



**LECCIÓN INAUGURAL
DEL CURSO ACADÉMICO
MMIII-MMIV**

RAFAEL GÓMEZ-LUS LAFITA

**LA EVOLUCIÓN
DE LA RESISTENCIA BACTERIANA
FRENTE AL DESARROLLO
DE LAS MOLÉCULAS DE ANTIBIÓTICOS**



LA EVOLUCIÓN DE LA RESISTENCIA BACTERIANA
FRENTE AL DESARROLLO DE LAS MOLÉCULAS
DE ANTIBIÓTICOS

Rafael Gómez-Lus Lafita

Catedrático de Microbiología

Profesor Emérito

Facultad de Medicina

Universidad de Zaragoza

Lección Inaugural del Curso Académico MMIII-MMTIV

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Zaragoza

Imprime: Doble Color, S. L.

D.L.: Z-2402-2003

A mi familia y a mis amigos

Índice

Presentación.....	9
Nacimiento de la era antibiótica	10
Evolución de la resistencia bacteriana.....	11
Criterios de resistencia y detección de cepas emergentes en los laboratorios de microbiología clínica	12
Minimizar la resistencia bacteriana	13
Contribución de la biología molecular al conocimiento de los mecanismos de resistencia	14
Resistencia cruzada y selección cruzada.....	14
Co-resistencia y co-selección.....	15
La diseminación de los genes de resistencia a los antibióticos.....	16
La resistencia en bacilos gram-negativos y en cocos gram-positivos.....	16
Origen de los genes de resistencia: pasado y presente.....	18
Resistencia transferible en BGN mediada por plásmidos R del grupo Inc. P ..	18
Resistencia transferible en BGN mediada por plásmidos R del grupo Inc. M.	19
Expresión de genes de resistencia de <i>Haemophilus influenzae</i> en <i>E. coli</i>	20
Resistencia a apramicina e higromicina mediada por plásmidos R en cepas clínicas de origen humano	21
Los antibióticos como feromonas sexuales para las bacterias	22
Resistencia al mercurio en las bacterias	23
Historia natural de los transposones vectores del gen <i>mer</i> en bacterias de la era pre-antibiótica	24

Epidemiología de la resistencia a los antibióticos: local, nacional e internacional.....	24
Diseminación intercontinental de un clon multirresistente de <i>S. pneumoniae</i> serotipo 23F de España a Estados Unidos y propagación de un clon de neumococo multirresistente serotipo 6B de España a Islandia	25
Diseminación internacional de bacilos gram-negativos resistentes productores de β -lactamasas.....	26
Bibliografía	26

Excmo. Sr. Presidente del Gobierno de Aragón
Excmo. Sr. Rector Magnífico de la Universidad de Zaragoza
Excmas. e Ilmas. Autoridades Civiles, Eclesiásticas y Militares
Compañeros universitarios: Profesores, Alumnos y Personal de Administración y
Servicios
Señoras y Señores
Amigos todos

El gran honor de inaugurar las lecciones de este curso 2003-2004, desde esta tribuna de nuestra cuatro veces centenaria Universidad, es además un sueño hecho realidad y por ello quiero expresar al Rectorado mi más profunda y emocionada gratitud, rememorando el protocolo que se iniciara en 1845. Y al pensar en el respetable criterio de la antigüedad, retroceder en el tiempo a mi pasado de profesor encargado de la Cátedra de Microbiología e Higiene en el curso 1956-1957, en este emblemático edificio de la entonces Facultad de Medicina y Ciencias. Once años de profesor adjunto y treinta y tres de catedrático de Microbiología y Parasitología, suman 44, al que falta uno de servicios especiales en la DGA (1993-1994), lleno de responsabilidad y nostalgia.

La elección del tema ha sido fácil por su importancia, porque aproxima a mi sentimiento de médico el deseo de ser útil en el diagnóstico y en el tratamiento, porque he aprendido a convivir —o al menos así lo creo— con las bacterias y ha sido una experiencia inolvidable, en la que se ha enraizado mi vocación por la docencia y desempeñar una profesión y una especialidad que me ha hecho inmensamente feliz, porque nada podía compensarme tanto como los discípulos y la investigación relacionada con la microbiología clínica. El mundo procariótico que hemos estudiado en esta mi tierra, en Aragón, nos ha permitido familiarizarnos y apasionarnos con un momento histórico en el que nos enfrentamos al reto de la resistencia bacteriana a los

antibióticos. Les hablaré como microbiólogo, aceptando las limitaciones que pueda imponerme la deformación profesional, intentando encontrar en ustedes la complicidad para que me acompañen en el desarrollo de esta lección inaugural.

Nacimiento de la era antibiótica

La era antibiótica es uno de los momentos clave de nuestra época, que merece la calificación de Tiempo-Eje, aplicada por el filósofo Karl Jaspers a los períodos de la Historia que han tenido un significado trascendental. Ya hace 74 años que A. Fleming descubrió la penicilina y más de medio siglo de la aparición de los antibióticos de amplio espectro. Una marcada diferencia existía entre estos dos hallazgos: el primero fue realizado por un hombre solo, como lo hiciera L. Pasteur, mientras que el segundo lo llevaron a cabo equipos de científicos; se había producido un cambio en la actitud mental y social de la investigación.

Como acertadamente señala R. Reiner en una excelente monografía,³⁴ la idea de la antibiosis aparece ya en las descripciones de L. Pasteur y J. F. Joubert (1877), y sobre todo de V. Babés (1885). Este último autor escribió: «Hemos estudiado experimentalmente el mecanismo por el que una bacteria de una especie conocida produce sustancias químicas o modifica el medio de cultivo de tal modo que daña a las bacterias de otras especies. Si el estudio del mutuo antagonismo surgiera cuando la enfermedad estaba ya en evolución, otra bacteria podría actuar terapéuticamente. La acción recíproca es mucho más obvia cuando la concurrencia de las bacterias no es simultánea. Así, la bacteria que se siembra primero en gelatina actúa de dos modos sobre la segunda: 1. actividad química, y 2. función vital». Estos criterios adquieren todo su valor si recordamos la proximidad de los hallazgos de L. Pasteur y de R. Koch. B. Gosio (1896) descubrió que ciertos microorganismos podían formar sustancias activas frente a las bacterias, observando que la especie *Penicillium brevicompactum*, productor de ácido micofenólico, inhibía el crecimiento de *Bacillus anthracis* y de ciertas especies de hongos. Por otra parte, una contribución más cercana al nacimiento de la era antibiótica y de indudable importancia es la tesis doctoral presentada el 17 de diciembre de 1897 en la Facultad de Medicina y de Farmacia de Lyon: su autor E. Duchesne y su título original *Contribution a l'étude de la concurrence vitale chez les Moisissures et les Microbes*. En ella se demostró que la inoculación simultánea de cultivos de *Penicillium glaucum* y patógenos como *Salmonella typhi* daban lugar a infecciones atenuadas. Resulta explicable que Duchesne recibiera el tributo de admiración a su genio investigador y a su trabajo en solitario que le acreditan como uno de los precursores de la era antibiótica.²⁸ Pese a todo, ninguna de las

