteriormente mostraba actividad adenilasa AAD(6). En las restantes estirpes resistentes a este antibiótico, SA 206, SA 191 y SA 100 no pudimos detectar actividad nucleotidasa; no obstante, la resistencia a SM está justificada por la producción de la enzima fosforilasa APH(3").

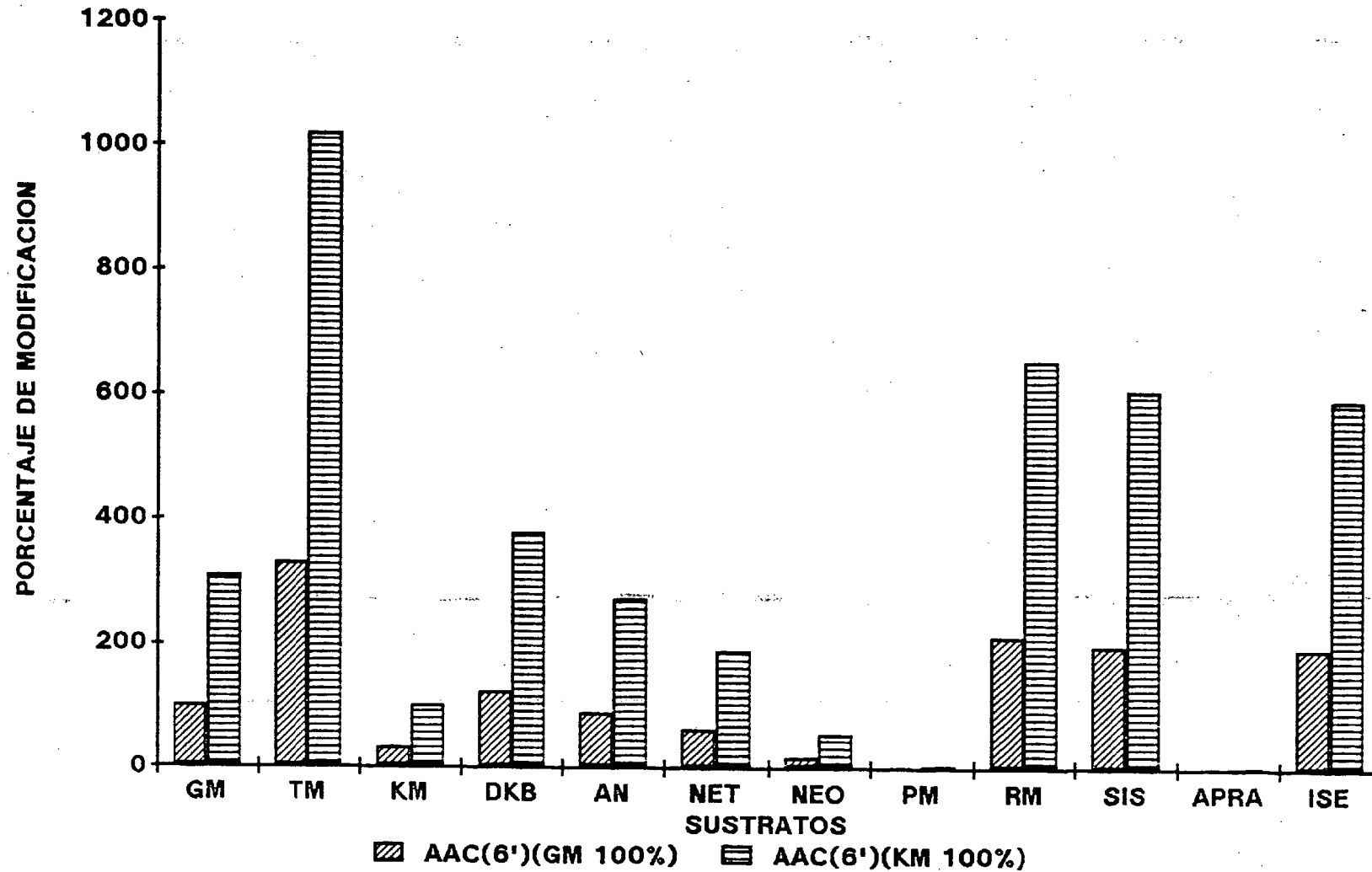
Un hecho que atrajo nuestra atención, fue que se encontraron 7 aislados resistentes a SP, pero no presentaban actividad adenilasa. Seis de estas cepas eran *S. epidermidis*, SE 224, SE 223, SE 213, SE 180, SE 177 y SE 38, y una era un *S. aureus*, SA 234. Es posible que estas cepas fueran productoras de enzimas y que no hayamos podido detectarlas mediante el ensayo empleado, debido a las enormes dificultades aparecidas dado el carácter lábil de las adenilasas. Otra explicación posible, puede ser que la resistencia no sea enzimática. Existen otros mecanismos de resistencia a la SP, debido a alteraciones ó mutaciones de proteínas ribosómicas (15,58).

La actividad acetilasa, se ha detectado en los 6 *S. aureus* estudiados y en 15 *S. epidermidis*. La única estirpe que no mostraba actividad acetilasa fue el aislado SE 354.

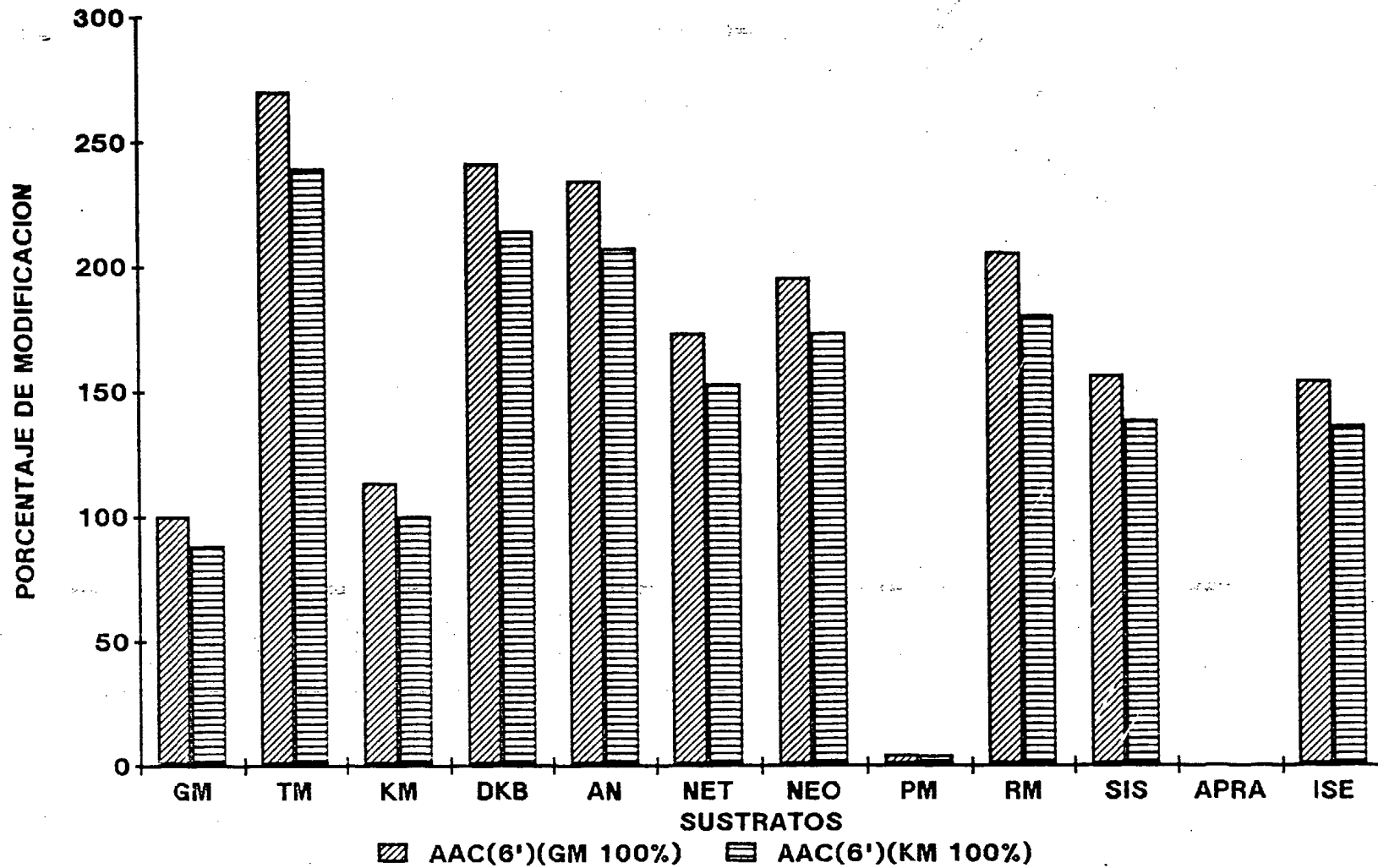
Para explicar las enzimas acetilasas, emplearemos tres cepas diferentes, SE 181 (gráfico 10), SE 179 (gráfico 11) y SA 221 (gráfico 12).

Estudiando la cepa SE 181, observamos que los antibióticos que poseen un grupo amino en posición 6' son modificados, mientras que aquellos que no lo poseen tales

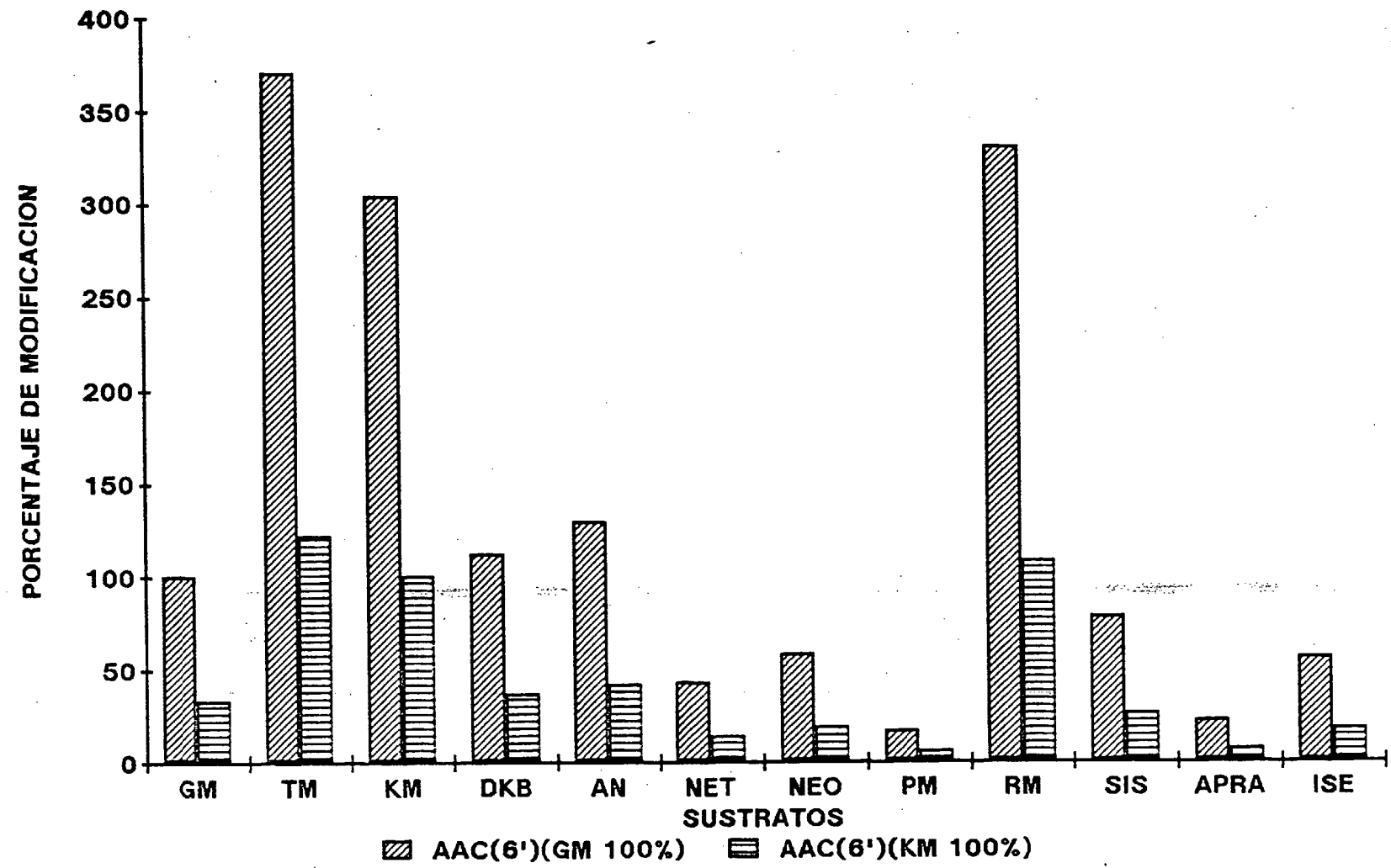
**GRAFICO 10. ENZIMAS ACETILASAS
CEPA SE 181**



**GRAFICO 11. ENZIMAS ACETILASAS
CEPA SE 179**



**GRAFICO 12. ENZIMAS ACETILASAS
CEPA SA 221**



como PM (97 cpm, 1,2% respecto a la GM) y APRA (0,5% y 39 cpm) no son sustratos. Dedujimos por tanto que en este microorganismo hay un sólo tipo de acetilasa que correspondería a la enzima AAC(6') que acompaña a la actividad APH(2'') constituyendo la enzima bifuncional APH(2'')+AAC(6'). En el extracto correspondiente a esta estirpe observamos que la modificación sobre la NEO es baja (17% respecto a GM, 54% respecto a KM, 1377 cpm), lo que coincide con lo observado generalmente por otros autores (30,49).

No obstante, se nos han presentado varios casos entre las cepas estudiadas, en los que la modificación de la NEO es muy alta, llegando en ocasiones a superar a la de la NET. Como ejemplo, proponemos la estirpe SE 179, que presenta una acetilación de la NEO de 195% respecto a la GM y 173% respecto a la KM; los centelleos por minuto que exhibe la NEO acetilada son 31240 cpm. Estos datos, los podemos observar mejor en el gráfico 11.

En realidad, nosotros pensamos que la enzima que presentaban estas cepas, era también la AAC(6'), pero nos llamó la atención la capacidad de las mismas para modificar tan fuertemente a la NEO; en algunos casos causándole resistencia, como en el caso de la cepa SE 179, donde la CMI alcanza un valor de 64 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para este antibiótico. En otros casos, no inactivaba al aminoglicósido en cuestión, como ocurría en la estirpe SE 142, que presentaba un 62% de modificación y una CMI: 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para la NEO.

Esta capacidad que tienen los *Staphylococcus* productores de AAC(6') para modificar la NEO y no causar resistencia, está ampliamente descrita (49,65). Esta situación, se puede explicar por la fuerte unión que se produce entre el antibiótico 6'-N-acetilado y el ribosoma bacteriano. Así mismo, Benveniste y Davies (8) comprobaron que algunos aminoglicósidos acetilados conservaban aún su actividad antimicrobiana, aunque no era tan

potente como la del producto no acetilado.

Analizaremos por último, la actividad acetilasa presentada por la cepa SA 221 (gráfico 12). Observamos que esta estirpe es capaz de modificar a la GM, KM, TM, DKB, NET, SIS, AN y NEO que en mayor ó menor grado son sustratos de la enzima AAC(6'); pero también acetila a la PM (17% de modificación y 1331 cpm), causando resistencia (CMI: 64 µg/ml); y a la APRA (22% de modificación y 1716 cpm), aunque en esta ocasión la cepa se muestra sensible a dicho antibiótico (CMI: 4 µg/ml). La cepa SA 221, fue la única estirpe capaz de acetilar la PM y APRA, las cuales no contienen grupo amino en 6'. Si analizamos las distintas enzimas acetilasas, observamos que las enzimas AAC(2'), AAC(3)-III, AAC(3)-IV y la AAC(1) son capaces de modificar la PM. La AAC(2') no se ha detectado en aislados de *Staphylococcus*, sino en *Providencia* (67,148), *Proteus* (67,148) y *Streptomyces* (148). Sin embargo, parece que existe evidencia de que determinadas AAC(3) son producidas por cepas de *Staphylococcus* (30,39), pero no se ha completado la caracterización de dichas enzimas.

La AAC(3)-III es activa frente a GM, TM, KM, SIS, DKB, NEO, PM y 5-episisomicina. No modifica a la APRA. No obstante, no pudimos determinar la presencia de esta enzima al no disponer de 5-episisomicina, ya que las estirpes productoras se muestran resistentes a dicho aminoglicósido. De cualquier modo, la AAC(3)-III, según Vliegthart y col. (207), sólo es producida por aislados de *Pseudomonas*.

La AAC(3)-VII modifica a PM, NEO, LM, KM, GM, TM, SIS y NET. El perfil es similar al de AAC(3)-III y al igual que ella no modifica a APRA, por lo que en un principio pensamos que la acetilasa producida por la cepa SA 221 no era la AAC(3)-VII.

La AAC(3)-IV es capaz de modificar a la APRA, GM, TM, NEO, RM y NET, pero muestra poca actividad con la PM (32). Esta enzima confiere altos niveles de resistencia a la APRA (67,171), lo que está en desacuerdo con lo encontrado en nuestra cepa SA 221, cuya CMI: 4 μ g/ml respecto a este antibiótico. Por último nos queda por analizar la AAC(1) que constituye un nuevo grupo de acetilasas aún no bien caracterizado. Modifica a APRA, NEO, PM y RM.

A la vista de este análisis, no podemos predecir qué tipo de acetilasa es producida por la estirpe SA 221 junto con la AAC(6'). Basándonos sólo en la modificación enzimática, podemos pensar que podría tratarse de una AAC(1) ó bien de una AAC(3)-IV, a pesar de que no causa resistencia a la APRA aunque sí la modifica.

En general, si comparamos los valores de CMI presentados por los distintos *Staphylococcus* con la modificación enzimática que ocasionan, observamos que todas las cepas productoras de AAC(6') muestran el fenotipo de resistencia "GM TM KM DKB RM SIS" (67). Esta enzima es capaz de modificar a la AN, NET e ISE sin causarles resistencia, tal como vimos que sucedía con la NEO. No obstante, en algunas ocasiones, las estirpes productoras se muestran resistentes a AN y NET (165).

La ISE es modificada por la AAC(6'). Este resultado contrasta con los observados por otros autores para esta enzima (83), ó bien para la AAC(6')-I de los gram negativos capaces de modificar a la AN (62,130). Las cepas de *Staphylococcus* muestran unos valores de CMI para este antibiótico que oscilan entre 4-64 μ g/ml. Sólo una cepa SA 206 aparece resistente a la ISE con una CMI: 64 μ g/ml y exhibiendo una modificación de 141% respecto a la GM y 13122 cpm. Estos resultados que no difieren de los presentados por las cepas sensibles ó medianamente sensibles a este aminoglicósido.

Antes de 1983, la mayoría de las resistencias a GM, TM, DKB, AN ó NET, eran causadas por una sólo enzima modificadora, ya fuera una fosforilasa, adenilasa ó acetilasa (130). No obstante, hoy en día es frecuente ver resultados de investigaciones en donde aparecen combinaciones de distintas enzimas modificadoras en una misma cepa (112,171).

En nuestras cepas de *Staphylococcus*, observamos también la coexistencia de distintas enzimas modificadoras de aminoglicósidos. En la tabla 14 podemos ver las combinaciones encontradas ó los patrones enzimáticos, así como el número de cepas que la presentan y las resistencias que originan.

La combinación más frecuente es la que presentan los aislados con el patrón enzimático 3. Es decir, APH(2'') + AAC(6') con APH(3')-III, originando resistencia a GM, TM, KM, DKB, NEO, PM, RM y SIS. En algunas ocasiones, también causa resistencia a AN, NET e ISE. Este perfil enzimático y el perfil nº 4, pueden tener implicaciones terapéuticas, ya que pueden causar resistencia a AN. Los perfiles nº 5 y 6, se distinguen porque las cepas que lo presentan, muestran además resistencia a la SM, ya sea por la enzima APH(3'') ó por la AAD(6).

Tabla 14.- Patrones enzimáticos encontrados en las cepas de *Staphylococcus* y resistencias que producen.-

PATRON ENZIMATICO	Nº CEPAS	RESISTENCIAS CAUSADAS
PE ₁ : APH(2") + AAC(6')	7	GM, TM, KM, DKB, SIS, (AN), (NET)
PE ₂ : APH(3')-III	1	NEO, KM, PM, RM, BT, LM, (AN), (ISE)
PE ₃ : APH(2") + AAC(6'), APH(3')-III	6	GM, TM, KM, DKB, NEO, PM, RM, SIS, BT, LM, (AN), (ISE), (NET)
PE ₄ : APH(2") + AAC(6'), ANT(4')(4")	4	GM, TM, KM, DKB, SIS, RM, (NEO), (AN), (NET)
PE ₅ : APH(2") + AAC(6'), APH(3')-III APH(3")	3	GM, TM, KM, DKB, SIS, NEO, PM, RM, BT, LM, SM, (AN), (ISE), (NET)
PE ₆ : APH(2") + AAC(6'), APH(3')-III APH(3"), AAD(6)	1	GM, TM, KM, DKB, NEO, PM, RM, SIS, BT, LM, SM, (AN), (ISE), (NET)

El paréntesis (), nos indica que en algunos casos las cepas muestran resistencia a esos antibióticos y en otros casos no.

* ESTUDIOS SOBRE LA INDUCCION DE RESISTENCIA.-

A lo largo de nuestro recorrido por las distintas enzimas modificadoras de aminoglicósidos detectadas en nuestras cepas de *Staphylococcus*, hemos comentado que antibióticos tales como la AN y NET, y en algunas ocasiones la ISE, son fuertemente modificados y sin embargo las cepas productoras no se muestran resistentes a los mismos. Si observamos nuestra colección de cepas, sólo una estirpe la SA 206, se muestra resistente a la AN con una CMI: 128 $\mu\text{g/ml}$. Las estirpes SE 217, SE 213, SE 181, SE 180, SE 179 y SE 177 muestran unas CMI: 32 $\mu\text{g/ml}$, considerándose medianamente sensibles. El resto de los *Staphylococcus* son sensibles a la AN con una CMI $\leq 16 \mu\text{g/ml}$. En el caso de la NET, sólo una cepa SA 206, presentaba una CMI $> 16 \mu\text{g/ml}$, alcanzando valores de resistencia.

