

ZUBIA	8	73-81	Logroño	1990
-------	---	-------	---------	------

RESISTENCIA A AMINOGLUCÓSIDOS POR ENZIMAS FOSFOTRANSFERASAS APH(3')*

Carmen Torres Manrique**

RESUMEN

Se presenta el estudio a nivel bioquímico y molecular de una actividad enzimática fosfo-transferasa presente en un aislamiento clínico de Serratia marcescens que confiere altos niveles de resistencia frente al antibiótico amikacina (CMI = 128 µg/ml). El perfil de sustrato de dicha actividad enzimática indica que se trata de una fosfotransferasa APH (3'), la cual presenta una alta afinidad por el sustrato amikacina. La actividad APH (3') está codificada por un gen localizado en un plásmido de 6,8 kb no conjugativo pero movilizable por un plásmido de 60 kb. también presente en la bacteria y por plásmidos de diferentes grupos de incompatibilidad. La detección de este mecanismo de resistencia es de gran importancia pues afecta a un aminogluucósido considerado como "de reserva" por su gran resistencia a la modificación por la mayor de los enzimas modificantes.

Palabras clave: aminogluucósidos, resistencia, enzimas fosfotransferasas.

We present the biochemical and molecular study of an enzymatic phosphotransferase activity in a clinical Serratia marcescens isolate that confers high level amikacin resistance (MIC = 128 µg/ml). The substrate profile of this enzymatic activity shows to be a phosphotransferase APH (3') with a high affinity for amikacin. The APH (3') activity is codified by a gen located in a 6.8 kb. non conjugative plasmid. This plasmid is mobilizable for a 60 Kb. plasmid that is also in the S. marcescens isolate and by plasmids of different incompatibility groups. The detection fo this mechanism of resistance is very important because is related to an aminoglycoside considered as "very restricted in use" due to its high resistance to the action by most of the aminoglycoside modifying enzymes.

Key words: aminoglycoside, resistance, phosphotransferase enzymes.

0. INTRODUCCIÓN

Los antibióticos aminogluucósidos constituyen un amplio grupo de compuestos con importancia clínica, particularmente efectivos en el tratamiento de infecciones graves cau-

* Recibido el 5 de Abril de 1990. Aprobado el 29 de Enero de 1990.

** Escuela de Ingeniería Técnica Agrícola de Logroño.

sadas por microorganismos gram negativos. La mayor parte de estos antibióticos han sido aislados a partir de diferentes especies del género *Streptomyces* aunque un pequeño número se ha obtenido también a partir de los géneros *Micromonospora*, *Bacillus* e incluso *Pseudomonas* (SIEGENTHALER, BONETTI y LUTHI, 1986).

Los aminoglucósidos se caracterizan por tener una estructura con un alcohol cíclico (aminociclitol) en enlace glucosídico con aminoazúcares sustituidos. Se pueden dividir en dos grandes grupos en función de si el aminociclitol presente es la 2-deoxiestreptamina u otro compuesto como la estreptidina o la actinamina. El amplio grupo con el aminociclitol 2-deoxiestreptamina se divide en dos subgrupos según si las sustituciones del aminoazúcar estén en la posición 4 y 5 (neomicina, paromomicina y butirosina) o en 4 y 6 (kanamicina, amikacina, tobramicina, gentamicina, sisomicina y netilmicina).

El mecanismo más frecuente por el que las bacterias adquieren resistencia frente a los aminoglucósidos es a través de enzimas modificantes de aminoglucósidos (EMA), cuya síntesis se realiza fundamentalmente por genes plasmídicos, y en muchos casos por transposones. Estos enzimas pueden actuar en tres tipos de reacciones generales: N-acetilación (acetiltransferasas, AAC), O-adenilación (nucleotidiltransferasas, ANT) y O-fosforilación (fosfotransferasas, APH). Dentro de cada una de estas reacciones, existen varios grupos de enzimas capaces de atacar varios grupos amino e hidroxilo específicos. Los enzimas se diferencian por el espectro de los substratos que modifican.

El aminoglucósido amikacina, un derivado semisintético de la kanamicina (1-N-HABA-kanamicina A), fue desarrollado para evitar la mayor parte de los mecanismos enzimáticos de resistencia. De hecho, hasta hace poco tiempo, las escasas bacterias con resistencia frente a la amikacina lo eran por mecanismos de impermeabilidad o por la producción de enzimas AAC (6'). Debido a la gran resistencia a la modificación enzimática de la amikacina, este antibiótico ha sido considerado como "aminoglucósido de reserva" y su uso intrahospitalario quedaba restringido a casos especiales dado su potencialidad para actuar sobre cepas con resistencia a otros aminoglucósidos como la gentamicina, tobramicina ó netilmicina.