mencionadas aportaciones superó los límites del laboratorio, en tanto que R. Emmerich y O. Löw (1889) introdujeron la piocianasa obtenida de cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* en el uso clínico, administrándose tanto local como parenteralmente. Llegó a comercializarse y se utilizó hasta la aparición de las sulfamidas, a pesar de que era una mezcla de sustancias, algunas con supuesto poder antimicrobiano pero con riesgo por su toxicidad. No es de extrañar que se produjeran graves complicaciones, ya que se aplicó incluso intratecalmente en el tratamiento de la meningitis. En veterinaria tuvo sus indicaciones como terapéutica de las mastitis en las vacas, anticipándose en ello a la misma penicilina.

Inequívocamente, el concepto de la quimioterapia moderna se inicia con P. Ehrlich y S. Hata (1907) en su búsqueda de sustancias con un elevado tropismo por los agentes infecciosos y un reducido organotropismo, descubriendo el salvarsán. El principio de la «toxicidad selectiva» basado en la interrelación parásito-quimioterápico-huésped, y el estudio de los mecanismos de resistencia de los parásitos, constituyeron piedras angulares que conservan en la actualidad plena vigencia. Por ello, la relación estructura-actividad, el modo de acción de los antibióticos y las bases genéticas de la resistencia son clave en la valoración de los agentes antimicrobianos.

Evolución de la resistencia bacteriana

La evolución de las bacterias hacia la resistencia a los antibióticos e incluso a la multiresistencia es inevitable porque ya existe en la naturaleza. Un ejemplo clásico es la identificación de una cepa de *Escherichia coli*, productora de β -lactamasa antes de que la penicilina se hubiera utilizado clínicamente.¹ Constituye un aspecto particular de la evolución general de las células procariotas que preocupa a *Homo sapiens* pero que ninguna fuerza puede detenerlo. En consecuencia, lo mejor que podemos lograr es retrasar la emergencia y subsecuente diseminación de las bacterias resistentes o de los genes de resistencia. Por eso, el fenómeno de la resistencia puede surgir por mutaciones de los genes metabólicos, estructurales o reguladores. Alternativamente, puede resultar de la adquisición horizontal de información genética exógena. Ambos mecanismos no son mutuamente exclusivos y pueden asociarse en la emergencia y una más eficiente propagación de la resistencia. Sin embargo, un concepto nuevo es el de las bacterias hipermutables consecuencia de fallos en la corrección de pruebas y en los sistemas de reparación de los errores de copia del ADN.⁵ Las células hipermutadoras tienen tasas de mutación 200 veces superiores a las de las bacterias normales. Una vez surge la mutación frente al primer fármaco, se desarrollarán muta-

ciones frente a otros antibacterianos. La selección o inducción transitoria de la hipermutabilidad puede explicar las variantes con múltiples mutaciones que han emergido con mayor rapidez de la prevista en los estudios de laboratorio.

Criterios de resistencia y detección de cepas emergentes en los laboratorios de microbiología clínica

Los criterios básicos pueden ser genéticos (existiendo diferencias con la cepa ancestral), bioquímicos (presencia o no de un mecanismo de resistencia), microbiológicos (al detectar una elevada concentración del agente antimicrobiano para que actúe), clínicos (resultado del tratamiento), intrínsecos (resistencia de un determinado género o especie) y adquiridos (resistencia solamente de algunas cepas de una especie o género).

El análisis molecular y la interpretación terapéutica de las pruebas de sensibilidad constan de tres pasos: 1) caracterizar el fenotipo de resistencia probando una seleccionada serie de antimicrobianos, 2) deducir del fenotipo observado los correspondientes mecanismos bioquímicos de resistencia y 3) predecir el fenotipo de resistencia y su probable genotipo.⁶

Uno de los retos más importantes con los que se enfrenta un laboratorio de microbiología clínica es la detección precisa de la resistencia emergente a los antibióticos entre algunos patógenos bacterianos.^{17,23} En los últimos años, la resistencia a vancomicina se ha hecho prevalente en los enterococos, así como en los neumococos la resistencia a penicilina, a macrólidos y a otros antimicrobianos. Más recientemente, han aparecido cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina con reducción primero y pérdida después de sensibilidad a vancomicina. Además las técnicas moleculares han demostrado que existen todavía problemas en la detección de resistencia a meticilina en los estafilococos, sobre todo en los coagulasa negativos. Por otra parte, en la familia *Enterobacteriaceae* las mutaciones en las β -lactamasas que causan resistencia a las últimas generaciones de penicilinas y cefalosporinas pueden resultar difícilmente demostrables en el laboratorio, y las bacterias anaerobias no presentan ya una sensibilidad a los antibióticos cuya predicción permita un selección de garantía para la terapéutica empírica. En consecuencia, los laboratorios de microbiología clínica pueden no ser capaces de basarse en un método único para detectar la emergencia de resistencia a los antibióticos o el aislamiento e identificación de bacterias problemáticas. Esto obliga a emplear métodos convencionales cuantitativos de sensibilidad a los antibióticos o a desarrollar medios con concentraciones únicas de antimicrobianos que permitan la búsqueda y detección de cepas

resistentes. Es decir, el laboratorio de microbiología clínica tendrá la versatilidad de determinar la resistencia tanto en patógenos que se aíslan con frecuencia como en los de aparición infrecuente.

Minimizar la resistencia bacteriana

Uno de los objetivos de un tratamiento antibiótico es evitar o al menos minimizar la resistencia bacteriana, que ha pasado a ser una preocupación de la comunidad científica mundial. En primer lugar, valoraremos reducir el consumo de antimicrobianos basándonos en un diagnóstico clínico y microbiológico que justifique su utilización adecuada, cumpliendo la dosificación en todos sus términos. En segundo lugar, rotaremos los antibióticos siempre que sea posible para privar a las bacterias resistentes, al menos temporalmente, la ventaja de la presión selectiva cuando determinados fármacos son sustituidos por otros.

Finalmente, el tercer procedimiento sugerido por K. Drlica¹⁰ es la dosificación estratégica de los antibióticos. La idea clave, familiar para los microbiólogos pero sin comprobar en la clínica, es que muy pocas mutantes se recuperarán si las concentraciones de antibióticos no permiten que una bacteria pueda mutar concurrentemente dos o más veces. La dosificación acorde con la idea de las dos mutaciones podría ayudar a restringir la selección de mutantes resistentes. Sin embargo, aun demostrándose estos hechos la aplicación de esta estrategia precisará del hallazgo de nuevos antibióticos para conservar o preservar los ya existentes.