Como hemos visto, todas nuestras estirpes producían enzimas que modificaban a dichos aminoglicósidos, bien la APH(2'') + AAC(6') que modificaba a ambos, ó bien la APH(3')-III y la ANT(4')(4'') que lo hacían sobre los grupos hidroxilos de la AN.

Dado el interés de estos aminoglicósidos desde el punto de vista clínico, nos pareció interesante comprobar si estas estirpes bacterianas, tras un contacto prolongado con los distintos antibióticos, eran capaces de mostrarse resistentes a los mismos. Así mismo, si adquirían valores de resistencia, estudiar cómo afectaba a la producción enzimática.

Quisimos por un lado, evaluar el efecto de la AN en las cepas sensibles; y por otro lado, el efecto de la NET en las cepas sensibles a dicho antibiótico. Utilizamos dos cepas sensibles y no productoras de actividad enzimática como controles, la SE 177C y la SE 141C. De este modo, evaluamos si el posible incremento en los niveles de resistencia era

igual en las cepas productoras que en las cepas que no poseían enzimas inactivadoras de aminoglicósidos.

En la tabla 15, podemos observar el incremento experimentado a nivel de las CMI's por las estirpes de *S. aureus* y *S. epidermidis* sensibles a AN (CMI \leq 16 $\mu\text{g/ml}$), tras incubarlas en BHI que contenía concentraciones subinhibitorias y crecientes de dicho antibiótico. Este experimento se realizó tres veces.

En la tabla 16, observamos el aumento producido por las cepas sensibles a la NET (CMI $<$ 16 $\mu\text{g/ml}$) tras los tres pases en concentraciones crecientes y subinhibitoria de este aminoglicósido.

Los resultados de dichos experimentos, nos muestran en todas las cepas ensayadas, que tras la incubación en medio con antibiótico, se produce un aumento en los valores de las CMI's, tanto en las cepas productoras, como en las usadas como control. No obstante, el factor de incremento es diferente según sea el antibiótico empleado.

En el caso de la NET, todas las estirpes se vuelven resistentes. El factor de incremento varía de 256 a 1024 veces el valor de la CMI antes del experimento. La diferencia entre las cepas productoras de enzimas modificadoras de aminoglicósidos y las controles es evidente (factores de incremento de 64 y 256 veces), mostrando la estirpe SE 177C una CMI: 16 $\mu\text{g/ml}$ (valor de resistencia) tras la inducción.

Cuando usamos AN, tras los tres pases, todas las cepas ensayadas aumentan los niveles de sus CMI's, adquiriendo valores de resistencia (CMI's entre 256 y 2048 $\mu\text{g/ml}$). El factor de incremento varía de 32 a 512 veces los valores de las CMI's iniciales y también

Tabla 15.- CMI's antes (CMI-0) y después (CMI-3) de tres pases en medio con AN.-

Nº CEPA	CMI-0	CMI-3	FACTOR DE INCREMENTO
SE 224	8	512	64
SE 223	16	512	32
SE 190	4	256	64
SE 142	8	512	64
SE 141	8	512	64
SE 66	8	512	64
SE 47	8	512	64
SE 38	16	512	32
SE 19	8	512	64
SA 234	16	1024	64
SA 221	2	1024	512
SA 191	16	2048	128
SA 100	16	2048	128
SA 17	4	2048	512
CONTROLES			
SE 177C	0,5	8	16
SE 141C	1	8	8

Tabla 16.- CMI's antes (CMI-0) y después (CMI-3) de tres pases en medio con NET.-

Nº CEPA	CMI-0	CMI-3	FACTOR DE INCREMENTO
SE 224	8	4096	512
SE 223	8	4096	512
SE 217	8	4096	512
SE 213	4	4096	1024
SE 190	2	1024	512
SE 181	8	1024	128
SE 180	8	4096	512
SE 179	8	2048	256
SE 177	8	1024	128
SE 142	2	1024	512
SE 141	2	4096	2048
SE 66	1	1024	1024
SE 47	8	2048	256
SE 38	8	2048	256
SE 19	4	4096	1024
SA 234	8	4096	512
SA 221	1	1024	1024
SA 206	32	4096	128
SA 191	8	4096	512
SA 100	8	4096	512
SA 17	4	4096	1024
CONTROLES			
SE 177C	0,06	16	256
SE 141C	0,12	8	64

difiere, como en el caso de la NET, de los incrementos padecidos por las cepas controles (8-16 veces) , las cuales siguen permaneciendo sensibles (CMI: 8 μ g/ml).

Este aumento observado en los valores de las CMIs para la AN y NET, tras los pases en medio con dichos antibióticos, permanece estable cuando sembramos las cepas en medio sin antibióticos.

Para algunos autores (11,15,174) este fenómeno supone una mutación, dado el carácter constitutivo de las enzimas modificadoras de aminoglicósidos, mientras que otros autores (30,34,88,117,203), lo consideran como una inducción de resistencia, si bien en algunos casos no permanece estable (34,88). En algunas ocasiones, la alta frecuencia de cepas resistentes a partir de una población es considerada un argumento en contra de la mutación (6).

Ya sea una mutación ó bien una inducción, el mecanismo por el cual las bacterias adquieren valores de resistencia no se conoce exactamente. Parece ser que están implicadas alteraciones a nivel del transporte a través de la membrana celular (15), superinducción, amplificación del gen ó incremento en el número de copias del plásmido (11,30). Se ha visto también, en el caso de resistencias inestables, que el mecanismo por el cual la bacteria adquiere esa resistencia viene dado por una regulación en la entrada del antibiótico en la fase dependiente de energía (EDP-II), que a su vez podría estar ocasionada por la existencia de lipopolisacáridos anormales, depleción de una proteína transportadora ó colapso en el potencial eléctrico (34,88).

Comprobamos así mismo, cómo se veían afectadas las CMIs de otros aminoglicósidos de uso clínico, tales como GM, TM, AN e ISE, en las estirpes inducidas

con la NET. Los resultados los podemos observar en la tabla G (anexo). En esta tabla, vemos que los valores de las CMIs respecto a estos antibióticos se ven aumentados considerablemente si lo comparamos con las CMIs antes de la inducción, (tabla C (anexo)).

Este resultado parece encontrarse en concordancia con los observados por otros autores (203). Así tenemos que Storrs y col. (174) encontraron que en sus cepas de *S. aureus* inducidas con GM, aumentaban los niveles de resistencia a un amplio número de aminoglicósidos. Daikos y col. (34) observaron así mismo, una resistencia cruzada a otros aminoglicósidos en sus cepas inducidas con GM ó TM. Lovering y col. (117) comunicaron que en cepas de *S. epidermidis* inducidas con GM, se producía un aumento en la CMI a otros aminoglicósidos, tales como NET, AN y TM, causando resistencia a los mismos. Para algunos autores, esta resistencia cruzada puede estar producida por problemas en el transporte de antibióticos (203).

A continuación, para valorar cómo afectaba este incremento de las CMIs a la producción enzimática, seleccionamos cuatro estirpes bacterianas, tres de ellas *S. epidermidis*, las cepas SE 224, SE 180 y SE 141, y un *S. aureus*, la cepa SA 191. A partir de este momento, denominaremos a estas estirpes inducidas con NET como SE 224I, SE 180I, SE 141I y SA 191I.

Antes de exponer y discutir los resultados obtenidos, comentaremos un poco las características de estas cepas. Las estirpes SE 224I y SE 180I son productoras de las enzimas APH(2'') + AAC(6') y ANT(4')(4''). En la cepa SE 141I solamente se ha detectado la enzima bifuncional APH(2'') + AAC(6'); mientras que en SA 191I encontramos diferentes tipos de enzimas, tales como APH(2'') + AAC(6'), APH(3')-III y APH(3''). Como cepas controles, utilizamos las mismas que empleamos previamente, es decir SE 177C y SE 141C,

las cuales no presentaban actividad enzimática.

La susceptibilidad de estas 6 estirpes a los distintos aminoglicósidos empleados, se calcularon por medio de antibiogramas y de una manera cuantitativa a través del cálculo de las CMI. Estos valores quedan reflejados en las tablas G y H (anexo).

A continuación determinamos los perfiles enzimáticos de cada cepa inducida y de la estirpe original ó inicial bajo las mismas condiciones. Los perfiles de fosforilasas y acetilasas, se muestran en la tabla I (anexo).

Si observamos las estirpes SE 224I, SE 180I y SE 141I, a primera vista, vemos que los centelleos por minuto que exhiben los antibióticos acetilados ó fosforilados por la cepa inducida son mayores que los mostrados por las cepas originales SE 224, SE 180 y SE 141 respectivamente. Pero ésto no es indicativo de mucho, a no ser que la concentración protéica en ambos extractos sea idéntica, y en cierto modo nos podría conducir a una conclusión errónea. Para evitar ésto, hemos de referirnos a la cantidad de proteínas totales presente en los extractos enzimáticos. Los perfiles de sustrato ó porcentaje de modificación, no son tan importante para determinar la resistencia, como la actividad enzimática absoluta ó nivel enzimático (11).

A continuación, analizamos las cepas SE 224 y SE 224I. Si dividimos los centelleos por minuto (cpm) que muestran los diferentes antibióticos por la cantidad de proteínas presente en los extractos enzimáticos de cada cepa, obtenemos una relación que nos da una idea del aumento en la producción enzimática. Por ejemplo, tenemos que las cpm mostradas por la NET fosforilada son, en la cepa original SE 224, 3340 cpm, mientras que en la cepa inducida SE 224I son 20041 cpm. Hemos determinado el contenido protéico de

cada extracto, de modo que la estirpe SE 224 contiene 28 mg de proteínas totales; mientras que en la cepa SE 224I el contenido protéico es el mismo e igual a 28 mg. En la tabla 17 se muestran los valores correspondientes a las proteínas totales de cada extracto enzimático determinadas por el método de Lowry.

Al dividir 3340 cpm entre 28 mg y 20041 cpm entre los correspondientes 28 mg, nos da un factor de 119 y 715 respectivamente. Dicho factor, nos da una idea del incremento que se ha producido en la fosforilación del antibiótico. Para este caso concreto, el antibiótico es la NET, y la fosforilación es del orden de unas 6 veces mayor en la estirpe inducida SE 224I, que en la original SE 224. Del mismo modo, lo hacemos con el resto de los antibióticos y para cada tipo de actividad enzimática. Estos valores quedan recogidos en la tabla J (anexo).

Analizando los datos que se muestran en la tabla J (anexo), si observamos las estirpes SE 224I y SE 180I, productoras de las enzimas APH(2'')+AAC(6') y ANT(4')(4'') frente a las cepas originales, detectamos tanto en los perfiles de acetilasas como de fosforilasas, una mayor producción enzimática en las cepas inducidas que en las cepas originales. El factor de incremento varía según el antibiótico y el tipo de actividad ensayada. Así por ejemplo, cuando realizamos el ensayo de las nucleotidasas para las estirpes SE 224I y SE 180I, observamos que los niveles de adenilación para la TM permanecían iguales que en las respectivas cepas originales. Por lo tanto, parece que la inducción de estas estirpes con NET, no afecta a este tipo de actividad enzimática.

A continuación comparamos la modificación enzimática producida por las cepas SE 141 y SE 141I. En ambas estirpes se detectó la presencia de la enzima APH(2'')+AAC(6'). Observamos que tras la inducción a través de pases por NET, se ha

Tabla 17.- Proteínas totales (en mg) determinadas en los extractos enzimáticos empleados en los experimentos de inducción.-

PROTEINAS TOTALES		
EXTRACTOS	FOSFORILACION	ACETILACION
SE 354	20,00	
SE 354I	32,00	
SE 224	28,00	16,80
SE 224I	28,00	16,20
SE 180	34,00	18,00
SE 180I	24,00	10,40
SE 141	29,00	21,00
SE 141I	13,20	18,20
SA 191	30,00	21,60
SA 191I	28,00	15,60
SE 177C	23,00	16,80
SE 177CI	37,80	44,80
SE 141C	27,00	8,75
SE 141CI	27,50	35,20

producido un incremento tanto en los niveles de fosforilasas como de acetilasas.

Por último, analizaremos lo ocurrido en la estirpe SA 191I comparada con la SA 191. Ambas poseen las siguientes enzimas: APH(2'')+AAC(6'), APH(3')-III y APH(3''). Cuando comparamos los niveles de producción de ambas cepas, observamos que la SA 191I sufre un aumento significativo en los niveles de acetilasa con respecto a la SA 191. En la fosforilación vemos que los sustratos típicos de la enzima APH(2'') aumentan considerablemente sus niveles de modificación, del orden de 5 a 6 veces, mientras que sustratos específicos de la acción de la enzima APH(3')-III, tales como NEO, PM y RM apenas se ven alterados. De modo que para la NEO pasamos de un factor de 206 a 211. En el caso de la PM de 351 a 285; y en la RM, de 341 a 385. La SM que es sustrato de la APH(3'') tampoco se ve significativamente aumentada en su modificación.

Estos resultados, junto con la ausencia de incremento en los niveles de producción de las nucleotidasas por parte de las estirpes SE 224I y SE 180I, parecen indicarnos que este fenómeno se produce en las enzimas para la cual el agente usado como inductor es sustrato (174). Es decir, la NET que es el aminoglicósido empleado, es sustrato de las enzimas APH(2'')+AAC(6'), y no lo es de la APH(3')-III, ANT(4')(4'') ni de la APH(3'').

Por último, vamos a observar el comportamiento en las estirpes usadas como controles, SE 177C y SE 141C, las cuales no sufren un aumento significativo en los niveles de acetilación ni de fosforilación. Este hecho refuerza el papel que juega la producción enzimática en la inducción de resistencia en aquellas cepas que poseen ciertos niveles de actividad (11,30,117,174). No obstante, también se han descrito casos en los que no se produce esta elevación en los niveles enzimáticos en cepas productoras, tras sucesivos pases

en concentraciones crecientes de un determinado aminoglicósido (30).

La cepa SE 354, como recordamos, se caracterizaba porque era productora de un sólo tipo de enzima, la fosforilasa APH(3')-III, y mostraba una CMI: 16 $\mu\text{g/ml}$ para la ISE. La modificación que padecía la ISE por parte de las estirpes productoras de este tipo de enzima fue objeto de nuestra atención, puesto que no se había descrito previamente (62,63,69,83). De este modo, nos pareció interesante estudiar si esta estirpe podía alcanzar niveles de resistencia para este aminoglicósido y además si la producción enzimática se veía afectada. Por lo tanto, sometimos a la cepa SE 354 a diversos pases en medio con concentraciones crecientes de ISE partiendo de la concentración subinhibitoria, que en este caso era de 8 $\mu\text{g/ml}$. Tras la inducción, la estirpe SE 354 alcanzó una CMI para la ISE de 1024 $\mu\text{g/ml}$. La susceptibilidad de la cepa inducida y de la original frente a distintos aminoglicósidos se observa en la tabla 18.

En la tabla K (anexo), observamos los correspondientes perfiles de sustrato de las cepas SE 354 original e inducida. Así mismo, vemos los niveles alcanzados tras la inducción. Este hecho apoya la hipótesis de que la ISE es sustrato para la enzima APH(3') detectada en nuestras cepas de *Staphylococcus*. Quizás pudiera tratarse de una nueva isoenzima del tipo de las APH(3'), aunque tendríamos que realizar más estudios al respecto.

En resumen, esta clase de resistencia a la que hemos hecho referencia es un potencial peligro dentro del ámbito hospitalario, ya que puede aparecer tras una larga terapia con esta clase de antibióticos. En el caso de la AN, se ha descrito en algunas ocasiones que el uso prolongado de este antibiótico conlleva un aumento de resistencia al mismo (90,203); mientras que otros autores sostienen que es independiente el número de aislados resistentes a AN con el uso del mismo dentro de la política de antibióticos del hospital (150,203). Price

Tabla 18.- Resultados de los antibiogramas de los aislados SE 354 y SE 354I con los diferentes aminoglicósidos empleados.-

ANTIBIOTICOS	ESTIRPES	
	SE 354	SE 354I
GM	20,0 S	19,5 S
TM	28,0 S	20,0 S
KM	0,0 R	0,0 R
DKB	40,0 S	23,0 S
AN	18,0 S	13,0 R
NET	30,0 S	22,0 S
NEO	0,0 R	0,0 R
SIS	34,0 S	28,0 S
ISE	24,0 S	0,0 R
SM	20,0 S	20,0 S
P	20,0 R	20,0 R

y col. (150) sugieren que no es justificable atribuirle a la AN el rango de antibiótico de reserva por peligro a que surja la resistencia, ya que este antibiótico tiene un espectro de acción mayor que cualquier otro aminoglicósido.

No obstante, estas discrepancias no se han observado *in vitro* para la NET, y menos aún para la ISE, antibiótico en estudio. Nuestros resultados sugieren que el contacto prolongado durante la terapia con estos tipos de aminoglicósidos puede conducir a que cepas productoras con cierto nivel enzimático, se vuelvan resistentes a estos antibióticos y a otros similares, pudiendo transmitir esta resistencia por conjugación como veremos más adelante.

* CARACTERIZACION DE PLÁSMIDOS DE RESISTENCIA.-

La información genética para la síntesis de estas enzimas se localiza frecuentemente en plásmidos. Dentro de un hospital es importante determinar y caracterizar los plásmidos de resistencia, principalmente si se tratan de plásmidos conjugativos. Además, se sabe que las estirpes de *S. epidermidis*, si bien no son potencialmente patógenas, pueden servir como reservorios de plásmidos que son transferidos dentro del ámbito hospitalario a especies con mayor poder patógeno, como son los *S. aureus*. Esta transferencia puede tener lugar *in vitro* (4,55,91,128) y en la piel del personal hospitalario y pacientes (133). Tal es su importancia, que en algunos hospitales de Estados Unidos se han realizado estudios de prevalencia de plásmidos conjugativos entre los aislados clínicos de *Staphylococcus* (5).

El siguiente paso que realizamos fue intentar determinar qué tipo de plásmidos eran los que conferían resistencia a los aminoglicósidos en nuestras cepas de *Staphylococcus*. Para ello nos basamos en tres técnicas: curación, transformación y conjugación, las cuales se complementan entre sí.

* Curación de plásmidos.-

Mediante la curación, de las 22 cepas ensayadas, sólo pudimos obtener 4 derivados que habían perdido la resistencia a los aminoglicósidos. Estas estirpes fueron la SE 224, SE 190, SE 177 y SE 141; que ahora denominaremos con el sufijo C, por ejemplo: SE 224C. Se emplearon dos sustancias como agentes curantes, el bromuro de etidio y el naranja de acridina acompañado de una temperatura de 44° C. Con la primera sustancia no obtuvimos ningún resultado positivo, mientras que con el naranja de acridina a 44° C el 18% de las cepas parecieron perder el plásmido que codificaba la resistencia a los

aminoglicósidos. Este hecho no es indicativo de que el resto de las estirpes estudiadas no presenten los genes de resistencia a los aminoglicósidos codificados por plásmidos; sino que más bien está en concordancia con los resultados observados por otros autores, quienes alegan que la efectividad de los distintos procedimientos empleados en la curación es imprevisible (210).

Para confirmar que las nuevas estirpes correspondían a los derivados curados de las cepas iniciales, utilizamos el sistema **API-STAPH**. Mediante este sistema de identificación, comprobamos que los biotipos de la cepa inicial y de la curada eran exactamente iguales, por lo que parecía remota la posibilidad de que se tratara de una contaminación. Se ha demostrado que el sistema **API-STAPH** constituye un método de identificación tanto para los *Staphylococcus* coagulasa negativos como positivos con un alto porcentaje de reproducibilidad (141).

En las tablas B y C (anexo), podemos observar los valores de los antibiogramas y CMI's respectivamente, de estas cepas frente a los diferentes antimicrobianos ensayados.

Analizando las distintas estirpes, vemos que las SE 141C y SE 190C se muestran sensibles a todos los aminoglicósidos ensayados; no obstante siguen mostrándose resistentes a la P y AM. Por el contrario, la cepa SE 177C que aparece sensible a todos, incluso a la P a la que antes era resistente.

Si observamos la estirpe SE 224C, vemos que sigue permaneciendo resistente a TM, KM, SP y P. El hecho de que esta cepa junto con las cepas SE 190C y SE 141C sigan manteniendo su resistencia a P tras los procedimientos de curación no es un

fenómeno aislado. Algunos autores han observado en cepas de *S. aureus*, derivados curados sensibles a los aminoglicósidos y resistentes a la penicilina (165,210).

Anteriormente vimos que 6 aislados de *S. epidermidis*, entre los que se encontraba la cepa SE 224, mostraban una CMI > 80 µg/ml para la SP, por lo que se consideraban resistentes al mismo. El problema que teníamos con estas cepas era que no conseguimos detectar producción de la AAD(3'')(9) que causa resistencia a la SP. El hecho de que el derivado curado SE 224C presente una CMI > 512 µg/ml, exactamente igual a la que mostraba la cepa original SE 224, parece apoyar nuestra hipótesis de que la resistencia a SP pueda ser debida a una alteración ó mutación de las proteínas ribosómicas (15,58).

A continuación, vamos a analizar el aislado SE 224 que mostraba dos enzimas modificadoras, la APH(2'')+ AAC(6') y la ANT(4'')(4''). Al comprobar los fenotipos de resistencia exhibidos por esta estirpe y por la curada, todo parece indicar que esta última ha perdido el plásmido que codifica la enzima bifuncional y ha conservado el que alberga los genes que codifican la nucleotidasa, ó bien estos genes tienen un origen cromosómico. El hecho de que la cepa curada SE 224C presentara el fenotipo de resistencia "TM KM DKB", nos hizo sospechar antes de poder detectar las enzimas adenilasas, la presencia de las mismas en nuestros extractos enzimáticos. La cepa SE 224C se convirtió de este modo en la única estirpe que presentaba esta enzima sin estar acompañada por otro tipo de actividad.