Los enzimas fosfotransferasa APH (3') descritos hasta hace poco tiempo en la literatura (APH (3')-I, -II, -III, -IV y -V), no confieren resistencia a la amikacina "in vivo" aunque algunos de ellos (enzimas APH (3')-II y -III) son capaces de modificar sin eficacia dicho aminoglucósido "in vitro". Esta discrepancia actividad enzimática/resistencia, se ha atribuido a la escasa afinidad de estos enzimas por el substrato amikacina de tal manera que es superior la tasa de incorporación del antibiótico al interior de la bacteria, que la tasa de modificación enzimática y por ello la bacteria permanece sensible (DEHERTOGH y LERNER, 1985).

Nuestro grupo de trabajo, en colaboración con el grupo de Lerner y cols (Medical Center de la Universidad de Chicago) detectó la aparición de una cepa de *Serratia marcescens* que presentaba un alto nivel de resistencia frente a la amikacina (CMI = 128 µg/ml) y que ha sido objeto de este trabajo. El aislamiento clínico *S. marcescens* SM23 poseía una nueva actividad enzimática APH (3') diferente de APH (3')-I, -II, -III, -IV y -V y fue obtenido a partir de un hospital que consumía amikacina como aminoglucósido de primera línea (más de 85% del consumo total de aminoglucósidos). El estudio de esta nueva actividad enzimática es de gran importancia, pues afecta a un antibiótico normalmente resistente a todos los enzimas.

1. MATERIAL Y MÉTODOS

1.1. Material biológico

La cepa salvaje de *Serratia marcescens* y las estirpes de *Escherichia coli* empleadas en el presente trabajo se especifican en la *Tabla I*. El aislamiento clínico *S. marcescens* SM23 se obtuvo en el Centro Médico de Veteranos San José de Puerto Rico, el cual utilizaba el antibiótico amikacina sin restricciones en su uso terapéutico (más del 85% del uso de aminoglucósidos).

Tabla I: Cepas utilizadas

Cepa	Especie	Característica y utilización	Origen	Referencias
SM23	<i>S. marcescens</i>	Amk ^r Kan ^r con posible nueva actividad APH(3') objeto del presente trabajo	C.H. Ramírez-Ronda. Hospital de Veteranos (Puerto Rico)	
ATCC 27853	<i>P. aeruginosa</i>	Estirpe empleada como patrón en el cálculo de CMIs	ATCC	
ATCC 25922	<i>E. coli</i>	Estirpe empleada como patrón en el cálculo de CMIs	ATCC	
HB 101	<i>E. coli</i>	F ⁻ , <i>rpsL 20</i> (Str ^r), utilizado como receptor en la conjugación y transformación	J.C. Pérez Díaz Hospital Ramón y Cajal (RYC)	NCCLS (1985)
BM21	<i>E. coli</i>	Mutante espontáneo resistente al ácido nalidíxico de una estirpe silvestre de <i>E. coli</i> K 12. Utilizado como receptor en la conjugación bacteriana	J.C. Pérez Díaz RYC	CLEWELL y HELISKY (1969)

1.2. Productos y reactivos

Productos y reactivos. Los antibióticos empleados fueron: kanamicina A, amikacina, dibekacina y lividomicina A (Bristol Lab., Syracuse, N.Y.); netilmicina, SCH-21561, SCH-21562 y gentamicina C₁, C_{1a}, C₂ y B (Schering Corp., Bloomfield, N.J.); tobramicina (Eli Lilly and Co. Indianapolis, Ind.); butirosina y paromomicina (Parke Davis and Co., Ann Arbor, Mich.); ribostomicina (Meiji Seika Kaisha, Ltd., Tokio, Japón); penicilina y estreptomocina (Sigma Chemical Co.); ampicilina, tetraciclina y rifampicina (Antibióticos S.A.); ácido nalidíxico (Prodes). Los discos de antibióticos para los antibiogramas por difusión en agar procedían de Oxoid y del Instituto Pasteur.