Las medidas para contrarrestar la diseminación de la resistencia bacteriana se requieren con urgencia. Hace falta un abordaje múltiple, primero tratando de prevenir la emergencia de patógenos resistentes por una correcta prescripción de los antimicrobianos, utilizándolos con la máxima prudencia. En segundo lugar, aislando a los portadores de cepas multirresistentes, siguiendo las directrices existentes en especial las del CDC de Atlanta.⁴⁶ En tercer lugar, restringiendo o eliminando el uso de los antibióticos como promotores del crecimiento de los animales, para excluir la presencia de patógenos resistentes en los alimentos.

Una visión ampliada de los factores de virulencia para comprender mejor el proceso infeccioso y su tratamiento, incluyendo elementos que se encuentran fuera del ser humano, nos lleva a una interpretación más ecológica. No debemos pensar simplemente en la interacción microorganismo-células del huésped, situando a la enfermedad infecciosa en un contexto ambiental. Una ventaja de esta perspectiva es que sitúa a la biología de la transmisión y a su progresión en el centro del problema.³⁸

Contribución de la biología molecular al conocimiento de los mecanismos de resistencia

La mayor contribución de los métodos moleculares al conocimiento de la resistencia bacteriana a los antibióticos ha sido el descubrimiento de casi todos los mecanismos bioquímicos y la determinación de los sistemas genéticos de diseminación.⁷ Estos hallazgos han llevado a diferenciar los conceptos de resistencia cruzada y de co-resistencia, al diseño de nuevas técnicas para la detección *in vitro* de la resistencia, a la creación de nuevos antimicrobianos, así como al desarrollo de técnicas epidemiológicas sensibles y a la implementación de medidas preventivas. La conclusión es que debemos acostumbrarnos a hablar en términos de mecanismos de resistencia y sobre todo a aplicarlo en la práctica clínica. Reiteradamente se ha demostrado que la emergencia y diseminación de la resistencia se correlaciona con el uso de los antibióticos, pero el problema es mucho más complejo y la valoración no debe hacerse con criterios exclusivamente antropocéntricos. Un aspecto importante ha sido la demostración de que la emergencia de la resistencia aparece por azar, puede incrementarse por necesidad procariótica y es independiente de la presencia de los antimicrobianos en el medio; es decir, estos agentes no inducen a la resistencia sino que la seleccionan. Esto significa que los antibióticos sólo aportan la presión selectiva sobre las mutantes, permitiendo su demostración y fomentando su multiplicación.

Resistencia cruzada y selección cruzada

En el fenómeno de la resistencia cruzada, un mecanismo bioquímico único confiere resistencia a una clase de antimicrobianos. Esta clase de agentes están químicamente relacionados, comparten la misma diana de acción y por lo tanto se produce la resistencia cruzada: las bacterias resistentes a un miembro de la clase son generalmente resistentes a todos, variando solamente la respuesta a causa de la actividad intrínseca de los diferentes fármacos. A la inversa, los antibióticos de diferentes clases son estructuralmente distintos, las dianas son diversas y por tanto no existe resistencia cruzada. Es decir, la utilización de uno de ellos no selecciona resistencia a los de otras clases. Sin embargo, puede producirse resistencia cruzada a antibióticos poco relacionados estructuralmente cuando se traslapan las dianas, como sucede con los macrólidos, cetólidos, lincosamidas y estreptograminas (MCLS) al metilarse un residuo adenina en el ARN ribosomal. También es posible que los mecanismos de eflujo, conocidos más recientemente, causen una resistencia múltiple ya que al

actuar determinadas bombas son capaces de expulsar un amplio espectro de antibióticos: β -lactámicos, aminoglucósidos, clase MCLS, cloranfenicol, tetraciclinas, sulfamidas, trimetoprima e incluso fluoroquinolonas.

Una evidente limitación para las bacterias es que la resistencia por eflujo no resulta fácilmente transferible porque requiere un conjunto de genes y además precisan su integración en la membrana bacteriana para que puedan expresarse los genes estructurales de la bomba de eflujo. Pero en tanto el mecanismo se expresa, a las bacterias les aporta un tiempo adicional que les permite la selección de mutantes.

Co-resistencia y co-selección

En contraste con la resistencia cruzada, la co-resistencia se debe a la presencia en la misma bacteria huésped de varios mecanismos, cada uno confiriendo resistencia a una clase de antimicrobiano. Los genes responsables se encuentran con frecuencia situados adyacentes, ligados físicamente y expresándose de un modo coordinado. Por ejemplo, los integrones representan uno de los sistemas más perfeccionados, habiéndose descrito inicialmente en bacilos gram-negativos,^{19,20} si bien recientemente se han encontrado también en gram-positivos, de manera concreta en la especie *Corynebacterium glutamicum*.³² Debido a la organización genética surge la co-expresión de varios genes, por lo que el empleo de uno de los antibióticos que es sustrato para uno de los mecanismos de resistencia co-seleccionará resistencia a los restantes fármacos, manteniendo completo el grupo de genes.

Un carácter de los antibióticos poco valorado es el denominado por S. B. Levy^{24,25} «efecto social» porque no se limita a la influencia sobre los enfermos que los reciben, afectando también a los individuos que comparten el medio ambiente. Además de la presión selectiva, surge otro hecho negativo de la resistencia ya que las bacterias no suelen destruir siempre a los antimicrobianos, que conservan su actividad. En efecto, existen relativamente pocos mecanismos que los inactiven como la hidrólisis por β -lactámicos, la acetilación del cloranfenicol, las esterasas para los macrólidos y en mucho menor grado las enzimas modificantes de aminoglucósidos.^{12,15} El resto de los modos de resistencia se limitan a cambiar las dianas de los antibióticos, o exportándolos activos fuera de las bacterias. En estas condiciones, se excretan los antimicrobianos por las personas o por los animales en el ambiente sobre cultivos o en las aguas municipales, donde los antibióticos pueden continuar ejerciendo su presión selectiva. El resultado es una fase de selección ambiental «post terapéutica» a concentraciones bajas, que son las ideales para seleccionar la resistencia.

La diseminación de los genes de resistencia a los antibióticos

Los estudios de genética molecular establecen tres niveles de diseminación de la resistencia a los antibióticos:

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

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

Estas observaciones conducen al conocimiento de que las bacterias atesoran un fondo de genes de resistencia, ya que están laxamente unidos a sus huéspedes y se diseminan con facilidad en condiciones naturales. Afirmación que tiene plena vigencia en el caso del uso de los antibióticos como aditivos de los piensos, que debe obligar a la investigación que permita saber si los mismos genes de resistencia se detectan en las infecciones humanas, como se ha demostrado para aminoglucósidos, gluco péptidos y otros antimicrobianos.