El paso siguiente fue comprobar si la pérdida aparente del plásmido iba acompañada de una pérdida de actividad enzimática, previamente detectada en las respectivas cepas originales. De este modo, comprobamos que las estirpes SE 190C y SE 177C, que antes producían la APH(2'')+ AAC(6') y APH(3')-III, carecían de cualquier tipo de actividad

enzimática. En la cepa SE 141C, que derivaba de SE 141, productora de APH(2'') + AAC(6'), tampoco se detectó ninguna enzima.

No obstante, verificamos mediante ensayos enzimáticos, la pérdida de la enzima bifuncional en el aislado SE 224C, pero seguía conservando la nucleotidasa ANT(4')(4''). Estos resultados se aprecian en las tablas D, E y F (anexo).

Este experimento no queda completo sin antes realizar una extracción del ADN plasmídico seguida de electroforesis en gel de agarosa. En la misma observamos que la pérdida de resistencia y actividad enzimática, va acompañada de la pérdida de material genético plasmídico.

En la fotografía 1 se puede observar que la estirpe SE 224 tiene un plásmido cerca del cromosoma de peso molecular 17,3 Md, que desaparece en el derivado curado. Todo nos hace pensar que ese plásmido alberga la enzima APH(2'') + AAC(6'), mientras que la enzima ANT(4')(4'') parece tener un origen cromosómico. Para asegurarnos de la codificación genética de esta adenilasa, procedimos a realizar experimentos de conjugación entre la cepa SE 224C como donadora y como receptora, la cepa *S. aureus ssp aureus* procedente de la Colección Española de Cultivos Tipo nº 4146 NCIB 10819. Esta cepa se caracteriza por ser sensible a todos los antibióticos excepto a la novobiocina. Pensamos que si la estirpe SE 224C poseía un plásmido que albergaba los determinantes genéticos para codificar la ANT(4')(4''), quizás podría transmitirlo por conjugación, tal como lo han observado otros autores (4,21,23,90,91,100,128). A pesar de repetir la prueba varias veces, no obtuvimos ningún transconjugante, lo que nos indicaba dos opciones: que el posible plásmido de resistencia no tuviera propiedades conjugativas, ó bien que en realidad la estirpe SE 224C no llevara ningún plásmido, tal como se observaba en la fotografía 1. Por lo tanto,

todo parecía indicar que los determinantes de la enzima ANT(4')(4") tenían una localización cromosómica, tal como se ha observado para cepas de *S. aureus* y *S. epidermidis* (112,191). Algunos autores sugieren que el gen aadD, que codifica la enzima ANT(4')(4") pudiera encontrarse en un transposón, pasando al cromosoma la información genética (112,191).

En el aislado SE 141, el gen que codifica la enzima bifuncional, puede estar situado en cualquiera de los dos plásmidos que presenta, cuyos pesos moleculares son 5,5 y 1,74 Md. La enzima APH(2") + AAC(6') se ha encontrado en plásmidos de alto peso molecular en numerosas ocasiones, tanto en *Staphylococcus aureus* como en *Staphylococcus epidermidis* (75,100,112,119,210).

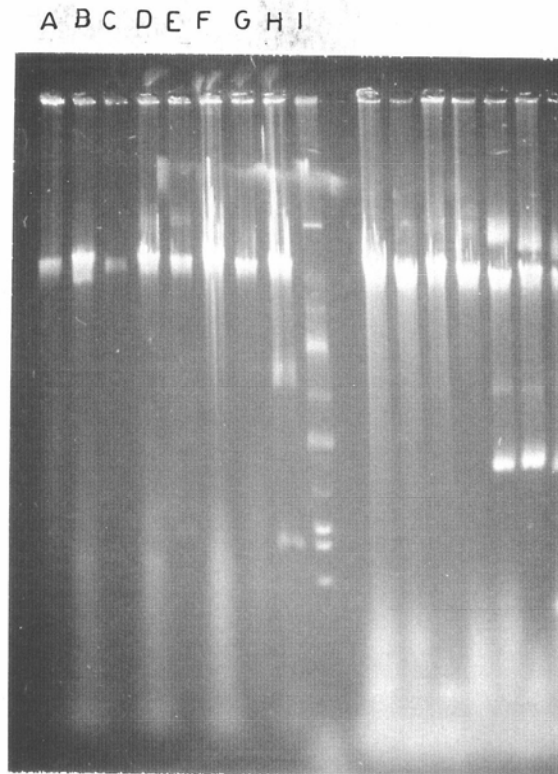
En las cepas SE 177 y SE 190, según se observa en la fotografía 1, las enzimas APH(3')-III y APH(2") + AAC(6') están localizadas en cada una de las cepas en un mismo plásmido de alto peso molecular. Para el aislado SE 177 es 41,7 Md; para la cepa SE 190 es 34,6 Md. La presencia de las enzimas APH(3')-III, que confiere resistencia a NEO, y APH(2") + AAC(6'), que causa resistencia a GM, TM y KM, en un mismo plásmido, va asociada con frecuencia a las propiedades conjugativas del mismo (213), tal como veremos más adelante.

* Transformación de ADN plasmídico.-

Otra técnica empleada para averiguar si los determinantes genéticos de resistencia a los antibióticos estaban codificados en plásmidos, fue la transformación.

Mediante esta técnica sólo se transformaron 7 *S. epidermidis*, de los cuales las cepas SE 213, SE 179, SE 177 y SE 19, pudimos comprobar más tarde, tenían

Fotografía 1.- Electroforesis de la extracción de ADN plasmídico de las estirpes curadas.



A: SE 224C

B: SE 224

C: SE 190C

D: SE 190

E: SE 177

F: SE 177C

G: SE 141C

H: SE 141

I: V-517

propiedades conjugativas. Las restantes estirpes transformadas fueron SE 223, SE 142 y SE 38. Cuando hablemos de los aislados transformados le pondremos el sufijo S a continuación de su número correspondiente de identificación.

Al igual que hicimos en la curación, estudiamos la sensibilidad de los transformantes a los distintos antibióticos empleados, mediante el antibiograma y el cálculo de las CMIs (tablas B y C (anexo)).

Por medio del método radioenzimático, comprobamos que las resistencias que exhibían las cepas transformantes respondían a la acción de las enzimas modificadoras de aminoglicósidos transferidas a través de plásmidos por las cepas donadoras. Sólo empleamos 2 ó 3 antibióticos para detectar la actividad enzimática en las transformantes. Estos resultados se observan en la tabla L (anexo).

Se determinó el biotipo de las transformantes mediante el sistema **API-STAPH** y se observó que se correlacionaba con el de la cepa receptora empleada, que en este caso fue el *S. aureus ssp. aureus* de la Colección Española de Cultivos Tipo nº 4146 NCIB 10819, que se caracteriza por ser sensible a todos los aminoglicósidos. El biotipo de esta cepa se puede observar en la tabla 19.

Posteriormente, procedimos a extraer el ADN plasmídico y realizar las correspondientes electroforesis en geles de agarosa.

Analizando los valores de resistencia y actividades enzimáticas presentadas por las cepas donadoras y transformantes, podemos observar que estas últimas presentan la misma resistencia a los aminoglicósidos que sus respectivas cepas donadoras, pero con unos

Tabla 19.- Biotipo presentado por la estirpe receptora *S. aureus ssp. aureus* de la CECT nº 4146 NCIB 10819.-

PRUEBAS	RESULTADOS
CONTROL	NEGATIVO
D-GLUCOSA	POSITIVO
D-FRUCTOSA	POSITIVO
D-MANOSA	POSITIVO
MALTOSA	POSITIVO
LACTOSA	POSITIVO
D-TREHALOSA	POSITIVO
D-MANITOL	POSITIVO
XILITOL	NEGATIVO
D-MELOBIOSA	NEGATIVO
NITRATO	POSITIVO
β -NAFTIL FOSFATO	POSITIVO
PIRUVATO DE SODIO	POSITIVO
RAFINOSA	NEGATIVO
XILOSA	NEGATIVO
SACAROSA	POSITIVO
α -METIL D-GLUCOSA	NEGATIVO
N-ACETIL-GLUCOSA	NEGATIVO
ARGININA	POSITIVO
UREA	POSITIVO

niveles de CMI ligeramente inferiores en algunos casos y superiores para otros antibióticos, tales como AN y NET. Este comportamiento que presentan los aislados transformantes, lo discutiremos posteriormente, cuando veamos la conjugación, ya que se repite.

Los transformantes SE 177S y SE 19S además se muestran resistentes a P; las cepas SE 142S y SE 38S han captado las resistencias a TE, C, CC y E en el primer caso, y a C, CC y E en el segundo caso, tras el proceso de transformación. Estos resultados sugieren que los marcadores de resistencia para estos antibióticos se encuentran localizados en plásmidos, y que se han transferido mediante transformación a la cepa receptora, junto con los marcadores de resistencia para los antibióticos aminoglicósidos.

Observando las enzimas producidas por los transformantes, vemos que las cepas SE 223S y SE 213S producen únicamente la enzima bifuncional APH(2'')+AAC(6'). Las correspondientes cepas donadoras sintetizaban además de esta enzima, la nucleotidasa ANT(4')(4''). Estos resultados nos sugieren que esta enzima puede tener un origen cromosómico en estos aislados, tal como lo mostraba la cepa SE 224 (112,191). Si observamos la fotografía 2, en la cepa SE 213S se observan dos plásmidos muy próximos al cromosoma, los cuales tienen unos pesos moleculares aproximados de 28,8 y 13 Md.

Las estirpes SE 179S, SE 177S y SE 38S sintetizan las enzimas APH(2'')+AAC(6') y APH(3')-III tal como lo hacían las cepas donadoras.

Observando la fotografía 2, podemos ver que las cepas SE 179S y SE 177S muestran un plásmido de alto peso molecular (50 y 41,7 Md respectivamente), transferido por transformación. Dichos plásmidos parecen albergar los determinantes genéticos que codifican las enzimas APH(3')-III y APH(2'')+AAC(6').

En la fotografía 2, vemos que la estirpe transformada SE 38S muestra tres plásmidos de 17,3 Md, 6,02 Md y 3,8 Md, como la cepa donadora; al igual que ella posee actividad APH(3')-III y APH(2'')+AAC(6'), además de las resistencias a C, CC y E.

La estirpe SE 142, muestra un plásmido de bajo peso molecular de 3,5 Md, y otro de alto peso molecular de 30,2 Md, muy próximo al cromosoma. La transformante SE 142S, ha captado los mismos plásmidos y exhibe el mismo patrón enzimático APH(2'')+AAC(6'), así como la resistencia a TE, C, CC y E.

Por último, la cepa SE 19S presenta dos plásmidos de 45,7 Md y 11,5 Md, y las siguientes enzimas APH(3')-III, APH(2'')+AAC(6') y APH(3''). La cepa donadora, SE 19 presenta estos dos plásmidos y estas enzimas, además de la AAD(6) que no se ha transferido, lo que nos sugiere un origen cromosómico.

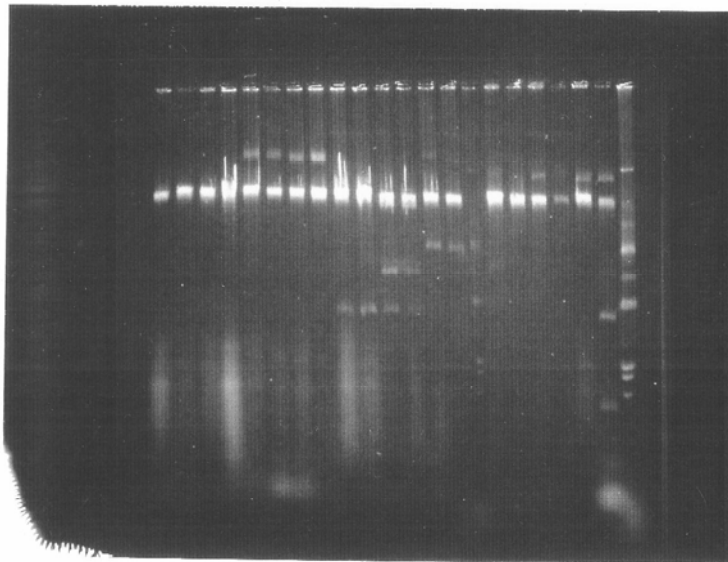
A pesar de que la selección de las transformantes se efectuó en placas de BHA+TM, BHA+SM y BHA+NEO, no pudimos obtener transformantes que expresaran las distintas actividades enzimáticas por separado. Cuando una estirpe posea diferentes enzimas, éstas se transmitan en bloque.

*** Transferencia conjugativa de plásmidos.-**

La transformación del ADN plasmídico, y las técnicas de curación, son complementarias para comprobar si los determinantes genéticos de la resistencia a aminoglicósidos están localizados en plásmidos ó no; pero lo que realmente nos interesa, es si estos plásmidos tienen la propiedad de transmitir la resistencia a los aminoglicósidos a otras cepas sensibles. Este fenómeno se puede estudiar mediante la conjugación.

Fotografía 2.- Electroforesis de la extracción de ADN plasmídico de las estirpes señaladas.

abcdefghijklmnopqrstuv



A: SE 223

B: SE 223S

C: SE 213

D: SE 213S

E: SE 179

F: SE 179S

G: SE 177

H: SE 177S

I: SE 142

J: SE 142S

K: SE 38

L: SE 38S

M: SE 19

N: SE 19S

O: V-517

P: SE 217

Q: SE 181

R: SE 66

S: SE 47

T: SE 354

U: SA 206

V: V-517

Para realizar los experimentos de conjugación, empleamos como cepa receptora el *Staphylococcus aureus ssp aureus* de la Colección Española de Cultivos Tipo nº 4146 NCIB 10819, que se caracteriza por ser resistente a la novobiocina y sensible a todos los demás antibióticos. Todos nuestros *Staphylococcus* resistentes, se mostraban sensibles a la NB.

Una vez realizábamos la conjugación, para conocer las resistencias transmitidas, se hicieron antibiogramas y se determinaron las CMI de los transconjugantes. Los resultados se muestran en las tablas B y C (anexo), junto a los de las cepas donadoras. Al igual que hicimos con las curadas y transformantes, a las estirpes transconjugantes las denominamos con el número de identificación de la estirpe donadora seguido de la letra T.

Para verificar que la cepa transconjugante no correspondía a una contaminación, a pesar del perfil de resistencia que mostraba, realizamos la identificación de las mismas mediante el sistema API-STAPH comprobando que el biotipo de las estirpes transconjugantes coincidía con el de la cepa receptora, resistente a la NB.

A continuación, para comprobar que los plásmidos transmitidos codificaban la síntesis de enzimas modificadoras de aminoglicósidos, realizamos la detección de las mismas por el método radioenzimático en las cepas transconjugantes. Sólo utilizamos dos ó tres aminoglicósidos para detectar la actividad enzimática. Estas se muestran en la tabla L (anexo), conjuntamente con las detectadas en las cepas donadoras y transformantes.

De los 16 *S. epidermidis* estudiados, 6 parecían tener plásmidos conjugativos, eran las cepas SE 213T, SE 190T, SE 180T, SE 179T, SE 177T y SE 19T, representando un 37,5% del total de los *S. epidermidis*. No obstante, en los *S. aureus* el

porcentaje fue mayor, mostrando 4 de los 6 *S. aureus* (SA 234T, SA 221T, SA 191T y SA 100T), plásmidos conjugativos; es decir el 67% tenían la propiedad de transmitir genes de resistencia a los aminoglicósidos.

Intentamos realizar el proceso de conjugación mediante la mezcla de cultivos líquidos de la cepa donadora y receptora, pero sin pasarlos a través de un filtro de membrana. No obtuvimos ningún resultado según este procedimiento. Sólo fue factible mediante el paso de las células receptoras y donadoras a través de filtros de nitrocelulosa. El aumento de la densidad de las células en el filtro incrementaba la frecuencia de transferencia.

No obstante, la frecuencia de conjugación, se vió aumentada aún más, al incubar los filtros directamente en las placas de agar de infusión cerebro y corazón que contenían el antibiótico aminoglicósido correspondiente y la novobiocina. Evans y Dyke (52), explican este hecho, argumentando que la incubación del filtro en placas con ambos antibióticos ayuda a seleccionar la formación de transconjugantes "prematuros".

La selección de las estirpes transconjugantes la realizamos en placas de BHA que contenían NB+TM, para seleccionar las cepas productoras de APH(2") + AAC(6') y ANT(4')(4"); en las placas de BHA con NB+NEO, crecían las cepas con actividad APH(3')-III, mientras que en las placas de BHA con NB+SM, se detectarían las cepas productoras de APH(3") ó bien de AAD(6).

Si comparamos las CMI de los transconjugantes con las de las cepas donadoras, en el caso de los *S. epidermidis*, no difieren excesivamente entre ambos grupos, apreciándose en casi todos los casos un aumento en la CMI de los transconjugantes a la AN

y NET. Este incremento en los niveles de resistencia a la NET y AN en cepas transconjugantes ha sido observado por otros autores (4).

En el caso de las cepas de *S. aureus* la tendencia de las transconjugantes a mostrar niveles de resistencia más altos, parece estar más generalizado. Es posible que en el aislamiento de las cepas transconjugantes se haya producido una presión selectiva, escogiendo la forma más eficaz de la enzima. Los valores de CMI no sólo dependen de la afinidad y velocidad de inactivación enzimática del antibiótico, sino también de la velocidad de acumulación por la célula entera (108). Puede ocurrir que en las estirpes transconjugantes la velocidad de entrada del antibiótico sea menor que la de inactivación, por lo que la enzima inactivaría todo el antibiótico que entrase, lo que explicaría la resistencia que presentaran estas estirpes.

Para otros autores (105), el hecho de que las transconjugantes presenten valores de CMI superiores a los de las cepas donadoras, puede ser el reflejo de las diferencias de expresión del mismo gen en dos cepas distintas.

Seguimos observando los valores de resistencia en las estirpes transconjugantes, y vemos que todas se muestran sensibles a la SP (CMI \leq 80 $\mu\text{g/ml}$), excepto la cepa SA 234T, que presenta una CMI: 128 $\mu\text{g/ml}$.

Las estirpes SE 213, SE 180 y SE 177, se mostraban inicialmente resistentes a SP, pero esta resistencia no parecía deberse a una inactivación enzimática. El hecho de poseer un único plásmido, como ya veremos, y que sus respectivas transconjugantes sean sensibles a dicho antibiótico, apoya la hipótesis de que la resistencia puede estar ocasionada por alteraciones ó mutaciones de las proteínas ribosómicas, codificadas en el cromosoma

bacteriano (15,58).

En el caso de la cepa SA 234, todo parece indicarnos, que la resistencia a la SP se transmite por conjugación, y es posible que esté producida por una AAD(3'')(9) que no pudiéramos detectar por el método radioenzimático, ni en la cepa donadora, ni en su respectiva transconjugante SA 234T.

En ningún caso detectamos en las cepas transconjugantes enzimas que no hubiéramos detectado previamente en las cepas donadoras.

Si observamos en la tabla L (anexo) las cepas donadoras que se han conjugado, vemos que se distinguen 4 patrones enzimáticos, entre los que tenemos: cepas productoras de APH(2'')+AAC(6') sin ningún otro tipo de actividad, donde encontramos los aislados SA 234 y SA 221. Las cepas donadoras SE 213 y SE 180, presentan dos tipos de enzimas, la bifuncional APH(2'')+AAC(6') y la adenilasa ANT(4')(4''). Otro patrón hallado es el que presentan las cepas SE 190, SE 179 y SE 177, donde se detectan las enzimas APH(2'')+AAC(6') y APH(3')-III. Por último, encontramos el patrón enzimático APH(2'')+AAC(6'), APH(3')-III y APH(3''), en las cepas SE 19, SA 191 y SA 100; hallándose presente también la AAD(6) en la estirpe SE 19.

Estudiando las resistencias y actividades enzimáticas, observamos que en las estirpes con el patrón enzimático APH(2'')+AAC(6') y ANT(4')(4''), que corresponde a las cepas SE 213 y SE 180, sólo se transmitió las actividades correspondientes a la enzima bifuncional. El hecho de que la estirpe SE 180 posea un sólo plásmido, tal como vemos en la fotografía 3, y que éste se haya transmitido por conjugación, parece indicarnos que los determinantes genéticos que codifican la producción de la adenilasa ANT(4')(4'') son de

localización cromosómica, tal como hemos visto al estudiar la estirpe SE 224 y su derivada curada SE 224C; y las transformantes SE 223S y SE 213S (112,191). No obstante, en muchas ocasiones la enzima ANT(4')(4"), se transfiere en el mismo plásmido junto con la enzima bifuncional APH(2") + AAC(6') (4,21,91,128).

En las restantes cepas transconjugantes, se detectó el mismo patrón enzimático que en las cepas donadoras. Así tenemos que las estirpes SE 190T, SE 179T y SE 177T presentaban las enzimas APH(2") + AAC(6') y APH(3')-III, al igual que sus respectivas donadoras. En la tabla 20, observamos los patrones enzimáticos encontrados en las cepas transconjugantes y las resistencias adquiridas.

En el caso de las cepas SA 221 y SA 234, cedieron el plásmido que codifica la única enzima que producían, a la cepa receptora, mostrando las transconjugantes la APH(2") + AAC(6').

Las enzimas APH(3')-III, APH(3") y APH(2") + AAC(6'), se detectaron en las transconjugantes SA 191T, SA 100T y SE 19T. Estas actividades estaban presentes en las cepas donadoras, encontrándose también la AAD(6) en la SE 19, que no se detectó en la transconjugante SE 19T. Tratándose de una adenilasa puede que no hayamos podido detectarla en el aislado SE 19T dado el carácter lábil de la misma, ó bien que el determinante genético fuese de origen cromosómico, puesto que por transformación tampoco se transfirió esta enzima. No obstante, la resistencia a la SM, originada por la cepa SE 19T, está plenamente justificada por la producción de la enzima fosforilasa APH(3") transmitida a través de la conjugación.