Los cofactores radioactivos, utilizados en los ensayos de enzimas modificantes de aminoglucósidos fueron adquiridos de Amersham Corp.:

- (γ -³²P) ATP (4000 mCi/ μ M, 0,0027 μ M/ml)
- (¹⁴C) ATP (50 μ Ci/ml, 52 μ Ci/ μ M)
- (¹⁴C) Acetil CoA μ Ci/ml, 60 Ci/mol).

1.3. Determinación de la sensibilidad a antibióticos

A) Difusión por disco: se siguió el método standard recomendado por NCCLS (CLEWELL y HELINSKY, 1984) el cual se basa, con algunas modificaciones, en el publicado por Bauer y cols (1966).

B) Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI): se siguió el método standard recomendado por el NCCLS (1985). Se incluyeron como cepas controles de susceptibilidad conocida: *E. coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 27853) y *E. faecalis* (CDC 5765).

1.4. Preparación de extractos crudos sonicados

La cepa en estudio se inoculó en 4 ml de caldo BHI y se incubó en baño con agitación durante 24 h a 37°C. Se realizó una dilución 1:50 en medio BHI y se volvió a incubar 2-3 horas a 37°C. La cepa en crecimiento activo se centrifugó durante 10 minutos a 6500 rpm (2-4°C). El precipitado se lavó con el mismo volumen de NaCl 0,85% y se centrifugó de nuevo a 6500 rpm, 10 minutos a 2-4°C. El precipitado se resuspendió en 1-2 ml de tampón Hepes 0,1M, pH: 8,0. Se añadió a la suspensión arena de mar lavada para facilitar la lisis. Se sonicó el extracto en hielo y en cámara fría, mediante tres golpes de 30 segundos separados por un minuto de enfriamiento. El extracto sonicado se centrifugó durante 15 minutos a 10.000 rpm en frío. El sobrenadante (extracto crudo sonicado) se mantuvo en hielo o congelado a -20°C en caso de no ser utilizado inmediatamente.

1.5. Determinación de la actividad modificante de aminoglucósidos

La modificación enzimática de los diferentes aminoglucósidos se analizó por el método de adsorción al papel de fosfo celulosa utilizando cofactores radioactivos por el método de Ozanne y cols (1969).

1.6. Estudios genéticos

El DNA plasmídico se obtuvo según la técnica de lisis neutra con lisozima y Tritón X-100 de Clewell y Helinsky (1969) y se purificó por centrifugación en gradiente de equilibrio de densidad siguiendo el método descrito por Guerry y cols (1973). El análisis del DNA plasmídico con endonucleasas de restricción se llevó a cabo según la técnica descrita por Maniatis y cols (1982).

Para la conjugación bacteriana se siguió el método descrito por O'Connell (1984). A partir de cultivos frescos de los microorganismos elegidos como dador y receptor, se inocularon 2-3 colonias aisladas de los mismos en dos matraces con 5 ml de medio líquido LB y se incubó con agitación a 37°C. Debido a que la mayor eficacia de transferencia se consigue al mezclar el microorganismo dador en fase exponencial y el receptor en fase estacionaria, se diluyó el cultivo dador 1:10 en medio LB y se incubó a 37°C hasta que se alcanzó la fase exponencial de crecimiento. Posteriormente se mezcló 5×10^7 células del dador con 1×10^8 células del receptor en un matraz y se incubó durante 1-2 horas a 37°C sin agitación. Después de agitar vigorosamente durante un minuto para separar las células del receptor de las del dador, se sembraron las diluciones oportunas en placas de MHA con los antibióticos adecuados para seleccionar los posibles transconjugantes obtenidos. La transferencia genética por transformación se realizó según se describe en Maniatis y cols (1982).

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El perfil de sensibilidad a antibióticos presentado por la cepa *Serratia marcescens* SM23, se detalla en la *Tabla II*. Es de destacar la elevada resistencia detectada frente a la kanamicina, amikacina, gentamicina, butirosina y lividomicina, con una CMI igual o superior a 128 $\mu\text{g/ml}$. En el caso de netilmicina el nivel de resistencia fue algo inferior, 32 $\mu\text{g/ml}$. Sin embargo, la cepa SM23 fue sensible al aminoglucósido tobramicina (CMI: 2 $\mu\text{g/ml}$). En cuanto al resto de los antibióticos analizados, la cepa SM23 fue resistente a ampicilina (CMI superior a 16 $\mu\text{g/ml}$), a la combinación amoxicilina-clavulánico y a la tetraciclina.