El impacto de la biología molecular en el conocimiento y diseminación de la resistencia no se ha acompañado de avances en la lucha contra la conjugación mediada por plásmidos ni en el bloqueo de la replicación de los pequeños replicones que constituyen los plásmidos R. Más aún, la utilización de agentes curantes que impedían la replicación del ADN extracromosómico generaba bacterias libres de plásmidos por poco tiempo ya que en su entorno abundaban las células bacterianas portadoras de plásmidos.

La resistencia en bacilos gram-negativos y en cocos gram-positivos

La resistencia bacteriana a los antibióticos en los bacilos gram-negativos (BGN) suele estar mediada por plásmidos R, y los genes vehiculados por transposones (Tn), integrones (In) y empaquetados en casetes génicas. En los cocos gram-positivos son

fundamentales los Tn conjugativos cromosómicos (TnCC), caracterizados por compartir rasgos con plásmidos R, bacteriófagos y transposones clásicos. Todos estos elementos juegan un papel central en la evolución, proporcionando mecanismos para generar diversidad y, con los sistemas de transferencia de ADN, para su diseminación a otras bacterias.

Como analizaremos más adelante, entre las poblaciones bacterianas de BGN, sobre todo en las causantes de infecciones hospitalarias, son fundamentales la intervención de los plásmidos R, de los transposones y los integrones, cuyo papel varía de unos a otros genes. Ha sido bien documentada la participación de los integrones en el mantenimiento y la difusión del gen *sul1* en las enterobacterias, mientras que el gen *sul2* no se asocia a integrones. Otro ejemplo lo encontramos en los genes que codifican β -lactamasas (derivados de *bla*_{TEM}), que en su mayoría son vehiculados por transposones, no por integrones, y las β -lactamasas OXA y PSE asociadas a integrones son considerablemente más raras. Muchos de los genes de resistencia adquiridos por los BGN son parte de pequeños elementos móviles: las casetes génicas, que al incorporar un pequeño sitio de recombinación (59 pb) les confiere movilidad. Su origen se sugiere que son estructuras genéticas antiguas que codifican proteínas de distintas funciones. Podrían haberse formado a partir de ARN mensajero en el que ya se encontrarían las secuencias repetidas (SR) de 59 pb, o se incorporarían posteriormente. Las SR les aporta movilidad porque son reconocidas por las recombinasas sitio-específicas codificadas por el integrón y que catalizan su captura. Es un mecanismo muy eficiente de empaquetar genes, y en cuanto al grado de divergencia entre las casetes génicas están en el rango existente entre especies como *E. coli* y *S. typhimurium*, es decir, de 10 a 160 millones de años. Las SR de 59 pb derivan de ancestros comunes, funcionalmente conservadas por muchos años. Probablemente existían depósitos de los componentes de las casetes génicas y se han constituido reorganizándose los genes de resistencia y las secuencias de 59 pb en la región límite interior, en vez de la habitual región exterior.

Entre los cocos gram-positivos la transferencia de genes de resistencia a macrólidos en *S. pneumoniae* está mediada por transposones cromosómicos de amplio espectro de huéspedes: géneros *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Enterococcus*. Dado que la resistencia a cloranfenicol, tetraciclinas y aminoglucósidos (alto nivel) también se transmite por TnCC, tales antibióticos pueden actuar co-seleccionando indirectamente eritromicina, como sucede en *S. pneumoniae* con el Tn1545 que porta los genes *erm* (B), *tet* (M) y *aph*(3')-III, además del *int*Tn.³⁹ En contraste, la mutación de los genes *pbps* y la transformación por genes *pbps* de otras especies constituyen el bien documentado mecanismo de resistencia a penicilina en neumococos. Es significativo que en una reciente publicación se haya descrito el mecanismo de transformación en neumococos como eficiente sistema en el laboratorio para transferir resisten-

cia a estreptomicina, fluoroquinolonas y rifampicina a partir de amplicones de los genes *rpsL*, *parC* y *rpoB* (A. J. Martín-Galiano, A. De la Campa (2003): *Antimicrob Agents Chemother* 47:1257-1261).

Origen de los genes de resistencia: pasado y presente

El origen de los plásmidos de resistencia lo encontramos en microorganismos productores de antibióticos (géneros *Bacillus*, *Micromonospora*, *Streptomyces*, etc.) y forma parte de un mecanismo anti-suicidio, con exportación de las sustancias protectoras. Este mecanismo propuesto inicialmente por T. Watanabe⁴⁵ y completado por R. Benveniste y J. Davies^{3,9} sugería que los determinantes R procedían de los cromosomas de los precitados géneros y eran capturados por plásmidos (factores sexuales). Otra posibilidad es la participación de genes metabólicos cuyos productos intervienen en las funciones procarióticas y son capaces también de modificar, inactivar o expulsar moléculas de antimicrobianos. Las bacterias patógenas pueden adquirir los genes R por transformación (ADN desnudo), transducción (mediada por bacteriófagos) y por conjugación, lo que significa la transferencia horizontal, que completa la vertical característica de la diseminación clonal. La integración de los genes exógenos en el genoma (ADN cromosómico o plasmídico) puede hacerse por recombinación homóloga o sitio-específica. Por otra parte, muchos de los determinantes genéticos de resistencia que ahora se encuentran en plásmidos pueden tener su origen en el cromosoma de otras especies, como se ha demostrado recientemente. Las β -lactamasas SHV mediadas por plásmidos derivan de genes cromosómicos de *Klebsiella pneumoniae*, así como las enzimas AmpC vehiculadas también por plásmidos detectadas en *Klebsiella* spp. y en *E. coli* proceden del cromosoma de *Citrobacter freundii*, *Hafnia alvei*, *Morganella morganii* y *Enterobacter cloacae*; diversas cefotaximasas (CTX-M) tienen su origen en el cromosoma de *Kluyvera* spp.²⁷

Resistencia transferible en BGN mediada por plásmidos R del grupo Inc. P

En el H.C.U. Lozano Blesa y en otros centros hospitalarios de Zaragoza se ha investigado la diseminación y evolución de la resistencia antibiótica, estudiando los plásmidos R conjugativos (tra⁺), los elementos transponibles y, en algunos casos, los mecanismos bioquímicos de resistencia. En 1974, de una cepa de *P. aeruginosa* pro-

cedente del Centro Regional de Traumatología, caracterizamos el plásmido pUZ1 (inicialmente R1033), peso molecular de 68 kb, grupo de incompatibilidad P (Inc. P), transferible a *E. coli* J62 por conjugación, patrón de resistencia a ampicilina, tetraciclina, gentamicina, kanamicina, estreptomina, cloranfenicol, sulfamidas y HgCl₂.⁴¹ Tanto la cepa donadora como la receptora codificaban las enzimas TEM-1, AAC(3)-I, APH(3')-I, y ANT(3'').⁹ El plásmido pUZ1 contenía dos transposones, el Tn3 ya conocido que porta el gen *bla*_{TEM-1}, y uno nuevo, el Tn1696³⁶ vehículo de los genes *aacC1*, *aadA1*, *cmlA*, *sul1* y *mer*. A su vez, el integrón In4 agrupaba los genes *aacC1*, *aad2* y *cmlA*, el gen *IntI* (situado en la región conservada 5') y el gen *sul1* (situada la R.C. en 3').⁴