Con la finalidad de caracterizar los plásmidos presentes en nuestros

Tabla 20.- Patrones enzimáticos encontrados en las cepas transconjugantes y resistencias adquiridas por las mismas.-

PATRONES	CEPAS	RESISTENCIAS ADQUIRIDAS
PE ₁ : APH(2'') + AAC(6')	SE 213T, SE 180T, SA 234T, SA 221T	GM, TM, KM, DKB, SIS, (AN), (NET), (ISE)
PE ₂ : APH(2'') + AAC(6') APH(3')-III	SE 190T, SE 179T, SE 177T	GM, TM, KM, DKB, NEO, PM, RM, SIS, BT, LM, AN, NET, ISE
PE ₃ : APH(2'') + AAC(6') APH(3')-III, APH(3'')	SE 19T, SA 191T, SA 100T	GM, TM, KM, DKB, SIS, NEO, PM, RM, BT, LM, SM, (AN), (NET), (ISE)

El paréntesis (), nos indica que algunas cepas han adquirido la resistencia a ese antibiótico y otras no.

Staphylococcus, hemos considerado el fenotipo de la cepa transconjugante como el del plásmido transferido.

En ningún caso obtuvimos dos ó más transconjugantes a partir de una misma cepa donadora, a pesar de que en la selección de las mismas, empleamos placas con los antibióticos adecuados para ese fin, tal como vimos anteriormente. Esto puede ser debido a que no todos los plásmidos tienen la capacidad para transmitirse por sí mismos. Sólo poseen esta propiedad, los llamados plásmidos conjugativos.

Examinando de nuevo las resistencias en las estirpes transconjugantes (tabla B (anexo)), observamos que en 4 ocasiones, las cepas SE 177T, SE 19T, SA 191T y SA 100T, han captado junto con la resistencia a los distintos aminoglicósidos, la resistencia a P y AM. Si recordamos cuando comentamos los resultados referentes a la curación, veíamos que la cepa SE 177C, se mostraba sensible a P y AM, por lo que parece ser que el determinante genético que codifica la β -lactamasa que causa resistencia a la P se encuentra en el mismo plásmido de resistencia a los aminoglicósidos, que además es conjugativo. En la transformación, pudimos demostrar que los transformantes SE 177S y SE 19S habían adquirido el plásmido de resistencia a la P y AM.

El resto de las cepas transconjugantes no parecen mostrar resistencia a la P y AM, a pesar de que las donadoras lo fueran. Parece ser que tras la conjugación, las cepas transconjugantes pueden perder la capacidad de producir β -lactamasas y por lo tanto pierden también la resistencia a la penicilina (213). Las estirpes SE 180, SE 179 y SE 177 que se muestran resistentes a CC y E no transfieren esas resistencias a la cepa receptora, por lo que las transconjugantes se muestran sensibles a los mismos.

Archer y Johnston (4), describen plásmidos conjugativos que codifican sólo la producción de antibióticos aminoglicósidos, y no confieren resistencia a ningún otro antimicrobiano. Hechos similares aparecen descritos a lo largo de la bibliografía (55,64,91).

En otras ocasiones, se produce cotransferencia de marcadores de resistencia a P junto con la resistencia a GM (4,64,91); ó bien de antibióticos macrólidos, cloranfenicol y tetraciclina junto a la resistencia a los aminoglicósidos (52,55,128). Puede ser por movilización de otros plásmidos que albergan esos determinantes (55,128), ó bien porque se encuentren todos en el mismo plásmido (128).

Es muy importante la difusión de plásmidos conjugativos que cotransfieren ó bien movilizan otros plásmidos de resistencia, ya que el uso de un tipo de antibiótico puede seleccionar la resistencia a otros. Cuando los genes de resistencia a los aminoglicósidos y β -lactámicos se encuentran en un mismo plásmido ó transposón, aunque los mecanismos de resistencia sean diferentes, se produce una resistencia cruzada.

Para completar el estudio, y tal como lo hemos comentado anteriormente, realizamos la extracción del ADN plasmídico y las electroforesis en geles de agarosa. Analizamos cada estirpe donadora con su respectiva transconjugante.

La cepa SE 180 y su transconjugante SE 180T, presentan un sólo plásmido muy cerca del cromosoma y de peso molecular 19,5 Md (fotografía 2). La transconjugante producía la enzima bifuncional APH(2'')+AAC(6'), pero no parecía poseer actividad ANT(4')(4''), que tal como hemos comentado repetidamente, pudiera tener localización cromosómica.

Las cepas SA 234 y SA 221 mostraban un sólo plásmido por encima del cromosoma y de alto peso molecular (28,8 y 25 Md respectivamente), (fotografía 5), y sintetizaban únicamente la enzima bifuncional APH(2'')+AAC(6'). Las respectivas transconjugantes adquirieron ese plásmido y mostraban esas actividades enzimáticas.

Las estirpes SE 190, SE 179 y SE 177 (fotografía 4), presentaban dos tipos de actividades, la APH(3')-III y la APH(2'')+AAC(6') y un sólo plásmido de alto peso molecular (34,7, 50, 41,7 Md respectivamente). Las transconjugantes exhibían las mismas actividades que las donadoras y habían adquirido el plásmido de alto peso molecular.

El hecho de que estas enzimas se encuentren en el mismo plásmido y tengan la propiedad de transmitirse por conjugación, ha sido observado por otros autores en numerosas ocasiones (75,193,213).

La estirpe SE 213 (fotografía 3), presenta dos plásmidos muy próximos al cromosoma, de pesos moleculares 28,8 Md y 13 Md. La cepa SE 213T, presenta ambos plásmidos, pero sólo es capaz de producir la enzima APH(2'')+AAC(6'). No se detectó en la transconjugante, la enzima ANT(4')(4"). Esto puede ser debido al carácter lábil de la misma; ó bien a que en realidad los marcadores genéticos fueran de origen cromosómico, como parecía ocurrir en las cepas SE 224, SE 223 y SE 180. Este hecho nos pareció el más probable, debido a que también la cepa transformante SE 213S, mostraba solamente la enzima APH(2'')+AAC(6').

La cepa SA 191, presentaba tres plásmidos de pesos moleculares 21,37 Md, 4,57 Md y 2,88 Md, y producía las enzimas APH(2'')+AAC(6'), APH(3')-III y APH(3"). La transconjugante SA 191T recibió los tres plásmidos y exhibía las mismas actividades

enzimáticas, tal como vemos en la fotografía 5.

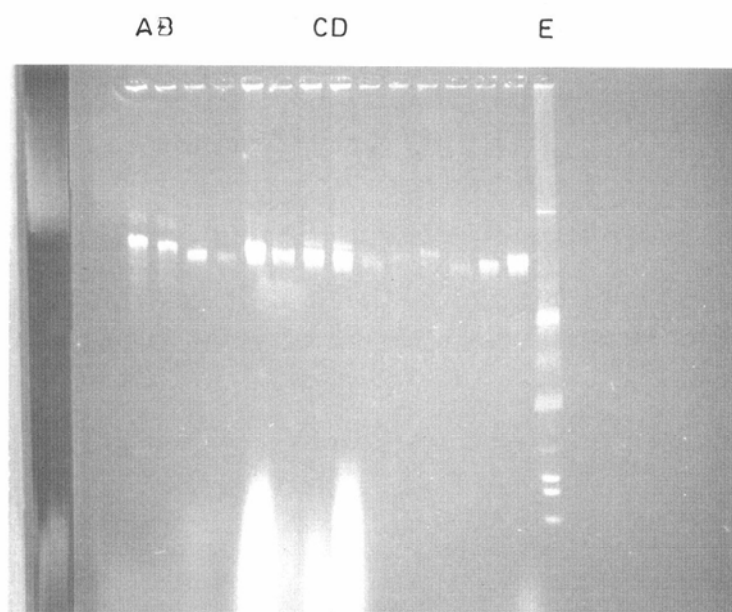
La estirpe transconjugante SA 100T producía las enzimas APH(3')-III, APH(2'')+AAC(6') y APH(3''), y al igual que la cepa donadora, poseía cuatro plásmidos de pesos moleculares 18,2, 4,6, 2,8 y 1,9 Md (fotografía 5).

El aislado SE 19, presentaba una gran cantidad de enzimas, APH(2'')+AAC(6'), APH(3''), APH(3')-III y AAD(6), y dos plásmidos de 45,7 y 11,5 Md de peso molecular, los cuales transfirió a la cepa receptora. La transconjugante mostraba las siguientes enzimas: APH(2'')+AAC(6'), APH(3')-III y APH(3'') (fotografía 4).

En estos tres últimos casos, en las cepas SA 191, SA 100 y SE 19 no podemos establecer a qué plásmido corresponde cada actividad enzimática. Puede ser que todos los plásmidos transferidos tengan propiedades conjugativas, pero nos inclinamos a pensar que el plásmido conjugativo moviliza los otros plásmidos. Esto es lo que sucede generalmente (55,64,128,194,198). Forbes y Schaberg (55) se cuestionaron el papel que juega el plásmido conjugativo en la movilización y cotransferencia de resistencia. Observaron que un derivado curado de la cepa transconjugante que carecía del plásmido que confería resistencia a la GM, era incapaz de transmitir los otros plásmidos mediante conjugación a una cepa receptora.

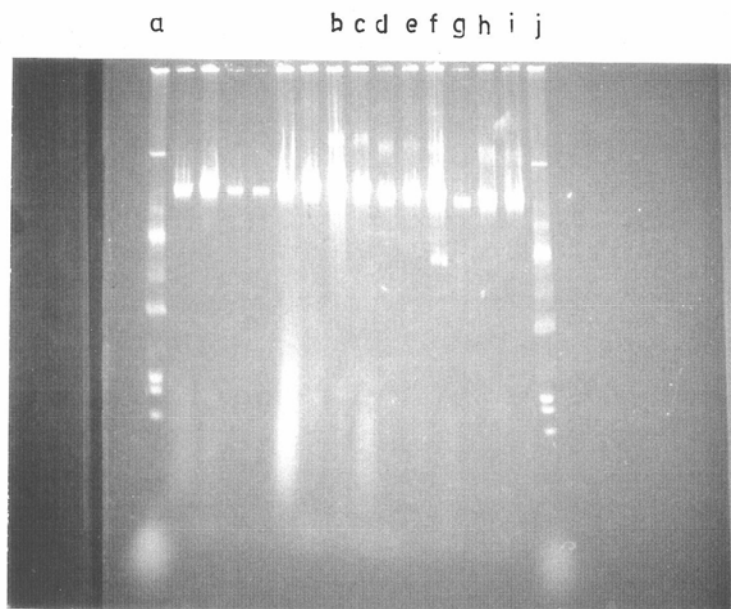
Otro hecho sorprendente, es que la actividad APH(2'')+AAC(6') está presente en todos los transconjugantes. Esto nos hace pensar que el plásmido donde reside este tipo de actividad que causa resistencia a GM, es el que posee los determinantes para llevar a cabo el proceso de conjugación (4,52,55,64,91,128,213).

Fotografía 3.- Electroforesis de la extracción de ADN plasmídico de las estirpes transconjugantes señaladas.



- A: SE 213
- B: SE 213T
- C: SE 180
- D: SE 180T
- E: V-517

Fotografía 4.- Electroforesis de la extracción de ADN plasmídico de las estirpes transconjugantes señaladas.



A: V-517

B: SE 179

C: SE 179T

D: SE 177

E: SE 177T

F: SE 19

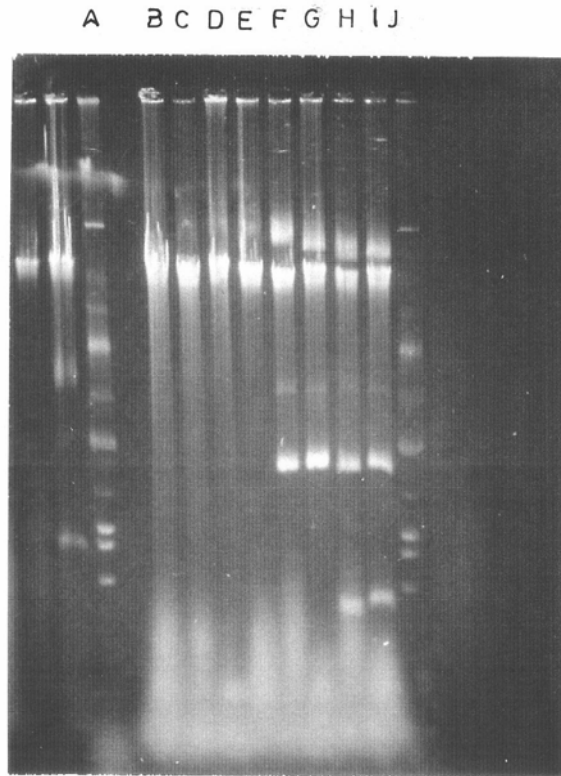
G: SE 19T

H: SE 190

I: SE 190T

J: V-517

Fotografía 5.- Electroforesis de la extracción de ADN plasmídico de las estirpes transconjugantes señaladas.



A: V-517

B: SA 234

C: SA 234T

D: SA 221

E: SA 221T

F: SA 191

G: SA 191T

H: SA 100

I: SA 100T

J: V-517

Estos plásmidos son fácilmente identificables en las cepas SE 180, SE 179, SE 190, SE 177, SA 234 y SA 221. Sus pesos moleculares varían desde 19,5 Md hasta 50 Md, lo que está en concordancia con lo observado por otros autores, quienes han detectado plásmidos conjugativos que confieren resistencia a GM, de alto peso molecular, tanto en cepas de *S. aureus* como en *S. epidermidis* (4,55,64,91,128,213).

Considerando los procesos de curación, transformación y conjugación en conjunto, podemos establecer que la resistencia a los antibióticos aminoglicósidos se localizó en plásmidos en 11 de los 16 *S. epidermidis* y en 4 de los 6 *S. aureus*. De las 11 cepas de *S. epidermidis*, 6 poseían plásmidos conjugativos, mientras que los 4 *S. aureus* poseían plásmidos con esta propiedad.

No pudimos demostrar en todas las cepas que la resistencia a los aminoglicósidos estaban codificadas por plásmidos. Las estirpes SE 217, SE 181, SE 66, SE 47, SE 354, SA 206 y SA 17 no se conjugaron, ni transferieron su material genético por transformación, ni perdieron sus plásmidos mediante los procedimientos empleados en la curación. A pesar de ello, realizamos una extracción del ADN plasmídico y realizamos una electroforesis en gel de agarosa, donde pudimos observar que poseen material genético extracromosómico, tal como se aprecia en la fotografía 2.

Otros autores han observado frecuencias similares de plásmidos conjugativos entre los aislados de *S. epidermidis*. Así tenemos que Archer y col. (4) encontraron sólo tres cepas de 10 *S. epidermidis* capaces de transmitir la resistencia a GM por conjugación. Forbes y Schaberg (55), encontraron una frecuencia de 2 de 6 aislados de *S. epidermidis* con esta propiedad. Zorbas y col. (213) observaron que sólo 9 *S. epidermidis* poseían esta propiedad.

Esto parece indicar que los plásmidos que muestran las estirpes antes mencionadas carecen del gen *tra* implicado en los procesos de conjugación, ó bien son plásmidos conjugativos defectuosos (213).

Archer y col. (5) estudiando la prevalencia de plásmidos conjugativos en distintos hospitales de Estados Unidos, encontraron que ésta era alta entre los *S. aureus* resistentes a la GM y ME, siendo probablemente la causa de la diseminación de la resistencia a la GM entre los *S. aureus* a lo largo del país.

No obstante, en Irlanda (174) y Australia (118), a pesar de que la prevalencia de *S. aureus* resistentes a GM y ME es alta, la presencia de plásmidos conjugativos es infrecuente. La resistencia a GM puede estar codificada por un transposón y los genes encontrarse en el cromosoma ó en plásmidos no conjugativos.

La prevalencia de plásmidos conjugativos observada por Archer y col. (5) entre los aislados coagulasa negativos meticilín resistentes fue bastante baja. Muchos autores han sugerido que los estafilococos coagulasa negativos pueden servir como reservorios de genes de resistencia capaces de transferir los mismos y movilizar pequeños plásmidos de resistencia mediante conjugación a cepas de *S. aureus* más virulentas. La baja prevalencia de estos plásmidos conjugativos entre la población de *Staphylococcus* estudiados no contradice la hipótesis anterior. Los *S. epidermidis* están sujetos a una presión antimicrobiana mayor que los *S. aureus*, al formar parte de la flora normal de la piel. Además la prevalencia de un determinado gen no tendría que ser alta entre la población de microorganismos para servir como reservorio de genes capaces de transferirse (5).

En resumen, la transferencia de resistencia a antibióticos tales como GM,

TM, KM, entre otros aminoglicósidos mediante conjugación *in vitro*, parece indicarnos que determinadas cepas de *S. aureus* y *S. epidermidis* pueden servir como reservorios de genes que codifican enzimas modificadoras de aminoglicósidos y transferir las mismas a estirpes más virulentas, y con mayores implicaciones clínicas.

ANEXO

Tabla A.- Valores de CMI₅₀ y CMI₉₀ de las estirpes de *Staphylococcus*.-

<i>S. aureus</i>					
ANTIBIOTICO	CMI ₅₀ (Nº Cepas)		CMI ₉₀ (Nº Cepas)		RANGO
P	2	(22)	8	(36)	0,06-32
AM	4	(21)	32	(36)	0,25-64
CX	1	(33)	2	(40)	0,12-2
ME	4	(33)	8	(40)	2-8
TIC	4	(27)	32	(36)	1-64
FOX	2	(27)	4	(39)	0,06-32
CID	4	(21)	16	(39)	2-32
CXM	2	(33)	4	(39)	0,5-32
ZOX	2	(32)	4	(38)	0,12-64
CAZ	8	(34)	16	(40)	1-16
CTX	2	(27)	4	(37)	0,06-16
NOR	1	(32)	2	(36)	0,25-64
CIP	0,12	(20)	0,5	(36)	0,06-4
NA	32	(25)	512	(40)	16-512
IPM	0,06	(33)	0,12	(38)	0,06-2
GM	4	(31)	32	(36)	0,12-128
TM	8	(34)	32	(38)	0,12-512
DKB	4	(22)	16	(36)	0,12-512
AN	2	(30)	8	(36)	0,12-128
NET	2	(34)	4	(36)	0,06-32
ISE	2	(28)	8	(37)	0,06-16
VA	1	(28)	2	(40)	0,5 -2
TE	0,5	(26)	1	(36)	0,25-2

Tabla A.- Valores de CMI₅₀ y CMI₉₀ de las estirpes de *Staphylococcus*.- (Continuación)

<i>S. epidermidis</i>					
ANTIBIOTICO	CMI ₅₀ (Nº Cepas)		CMI ₉₀ (Nº Cepas)		RANGO
P	4	(15)	32	(24)	0,12-64
AM	8	(16)	64	(25)	0,25-64
CX	8	(14)	64	(25)	0,12-64
ME	32	(14)	64	(25)	1-64
TIC	16	(15)	64	(25)	1-64
FOX	2	(14)	16	(23)	0,06-32
CID	16	(22)	32	(25)	0,5-32
CXM	4	(16)	32	(25)	0,12-32
ZOX	16	(15)	64	(25)	0,06-64
CAZ	8	(17)	16	(23)	2-32
CTX	4	(17)	16	(23)	0,06-32
NOR	1	(15)	4	(23)	0,12-64
CIP	0,12	(17)	2	(23)	0,06-16
NA	64	(16)	512	(25)	16-512
IPM	0,12	(18)	1	(24)	0,06-2
GM	16	(16)	64	(25)	0,06-64
TM	64	(15)	512	(25)	0,06-512
DKB	16	(16)	32	(24)	0,25-64
AN	8	(16)	32	(25)	0,06-32
NET	4	(14)	8	(25)	0,06-8
ISE	8	(14)	16	(25)	0,25-16
VA	2	(19)	4	(25)	1-4
TE	2	(19)	4	(25)	0,25-4

Tabla A.- Valores de CMI₅₀ y CMI₉₀ de las estirpes de *Staphylococcus*.- (Continuación)

Otros <i>Staphylococcus</i>				
ANTIBIOTICO	CMI ₅₀ (Nº Cepas)		CMI ₉₀ (Nº Cepas)	RANGO
P	0,5	(12)	8 (22)	0,06-64
AM	2	(14)	32 (22)	0,25-64
CX	1	(15)	16 (22)	0,06-64
ME	4	(14)	64 (24)	1-64
TIC	2	(12)	64 (24)	2-64
FOX	1	(13)	8 (22)	0,06-64
CID	8	(16)	32 (22)	2-256
CXM	2	(12)	32 (22)	0,5-128
ZOX	4	(13)	32 (23)	0,06-256
CAZ	8	(19)	64 (23)	1-128
CTX	2	(15)	16 (22)	0,06-64
NOR	0,5	(12)	2 (23)	0,25-8
CIP	0,12	(12)	1 (24)	0,06-1
NA	32	(15)	256 (23)	8-512
IPM	0,06	(22)	0,06 (22)	0,06-0,5
GM	0,5	(12)	8 (23)	0,12-16
TM	2	(19)	16 (22)	0,12-64
DKB	4	(16)	8 (24)	0,25-8
AN	2	(20)	4 (23)	0,12-8
NET	1	(12)	4 (23)	0,06-8
ISE	1	(18)	2 (24)	0,06-2
VA	1	(16)	2 (22)	0,5-4
TE	0,5	(15)	1 (22)	0,25-2

Tabla B.- Resultados de los antibiogramas.-

ESTIRPES	ANTIBIOTICOS																	
	GM	TM	KM	DKB	AN	NET	NEO	SIS	SM	P	AM	ME	TE	C	CC	VA	E	NB
SE 354	S	S	R	S	R	S	R	S	S	R	R	R	S	S	S	S	R	S
SE 224	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	R	R	S	S	R	S	R	S
224C	S	R	R	S	R	S	S	S	S	R	R	R						
SE 223	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S
223S	R	R	R	R	R	I	S	R	S	S	S		S	S	S	S	S	R
SE 217	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	S	S	R	S	R	S
SE 213	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S
213T	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S		S	S	S	S	S	R
213S	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S		S	S	S	S	S	R
SE 190	R	R	R	I	S	S	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S
190C	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R						
190T	R	R	R	R	R	I	R	I	S	S	S		S	S	S	S	S	R