Tabla II: Perfil de sensibilidad a antibióticos de la cepa S. marcescens SM23

Antibiótico	CMI en agar ($\mu\text{g/ml}$)	Difusión en disco (mm halo)
Amikacina	128	^a 6
Gentamicina	128	8
Tobramicina	2	16
Netilmicina	32	6
Kanamicina	>512	6
Butirosina	>512	ND
Lividomicina	>512	ND
Dibekacina	128	ND
Ampicilina	>16	6
Amoxicilina-clavulánico	ND	6
Tetraciclina	>8	6

^a6 mm indica ausencia de halo

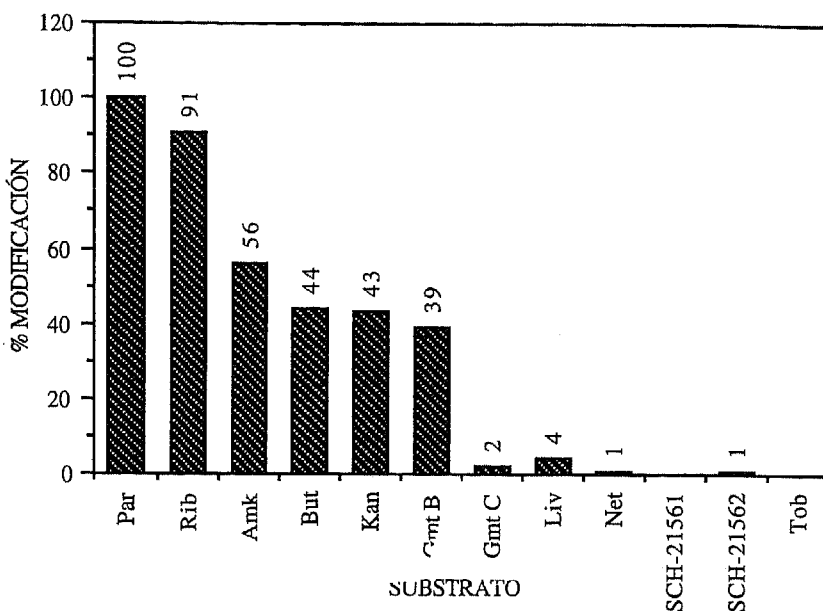
ND: no determinado

El patrón de resistencia a aminoglucósidos sugirió desde el primer momento, la presencia de una actividad enzimática inusual. Llama la atención la disociación gentamicina/tobramicina y la alta CMI presentada frente a amikacina.

Los ensayos realizados para la detección de una actividad enzimática nucleotidiltransferasa modificante de aminoglucósidos fueron negativos. Sin embargo, se detectó una actividad acetiltransferasa que afectaba a la gentamicina, tobramicina, kanamicina, amikacina, netilmicina, dibekacina y butirosina. Este tipo de perfil enzimático podría corresponder a la acetiltransferasa AAC (6').

En la *Figura 1* se presenta el perfil de sustrato de la actividad fosfotransferasa APH obtenida con el extracto crudo sonificado de la cepa SM23. La fosforilación de los diferentes aminoglucósidos, a una concentración de 167 μM , se expresa respecto a la inactivación de la paromomicina considerada como el 100% (12.060 cpm.). Como se puede observar, el porcentaje de modificación de la amikacina, butirosina, kanamicina y gentamicina B se aproxima a la mitad del que se obtiene con la paromomicina y ribostamicina, confirmando la escasa o nula actividad sobre la lividomicina, netilmicina y tobramicina. La amikacina presenta un porcentaje de modificación incluso superior a la kanamicina y butirosina.

Figura 1: Perfil de sustrato de la actividad APH del extracto crudo sonificado de la cepa SM23