Cuatro años después, aislamos en nuestro hospital diferentes cepas de enterobacterias y de *P. aeruginosa*, que albergaban plásmidos del grupo Inc. P, con igual peso molecular e idéntico patrón de restricción y de producción de enzimas.¹⁴ Estos hallazgos apoyaban la hipótesis de la diseminación de plásmidos R en áreas próximas, con la ventaja de propagarse entre las familias *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonadaceae*, característica del grupo Inc. P.

Resistencia transferible en BGN mediada por plásmidos R del grupo Inc. M

En 1976 detectamos un plásmido de 73 kb perteneciente al grupo Inc. M y por tanto transferible solamente a enterobacterias. El patrón de resistencia antibiótica era ampicilina, tetraciclina, gentamicina, tobramicina y netilmicina, produciendo las enzimas TEM-1 y AAC(3)-V.³⁵ Posteriormente se aislaron numerosas cepas de enterobacterias con plásmidos del grupo Inc. M e idénticas propiedades genotípicas y fenotípicas. Es interesante que en una cepa de *Proteus vulgaris* (#18182) se detectó la presencia de dos plásmidos conjugativos, uno del grupo M (pUZ3a) y otro del grupo P (pUZ3b), cuyos determinantes de resistencia correspondían a los descritos previamente. Además, como consecuencia de la vigilancia epidemiológica de las cepas portadoras de plásmidos R, pudimos comprobar que algunos inicialmente transferibles (tra⁺) dejaban de serlo (tra⁻), así como la pérdida de plásmidos, o bien la recombinación de parte de sus genes en el cromosoma, que sugería mecanismos de transposición. Un ejemplo práctico lo constituye una transconjugante de la cepa de *E. coli* #3644, que perdió el plásmido que portaba pero conservaba su patrón de resistencia. La estrategia de rescate fue la utilización del plásmido pUZ8, carente de elementos transponibles, e introducirlo en la precitada transconjugante de *E. coli* J62 (F⁻ his lac Nal^r pro trp). Mediante conjugación con *E. coli* J53 (F⁻ met pro Rif^r) se obtuvo un

plásmido (pUZ3644) que contenía un fragmento de 27 kb, portando los genes *bla*_{TEM-1} y *aacC5*, flanqueados por dos copias de una secuencia de inserción IS140. En este segmento se caracterizó el transposón compuesto Tn2922, que es un cointegrado capaz de transponer como una unidad y formado por la fusión de los genes *tnpR*, *bla*_{TEM-1} y *aacC5*.²⁹ Estos dos genes constituyen una unidad de transcripción, actuando como promotor el del gen *bla*_{TEM-1}, que es responsable de la movilización de una IS140.

Es llamativa la capacidad de transposición entre replicones que poseen los genes *bla*, lo que se refleja en los numerosos grupos de incompatibilidad plasmídicos en los que se han detectado: 18 para la β -lactamasa TEM-1, 7 para la TEM-2, 3 para la OXA-1, 4 para la OXA-2 y 2 para la OXA-3. Ya hemos referido parte de nuestra experiencia sobre los genes *bla*_{TEM-1} aislados en plásmidos de los grupos Inc. P e Inc. M; también en plásmidos R del grupo Inc. M se caracterizó en Francia el gen *bla*_{TEM-3}, que codifica β -lactamasas plasmídicas de espectro ampliado. Con anterioridad se había descrito en el mismo país un plásmido Inc. C portador del gen de la β -lactamasa de espectro ampliado TEM-4.

Expresión de genes de resistencia de *Haemophilus influenzae* en *E. coli*

Como ya hemos mencionado, la eficiencia de los mecanismos genéticos queda reflejada en la diseminación de la resistencia múltiple a sulfamidas, β -lactámicos, cloranfenicol, aminoglucósidos, etc., cuya selección puede hacerse simplemente por el empleo de uno de los antimicrobianos que afecta a la totalidad de los determinantes genéticos. Un ejemplo interesante lo ofrece la resistencia de *Haemophilus influenzae* al cloranfenicol en nuestro medio (12%), a pesar de su limitada utilización clínica. En contraste, el porcentaje de resistencia a ampicilina (Ap^R) es del 35%, y de las cepas resistentes al cloranfenicol, todas menos una (95,8%) eran también resistentes a ampicilina. Esta resistencia está mediada por β -lactamasas TEM-1, no habiéndose detectado ninguna tipo ROB-1. En cuanto a la resistencia al cloranfenicol, se debe a la síntesis de una acetiltransferasa (CAT) que comparte propiedades bioquímicas con las CAT II y III de *E. coli*. Algunas de estas cepas hibridaban con una sonda *cmlA* (gen presente en el integrón In4, y éste situado en el Tn1696), demostrando alteraciones de la permeabilidad equivalentes a las causadas en *E. coli* y *P. aeruginosa* por la proteína CmlA.

El 37,5% de las cepas de *H. influenzae* Ap^R y Cm^R eran además resistentes a kanamicina por producción de una fosfotransferasa APH(3')-I. La transferencia de la resistencia se logró mediante electroporación de una cepa competente (*E. coli*

DH5 α) con ADN total de *H. influenzae*, seleccionando para ampicilina y kanamicina. Al seleccionar 9 colonias para extracción de ADN, en todas se encontró un plásmido de 7 kb; el análisis con enzimas de restricción (*EcoR*I y *Pst*I) demostró que los plásmidos eran idénticos. Los extractos enzimáticos crudos de las cepas mostraron actividad β -lactamasa TEM-1 (PI = 5,4) y 3'-O-fosfotransferasa-(APH(3')-I), que modificaba kanamicina, neomicina y lividomicina.¹⁶

Esta enzima purificada mostró un PM de 26 000 y un PI de 5,3, con la secuencia de aminoácidos del extremo aminoterminal similar al de otras fosfotransferasas de enterobacterias. Las hibridaciones con la sonda intragénica *aph*(3')-Ia demostraron que el gen en *H. influenzae* no se halla en el transposón Tn903, lo que constituye un rasgo diferencial con las enterobacterias. En las enterobacterias, los genes *cat*I, *cat*II y *cat*III se encuentran sobre todo en plásmidos Inc. M, en tanto que genes *cm*IA y relacionados, en plásmidos Inc. P. La coexistencia de ambos tipos de determinantes en el género *Haemophilus*, situados en plásmidos y/o en el cromosoma, demuestra la heterogeneidad del intercambio genético con enterobacterias, pareciendo probable que la especie *H. parainfluenzae* actúe de intermediario con un fenómeno de translocación entre *E. coli* (tracto digestivo) y *H. influenzae* (tracto respiratorio).