S: Sensible R: Resistente I: Intermedio

Tabla B.- Resultados de los antibiogramas.- (Continuación)

ANTIBIOTICOS																		
ESTIRPES	GM	TM	KM	DKB	AN	NET	NEO	SIS	SM	P	AM	ME	TE	C	CC	VA	E	NB
SE 181	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S
SE 180	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	R	R	S	S	R	S	R	S
180T	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S		S	S	S	S	S	R
SE 179	R	R	R	R	R	S	R	R	I	R	R	R	S	S	R	S	R	S
179T	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S		S	S	S	S	S	R
179S	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S		S	S	S	S	S	R
SE 177	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	S	S	R	S	R	S
177C	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R						
177T	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R		S	S	S	S	S	R
177S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R		S	S	S	S	S	R
SE 142	R	R	R	R	I	I	S	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	S
142S	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S		R	R	R	S	R	R

S: Sensible

R: Resistente

I: Intermedio

Tabla B.- Resultados de los antibiogramas.- (Continuación)

ESTIRPES	ANTIBIOTICOS																	
	GM	TM	KM	DKB	AN	NET	NEO	SIS	SM	P	AM	ME	TE	C	CC	VA	E	NB
SE 141	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S
141C	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R						
SE 66	R	R	R	I	I	S	S	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S
SE 47	R	R	R	R	S	S	S	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S
SE 38	R	R	R	R	S	S	S	R	S	R	R	R	S	R	R	S	R	S
38S	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S		S	R	R	S	R	S
SE 19	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S
19T	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		S	S	S	S	S	R
19S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		S	S	S	S	S	R
SA 234	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
234T	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S		S	S	S	S	S	R

S: Sensible R: Resistente I: Intermedio

Tabla B.- Resultados de los antibiogramas.- (Continuación)

	ANTIBIOTICOS																	
	GM	TM	KM	DKB	AN	NET	NEO	SIS	SM	P	AM	ME	TE	C	CC	VA	E	NB
SA 221	R	R	R	R	S	S	S	R	I	R	R	R	S	S	S	S	S	S
221T	R	R	R	R	S	S	S	R	S	S	S		S	S	S	S	S	R
SA 206	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S
SA 191	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	S	I	S	S	R	S
191T	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R		S	S	S	S	S	R
SA 100	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S
100T	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R		S	S	S	S	S	R
SA 17	R	R	R	R	S	S	S	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S

S: Sensible R: Resistente I: Intermedio

Tabla C.- CMI de las cepas de *Staphylococcus*.-

CEPA	CMI ($\mu\text{g/ml}$)																
	GM	TM	KM	DKB	AN	NET	NEO	PM	RM	SIS	ISE	APRA	SM	SP	BT	LM	NB
SE 354	0,25	0,12	>512	1	0,06	0,06	512	>512	>512	0,25	16	1	4	32	128	>512	0,06
SE 224	16	256	512	32	8	8	8	512	>512	256	8	0,5	1	>512	512	4	0,12
224C	4	256	256	16	1	2	8	512	>512	4	16	0,5	1	>512	512	4	0,06
SE 223	16	256	512	32	16	8	8	512	512	256	8	0,5	1	>512	256	4	0,25
223S	32	16	64	16	128	8	8	128	128	16	8	0,5	1	64	128	4	16
SE 217	32	256	>512	32	32	8	16	>512	>512	256	16	0,5	1	64	256	>512	0,25
SE 213	32	64	512	32	32	4	4	256	512	256	16	0,5	1	128	>512	4	0,25
213T	64	64	256	32	128	8	4	128	128	16	32	1	1	64	64	4	16
213S	64	16	64	32	128	8	8	128	128	16	16	1	1	64	128	4	16
SE 190	16	16	>512	16	4	2	16	512	>512	128	4	0,5	1	64	128	512	0,12
190C	0,06	0,06	0,25	0,25	0,06	0,06	4	0,5	1	0,12	0,5	0,5	1	64	2	2	0,06
190T	16	16	512	16	16	4	16	128	128	16	32	1	1	64	32	16	16
SE 181	32	128	>512	16	32	8	16	>512	>512	256	16	0,5	1	64	256	>512	0,25

Tabla C.- CMI de las cepas de *Staphylococcus*.- (Continuación)

CEPA	CMI ($\mu\text{g/ml}$)																
	GM	TM	KM	DKB	AN	NET	NEO	PM	RM	SIS	ISE	APRA	SM	SP	BT	LM	NB
SE 180	32	512	>512	32	32	8	4	>512	>512	256	16	0,5	1	>512	512	8	0,25
180T	64	512	512	16	32	8	16	128	128	32	32	1	1	64	32	4	16
SE 179	64	128	>512	32	32	8	64	>512	>512	256	16	0,5	1	32	512	>512	0,12
179T	32	32	>512	16	128	16	32	128	128	16	16	1	1	32	64	64	16
179S	32	32	128	32	128	8	3	128	128	16	16	0,5	1	32	64	128	16
SE 177	64	64	>512	64	32	8	128	>512	>512	256	16	0,5	1	128	512	>512	0,12
177C	0,06	2	0,5	0,25	0,5	0,06	0,25	0,25	0,06	0,06	0,5	0,5	1	64	0,06	0,06	0,12
177T	64	256	>512	128	128	16	128	>512	>512	128	32	2	1	32	128	>512	16
177S	64	16	512	32	128	8	32	128	128	16	16	0,5	1	32	128	>512	16
SE 142	16	64	256	16	8	2	8	256	>512	64	8	0,5	1	32	512	8	0,12
142S	16	16	128	16	128	8	8	128	128	16	8	0,5	1	64	512	8	16
SE 141	16	256	512	16	8	2	8	512	>512	64	16	0,5	4	64	>512	4	0,12
141C	0,06	0,06	1	0,25	1	0,06	0,25	2	1	0,12	0,5	1	4	32	4	2	0,06
SE 66	16	512	256	16	8	1	8	512	>512	32	16	0,5	1	64	>512	4	0,12

Tabla C.- CMI's de las cepas de *Staphylococcus*.- (Continuación)

		CMI ($\mu\text{g/ml}$)																
CEPA		GM	TM	KM	DKB	AN	NET	NEO	PM	RM	SIS	ISE	APRA	SM	SP	BT	LM	NB
SE	47	32	32	512	32	8	8	4	128	256	128	4	0,5	1	64	64	2	0,12
SE	38	64	512	512	32	16	8	16	>512	>512	256	16	0,5	2	>512	>512	8	0,12
	38S	16	16	64	16	16	1	2	64	16	16	16	0,5	1	64	>512	8	16
SE	19	32	32	>512	16	8	4	128	>512	>512	256	8	0,5	512	32	64	>512	0,25
	19T	16	16	>512	16	64	8	128	128	>512	16	32	16	512	64	64	>512	16
	19S	16	16	256	16	64	1	128	128	128	16	16	1	512	32	64	>512	16
SA	234	128	64	>512	128	16	8	0,12	2	512	512	8	2	4	128	4	4	0,25
	234T	>512	512	>512	>512	128	64	2	2	>512	>512	32	4	1	128	64	4	16
SA	221	16	32	128	16	2	1	4	64	64	32	4	4	2	256	16	2	0,25
	221T	256	512	>512	256	64	8	4	>512	>512	128	32	4	1	64	64	4	16
SA	206	128	512	>512	512	128	32	256	>512	>512	>512	64	8	16	64	512	>512	0,25
SA	191	64	32	>512	32	16	8	256	>512	>512	>512	64	4	16	16	256	>512	0,25
	191T	32	32	>512	128	32	8	512	>512	>512	16	32	2	16	32	32	128	16

Tabla C.- CMI de las cepas de *Staphylococcus*.- (Continuación)

CEPA	CMI ($\mu\text{g/ml}$)																
	GM	TM	KM	DKB	AN	NET	NEO	PM	RM	SIS	ISE	APRA	SM	SP	BT	LM	NB
SA 100	64	32	>512	32	16	8	512	>512	>512	128	16	4	16	16	512	>512	0,25
100T	32	32	>512	128	32	8	512	>512	>512	16	16	2	16	32	32	32	16
SA 17	32	16	256	16	4	4	1	2	512	64	4	4	4	16	4	4	0,12
SA CECT	0,12	0,06	1	0,5	0,06	0,06	0,5	0,5	4	0,25	0,5	2	2	16	2	2	16

Tabla D.- Perfiles de fosforilasas.-

ESTIRPES					
ANTIBIOTICOS	SE 354	SE 224	SE 223	SE 217	
GM		100	100	100	86
TM		28	38	59	51
KM	25	49	22	231	128
DKB		41	39	41	36
AN	52	29	20	562	482
NET		59	59	84	72
NEO	100	3	2	116	100
PM	79			320	275
RM	82			319	273
ISE	55	16	21	336	289
BT	35			584	498
LM	50			644	553
SM	0	0	1	3	2

Los valores se han calculado considerando como 100% la actividad de la GM y de la NEO en aquellas cepas que presentan la APH(3')-III.

Tabla D.- Perfiles de fosforilasas.- (Continuación)

ESTIRPES				
ANTIBIOTICOS	SE 213	SE 190	SE 181	SE 180
GM	100	100 197	100 79	100
TM	44	37 72	43 34	34
KM	50	109 215	224 177	66
DKB	44	33 65	16 13	52
AN	38	146 287	194 153	43
NET	56	70 138	187 148	91
NEO	2	51 100	127 100	7
PM		105 207	286 226	
RM		114 224	291 230	
ISE	15	155 304	157 124	43
BT		46 89	156 123	
LM		34 67	145 115	
SM	0	3 5	2 1	0

Los valores se han calculado considerando como 100% la actividad de la GM y de la NEO en aquellas cepas que presentan la APH(3')-III.

Tabla D.- Perfiles de fosforilasas.- (Continuación)

ESTIRPES				
ANTIBIOTICOS	SE 179	SE 177	SE 142	SE 141
GM	100 147	100 249	100	100
TM	28 41	26 66	16	21
KM	130 192	109 66	44	26
DKB	95 140	21 52	30	46
AN	332 440	139 347	21	19
NET	119 176	14 35	103	63
NEO	68 100	40 100	1	2
PM	242 357	245 610		
RM	417 614	183 457		
ISE	191 282	181 452	19	37
BT	71 104	25 61		
LM	72 106	26 65		
SM	2 3	1 4	0	1

Los valores se han calculado considerando como 100% la actividad de la GM y de la NEO en aquellas cepas que presentan la APH(3')-III.

Tabla D.- Perfiles de fosforilasas.- (Continuación)

ESTIRPES				
ANTIBIOTICOS	SE 66	SE 47	SE 38	SE 19
GM	100	100	100 557	100 109
TM	35	40	75 421	16 17
KM	45	59	89 449	174 189
DKB	37	30	68 380	28 30
AN	41	35	73 409	253 275
NET	33	39	145 806	106 116
NEO	4	1	18 100	92 100
PM			53 294	198 215
RM			17 94	194 211
ISE	46	21	114 635	412 448
BT				209 227
LM				212 230
SM	1	0	0 3	9 10

Los valores se han calculado considerando como 100% la actividad de la GM y de la NEO en aquellas cepas que presentan la APH(3')-III.

Tabla D.- Perfiles de fosforilasas.- (Continuación)

ESTIRPES						
ANTIBIOTICOS	SA 234	SA 221	SA 206		SA 191	
GM	100	100	100	19	100	36
TM	35	22	33	6	97	35
KM	49	34	842	163	704	243
DKB	40	35	28	5	35	12
AN	30	43	41	8	498	172
NET	71	70	37	7	62	21
NEO	2	0	517	100	290	100
PM			694	134	377	130
RM			1062	205	472	163
ISE	27	61	2339	451	1124	456
BT			894	173	540	186
LM			896	173	523	180
SM	0	3	14	3	8	4

Los valores se han calculado considerando como 100% la actividad de la GM y de la NEO en aquellas cepas que presentan la APH(3')-III.

Tabla D.- Perfiles de fosforilasas.- (Continuación)

ESTIRPES			
ANTIBIOTICOS	SA 100		SA 17
GM	100	34	100
TM	72	25	40
KM	964	350	47
DKB	50	17	38
AN	1237	423	72
NET	29	10	114
NEO	292	100	12
PM	530	181	
RM	186	64	
ISE	866	296	83
SM	12	4	4

Los valores se han calculado considerando como 100% la actividad de la GM y de la NEO en aquellas cepas que presentan la APH(3')-III.

Tabla E.- Perfiles de acetilasas.-

ESTIRPES									
ANTIBIOTICOS	SE 224		SE 223		SE 217		SE 213		
GM	100	25	100	56	100	109	100	127	
TM	561	141	204	116	199	219	146	185	
KM	396	100	177	100	91	100	78	100	
DKB	381	96	142	80	171	188	274	348	
AN	341	86	26	15	117	129	38	49	
NET	134	34	96	54	89	98	148	188	
NEO	80	20	56	32	14	15	27	34	
PM	2	1	13	7	1	1	6	8	
RM	325	82	188	106	123	135	296	376	
SIS	78	20	333	188	123	135	152	193	
APRA	2	0	3	2	1	1	0	0	
ISE	162	41	192	108	120	132	241	307	

Los valores se han calculado considerando las actividades de la GM y KM como 100%.

Tabla E.- Perfiles de acetilasas.- (Continuación)

ESTIRPES								
ANTIBIOTICOS	SE 190		SE 181		SE 180		SE 179	
GM	100	62	100	309	100	126	100	88
TM	257	159	329	1018	575	727	270	239
KM	161	100	32	100	79	100	113	100
DKB	95	59	122	378	268	339	241	214
AN	116	72	88	272	263	332	234	207
NET	30	18	61	188	116	147	173	153
NEO	12	8	17	54	82	104	195	173
PM	2	1	1	4	6	7	4	4
RM	285	177	212	654	460	581	205	180
SIS	92	57	197	607	178	225	156	138
APRA	1	1	1	2	0	0	0	0
ISE	58	36	192	593	204	258	154	136

Lós valores se han calculado considerando las actividades de la GM y KM como 100%.

Tabla E.- Perfiles de acetilasas.- (Continuación)

ESTIRPES									
ANTIBIOTICOS	SE 177		SE 142		SE 141		SE 66		
GM	100	87	100	34	100	41	100	32	
TM	246	215	346	119	360	147	349	112	
KM	114	100	291	100	245	100	312	100	
DKB	214	187	196	67	168	69	136	44	
AN	174	152	111	38	116	47	157	50	
NET	176	154	44	15	53	22	38	12	
NEO	143	125	62	21	83	34	59	19	
PM	5	4	0	0	1	0	1	0	
RM	217	189	267	92	248	101	196	61	
SIS	178	156	96	33	103	42	73	23	
APRA	0	0	0	0	0	0	0	0	
ISE	217	184	76	26	130	53	108	34	

Los valores se han calculado considerando las actividades de la GM y KM como 100%.

Tabla E.- Perfiles de acetilasas.- (Continuación)

ESTIRPES									
ANTIBIOTICOS	SE 47		SE 38		SE 19		SA 234		
GM	100	22	100	28	100	17	100	24	
TM	364	79	226	64	949	163	436	105	
KM	463	100	355	100	581	100	415	100	
DKB	218	47	79	22	312	53	369	89	
AN	458	93	119	33	198	34	379	91	
NET	58	13	18	52	103	18	163	39	
NEO	6	8	21	6	85	15	76	18	
PM	1	0	1	0	0	0	5	4	
RM	416	89	91	25	564	97	501	121	
SIS	134	29	45	12	98	17	179	43	
APRA	0	0	1	0	2	0	4	1	
ISE	189	42	50	14	102	18	234	56	

Los valores se han calculado considerando las actividades de la GM y KM como 100%.

Tabla E.- Perfiles de acetilasas.- (Continuación)

ESTIRPES											
ANTIBIOTICOS	SA 221		SA 206		SA 191		SA 100		SA 17		
GM	100	33	100	20	100	18	100	23	100	19	
TM	370	122	390	76	495	87	306	69	385	73	
KM	304	100	513	100	569	100	443	100	592	100	
DKB	112	37	125	24	264	46	209	47	238	45	
AN	129	42	301	59	237	42	146	33	215	41	
NET	43	14	95	19	61	11	32	7	34	7	
NEO	58	19	72	14	34	6	66	15	61	11	
PM	17	6	2	0	8	1	9	2	8	1	
RM	330	108	435	85	456	80	174	39	377	71	
SIS	78	26	176	34	133	23	96	22	97	18	
APRA	22	7	6	1	12	2	11	2	10	2	
ISE	56	18	141	27	70	12	59	13	91	17	

Los valores se han calculado considerando las actividades de la GM y KM como 100%.

Tabla F.- Perfiles de nucleotidasas.-

ESTIRPES

ANTIBIOTICOS	SE 224	SE 223	SE 213	SE 180
GM	14	17	17	16
TM	100	100	100	100
KM	187	94	83	107
DKB	35	58	56	89
AN	96	109	126	88
NEO	90	83	68	94
RM	225	99	99	89
ISE	172	120	107	109
SM	0	0	0	0
SP	0	0	0	0

Los valores se han calculado considerando la actividad de la TM como 100%.

Tabla G.- CMI (en $\mu\text{g/ml}$) de las cepas de *Staphylococcus* inducidas con NET.-

ANTIBIOTICOS						
CEPAS	GM	TM	AN	ISE	NET	
SE 224I	256	>512	512	512	>512	
SE 223I	512	>512	512	128	>512	
SE 217I	128	>512	64	128	>512	
SE 213I	128	256	64	128	>512	
SE 190I	128	128	256	32	>512	
SE 181I	128	512	64	32	>512	
SE 180I	64	>512	64	512	>512	
SE 179I	256	512	256	128	>512	
SE 177I	256	512	128	32	>512	
SE 142I	128	512	512	32	>512	
SE 141I	128	>512	512	512	>512	
SE 66I	128	>512	512	32	>512	
SE 47I	256	>512	512	512	>512	
SE 38I	128	>512	512	32	>512	
SE 19I	256	128	512	32	>512	
SA 234I	512	>512	>512	32	>512	
SA 221I	256	128	>512	128	>512	
SA 206I	512	>512	>512	512	>512	
SA 191I	512	>512	>512	512	>512	
SA 100I	512	>512	>512	512	>512	
SA 17I	256	128	>512	16	>512	
SE 177CI	16	16	8	8	16	
SE 141CI	2	0,06	8	0,5	8	

Tabla H.- Resultado de los antibiogramas de las cepas inducidas con NET.-

ESTIRPES			
ANTIBIOTICOS	SE 224I	SE 180I	SE 141I
GM	0,0 R	0,0 R	0,0 R
TM	0,0 R	0,0 R	0,0 R
KM	0,0 R	0,0 R	0,0 R
DKB	0,0 R	0,0 R	0,0 R
AN	0,0 R	0,0 R	0,0 R
NET	0,0 R	0,0 R	0,0 R
NEO	19,5 S	19,2 S	20,5 S
SIS	0,0 R	0,0 R	0,0 R
SM	22,0 S	22,4 S	20,5 S
P	0,0 R	0,0 R	0,0 R
TE	32,5 S	27,5 S	36,0 S
C	30,5 S	32,0 S	32,2 S
CC	0,0 R	33,5 S	32,0 S
VA	23,0 S	21,0 S	23,5 S
E	0,0 R	36,0 S	33,0 S

S: Sensible R: Resistente I: Intermedio

**Tabla H.- Resultado de los antibiogramas de las cepas inducidas con NET.-
(Continuación)**

ESTIRPES			
ANTIBIOTICOS	SA 191I	SE 177CI	SE 141CI
GM	0,0 R	10,0 R	26,0 S
TM	0,0 R	10,0 R	28,0 S
KM	0,0 R	14,0 I	25,0 S
DKB	0,0 R	15,0 S	29,0 S
AN	0,0 R	16,0 S	22,0 S
NET	0,0 R	16,0 S	29,0 S
NEO	0,0 R	19,5 S	34,0 S
SIS	0,0 R	20,0 S	26,0 S
SM	11,5 R	24,2 S	23,7 S
P	0,0 R	0,0 R	0,0 R
TE	36,3 S	31,0 S	38,0 S
C	14,2 I	35,5 S	36,0 S
CC	38,4 S	30,5 S	30,0 S
VA	26,0 S	25,0 S	27,0 S
E	0,0 R	36,0 S	36,0 S
<p>S: Sensible R: Resistente I: Intermedio</p>			

Tabla I.- Perfiles enzimáticos de las cepas inducidas.-

FOSFORILASAS (CPM - % APROX.)									
ANTIBIOTICOS	SE 224		SE 224I		SE 180		SE 180I		
GM	3277	100	20402	100	6556	100	47917	100	
TM	1909	58	18709	91	1563	24	14359	30	
KM	3445	75	22329	109	1302	20	21760	45	
DKB	2256	69	16175	79	1318	20	18451	32	
AN	1738	53	13430	66	1750	26	5766	12	
NET	3340	102	20041	98	826	13	15165	32	
NEO	1909	58	17110	84	131	2	677	2	
ISE	1623	50	8117	40	2396	36	5000	10	
SM	77	2	415	2	45	0	120	0	

Tabla I.- Perfiles enzimáticos de las cepas inducidas.- (Continuación)

FOSFORILASAS (CPM - % APROX.)				
ANTIBIOTICOS	SE 141	SE 141I	SA 191	SA 191I
GM	5112 100	16962 100	2209 100	9282 100
TM	819 16	5788 34	2646 119	7169 77
KM	2532 48	9976 59	9012 408	15618 168
DKB	1184 23	6350 37	530 24	3687 39
AN	1277 25	4249 25	7876 356	10087 109
NET	5235 102	17369 102	1809 82	5111 55
NEO	278 5	186 1	6204 281	5914 63
ISE	1406 28	4410 26	8767 397	10887 117
SM	24 0	55 0	410 18	1093 12
PM			10545 477	7991 86
RM			10247 464	10802 116