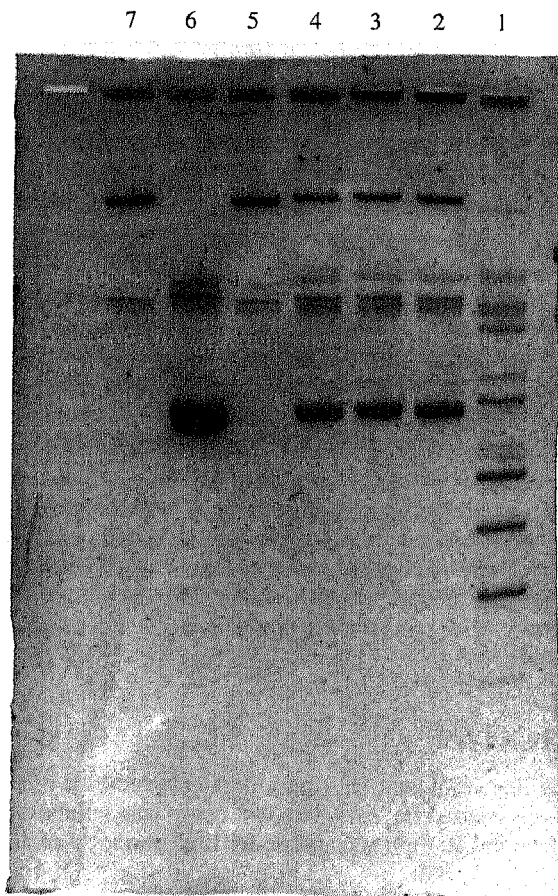
La fosforilación de los diferentes aminoglucósidos se expresa respecto a la inactivación de paromomicina considerada como el 100% (12.060 cpm). La reacción se llevó a cabo con un tiempo de incubación de 20 minutos a 30°C y con una concentración final de sustrato de 167 μM . Abreviaturas: Par (paromomicina); Gmt B (gentamicina B); Gmt C (complejo C de la gentamicina); Liv (lividomicina); Net (netilmicina); SCH-21561 (2' N etil netilmicina); SCH-21562 (6' N etil netilmicina); Tob (tobramicina).

Este perfil de sustrato sugiere que el punto modificado en la molécula es el hidroxilo en la posición 3'. La tobramicina, netilmicina, SCH-21561, SCH-21562 y el complejo C de la gentamicina no serían afectadas por carecer de grupo hidroxilo en 3'. El resto de los aminoglucósidos modificados por la fosfotransferasa, poseen la diana del enzima. En el caso de ribostamicina y paromomicina, las moléculas contienen los dos puntos dianas de este tipo de fosfotransferasas, los grupos OH en las posiciones 3' y 5'.

La actividad enzimática APH (3') de la cepa SM23, se diferencia de las actividades APH (3')-I, II, III, IV y V por la modificación de los sustratos butirosina y amikacina y por la elevada resistencia presentada por la cepa portadora frente a dichos aminoglucósidos. Sin embargo, presenta similitud con el enzima APH (3')-VI descrito recientemente en una cepa de *Acinetobacter* (LAMBERT y cols., 1988).

La elevada velocidad inicial de fosforilación (9121 cpm/min) determinada de forma preliminar con extracto acelular de la cepa SM23 para la concentración de sustrato amikacina 16,7 μM , hace sugerir una buena afinidad del enzima APH (3') por dicho aminoglucósido. Este hecho podría estar relacionado con el elevado nivel de resistencia presentado por la cepa SM23 frente a la amikacina. Asimismo, el enzima APH (3') de SM23 presentó inhibición por concentraciones relativamente elevadas de amikacina y principalmente de kanamicina.

Figura 2: Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% de los DNAs purificados en gradiente de cloruro de cesio/bromuro de etidio de la cepa SM23 y de sus transconjugantes y transformantes. Se utilizó como patrón de peso molecular conocido un lisado de la cepa V517.



Líneas: (1) V517; (2) SM23; (3) CUR231; (4) CUR232; (5) CUR233; (6) CUR234; (7) CUR235.

Se obtuvo el DNA de la cepa SM23 mediante la técnica de lisis clara y posteriormente se purificó en un gradiente de cloruro de cesio/bromuro de etidio. La realización de electroforesis en geles de agarosa al 0,8% de este material genético purificado, permitió la detección de dos bandas de DNA extracromosómico correspondiendo una de ellas a un plásmido de elevado peso molecular y la otra, a un segundo plásmido de pequeño tamaño. Mediante digestiones con endonucleasas de restricción, se estimó que el peso molecular del plásmido de gran tamaño era de 60 Kb. y el de bajo peso molecular, de 6,8 Kb. Por medio de ensayos de transferencia genética por conjugación y transformación se determinó que el plásmido de 6,8 Kb. contenía el gen que codificaba para la actividad enzimática fosfotrans-