Resistencia a apramicina e higromicina mediada por plásmidos R en cepas clínicas de origen humano

Existen en la literatura científica ejemplos de genes de resistencia a los antibióticos que vehiculados por las bacterias de origen animal llegan al hombre, siendo ya clásica la preocupación por el correcto uso de los antibióticos en veterinaria, plasmada en el Swann Report (1969). Así ha sucedido con la utilización de los aminoglucósidos apramicina e higromicina en bovinos y porcinos respectivamente. En efecto, tras su aplicación surgieron cepas resistentes aisladas en animales sometidos a tratamiento; la resistencia era plasmídica, detectándose los genes de una apramicín-acetiltransferasa (AAC(3)-IV) y una higromicín-fosfotransferasa (APH-(4)-I).

En 1989 pudimos comprobar el aislamiento de dos cepas clínicas (*E. coli* y *K. pneumoniae*) resistentes a los precitados aminoglucósidos, con plásmidos R de 110 kb, que poseían los genes *aacC4* y *aph4*; posteriormente se aislaron cuatro cepas de enterobacterias con similares características. Al analizar la organización de estos genes se comprobó que estaban adyacentes y agrupados en la misma orientación que se había demostrado en los aislamientos de origen animal. Los dos genes de resistencia a apramicina e higromicina forman un operón y están asociados con secuencias IS140, lo que implica una estructura transponible.³⁷ Dado que la enzima AAC(3)-IV inactiva

además de apramicina, a gentamicina y tobramicina, constituye un riesgo potencial para seleccionar resistencias a aminoglucósidos de uso clínico. El problema es más grave si valoramos que las 6 cepas aisladas por nosotros, portadoras de los plásmidos pUZ6734, pUZ6743, pUZ6776, pUZ7852 y pUZ7874, mostraban también resistencia transferible a ampicilina (β -lactamasa TEM-1) y estreptomycin [fosfotransferasa APH(3'')].¹³

Los antibióticos como feromonas sexuales para las bacterias

Una complejidad adicional la plantean los antibióticos, que además de proporcionar una fuerza selectiva para la diseminación de las bacterias resistentes pueden incrementar los mecanismos de transferencia génica, actuando como hormonas para las células procarióticas. La translocación del ADN a través de las membranas, incluida la membrana externa característica de los gram-negativos, surge al inicio de muchos procesos biológicos conocidos: transducción, transformación y conjugación. La gruesa pared de los gram-positivos (de 50 a 100 capas de peptidoglucano), en comparación con la fina de los gram-negativos (de 1 a 2 capas), puede representar una barrera importante para la adquisición de material genético exógeno. Por ello los antibióticos que inhiben la síntesis de la pared procariótica, como los β -lactámicos y los glucopéptidos, incrementan significativamente a concentraciones subinhibitorias la transferencia de plásmidos entre *E. coli* y *S. aureus* o *Listeria monocytogenes*.⁴³ Su explicación radica en que se reduce la reticulación de la pared al bloquearse las transpeptidasas. Análogamente el uso de oxacilina incrementa la transferencia del transposón conjugativo cromosómico Tn916 entre *Enterococcus faecalis* y *B. anthracis*.²² Resulta clave que los transposones estimulados por algunos antibióticos, como las tetraciclinas y los macrólidos, elevan significativamente su movilidad intracelular e intercelular. El transposón de enterococos Tn917 confiere a las células que lo portan resistencia inducible al complejo grupo de antimicrobianos MCLS, y al exponer los cultivos a concentraciones bajas de eritromicina (0,001 $\mu\text{g/ml}$) se logra la inducción de la resistencia y de la transposición. Ésta se produce porque se atenúa el mecanismo que facilita la extensión de la transcripción del gen de resistencia a eritromicina al de la transposasa, situado corriente abajo. La transposición inducida en el Tn917 incrementa la translocación de un plásmido no conjugativo a otro conjugativo. En los transposones conjugativos de la familia Tn916/Tn1545, ubicuos en gram-positivos, el primero conteniendo el gen *tet* (M) y el segundo, además de éste, el *erm* (B), *cat*_{pC194} y *aph*(3')-III, se ha demostrado que la exposición a bajas concentraciones de tetraciclina (0,2-1 $\mu\text{g/ml}$) eleva in vivo la frecuencia de transferencia de 10 a 100

veces. La transposición se produce por escisión del Tn, que pasa a ser circular cerrado covalente, no replicativo, fase intermedia que puede ser sustrato para la integración o la conjugación. También el TnC DOT de *Bacteroides*, con resistencia a eritromicina y tetraciclina, a concentraciones bajas de tetraciclina se incrementa la transferencia en 10 000 veces.²⁶ En este caso, el antibiótico estimula la transcripción de un operón en el que se encuentra el gen *tet* (Q) y los genes reguladores *rteA* y *rteB*, actuando éste como anti-represor de los genes de transferencia.

Son pruebas inequívocas de que al menos determinados antibióticos se comportan como hormonas sexuales para las procariotas. Es llamativo que estas sustancias sintetizadas por ciertos microorganismos (sobre todo *Actinomycetes*) actúan en dianas muy específicas situadas en organismos distantes, promoviendo el intercambio de ADN.

Resistencia al mercurio en las bacterias

El mercurio, uno de los metales conocidos ya en tiempo de las primeras dinastías chinas y encontrado en tumbas egipcias que datan de 1500 a. de C., se halla en estado nativo en algunos casos, siendo la materia prima el cinabrio (HgS). Existen zonas con abundancia de mercurio, pero en la corteza terrestre representa sólo el 0,5 ppm, un entorno en el que las células procarióticas han desarrollado mecanismos de protección. Hecho no desdeñable ya que el ser humano ha utilizado los mercuriales a lo largo de la Historia como antisépticos, astringentes, purgantes, diuréticos, y en el tratamiento de la sífilis. En 1521, el médico, poeta y astrónomo Girolamo Fracastoro de Verona difundió su aplicación terapéutica, en la que previamente había demostrado su magistral conocimiento F. T. Bombast de Hohenheim. En la obra clásica *Die Belägert und Ensetzte Venus* (J. Friedrich, Leipzig 1689)⁴⁰ se describen con detalle e ilustran con figuras las estufas para sudar, las aplicaciones de inhalaciones y ungüentos en la cama, midiendo la saliva secretada por el enfermo luético, porque cantidades superiores a 1500 ml en 24 horas eran signo de buen pronóstico.