Tabla I.- Perfiles enzimáticos de las cepas inducidas.- (Continuación)

ACETILASAS (CPM - % APROX)									
ANTIBIOTICOS	SE 224		SE 224I		SE 180		SE 180I		
GM	4953	100	9169	100	13205	100	11835	100	
TM	12589	260	28875	281	21249	161	21860	185	
KM	9726	196	47563	517	12804	97	10098	85	
DKB	4406	89	20947	228	28965	219	24990	211	
AN	2681	54	20690	225	28210	214	11120	95	
NET	1276	26	8393	92	16891	128	15212	128	
NEO	1251	25	6884	75	21065	159	13065	110	
PM	83	2	141	2	357	3	332	3	
RM	1811	36	49414	539	19672	149	23051	195	
SIS	1589	32	11585	126	20635	156	19349	163	
APRA	43	1	138	2	90	1	118	1	
ISE	2536	51	14462	158	15249	115	19857	168	

Tabla I.- Perfiles enzimáticos de las cepas inducidas.- (Continuación)

ACETILASAS (CPM - % APROX.)				
ANTIBIOTICOS	SE 141	SE 141I	SA 191	SA 191I
GM	2980 100	6895 100	4135 100	10613 100
TM	10752 361	22104 320	20496 495	40866 385
KM	7302 245	9336 135	23534 569	44058 415
DKB	5020 186	10738 156	10935 264	36565 344
AN	3465 116	5750 83	9786 237	50780 478
NET	1581 53	3221 47	2505 61	20430 192
NEO	2472 83	2659 38	1410 34	27294 257
PM	14 0	91 2	331 8	507 5
RM	7397 248	13486 195	18860 456	54490 513
SIS	3061 103	6685 97	5507 133	24562 231
APRA	4 0	70 1	488 12	404 4
ISE	3887 130	7397 107	2903 70	42167 397

Tabla J.- Actividades específicas de las cepas inducidas comparadas con las cepas originales.-

FOSFORILASAS				
ANTIBIOTICOS	SE 224	SE 224I	SE 180	SE 180I
GM	117	728	193	1996
TM	68	668	46	598
KM	87	797	38	768
DKB	81	577	38	906
AN	62	480	51	240
NET	119	715	24	631
NEO	68	611		
ISE	58	290	70	208

Tabla J.- Actividades específicas de las cepas inducidas comparadas con las cepas originales.- (Continuación)

FOSFORILASAS				
ANTIBIOTICOS	SE 141	SE 141I	SA 191	SA 191I
GM	176	1285	76	331
TM	28	438	88	256
KM	84	755	300	557
DKB	41	481	26	131
AN	44	322	262	360
NET	180	1316	60	182
NEO			206	211
ISE	48	334	292	388
SM			14	39
PM			351	285
RM			341	385

Tabla J.- Actividades específicas de las cepas inducidas comparadas con las cepas originales.- (Continuación)

FOSFORILASAS				
ANTIBIOTICOS	SE 177C	SE 177CI	SE 141C	SE 141CI
GM	20	21	7	2
NEO	19	20	9	13
SM	14	17	4	4

Tabla J.- Actividades específicas de las cepas inducidas comparadas con las cepas originales.- (Continuación)

ACETILASAS				
ANTIBIOTICOS	SE 224	SE 224I	SE 180	SE 180I
GM	295	566	734	1138
TM	749	1782	1181	2102
KM	579	2936	711	971
DKB	262	1293	1606	2403
AN	160	1278	1567	1079
NET	76	518	938	1463
NEO	75	425	1170	1256
RM	108	3050	1093	2216
SIS	95	732	1146	1860
ISE	151	893	847	1909

Tabla J.- Actividades específicas de las cepas inducidas comparadas con las cepas originales.- (Continuación)

ACETILASAS				
ANTIBIOTICOS	SE 141	SE 141I	SA 191	SA 191I
GM	142	379	191	680
TM	512	1215	949	2620
KM	348	513	1090	2824
DKB	239	590	506	2344
AN	165	316	453	3341
NET	75	177	116	1310
NEO	118	146	65	1796
RM	352	741	873	3585
SIS	146	378	255	1616
ISE	185	406	134	2774

Tabla J.- Actividades específicas de las cepas inducidas comparadas con las cepas originales.- (Continuación)

ACETILASAS				
ANTIBIOTICOS	SE 177C	SE 177CI	SE 141C	SE 141CI
GM	7	13	4	11
TM	7	20	6	2
KM	4	8	7	9

Tabla J.- Actividades específicas de las cepas inducidas comparadas con las cepas originales.- (Continuación)

ADENILASAS				
ANTIBIOTICOS	SE 224	SE 224I	SE 180	SE 180I
TM	36	26	57	40
KM	67	65	62	63

Tabla K.- Perfiles de sustrato y actividad específica (A_e) de las cepas SE 354 y SE 354I.-

FOSFORILASAS						
ANTIBIOTICOS	SE 354			SE 354I		
	CPM	%	A_e	CPM	%	A_e
KM	930	25	47	22508	116	703
AN	1932	52	97	13801	71	431
NEO	3694	10	184	19300	100	603
ISE	2033	55	101	24249	125	757
PM	2934	79	146	31403	162	981

Tabla L.- Enzimas encontradas en cada aislado y actividades detectadas en las transconjugantes y transformantes.-

CEPA N°	ENZIMAS	
SE 354	APH(3')-III	
SE 224	APH(2") + AAC(6')	ANT(4')(4")
SE 223	APH(2") + AAC(6')	ANT(4')(4")
223S	APH(2") + AAC(6')	
SE 217	APH(2") + AAC(6')	APH(3')-III
SE 213	APH(2") + AAC(6')	ANT(4')(4")
213T	APH(2") + AAC(6')	
213S	APH(2") + AAC(6')	
SE 190	APH(2") + AAC(6')	APH(3')-III
190T	APH(2") + AAC(6')	APH(3')-III
SE 181	APH(2") + AAC(6')	APH(3')-III
SE 180	APH(2") + AAC(6')	ANT(4')(4")
180T	APH(2") + AAC(6')	

Tabla L.- Enzimas encontradas en cada aislado y actividades detectadas en las transconjugantes y transformantes.- (Continuación)

CEPA N°	ENZIMAS	
SE 179	APH(2") + AAC(6')	APH(3')-III
179T	APH(2") + AAC(6')	APH(3')-III
179S	APH(2") + AAC(6')	APH(3')-III
SE 177	APH(2") + AAC(6')	APH(3')-III
177T	APH(2") + AAC(6')	APH(3')-III
177S	APH(2") + AAC(6')	APH(3')-III
SE 142	APH(2") + AAC(6')	
142S	APH(2") + AAC(6')	
SE 141	APH(2") + AAC(6')	
SE 66	APH(2") + AAC(6')	
SE 47	APH(2") + AAC(6')	
SE 38	APH(2") + AAC(6')	APH(3')-III
38S	APH(2") + AAC(6')	APH(3')-III

Tabla L.- Enzimas encontradas en cada aislado y actividades detectadas en las transconjugantes y transformantes.- (Continuación)

CEPA N°	ENZIMAS
SE 19	APH(2") + AAC(6') APH(3')-III APH(3") AAD(6)
19T	APH(2") + AAC(6') APH(3')-III APH(3")
19S	APH(2") + AAC(6') APH(3')-III APH(3")
SA 234	APH(2") + AAC(6')
234T	APH(2") + AAC(6')
SA 221	APH(2") + AAC(6')
221T	APH(2") + AAC(6')
SA 206	APH(2") + AAC(6') APH(3')-III APH(3")
SA 191	APH(2") + AAC(6') APH(3')-III APH(3")
191T	APH(2") + AAC(6') APH(3')-III APH(3")
SA 100	APH(2") + AAC(6') APH(3')-III APH(3")
100T	APH(2") + AAC(6') APH(3')-III APH(3")
SA 17	APH(2") + AAC(6')

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES.- Hemos realizado un estudio sobre un conjunto de *Staphylococcus* procedentes del Hospital Insular, escogiendo entre ellos, los que presentan resistencia a uno ó más aminoglicósidos. En estos aislados, hemos estudiado las enzimas modificadoras de aminoglicósidos presentes, así como la resistencia que originan y su codificación genética, llegando a las siguientes conclusiones:

1.- Los antibióticos más eficaces *in vitro* sobre los *Staphylococcus* del Hospital Insular, son la CIP, NOR, VA, IPM, TE y NET.

2.- La detección de *Staphylococcus* resistentes a ME y CX, se vio potenciada con el empleo de agar Mueller-Hinton suplementado con cationes y cloruro sódico, además de una incubación a 30° C durante 24 horas, excepto para los *S. epidermidis* que fue de 48 horas.

3.- Todos los *Staphylococcus* resistentes a los aminoglicósidos, poseían la propiedad de ser resistentes a la meticilina y producían β -lactamasas.

4.- De los 16 *Staphylococcus epidermidis* resistentes a los aminoglicósidos, 12 producían el polisacárido extracelular denominado limo ó "slime".

5.- Todos los *Staphylococcus* resistentes a los aminoglicósidos producían enzimas modificadoras de aminoglicósidos.

6.- Las enzimas nucleotidasas sólo se detectaron mediante una modificación del ensayo enzimático, que incluía un tiempo de incubación de 180' y 32° C de temperatura.

7.- En nuestro estudio, las enzimas modificadoras que causan resistencia a los aminoglicósidos en las cepas de *Staphylococcus* son APH(2'')+AAC(6'), ANT(4')(4''), APH(3')-III, APH(3'') y AAD(6).

8.- La enzima APH(3')-III produce un alto grado de modificación para la ISE, mayor que el producido por la APH(2'')+AAC(6'), que también la modifica.

9.- La ISE también es modificada por la ANT(4')(4'').

10.- La combinación de varias enzimas modificadoras originan patrones de multirresistencia importante. La combinación más frecuente es la APH(2'')+AAC(6') + APH(3')-III que causa resistencia a GM, TM, KM, DKB, NEO, PM, RM y SIS, y en algunas ocasiones a NET, AN e ISE.

11.- No siempre la producción de una enzima modificadora de aminoglicósidos implica resistencia a estos antibióticos.

12.- En las estirpes de *Staphylococcus* productoras de enzimas modificadoras de aminoglicósidos, pero sensibles a AN y NET, se consiguió la expresión de resistencia estable a los mismos, tras sucesivos pases en medio con dichos antibióticos.

13.- En estas cepas inducidas se produce un aumento en las CMI de aminoglicósidos tales como GM, TM, AN e ISE.

14.- En los aislados de *Staphylococcus* inducidos con NET se apreció una actividad específica (A) (entendida como la relación entre CPM/mg proteínas totales) significativamente mayor que en los aislados iniciales u originales para las actividades enzimáticas para las cuales la NET era sustrato.

15.- A pesar de que las 22 estirpes de *Staphylococcus* estudiados contenían plásmidos, sólo en 15 cepas pudimos comprobar que se trataban de plásmidos de resistencia a aminoglicósidos.

16.- La enzima ANT(4')(4") parecía tener una localización cromosómica en los aislados SE 224, SE 223, SE 213 y SE 180.

17.- El contacto célula a célula parecía ser un requerimiento absoluto para que tuviera lugar la transferencia conjugativa de plásmidos. Además la frecuencia de conjugación se vio incrementada al incubar los filtros en placas de agar infusión de cerebro y corazón con los antibióticos adecuados.

18.- La conjugación se produjo en todos los *Staphylococcus aureus* cuyos plásmidos codificaban enzimas modificadoras de aminoglicósidos. Sólo 6 *Staphylococcus epidermidis* poseían plásmidos conjugativos.

19.- Todos los plásmidos conjugativos parecían codificar la enzima bifuncional APH(2") + AAC(6').

20.- Los plásmidos que poseían la capacidad de transmitirse tenían un peso molecular que variaba de 19,5 a 50 Md.

21.- Los genes que codifican las enzimas modificadoras de aminoglicósidos en los *Staphylococcus* estudiados se localizan en una población de plásmidos cuyos pesos moleculares van desde 1,74 a 50 Md.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA.-

- 1.- AHMAD,M.H., RECHENMACHER,A. and BOCK,A.. (1980). Interaction between aminoglycoside uptake and ribosomal resistance mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 18: 798-806.
- 2.- ALAEDDINOGLU,N.G. and KOCABIYIK,S.. (1987). Plasmid-mediated enzymatic detoxification of aminoglycoside antibiotics in clinical isolates of gram negative bacilli. En: *Progress in Chemotherapy Antimicrobial Section*. Berkardar,B. and Kuemmerle,H.P. (eds.). ECOMED.FED.REP. Germany. 1: 650-652
- 3.- ARCHER,G.L.. (1988). Molecular epidemiology of multiresistant *Staphylococcus epidermidis*. *J. Antimicrob. Chemother.* 21: 133-138.
- 4.- ARCHER,G.L. and JOHNSTON,J.L.. (1983). Self-transmissible plasmids in *Staphylococci* that encode resistance to aminoglycoside. *Antimicrob. Agents Chemother.* 24: 70-77.
- 5.- ARCHER,G.L. and SCOTT,J.. (1991). Conjugative transfer genes in *Staphylococcal* isolates from the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 2500-2504.
- 6.- ARTHUR,M., BRISSON,A. and CARLIER,C.. (1985). Techniques d'étude du support génétique de la résistance aux antibiotiques. En: *L'ANTIBIOGRAME*. Courvalin,P., Goldstein,F., Philipon,A. and Sirat,J. (eds.). MPC-VIDEOM (Paris). pp: 253-343.
- 7.- BARG,N.L.. (1988). Construction of a probe for the aminoglycoside 3-V-acetyltransferase gene and detection of the gene among endemic clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 1834-1838.
- 8.- BENVENISTE,R. and DAVIES,J.. (1971). Enzymatic acetylation of aminoglycoside antibiotics by *Escherichia coli* carrying an R-factor. *Biochemistry.* 10: 1787-1796.
- 9.- BIALKOWSKA-HOBRZANSKA,H., HARRY,V.S., BAI,T.S.C. and HAMMMERBERG.. (1989). Expression of the gene specifying the bifunctional 6'-aminoglycoside acetyltransferase [AAC(6')] 2"-aminoglycoside phosphotransferase [APH(2")] of *Staphylococcus epidermidis* in *E. coli* C and *E. coli* K-12. En: *Abstracts of the 1989 Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. USA. p: 126.
- 10.- BIDDLECOME,S., HAAS,M., DAVIES,J., MILLER,G.H., RANE,D.F. and DANIELS,P.J.L.. (1976). Enzymatic modification of aminoglycoside antibiotics: a new 3-N-acetylating enzyme from a *Pseudomonas aeruginosa* isolated. *Antimicrob. Agents Chemother.* 9: 951-955.

- 11.- BONGAERTS,G.P. and KAPTIJN,G.M.P.. (1981). Aminoglycoside phosphotransferase-II-mediated amikacin resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 20: 344-350.
- 12.- BONGAERTS,G.P. and MOLENDIJK,L.. (1984). Relation between aminoglycoside 2"-O-nucleotidyltransferase activity aminoglycoside resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 25: 234-237.
- 13.- BONGAERTS,G.P. and Vliegenthart,J.S.. (1988). Effect of aminoglycoside concentration on reaction rates of aminoglycoside-modifying-enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 740-746.
- 14.- BOUANCHAUD,D.H., FOUACE,J.M. and BIETH,G.. (1977). Physical studies of a *Staphylococcus aureus* plasmid mediating resistance to streptogramins, lincosamins and aminoglycosides. *Ann. Microbiol.* 128B: 431-437.
- 15.- BRYAN,L.E.. (1984). Aminoglycoside resistance. En: *Antimicrobial drugs resistance*. Bryan,L.E. (ed.). Academic Press, Inc., Orlando, USA. pp: 241-277.
- 16.- BRYAN,L.E. and KWAN,S.. (1981). Aminoglycoside-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* deficient in cytochrome d, nitrito reductase and aerobic transport. *Antimicrob. Agents Chemother.* 19: 958-964.
- 17.- BRYAN,L.E. and KWAN,S.. (1983). Roles of ribosomal binding, membrane potential and electron transport in bacterial uptake of streptomycin and gentamicin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 23: 835-845.
- 18.- BRYAN,L.E., NICAS,T., HOLLOWAY,B.W. and CROWTHER,C.. (1980). Aminoglycoside-resistant mutation of *Pseudomonas aeruginosa* defective in cytochrome c_{552} and nitrate-reductase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 17: 71-79.
- 19.- BRYAN,L.E. and VAN DEN ELZEN,H.M.. (1977). Effects of membrane-energy mutations and cations on streptomycin and gentamicin accumulation by bacteria: a model for entry of streptomycin and gentamicin in susceptible and resistant bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 12: 163-177.
- 20.- BYRNE,M.E., GILLESPIE,M.T. and SKURRAY,R.A.. (1990). Molecular analysis of a gentamicin transposonlike element on plasmids isolates from North American *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 2106-2113.
- 21.- BYRNE,M.E., GILLESPIE,M.T. and SKURRAY,R.A.. (1991). 4'4" adenylyltransferase activity on conjugative plasmids isolated from *Staphylococcus aureus* is encoded on an integrated copy of pUB110. *Plasmid.* 25: 70-75.

- 22.- CARLIER,C. and COURVALIN,P.. (1982). A plasmid which does not encode the aminoglycoside phosphotransferase in the butirosin-producing strain of *Bacillus circulans*. *J. Antibiot.* xxxv: 629-634.
- 23.- CARLIER,C. and COURVALIN,P.. (1990). Emergence of 4'4"-aminoglycoside nucleotidyltransferase in *Enterococci*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 1565-1569.
- 24.- CARLIER,C., LAURENT,G., CLAES,P., VANDHERHAEGHE,H.J. and TULKENS,P.M.. (1983). Inhibition of lysosomal phospholipases by aminoglycoside antibiotics in vitro comparative studies. *Antimicrob. Agents Chemother.* 23: 440-449.
- 25.- COIA,J.E., NOOR-HUSAIN,I., PLATT,D.J.. (1988). Plasmid profiles and restriction enzyme fragmentation patterns of plasmids of methicillin-sensitive and methicillin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus* from hospital and the community. *J. Med. Microbiol.* 27: 271-276.
- 26.- COLLATZ,E., CARLIER,C. and COURVALIN,P.. (1983). The chromosomal 3'5"-aminoglycoside phosphotransferase in *Streptococcus pneumoniae* is closely related to its plasmid-coded homologs in *Streptococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 156: 1373-1377.
- 27.- COLLATZ,E., CARLIER,C. and COURVALIN,P.. (1984). Characterization of high-level aminoglycoside resistance in a strain of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Gen. Microbiol.* 130: 1665-1671.
- 28.- COOMBE,R.G. and GEORGE, A.M.. (1981). New plasmid-mediated aminoglycoside adenylyltransferase of broad substrate range that adenylylates amikacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 20: 75-80.
- 29.- COURVALIN,P. and CARLIER,C.. (1986). Transposable multiple antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Gen. Genetic.* 205: 291-297.
- 30.- COURVALIN,P., CARLIER,C. and COLLATZ,E.. (1982). Evolutionary relationship between plasmid-mediated aminoglycoside modifying enzymes from gram positive cocci. En: VII Congreso Nacional de Microbiología. Mira,J. y Zafra,J.A. (eds.). SEM. Madrid. España. pp: 92-102.
- 31.- COURVALIN,P. and FIANDT,M.. (1980). Aminoglycoside-modifying enzymes of *Staphylococcus aureus*: expression in *Escherichia coli*. *Gene* 2: 247-269.
- 32.- CHASCLUS-DANCLA,E., MARTEL,J., CARLIER,C., LAFONT,J. and COURVALIN,P.. (1986). Emergence of aminoglycoside 3-N-acetyltransferase IV in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* isolated from animals in France. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29: 239-243.

- 33.- **CHASCLUS-DANCLA, E., POHL, P., MEURISSE, M., MARIN, M. and LAFONT, J.P.** (1991). High genetic homology between plasmids of human and animal origins conferring resistance to the aminoglycosides gentamicin and apramycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**: 590-593.
- 34.- **DAIKOS, G.L., JACKSON, G.G., LOLANS, V.T. and LIVERMORE, D.M.** (1990). Adaptative resistance to aminoglycoside antibiotics from first-exposure down-regulation. *J. Infect. Dis.* **162**: 414-420.
- 35.- **DAMASO, D., MORENO-LOPEZ, M. and DAZA, R.M.** (1990). Aminoglicósidos. En: *Antibióticos y quimioterápicos antibacterianos. Uso clínico*. Dámaso, D., Moreno-López, M. y Daza, R.M. (eds.). GRUTESA. Madrid. España. pp: 297-329.
- 36.- **DAMPER, P.D. and EPSTEIN, W.** (1981). Role of the membrane potential in bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **20**: 803-808.
- 37.- **DAVIES, J.** (1980). Mechanisms of antibiotic resistance. En: *Current Concept of the Upjohn Company*.
- 38.- **DAVIES, J. and O'CONNOR, S.** (1978). Enzymatic modification of aminoglycoside antibiotics: 3-N-acetyltransferase with broad especificity that determines resistance to the novel aminoglycoside apramycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **14**: 69-72.
- 39.- **DAVIES, J. and SMITH, D.I.** (1978). Plasmid-determined resistance to antimicrobial agents. *Ann. Rev. Microbiol.* **32**: 469-518.
- 40.- **DAVIS, B.D.** (1987). Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides. *Microbiol. Rev.* **51**: 341-350.
- 41.- **DAVIS, B.D., DULBECCO, R., EISEN, H.N., GINSBERG, H.S., WOOD, W.B. and McCARTY, M.** (1979). Estafilococos. En: *Tratado de Microbiología*. Davis, B.D., Dulbecco, R., Eisen, H.N., Ginsberg, H.S., Wood, W.B. y McCarty, M. (eds.). Salvat Editores S.A. Barcelona. España. pp: 751-763.
- 42.- **DEIGHTON, M.A., FRANKLIN, J.C., SPICER, W.J., BALKAU, B.** (1988). Species identification, antibiotic sensitivity and slime production of coagulase-negative *Staphylococci* isolated from clinical specimens. *Epidem. Inf.* **101**: 99-113.
- 43.- **DEVAUD, M., KAYSER, F.H. and BÄCHI, B.** (1982). Transposon-mediated multiple antibiotic resistance in *Acinetobacter* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* **22**: 323-329.