ferasa APH (3') y por tanto para la resistencia a la amikacina y a la kanamicina, mientras que el plásmido de mayor tamaño, codificaba para la resistencia a la ampicilina y a la tetraciclina. En la *Figura 2* podemos observar la electroforesis en gel de agarosa al 0,8% de los DNAs purificados en gradiente de cloruro de cesio/bromuro de etidio de la cepa original SM23, así como de los transconjugantes (CUR231, CUR232 y CUR233) y transformantes (CUR234 y CUR235). La cepa CUR232 posee resistencia a la ampicilina y tetraciclina pero no a los aminoglucósidos y como observamos, sólo posee el plásmido de 60 Kb. Por otro lado, el transformante CUR234 es resistente a amikacina y kanamicina pero no a ampicilina y tetraciclina; posee como vemos el plásmido de 6,8 Kb. que codifica para la nueva actividad APH (3').

La localización de este determinante de resistencia en un plásmido, tiene una gran importancia a nivel epidemiológico por las posibles facilidades de diseminación entre otras cepas hospitalarias o extrahospitalarias. En este sentido, se ha llevado a cabo un estudio epidemiológico sobre 100 muestras fecales procedentes de pacientes del hospital Ramón y Cajal de Madrid que fueron inoculadas sobre placas conteniendo 20 µg/ml de kanamicina, y replicando posteriormente sobre placas con amikacina (20 µg/ml). En este estudio preliminar no fue posible la detección de aislamientos correspondientes al fenotipo de la fosfotransferasa estudiada.

Parece un hecho significativo el que la cepa de *S. marcescens* SM23, con una posible nueva actividad fosfotransferasa inactivante de la amikacina, haya surgido en un hospital en el que se había suprimido la habitual política de restricción para este antibiótico. Muy probablemente existía en las poblaciones microbianas este determinante de resistencia, que había pasado inadvertido al no haber sido seleccionadas las cepas productoras por las condiciones de bajo consumo de amikacina. Parece que el hiperconsumo de amikacina ha creado las condiciones para la selección de estas poblaciones, que una vez enriquecidas, podrían diseminarse epidémicamente.

3. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha llevado a cabo gracias a la Ayuda recibida por el Instituto de Estudios Riojanos y la Universidad de Zaragoza, así como a la colaboración del Servicio de Microbiología del Hospital Ramón y Cajal de Madrid donde se realizó una parte de este proyecto.

4. BIBLIOGRAFÍA

- Bauer A.W., Kirby W.H.M., Sherrys J.C., Turck M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J.Clin. Pathol.* 45: 493-496.
- Clewell D.B., Helinsky D.R. (1969). Supercoiled circular DNA-protein complex in *Escherichia coli*: purification and induced conversion to an open circular DNA form. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 62: 1159-1166.
- Dehertogh D.A., Lerner, S.A. (1985). Correlation of aminoglycoside resistance with the Km's and Vmax/Km ratios of enzymatic modification of aminoglycosides by 2'-O-Nucleotidil-transferse. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 27: 670-671.
- Guerry P., Leblanc D.J., Falkow S. (1973). General method for the isolation of plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.* 116: 1064-1066.

RESISTENCIA A AMINOGLUCÓSIDOS POR ENZIMAS FOSFOTRANSFERASAS APH(3')

- Lambert T., Gerbaud G., Courvalin P. (1988). Transferable amikacin resistance in *Acinetobacter* spp. due to a new type of 3'-aminoglycoside phosphotransferase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 15-19.
- Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. (1982). "Molecular cloning" Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Martin P., Jullien E., Courvalin P. (1988). Nucleotide sequence of *Acinetobacter baumannii* aphA-6 gene: evolutionary and functional implications of sequence homologies with nucleotide-binding proteins, kinases and other aminoglycoside-modifying enzymes. *Mol. Microbiol.*
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (1984). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. 3rd Ed. Publication M2-A3. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (1985). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard. Publication M7-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.
- O'Connell M.P. (1984). En: "Advanced Molecular Genetics". Springer-Verlag Berlin Heidelberg. New York. Tokio. Ed. A. Puhler, K.N. Timmis, pp. 3-13.
- Ozanne B., Benveniste R., Tipper D., Davies J. (1969). Aminoglycoside antibiotics: inactivation by phosphorylation in *Escherichia coli* carrying R factors. *J. Bacteriol.* 100: 1144-1146.
- Siegenthaler W.E., Bonetti A., Luthi R. (1986) Aminoglycoside antibiotics in infectious diseases. *Am. J. Med.* 80 (Suppl. 6B) 2-14.