Los transposones de la familia del Tn21, como el Tn2603, están ampliamente diseminados entre diversas especies bacterianas. Así, se ha evidenciado la universalidad de los transposones de resistencia al mercurio, destacando el Tn5036, que se ha diseminado intercontinentalmente. Este transposón se aisló del intestino de un sapo encontrado en una mina de mercurio en Rusia,⁴⁷ mientras que el Tn3926 se halló en leche de vaca en una cepa de *Yersinia enterocolitica* en Francia. Como ya hemos mencionado, el Tn1696 se identificó vehiculado por un plásmido en una cepa clínica de *P. aeruginosa* aislada en nuestra ciudad en el año 1974.

Historia natural de los transposones vectores del gen *mer* en bacterias de la era pre-antibiótica

Para intentar conocer la historia natural de estos transposones se ha hecho un estudio en cepas bacterianas de la era pre-antibiótica, la llamada «colección Murray».²¹ Investigando sobre tres transposones portados por enterobacterias de esta colección, se ha comprobado que poseen más del 99% de identidad en las secuencias comparadas con las de los actuales. Por ejemplo, el Tn5073 está más estrechamente relacionado al Tn5036 y al Tn1696, mientras que el Tn5074 tiene más homología con el Tn5053. Y respecto al Tn5075, aunque más relacionado con el Tn21 carece del integrón In2 y está flanqueado por elementos de inserción.¹¹ Estos resultados no son sorprendentes, ya que con anterioridad se había demostrado que el Tn1696 y el Tn21, y sus correspondientes integrones In4 e In2, tenían orígenes independientes.³³ Debe señalarse que comparten similitudes, ya que en ambos transposones los determinantes de resistencia a los antibióticos están situados entre los genes de transposición (*tnpA* y *tnpR*) y el gen de resistencia al mercurio (*mer*).

Epidemiología de la resistencia a los antibióticos: local, nacional e internacional

La mayor parte de los brotes aparecen a un nivel extremadamente local, afectando a un limitado número de pacientes en una determinada unidad, y la prevalencia de la resistencia es con frecuencia la más elevada ya que coinciden enfermos más vulnerables y un amplio uso de antimicrobianos. En este sentido, es previsible que en las Unidades de Cuidados Intensivos las cepas de *S. aureus* sean más resistentes a meticilina, las de *E. cloacae* a ceftazidima, las de *P. aeruginosa* a imipenem y las de *Enterococcus* spp. a vancomicina.²

Un segundo nivel epidemiológico es el nacional, como sucede en Europa, comprobándose que los patrones de resistencia son más altos en los países mediterráneos y más bajos en Escandinavia. En Norteamérica las tasas de resistencia son más altas en Estados Unidos que en Canadá. Por citar un ejemplo muy demostrativo, las cepas invasivas de *S. aureus*, resistentes a meticilina, alcanzan el 30-40% en España, Portugal, Italia y Francia, se mantienen en el 10-15% en Alemania y Austria, y bajan al 1% en Holanda y Escandinavia.

Finalmente, la epidemiología de la resistencia es parcialmente internacional, porque algunos determinantes genéticos son transferibles y prevalecen en todo el mundo. Pero es también internacional cuando algunas cepas resistentes se

diseminan entre países y continentes, habiendo alcanzado una gran relevancia el problema de los clones españoles de neumococos que mencionaremos a continuación.

Diseminación intercontinental de un clon multirresistente de *S. pneumoniae* serotipo 23F de España a Estados Unidos y propagación de un clon de neumococo multirresistente serotipo 6B de España a Islandia

Aun cuando los neumococos resistentes a penicilina se aislaron por primera vez en Australia y Nueva Guinea en la década de los 60, la frecuencia más elevada de cepas resistentes se describió en Suráfrica (1988), España (1990) y Hungría (1991). Durante más de una década se han aislado en nuestro país cepas de *S. pneumoniae* serotipo 23F, con altos niveles de resistencia a penicilina, llegando finalmente al hallazgo de cepas con idénticas características en Cleveland, Ohio. Para demostrar su posible relación se compararon seis cepas españolas aisladas en 1989 (4 de Barcelona, 1 de Madrid y 1 de Zaragoza) con seis identificadas en Ohio (1989-1990), aplicando campo pulsado, estudio de los antibiogramas, de las proteínas fijadoras de penicilinas (PBPs), comprobándose que se trataba de una diseminación clonal intercontinental.³⁰

Por otra parte, la súbita aparición de neumococos multirresistentes serotipo 6B (Pn^R, Tc^R, Cm^R, Erm^R, co-trimoxazol^R) en Islandia entre 1989 y 1992, planteó su origen dado que algunas familias habían pasado sus vacaciones en nuestro país. De 76 cepas analizadas con técnicas moleculares y patrón de PBPs, se demostró que eran idénticas a las caracterizadas en España en las dos últimas décadas, tratándose de la propagación internacional de un clon de neumococo serotipo 6B, del sur al norte de Europa.⁴²

Desde 1997 está establecida la Red Epidemiológica Molecular de Neumococos (Pneumococcal Molecular Epidemiology Network), bajo los auspicios de la Unión Internacional de Sociedades de Microbiología, con la finalidad de estandarizar la nomenclatura y la clasificación de los clones de *S. pneumoniae* a nivel mundial. Los objetivos específicos incluyen: (1) colaboración internacional y entrenamiento entre laboratorios e instituciones; (2) incrementar el conocimiento de la resistencia y diseminación de las cepas de neumococos; (3) estandarización de la nomenclatura de los clones nacionales e internacionales; (4) identificación de los clones usando electroforesis en campo pulsado (PFGE), BOX-PCR y SML (secuencias multilocus); (5) disponibilidad de cepas de referencia (ATCC); y (6) acceso a la información vía Inter-

net. También se dispone de los patrones de *pbps* y de resistencia a macrólidos (L. McGee, L. McDougal, J. Zhou, et al. (2000): J Clin Microbiol 39:2565-2571). De forma resumida, reflejamos aplicando la nomenclatura actualizada los clones más conocidos y caracterizados:

Clones más importantes: Spain^{23F}-1, Spain^{6B}-2, France^{9V}-3, Spain¹⁴-5

Clones de diseminación intercontinental: Spain^{23F}-1, Spain^{6B}-2, France^{9V}-3

Clones multirresistentes Spain^{23F}-1, Spain^{6B}-2, Peni^R France^{9V}-3: comunes en España desde 1980.

Clon multirresistente Spain¹⁴-5: detectado más recientemente.