- 44.- **DEVAUD,M., KAYSER,F.H. and HUBER,U.** (1977). Resistance of bacteria to the newer aminoglycoside antibiotics: an epidemiological and enzymatic study. *J. Antibiot.* xxx: 655-664.
- 45.- **DICKGIESSER,N. and KREISWIRTH,B.N.** (1986). Determination of aminoglycoside resistance in *Staphylococcus aureus* by DNA hybridization. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29: 930-932.
- 46.- **DOWDING,J.E.** (1977). Mechanisms of gentamicin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 11: 45-50.
- 47.- **EASMON,C.S.F., GOODFELLOW,M.** (1990). *Staphylococcus* and *Micrococcus*. En: *Principles of Bacteriology, Virology and Immunity. Vol 2: Sistematic Bacteriology.* Parker,M.T., Collier,L.H. (eds.). Topley and Wilson. London. Great Britain. pp: 162-179.
- 48.- **ELIOPOULOS,G.M., WENNERSTEN,C., ZIGHELBOIM-DAUM,S., REISZNER,E., GOLDMANN,D. and MOELLERING,R.C.** (1988). High-level resistance to gentamicin in clinical isolates of *Streptococcus (Enterococcus) faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 1523-1532.
- 49.- **EL SOHL,N., MOREAU,N. and EHRLICH,S.D.** (1986). Molecular cloning and analysis of *Staphylococcus aureus* chromosomal aminoglycoside resistance genes. *Plasmid* 15: 104-118.
- 50.- **ESPLUGES,J.** (1981). Aminoglicósidos. En: *Terapéutica antibiótica.* Belmonte,A. (ed.). RUAN S.A. Madrid. España. pp: 65-74.
- 51.- **ESTARREADO,V.M.** (1980). Contribución al estudio de algunos enzimas inactivantes de aminoglicósidos producidos por plásmidos R. *Inmunologika* 4: 26-54.
- 52.- **EVANS,J and DYKE,K.G.H.** (1988). Characterization of the conjugation system associated with the *Staphylococcus aureus* plasmid pJE1. *J. Gen. Microbiol.* 134: 1-8.
- 53.- **FAURA,C., AZANZA,J.R. and HONORATO,J.** (1989). Farmacocinética de los aminoglicósidos en neonatos. *Rev. Esp. Quimioterap.* 2: 207-208.
- 54.- **FERRETTI,J.J., GILMORE,K.S. and COURVALIN,P.** (1986). Nucleotide sequence analysis of the gene specifying the bifunctional 6'-aminoglycoside-acetyltransferase, 2"-aminoglycoside-phosphotransferase enzyme in *Streptococcus faecalis* and identification and cloning of gene regions specifying the two activities. *J. Bacteriol.* 167: 631-638.
- 55.- **FORBES,B.A. and SCHABERG,D.R.** (1983). Transfer of resistance plasmids from *Staphylococcus epidermidis* to *Staphylococcus aureus*: evidence for conjugative exchange of resistance. *J. Bacteriol.* 153: 627-634.

- 56.- **FOSTER, T.J.** (1983). Plasmid-determined resistance to antimicrobial drugs and toxic metals ions in bacteria. *Microbiol. Rev.* **47**: 361-409.
- 57.- **FOUACE, J., BOUANCHAUD, D.H. and DUVAL, J.** (1977). Propriétés génétiques d'un plasmide de staphylocoque codant pour la résistance à cinq aminosides et aux streptogramines. *Ann. Microbiol.* **128A**: 371-382.
- 58.- **GALE, E.F., CUNDLIFFE, E., REYNOLDS, P.E., RICHMOND, M.H. and WARING, M.J.** (1982). Antibiotics inhibitors ribosome function. En: *The molecular basis of antibiotic action*. Wiley, J. and sons (eds.). London, New York, Sidney, Toronto. pp: 402-547.
- 59.- **GATELL, J.M.** (1988). Los aminoglicósidos. Bristol Meyer, S.A.E..
- 60.- **GENILLOUD, O., BLAZQUEZ, J., MAZODIER, P. and MORENO, F.** (1989). A clinical isolate of transposon Tn5 expressing streptomycin resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **170**: 1275-1278.
- 61.- **GERDING, D.N., LARSON, T.A., HUGHES, R.A., WEILER, M., SHANHOLTZER, C. and PETERSON, L.P.** (1991). Aminoglycoside resistance and aminoglycoside usage: ten years of experience in one hospital. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**: 1284-1290.
- 62.- **GIAMARELLOU, H., PEPHANIS, A., FLORENTIN, I., PETRIKKOS, G., AULAMIS, A. and GRAMMATIKOU, M.** (1989). In vitro activity of isepamicin against *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter cloacae* strains resistant to amikacin: a preliminary report. *J. Chemother. suppl.* **4**, **1**: 399-400.
- 63.- **GIAMARELLOU, H., PETRIKKOS, G., TSAGARAKI, Ch., PEPHANIS, A., NIKAS, K., HATZIPAPAS, A. and SFIKAKIS, P.** (1989). Preliminary in vitro and in vivo evaluation of isepamicin (IS) a new aminoglycoside. En: *Abstracts of the 16TH International Congress of Chemotherapy*. June. Jerusalem. Israel. p: 297.
- 64.- **GOERING, R.V. and RUFF, E.A.** (1983). Comparative analysis of conjugative plasmids mediating gentamicin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **24**: 450-452.
- 65.- **GOMEZ-LUS, R.** (1982). Enzimas inactivantes de aminoglicósidos producidos por plásmidos R. En: *Actas del VII Congreso Nacional de Microbiología*. Mira, J., Zafra, J. (eds.). SEM. Madrid. España. pp: 108-116.
- 66.- **GOMEZ-LUS, R.** (1989). Enzimas modificantes de aminoglicósidos. *Rev. Esp. Quimioterap.* **II(2)**: 107-114.
- 67.- **GOMEZ-LUS, R.** (1989). Detección por antibiograma de los mecanismos de resistencia a aminoglicósidos. *Rev. Esp. Quimioterap.* **2(suppl.1)**: 23-25.

- 68.- GOMEZ-LUS,R., GOMEZ-LUS,M.P., GIL,J., OTAL,I., GOMEZ-LUS,S. and RUBIO,M.C.. (1990). In vitro activity of isepamicin against 203 aminoglycoside-modifying enzyme producers isolates. *Rev. Esp. Quimioterap.* 3(3): 255-258.
- 69.- GOMEZ-LUS,R., GOMEZ-LUS,S., GOÑI,M.P. and RUBIO,M.C.. (1988). Stability of isepamicin to 3-N-acetylating enzymes. En: *Abstracts of the VI Mediterranean Congress of Chemotherapy*. May, 22-27. Taormina, Giardini-Naxos. Italia. p: 225.
- 70.- GOMEZ-LUS,R., GOÑI,M.P., AGUDO,M.C., RIVERA,M.J., GOMEZ-LUS,S., OTAL,I., CASTILLO,J., GIL,J. and RUBIO,M.C.. (1989). Acetilases AAC(3)-IV y AAC(6')-I y fosforilasa APH(4) producidas por una cepa clónica de *Serratia marcescens*. *Rev. Esp. Quimioterap.* 2(supl.1): 43.
- 71.- GOMEZ-LUS,R., LARRAD,L., RUBIO-CALVO,M.C., NAVARRO,M. and LASIERRA,M.P.. (1980). AAC(3) and AAC(6') enzymes produced by R plasmids isolated in General Hospital. En: *Antibiotic Resistance*. Mitsuhashi,S., Rosival,L. and Krcmere,V. (eds.). Springer-Verlag K.G., Berlin. Fed. Rep. Germany. pp: 295-303.
- 72.- GOMEZ-LUS,R., RIVERA,M.J., GRASA,B., GOMEZ-LUS,M.L., CASTILLO,J. and ROBLEDANO,L.. (1989). Amikacin-modifying phosphotransferase studied by the polyacrilamide gel electrophoresis method. *Rev. Esp. Quimioterap.* 2(4): 369-372.
- 73.- GOMEZ-LUS,R., RIVERA,M.J. and VITORIA,M.A.. (1984). A growing clinical problem: plasmid-determined resistance to aminocyclitol-aminoglycosides in *Enterobacteria*. *Chemioterapia* III: 368-370.
- 74.- GOMEZ-LUS,R., RUBIO-CALVO,M.C., LARRAD,L., NAVARRO,M., LASIERRA,P. and VITORIA,M.A.. (1980). 3-N-aminoglycoside acetylating enzymes produced by R plasmids-carrying bacterial isolated in General Hospital. En: *Current Chemotherapy and Infectious Diseases*. Nelson,J.D. and Grassi,C. (eds.). American Society of Microbiology. Washington D.C. USA. 1: 708-710.
- 75.- GRAY,G.S., HUANG,R.T.S., DAVIES,J.. (1983). Aminocyclitol resistance in *Staphylococcus aureus*: presence of plasmids and aminocyclitol-modifying enzymes. *Plasmid* 9: 147-158.
- 76.- GROOT OBBINK,D.J., RITCHIE,L.J., CAMERON,F.H., MATTICK,J.S. and ACKERMAN,V.F.. (1985). Construction of a gentamicin resistance gene probe for epidemiological studies. *Antimicrob. Agents Chemother.* 28: 96-102.
- 77.- GU,J. and NEU.H.C.. (1989). In vitro activity of dactimicin, a novel pseudodisaccharide aminoglycoside, compared with activities of other aminoglycosides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 1998-2003.

- 78.- HAAS,M., BIDDLECOME,S., DAVIES,J., LUCE,C.E. and DANIELS,P.J.L.. (1976). Enzymatic modification of aminoglycoside antibiotics: a new 6'-N-acetylating enzyme from a *Pseudomonas aeruginosa* isolate. *Antimicrob. Agents Chemother* **9**: 945-950.
- 79.- HACKBARTH,C.J. and CHAMBERS,H.F.. (1989). Methicillin-resistant *Staphylococci*: detection methods and treatment of infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**: 995-999.
- 80.- HAJNAL,A. and FALUS,A.. (1989). Spreading of streptomycin antibiotic resistance gene in *Escherichia coli* plasmids demonstrated by Southern Blot analysis. *Microbiol. Immunol.* **33**: 441-447.
- 81.- HANCOCK,R.E.W., FARMER,S.W., ZUSHENG,L. and POOLE,K.. (1991). Interaction of aminoglycosides with the outer membranes and purified lipopolysaccharide and ompF porin of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**: 1309-1314.
- 82.- HANCOCK,R.E., RAFFLE,V.J. and NICAS,P.I.. (1981). Involvement of the outer membrane in gentamicin and streptomycin uptake and killing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **19**: 777-785.
- 83.- HARE,R., MILLER,G. and SABATELLI,F.. (1988). Comparison of the activities of isepamicin (ISM) and amikacin (AMK) against aminoglycoside (AG) resistant strains. En: *Abstracts of the VI Mediterranean Congress of Chemotherapy*. May, 22-27. Taormina, Giardini-Naxos. Italia. p:225.
- 84.- HEDGES,R.W. and SHANNON,K.P.. (1984). Resistance to apramycin in *Escherichia coli* isolated from animals: detection of a novel aminoglycoside-modifying enzyme. *J. Gen. Microbiol.* **130**: 473-482.
- 85.- HODEL-CHRISTIAN,S.L. and MURRAY,B.E.. (1991). Characterization of the gentamicin resistance transposon Tn5281 from *Enterococcus faecalis* and comparison to staphylococcal transposons Tn4001 and Tn 4031. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**: 1147-1152.
- 86.- HOPKINS,J.D., FLORES,A., PLA,M.P., LESTER.S. and O'BRIEN,T.F.. (1991). Nosocomial spread of an amikacin resistance gen on both a mobilized, nonconjugative plasmid and a conjugative plasmid. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**: 1605-1611.
- 87.- IKE,Y., FUJISAWA-KON,N., SHIMIZU,S., MOTOHASHI,K., HASHIMOTO,H. and MITSUHASHI,S.. (1981). Identification of R plasmids mediating gentamicin resistance from *Escherichia coli* strains in Japan. *Antimicrob. Agents chemother.* **19**: 1070-1072.
- 88.- JACKSON,G.G., LOLANS,V.T. and DAIKOS,,G.L.. (1990). The inductive role of ionic binding in the bactericidal and postexposure effects of aminoglycoside antibiotics with implications for dosing. *J. Infect. Dis.* **162**: 408-413.

- 89.- JACOBY,G.A..(1974). Properties of an R plasmid in *Pseudomonas aeruginosa* producing amikacin (BB-K8), butirosin, kanamycin, tobramycin, and sisomicin resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 6: 807-810.
- 90.- JACOBY,G.A., BLASER,M.J., SANTANAM,P., HÄCHLER,H., KAYSER,F.H., HARE,R.S. and MILLER,G.H.. (1990). Appearance of amikacin and tobramycin resistance due to 4'-aminoglycoside nucleotidyltransferase [ANT(4')-II] in gram-negative pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 2381-2386.
- 91.- JAFFE,H.W., SWEENEY,H.M., WEINSTEIN,R.A., KABINS,S.A., NATHAN,C. and COHEN,S.. (1982). Structural and phenotypic varieties of gentamicin resistance plasmids in hospital strains of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococci*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 21: 773-779.
- 92.- JOHN,J.F., McNEILL,W.F., PRICE,K.E. and KRESEL.P.A.. (1982). Evidence for a chromosomal site specifying amikacin resistance in multiresistant *Serratia marcescens*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 21: 587-581.
- 93.- JOHNSON,A.P., BURNS,L., HOODFORD,N., COOKSON,B.D., THRELFORD,E.J. and GEORGE,R.C.. (1991). Human clinical isolates of *Enterobacteriaceae* resistant to the veterinary aminoglycoside apramycin. En: *Abstracts of 5TH European Congress of Clinical Microbiology of Infectious Diseases*. September,9-11. Oslo. Norway. p: 99.
- 94.- JORDENS,J.Z. and HALL,L.M.C.. (1988). Characterisation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates by restriction endonuclease digestion of chromosomal DNA. *J. Med. Microbiol.* 27: 117-123.
- 95.- KADO,C.I. and LIU,S.T.. (1981). Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* 145: 1365-1373.
- 96.- KAYSER,F.H., SANTANAM,P. and BIBER,J.. (1976). Genetic basis and mode of resistance to aminoglycosides in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Zbl. Bakt. Hyg. I.Abt.(suppl.5)*: 275-286.
- 97.- KAWABE,H., INOUE,M. and MITSUHASHI,S.. (1974). Inactivation of dihydrostreptomycin and spectinomycin by *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 5: 553-557.
- 98.- KAWABE,H., KONDO,S., UMEZAWA,H. and MITSUHASHI,S.. (1975). R factor-mediated aminoglycoside antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: a new aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 7: 494-499.
- 99.- KAWABE,H., NAITO,T. and MITSUHASHI,S.. (1975). Acetylation of amikacin, a new semisynthetic antibiotic, by *Pseudomonas aeruginosa* carrying an R factor. *Antimicrob. Agents Chemother.* 7: 50-54.

- 100.- KETTNER, M., MACICKOVA, T. and KRČMERY, V.. (1989). Occurrence of 4'-O-aminoglycoside-nucleotidyltransferase in clinical strains of *Enterobacteriaceae*. *Infection* 17: 100-101.
- 101.- KETTNER, M., MACICKOVA, T., MILOSOVIC, P., STEPANKOVA, K., TORSOVA, V. and LANGSADL, L.. (1990). Mechanisms of dactimicin and isepamicin resistance in Czechoslovak clinical isolates of gram-negative bacilli. En: *Abstracts of the VII Mediterranean Congress of Chemotherapy*. May, 20-25. Barcelona. Spain. p: 148.
- 102.- KIDA, M., IGARASI, S., OKUTANI, T., ASAKO, T., HIRAGA, K. and MITSUHASHI, S.. (1974). Selective phosphorylation of the 5"-hydroxy group of ribostamycin by a new enzyme from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 5: 92-94.
- 103.- KLOOS, W.E. and LAMBE, D.W.. (1991). *Staphylococcus*. En: *Manual of Clinical Microbiology*. Balows, A., Hausler, W.J., Herrmann, K.L., Isenberg, H.d. and Shadomy, H.J. (eds.). American Society for Microbiology. Washington, D.C.. USA. pp: 222-237.
- 104.- LAMBERT, T., GERBAUD, G., BOUVET, P. VIEU, J.F. and COURVALIN, P.. (1990). Dissemination of amikacin resistance gene aphA6 in *Acinetobacter spp.*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 1244-1248.
- 105.- LEBLANC, D.J., LEE, L.N. and INAMINE, J.M.. (1991). Cloning and nucleotide base sequence analysis of a spectinomycin adenylyltransferase AAD(9) determinant from *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 1804-1810.
- 106.- LEE, S.C., CLEARY, P.P. and GERDING, D.N.. (1987). More than one DNA sequence encodes the 2"-O-adenylyltransferase phenotype. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31: 667-670.
- 107.- LE GOFFIC, F.. (1977). The resistance of *S. aureus* to aminoglycoside antibiotics and pristinamycins in France in 1976-1977. *Jpn. J. Antibiot.* xxx(suppl.): 286-291.
- 108.- LE GOFFIC, F., MARTEL, A., CAPMAU, M.L., BACA, B., GOEBEL, P., CHARDON, H., SOUSSY, C.J., DUVAL, J. and BOUANCHAUD, D.H.. (1976). New plasmid-mediated nucleotidylation of aminoglycoside antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 10: 258-264.
- 109.- LE GOFFIC, F., MARTEL, A., MOREAU, N., CAPMAU, M.L., SOUSSY, C.J. and DUVAL, J.. (1977). 2"-O-phosphorylation of gentamicin components by a *Staphylococcus aureus* strain carrying a plasmid. *Antimicrob. Agents Chemother.* 12: 26-30.

- 110.- LE GOFFIC,F., MARTEL,A. and WITCHITZ,J.. (1974). 3-N enzymatic acetylation of gentamicin, tobramycin, and kanamycin by *Escherichia coli* carrying an R factor. *Antimicrob. Agents Chemother.* **6**: 680-684.
- 111.- LE GOFFIC,F., MOREAU,N., SOUSSY,C.J. and DUVAL,J.. (1977). How can DKB and tobramycin be inactivated on two different sites by the same enzyme?. *Ann. Microbiol.* **128B**: 459-463.
- 112.- LICITRA,C.M., BROOKS,R.G., TERRY,P.M., SHAW,K.J. and HARE,R.S.. (1989). Use of plasmid analysis and determination of aminoglycoside-modifying enzymes to characterize isolates from an outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **27**: 2535-2538.
- 113.- LINDBERG,M. and NOVICK,R.P.. (1973). Plasmid-specific transformation in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **115**: 139-145.
- 114.- LINDBERG,M., SJÖSTRÖM,J.E. and JOHANSSON,T.. (1972). Transformation of chromosomal and plasmid characters in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **109**: 844-847.
- 115.- LIÑARES,J.. (1989). Significado clínico del aislamiento de microorganismos del género *Staphylococcus*. *Rev. Esp. Quimioterap.* **2**(suppl.1): 93-94.
- 116.- LOPEZ-CABRERA,M., PEREZ-GONZALEZ,J.A., HEINZEL,P., PIEPERSBERG,W. and JIMENEZ,A.. (1989). Isolation and nucleotide sequencing of an aminocyclitol acetyltransferase gene from *Streptomyces rimosus* forma *paromomycinus*. *J. Bacteriol.* **171**: 321-328.
- 117.- LOVERING,A.M., WHITE,L.O. and REEVES,D.S.. (1987). The induction of resistance to tobramycin, netilmicin and amikacin in sensitive strains of *Staphylococcus epidermidis* producing APH(2⁺)+AAC(6[']) enzymes. En: *Abstracts of the 15TH International Congress of Chemotherapy*. July, 19-24. Istanbul. Turkey. p:176.
- 118.- LYON,B.R., GILLESPIE,M.T., BYRNE,M.E., MAY,J.W. and SKURRAY,R.A.. (1987). Plasmid-mediated resistance to gentamicin in *Staphylococcus aureus*: the involvement of a transposon. *J. Med. Microbiol.* **23**: 101-110.
- 119.- LYON,B.R., IUORIO,J.L., MAY,J.W. and SKURRAY,R.A.. (1984). Molecular epidemiology of multiresistant *Staphylococcus aureus* in Australian hospitals. *J. Med. Microbiol.* **17**: 79-89.
- 120.- LYON,B.R., MAY,J.W. and SKURRAY,R.A.. (1983). Analysis of plasmids in nosocomial strains of multiple-antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **23**: 817-826.

- 121.- LYON,B.R., MAY,J.W. and SKURRAY,R.A.. (1984). Tn4001: a gentamicin and kanamycin resistance transposon in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Gen. Genet.* 193: 554-556.
- 122.- LYON,B.R. and SKURRAY,R.A.. (1987). Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetic basis. *Microbiol. Rev.* 51: 88-134.
- 123.- MARTIN,C., GOMEZ-LUS,R., ORTIZ,J.M. and GARCIA-LOBO,J.M.. (1987). Structure and mobilization of an ampicillin and gentamicin resistant determinant. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31: 1266-1270.
- 124.- MARTINEZ,J.L., BLAZQUEZ,J., VICENTE,M.F., MARTINEZ-FERRER,M., REGUERA,J.A., CULEBRAS,E. and BAQUERO,F.. (1987). Influence of gene dosing on antibiotic resistance mediated by inactivating enzymes. *J. Chemother.* 1(suppl.4): 265-267.
- 125.- MATES,S.M., PATEL,L., KABACK,H.R. and MILLER,M.H.. (1983). Membrane potential in anerobically growing *Staphylococcus aureus* and its relationship to gentamicin uptake. *Antimicrob. Agents Chemother.* 23: 526-530.
- 126.- MATSUHASHI,Y., YAGISAWA,M., KONDO,S., TAKEUCHI,T. and UMEZAWA,H.. (1975). Aminoglycoside 3'-phosphotransferases I and II in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antibiot.* XXVIII: 442-447.
- 127.- MATSUNAGA,K., YAMAKI,H., NISHIMURA,T. and TANAKA,N.. (1986). Inhibition of DNA replication initiation by aminoglycoside antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30: 468-474.
- 128.- McDONNELL,R.W., SWEENEY,H.M. and COHEN,S.. (1983). Conjugational transfer of gentamicin resistance plasmids intra- and interspecifically in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53: 151-160.
- 129.- MEYER,J.F., NIES,B.A., KRATZ,J. and WIEDEMANN,B.. (1985). Evolution of Tn21-related transposons: isolation of Tn2425, which harbours IS161. *J. Gen. Microbiol.* 131: 1123-1130.
- 130.- MILLER,G.H. and HARE,R.S.. (1990). The recent emergence of strains containing novel combinations of aminoglycoside resistance mechanisms and the activity against these strains of isepamicin - a new aminoglycoside. En: *Recent Advances in Chemotherapy*. Rubinstein,E. and Adam,D. (eds.). E.Lewin-Epstein LTD. Jerusalem. Israel. pp: 11-12.
- 131.- MURRAY,B.E. and MOELLERING,R.C.. (1979). Aminoglycoside-modifying enzymes among clinical isolates of *Acinetobacter calcoaceticus* subsp. *anitratus* (*Herellea vaginicola*): explanation for high-level aminoglycoside resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 15: 190-199.

- 132.- NAHAIE, M.R., GOODFELLOW, M. and HARWOOD, C.R.. (1984). A rapid screening procedure for staphylococcal plasmids. *J. Microbiol. Met.* 2: 73-81.
- 133.- NAIDOO, J.. (1984). Interspecific co-transfer of antibiotic resistance plasmids in *Staphylococci* in vivo. *J. Hyg. Camb.* 93: 59-66.
- 134.- NAKAE, R. and NAKAE, T.. (1982). Diffusion of aminoglycoside antibiotics across the outer membrane of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 22: 554-559.
- 135.- NOBUTA, K., TOLMASKY, M.E., CROSA, L.M. and CROSA, J.H.. (1988). Sequencing and expression of the 6'-N-acetyltransferase gene of transposon Tn1331 from *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 170: 3769-3773.
- 136.- NOVICK, R.P.. (1989). Staphylococcal plasmids and their replication. *Annu. Rev. Microbiol.* 43: 537-565.
- 137.- O'CALLAGHAN, R.J., ROUSSET, K.M., HARKESS, N.K., MURRAY, N.L., LEWIS, A.C. and WILLIAMS, W.L.. (1978). Analysis of increasing antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* relative to changes in chemotherapy. *J. Infect. Dis.* 138: 293-298.
- 138.- OKII, M., IYOBE, S. and MITSUHASHI, S.. (1983). Mapping of the gene specifying aminoglycoside 3'-phosphotransferase II on the *Pseudomonas aeruginosa* chromosome. *J. Bacteriol.* 155: 643-649.
- 139.- OUELLETTE, M., GERBAUD, G., LAMBERT, T. and COURVALIN, P.. (1987). Acquisition by a *Campylobacter*-like strain of a aphA-1, a kanamycin resistance determinant from members of the family *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31: 1021-1026.
- 140.- OUNISSI, H., DERLOT, E., CARLIER, C. and COURVALIN, P.. (1990). Gene homogeneity for aminoglycoside-modifying enzymes in gram-positive cocci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 2164-2168.
- 141.- OVERMAN, T.L. and OVERLEY, J.K.. (1990). Reproducibility of API Staph-Ident system identifications of coagulase-negative *Staphylococci* isolated from blood. *J. Clin. Microbiol.* 28: 2585-2586.
- 142.- PAPANICOLAOU, G.A., HARE, R.S., MIERZWA, R. and MILLER, G.H.. (1989). AAC(3)-VI, a novel 3-N-aminoglycoside acetyltransferase in clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. En: *Abstracts of the 1989 Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. USA. p:126.
- 143.- PASCUAL, A.. (1989). Adhesividad y otros factores de *Staphylococcus* que pueden interferir con la acción antimicrobiana. *Rev. Esp. Quimioterap.* 2(suppl.1): 99-101.

- 144.- PEREZ-GONZALEZ, J.A., LOPEZ-CABRERA, M., PARDO, J.M. and JIMENEZ, A.. (1989). Biochemical characterization of two cloned resistance determinants encoding a paromomycin phosphotransferase from *Streptomyces rimosus* forma *paromomycinus*. *J. Bacteriol.* 171: 329-334.
- 145.- PERLIN, M.H. and LERNER, S.A.. (1981). Localization of an amikacin 3'-phosphotransferase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 147: 320-325.
- 146.- PERLIN, M.H. and LERNER, S.A.. (1982). Decreased susceptibility to 4'-deoxy-6'-N-methylamikacin (BB-K311) conferred by a mutant plasmid in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 22: 78-82.
- 147.- PFALLER, M.A. and HERWALDT, L.A.. (1988). Laboratory, clinical, and epidemiological aspects of coagulase-negative *Staphylococci*. *Clin. Microbiol. Rev.* 1: 281-299.
- 148.- PHILLIPS, I. and SHANNON, K.. (1984). Aminoglycoside resistance. *Br. Med. Bull.* 40: 28-35.
- 149.- PIWOWARSKI, J.M. and SHAW, P.D.. (1979). Streptomycin resistance in a streptomycin-producing microorganism. *Antimicrob. Agents Chemother.* 16: 176-182.
- 150.- PRICE, K.E.. (1986). Aminoglycoside research 1975-1985: prospects for development of improved agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29: 543-548.
- 151.- PRICE, K.E., DEFURIA, M.D. and PURSIANO, T.A.. (1976). Amikacin, an aminoglycoside with marked activity against antibiotic resistant clinical isolates. *J. Infect. Dis.* 134(suppl.). 5249-5261.
- 152.- PROJAN, S.J. and ARCHER, G.L.. (1988). Mobilization of the relaxable *Staphylococcus aureus* plasmid pC221 by the conjugative plasmid pG01 involves three pC221 loci. *J. Bacteriol.* 171: 1841-1845.
- 153.- PULVERER, G., PETERS, G. and SCHUMACHER-PERDREAU, F.. (1987). Coagulase-negative *Staphylococci*. *Zbl. Bakt. Hyg. A* 264: 1-28.
- 154.- PUMAROLA, A.. (1987). *Staphylococcus*. En: *Microbiología y Parasitología Médica*. Pumarola, A., Rodríguez-Torres, A., García-Rodríguez, A. y Piedrola-Angulo, G. (eds.). Salvat Editores S.A. Barcelona. España. pp: 333-342.
- 155.- RAO, R.N., ALLEN, N.E., HOBBS, J.N., ALBORN, W.E., KIRST, H.A. and PASCHAL, J.W.. (1983). Genetic and enzymatic basis of hygromycin B resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 24: 689-695.
- 156.- RHOADS KRAEMER, G. and IANDOLO, J.J.. (1990). High-frequency transformation of *Staphylococcus aureus* by electroporation. *Current Microbiology* 21: 373-376.

- 157.- RIDGWAY,G.L., WEBB,G., FELMINGHAM,D. and GRÜNEBERG,R.N.. Influence of aminoglycoside-modifying enzymes on the activity of arbekacin, gentamicin, tobramycin, netilmicin and amikacin. *J. Chemother.* 1: 931-933.
- 158.- RIVERA,M.J., CASTILLO,J., MARTIN,C., NAVARRO,M. and GOMEZ-LUS,R.. (1986). Aminoglycoside-phosphotransferases APH(3')-IV and APH(3'') synthesized by a strain of *Campylobacter coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* 18: 153-158.
- 159.- RIVERA,M.J., ROBLEDANO,L., GOMEZ-LUS,M.L., MARCO,M.A., OTAL,I., GRASA,B. and GOMEZ-LUS,R.. (1986). Mecanismos de resistencia a antibióticos betalactámicos y aminociclitolos en una cepa hospitalaria de *Staphylococcus epidermidis*. *Enf. Infec. y Microbiol. Clin.* 4: 229-231.
- 160.- ROBLEDANO,L., RIVERA,M.J., OTAL,I. and GOMEZ-LUS,R.. (1986). Enzymatic modification of aminoglycoside antibiotics by *Branhamella catarrhalis* carrying an R factor. En: Abstract of VII International Symposium on Future Trends in Chemotherapy. Tirrenia, Pisa. Italia. p:88.
- 161.- ROUCH,D.A., BYRNE,M.E., KONG,Y.C. and SKURRAY,R.A.. (1987). The *aacA-aphD* gentamicin and kanamycin resistance determinant of Tn4001 from *Staphylococcus aureus*: expression and nucleotide sequence analysis. *J. Gen. Microbiol.* 133: 3039-3052.
- 162.- SALAS,J.A. and CUNDLIFFE,E.. (1985). Characterization in *Micromonospora inyoensis* of aminoglycoside acetyltransferase activity not previously encountered among *Actinomycetes*. *J. Gen. Microbiol.* 131: 451-457.
- 163.- SANSON-LE PORS,M.J., CASIN,I.M. and COLLATZ,E.. (1985). Plasmid-mediated aminoglycoside phosphotransferases in *Haemophilus ducreyi*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 28: 315-319.
- 164.- SANTANAM,P. and KAYSER,F.H.. (1976). Enzymatic adenylylation by aminoglycoside 4'-adenyltransferase and 2"-adenyltransferase as a means of determining concentrations of aminoglycoside antibiotics in serum. *Antimicrob. Agents Chemother.* 10: 664-667.
- 165.- SCOTT,D.F., WOOD,D.O., BROWNELL,G.H., CARTER,M.J. and BEST,G.K.. (1978). Aminoglycoside modification by gentamicin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 13: 641-644.
- 166.- SCHABERG,D.R. and ZERVOS,M.J.. (1986). Intergeneric and interspecies gene exchange in gram-positive cocci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30: 817-822.

- 167.- SCHINETTI,M.L., ROSSINI,D., VAGLINI,F. and BERTELLI,A. (1987). Interaction of gentamicin, dactimicin and fortimicin with the neutrophil oxidative metabolism. En: **Progress in Chemotherapy**. Berkardá,b. and Kuemmerle,H.P. (eds.). Ecomed. Fed. Rep. Germany. p:317.
- 168.- SCHLEIFER,K.H.. (1986). Gram-positive cocci. En: **Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology**. Sneath,P.A., Mair,N:S., Sharpe,M.E. and Holt,J.G. (eds.). Williams and Wilkins. Baltimore/London. UK. pp:999-1035.
- 169.- SHANNON,K. and PHILLIPS,I.. (1982). Mechanisms of resistance to aminoglycosides in clinical isolates. **J. Antimicrob. Chemother.** 9: 91-102.
- 170.- SHAW,K.J., CRAMER,C.A., RIZZO,M., MIERZWA,R., GEWAIN,K., MILLER.G.H. and HARE,R.S.. (1989). Isolation, characterization, and DNA sequence analysis of an AAC(6')-II gene from *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 33: 2052-2062.
- 171.- SHIMIZU,K., KUMADA,T., HSIEH,W-C, CHUNG,H-Y, CHONG,Y., HARE,R.S., MILLER,G.H., SABATELLI,F.J. and HOWARD,J.. (1985). Comparison of aminoglycoside resistance patterns in Japan, Formosa, and Korea, Chile, and the United States. **Antimicrob. Agents Chemother.** 28: 282-288.
- 172.- SKEGGS,P.A., HOLMES,D.J. and CUNDLIFFE,E.. (1987). Cloning of aminoglycoside-resistance determinants from *Streptomyces tenebrarius* and comparison with related genes from other *Actinomycetes*. **J. Gen. Microbiol.** 133: 915-923.
- 173.- STEFANI,S. and RUSSO,G.. (1989). Aminoglycoside resistance due to alterations of transport mechanisms. **J. Chemother.** 1(suppl.4): 369-370.
- 174.- STORRS,M.J., COURVALIN,P. and FOSTER,T.J.. (1988). Genetic analysis of gentamicin resistance in methicillin- and gentamicin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* isolated in Dublin Hospitals. **Antimicrob. Agents Chemother.** 32: 1174-1181.
- 175.- SUGIYAMA,M., SAKAMOTO,M., MOCHIZUKI,H., NIMI,O. and NOMI,R.. (1983). Purification and characterization of streptomycin 6-kinase, an enzyme implicated in self-protection of a streptomycin-producing micro-organism. **J. Gen. Microbiol.** 129: 1683-1687.
- 176.- TAKAHASHI,S. and NAGANO,Y.. (1984). Rapid procedure for isolation of plasmid DNA and application to epidemiological analysis. **J. Clin. Microbiol.** 20: 608-613.
- 177.- TAYLOR,D.E., YAN,W., NG,L.K., MANAVATHU,E.K. and COURVALIN,P.. (1988). Genetic characterization of kanamycin resistance in *Campylobacter coli*. **Ann. Inst. Pasteur Microbiol.** 139: 665-676.

- 178.- **TENOVER,F.C., GILBERT,T. and O'HARA,P.** (1989). Nucleotide sequence of a novel kanamycin resistance gene, *aphA-7*, from *Campylobacter jejuni* and comparison to other kanamycin phosphotransferase genes. *Plasmid* 22: 52-58.
- 179.- **TENOVER,F.C., PHILLIPS,K.L., GILBERT,T., LOCKHART,P., O'HARA,P.J. and PLORDE,J.J.** (1989). Development of a DNA probe from the deoxyribonucleotide sequence of a 3-N-aminoglycoside acetyltransferase [AAC(3)-I] resistance gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 551-559.
- 180.- **TERAN,F.J., ALVAREZ,M., SUAREZ,J.E. and MANDOZA,M.C.** (1991). Characterization of two aminoglycoside-(3)-N-acetyltransferase genes and assay as epidemiological probes. *J. Antimicrob. Chemother.* 28: 333-346.
- 181.- **TERAN,F.J., SUAREZ,J.E. and MENDOZA,M.C.** (1991). Cloning, sequencing, and use as a molecular probe of a gene encoding an aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase of broad substrate profile. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 714-719.
- 182.- **THOMAS,W.D. and ARCHER,G.L.** (1989). Mobility of gentamicin resistance genes from *Staphylococci* isolated in the United States: identification of Tn4031, a gentamicin resistance transposon from *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 1335-1341.
- 183.- **THORNSBERRY,C.** (1988). The development of antimicrobial resistance in *Staphylococci*. *J. Antimicrob. Chemother.* 21(suppl.C): 9-16.
- 184.- **TIMMIS,K.M., GONZALEZ-CARRERO,M.I., SEKIZAKI,T. and ROJO,F.** (1986). Biological activities specified by antibiotic resistance plasmids. *J. Antimicrob. Chemother.* 18(suppl.C): 1-12.
- 185.- **TRAN VAN NHIEU,G. and COLATZ,E.** (1987). Primary structure of an aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase, AAC(6')-4, fused in vivo with the signal peptide of the Tn3-encoded β -lactamase. *J. Bacteriol.* 169: 5708-5714.
- 186.- **TRAN VAN NHIEU,G. and COLLATZ,E.** (1988). Heterogeneity of 6'-N-acetyltransferases of type 4 conferring resistance to amikacin and related aminoglycosides in members of the family *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 1289-1291.
- 187.- **TRIEU-CUOT,P., ARTHUR,M. and COURVALIN,P.** (1987). Origin, evolution and dissemination of antibiotic resistance genes. *Microbiol. Sci.* 4: 263-266.
- 188.- **TRIEU-CUOT,P. and COURVALIN,P.** (1983). Nucleotide sequence of the *Streptococcus faecalis* plasmid gene encoding the 3'5"-aminoglycoside phosphotransferase type III. *Gene* 23: 331-341.

- 189.- TRIEU-CUOT,P. and COURVALIN,P.. (1985). Characterization of the insertion sequence IS15 which flanks the kanamycin resistance transposon Tn1525. En: **Abstracts of the IV Mediterranean Congress of Chemotherapy**. 19-25 October. Rhodos. Greece. pp: 153-154.
- 190.- TRIEU-CUOT,P. and COURVALIN,P.. (1986). Evolution and transfer of aminoglycoside resistance genes under natural conditions. **J. Antimicrob. Chemother.** 18(suppl.C): 93-102.
- 191.- UBUKATA,K., NONOGUCHI,R., MATSUHASHI,M., SONG,M.D. and KONNO,M.. (1989). Restriction maps of the regions coding for methicillin and tobramycin resistances on chromosomal DNA in methicillin-resistant *Staphylococci*. **Antimicrob. Agents chemother.** 33: 1624-1626.
- 192.- UBUKATA,K., YAMASHITA,N., GOTOH,A. and KONNO,M.. (1984). Purification and characterization of aminoglycoside-modifying enzymes from *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 25: 754-759.
- 193.- UDO,E.E. and GRUBB,W.B.. (1990). A new class of conjugative plasmid in *Staphylococcus aureus*. **J. Med. Microbiol.** 31: 207-212.
- 194.- UDO,E.E. and GRUBB,W.B.. (1990). Excision of a conjugative plasmid from the staphylococcal chromosome. **J. Med. Microbiol.** 33: 227-234.
- 195.- UDO,E.E. and GRUBB,W.B.. (1990). Conjugal transfer of plasmid pWBG637 from *Staphylococcus aureus* to *Staphylococcus epidermidis* and *Streptococcus faecalis*. **FEMS Microbiol. Lett.** 72: 183-188.
- 196.- UDO,E.E. and GRUBB,W.B.. (1991). A new incompatibility group plasmid in *Staphylococcus aureus*. **FEMS Microbiol. Lett.** 78: 33-36.
- 197.- UDO,E.E. and GRUBB,W.B.. (1991). Transposition of genes encoding kanamycin, neomycin and streptomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. **J. Antimicrob. Chemother.** 27: 713-720.
- 198.- UDO,E.E. and GRUBB,W.B.. (1991). Transfer of resistance determinants from a multi-resistant *Staphylococcus aureus* isolate. **J. Med. Microbiol.** 35: 72-79.
- 199.- UDOU,T., MIZUGUCHI,Y. and YAMADA,T.. (1986). Biochemical mechanisms of antibiotic resistance in a clinical isolate of *Mycobacterium fortuitum*. **Ann. Rev. Respir. Dis.** 133: 653-657.
- 200.- UMEZAWA,H.. (1974). Biochemical mechanism of resistance to aminoglycosidic antibiotics. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.** 30: 183-225.

- 201.- UMEZAWA,H., OKANISHI,M., KONDO,S., HAMANA,K., UTAMARA,R. and MAEDA,K.. (1967). Phosphorylative inactivation of aminoglycoside antibiotics by *Escherichia coli* carrying R factor. *Science* 157: 1559-1561.
- 202.- UMEZAWA,Y., YAGISAWA,M., SAWA,T., TAKEUCHI,T. and UMEZAWA,H.. (1975). Aminoglycoside 3'-phosphotransferase III, a new phosphotransferase resistance mechanism. *J. Antibiot.* 28: 845-853.
- 203.- VAN DE KLUNDERT,J.A.M. Vliegenthart,J.S. and MOUTON,R.P.. (1988). Bacterial resistance after in vitro exposure to amikacin and netilmicin. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 5: 456-458.
- 204.- VASTOLA,A.P., ALTSCHAEFL,J. and HARFORD,S.. (1980). 5-epi-sisomicin and 5-epi-gentamicin B: substrates for aminoglycoside-modifying enzymes that retain activity against aminoglycoside-resistant bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 17: 798-802.
- 205.- Vliegenthart,J.S., Ketelaar-van Gaalen,P.A.G. and Van de Klundert,J.A.M.. (1989). Nucleotide sequence of the aacC-2 gene, a gentamicin resistance determinant involved in a hospital epidemic of multiply resistant members of the family *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 1153-1159.
- 206.- Vliegenthart,J.S., Ketelaar-van Gaalen,P.A.G. and Van de Klundert,J.A.M.. (1990). Identification of three genes coding for aminoglycoside-modifying enzymes by means of the polymerase chain reaction. *J. Antimicrob. Chemother.* 25: 759-765.
- 207.- Vliegenthart,J.S., Ketelaar-van Gaalen,P.A.G. and Van de Klundert,J.A.M.. (1991). Nucleotide sequence of the aacC-3 gene, a gentamicin resistance determinant encoding aminoglycoside-(3)-N-acetyltransferase III expressed in *Pseudomonas aeruginosa* but not in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 892-897.
- 208.- WALKER,S.G. and BEVERIDGE,T.J.. (1988). Amikacin disrupts the cell envelope of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. *Can. J. Microbiol.* 34: 12-18.
- 209.- WEEMS,J.J., LOWRANCE,J.H., BADDOUR,L.M. and SIMPSON,W.A.. (1980). Molecular epidemiology, multiply aminoglycoside resistant *Enterococcus faecalis*. *J. Antimicrob. Chemother.* 24: 121-130.
- 210.- WOOD,D.O., CARTER,M.J. and BEST,G.K.. (1977). Plasmid-mediated resistance to gentamicin in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 12: 513-517.
- 211.- WRAY,C., HEDGES,R.W., SHANNON,K.P. and BRADLEY,D.E.. (1986). Apramycin and gentamicin resistance in *Escherichia coli* and *Salmonellas* isolated from farm animals. *J. Hyg. Camb.* 97: 445-456.

- 212.- **YOUNG,S.A., TENOVER,F.C., GOOTZ,T.D., GORDON,K.P. and PLORDE,J.J..** (1985). Development of two DNA probes for differentiating the structural genes of subclasses I and II of the aminoglycoside-modifying enzyme 3'-aminoglycoside phosphotransferase. **Antimicrob. Agents Chemother.** 27: 739-744.
- 213.- **ZORBAS,I., HALL,R.T., HALL,S.L., BARNES,W.G. and ROGOLSKY,M..** (1988). Molecular analyses of conjugative, gentamicin-resistance plasmids from staphylococcal clinical isolates. **Can. J. Microbiol.** 34: 1050-1057.