Clones detectados en Canadá:¹⁸ France^{9V}-3, Spain¹⁴-5, Spain-USA^{23F}

Diseminación internacional de bacilos gram-negativos resistentes productores de β -lactamasas

Aunque en menor escala, muchas de las cepas de *E. coli* y *Klebsiella* spp. estudiadas en el Reino Unido producían β -lactamasas AmpC mediadas por plásmidos, habiéndose establecido su conexión con el subcontinente indio (Punjab) al demostrarse la frecuencia de aislamientos idénticos.³¹ Respecto a la β -lactamasa de espectro ampliado PER-1, descrita primero en una cepa de *P. aeruginosa* estudiada en Francia, es destacable que poco después se encontraron en distintas ciudades de Turquía numerosas cepas de *P. aeruginosa*, *Salmonella* y *Acinetobacter* spp. productoras de la enzima PER-1. La investigación epidemiológica reveló que el paciente en el que se aisló la cepa de *P. aeruginosa* era un ciudadano turco que había viajado a Francia para recibir tratamiento médico.^{8,44}

Bibliografía

1. ABRAHAM, E. P., CHAIN, E. (1940): An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. Nature 146:837.
2. ARCHIBALD, L., PHILLIPS, L., MONNET, D. (1997): Antimicrobial resistance in isolates from inpatients and outpatients in the United States: increasing importance of the intensive care unit. Clin Infect Dis 24:211-215.
3. BENVENISTE, R., DAVIES, J. (1973): Aminoglycoside antibiotic-inactivating enzymes in *Antinomycetes* similar to those present in clinical isolates of antibiotic-resistant bacteria. Proc Natl Acad Sci (USA) 70:2270-2280.

4. BISSONNETTE, L., CHAMPETIER, C., BUISSON, J. P., ROY, P. H. (1991): Characterization of the non-enzymatic chloramphenicol resistance (*cmIA*) Gene of the *In4* integron of *Tn1696*: similarity of the product to transmembrane transport proteins. *J Bacteriol* 173:4493-4502.
5. BRIDGES, B. A. (2001): Hypermutation in bacteria and other cellular systems. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356:29-39.
6. COURVALIN, P. (1992): Interpretive reading of antimicrobial susceptibility tests. *ASM News* 58:368-375.
7. COURVALIN, P., TRIEU-CUOT, P. (2001): Minimizing potential resistance: The molecular view. *Clin Infect Dis* 33(Suppl 3):138-146.
8. DANIEL, F., HALL, L. M., GUR, D. (1995): Transferable production of PER-1 β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 35:281-294.
9. DAVIES, J. (1986): Life among the aminoglycosides. *ASM News* 52,12:620-624.
10. DRLICA, K. (2001): A strategie for fighting antibiotic resistance. *ASM News* 67:27-33.
11. ESSA, A. M. M., JULIAN, D. J., KIDD, S. P. (2003): Mercury resistant determinants related to *Tn21*, *Tn1696*, and *Tn5053* in enterobacteria from the pre-antibiotic era. *Antimicrob Agents Chemother* 47:1115-1119.
12. GÓMEZ-LUS, R. (1986): Antibióticos y bacterias. *Investigación y Ciencia* 114:45-47.
13. GÓMEZ-LUS, R. (1998): Evolution of bacterial resistance to antibiotics during the last three decades. *Internat Microbiol* 1:279-284.
14. GÓMEZ-LUS, R., LARRAD, L., RUBIO CALVO, M. C., NAVARRO, M., LASIERRA, M. P. (1980): AAC(3) and AAC(6') enzymes coded by R plasmid isolated in a general hospital. In: *Antibiotic resistance*. S. Mitsuhashi, L. Rosival & V. Krcmery (eds.). Springer Verlag: 295-303.
15. GÓMEZ-LUS, R., RUBIO, M. C. (1994): La era de los antibióticos aminoglicósidos y la reacción de las bacterias a su utilización en medicina. En: *descifrar la vida, ensayos de historia de la biología*. J. Casadesús y F. Ruiz Berraquero (eds.). Universidad de Sevilla: 385-399.
16. GÓMEZ-LUS, R., VERGARA, Y. (1995): Aminoglycoside resistance in *Haemophilus influenzae*. *J Chemother* 40:97-99.
17. GÓMEZ-LUS, R., CLAVEL, A., CASTILLO, J., SERAL, C., RUBIO, M. C. (2000): Emerging and reemerging pathogens. *Int J Antimicrob Agents* 16:335-339.
18. GREENBERG, D., SPEERT, D. P., MAHENTHIRALINGAM, E. (2002): Emergence of penicillin-nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* invasive clones in Canada. *J Clin Microbiol* 40:68-74.
19. HALL, R. M., COLLIS, C. M. (1995): Mobile cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol Microbiol* 15:593-600.
20. HALL, R. M., STOKES, H. W. (1993): Integrons: novel DNA elements which capture genes by site-specific recombination. *Genetica* 90:115-132.
21. HUGHES, V. M., DATTA, N. (1983): Conjugative plasmids in bacteria of the «pre-antibiotic» era. *Nature* 302:725-726.

22. IVINS, B. E., WELKOS, S. L. (1988): Transposon Tn916 mutagenesis in *Bacillus anthracis*. *Infect Immun* 56:176-181.
23. JORGENSEN J. H., FERRARO, M. J. (2000): Antimicrobial susceptibility testing: special needs for fastidious organisms and difficult-to-detect resistance mechanisms. *Clin Infect Dis* 30:799-808.
24. LEVY, S. B. (1998): The challenge of antibiotic resistance. *Scientific American* 278:46-53.
25. LEVY, S. B. (2001): Antibiotic resistance: consequences of inaction. *Clin Infect Dis* 33:5124-5129.
26. LI, L. Y., SHOEMAKER, N. B. (1995): Location and characteristics of the transfer region of a *Bacteroides* conjugative transposon and regulation of transfer gene. *J Bacteriol* 177:4992-4999.
27. LIVERMORE, D. M. (2003): Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. *Clin Infect Dis* 33(Suppl 1):S11-23.
28. MARTÍ-IBÁÑEZ, F. (1959): The first thirty years. *Antibiotic Annuals 1958-59*, 3-11, Med Encyclopedia, Inc. New York.
29. MARTÍN, C., GÓMEZ-LUS, R., ORTIZ, J. M., GARCÍA-LOBO, J. M. (1987): Structure and mobilization of an ampicillin and gentamicin resistance determinant. *Antimicrob Agents Chemother* 31:1266-1270.
30. MUÑOZ, R., COFFEY, T. J., DANIELS, M. R., et al. (1991): Intercontinental spread of a multiresistant clone of serotype 23F *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* 164:302-306.
31. M'ZALI, F. H., HERITAGE, J., GASCOYNE-BINZI, D. M. (1997): Transcontinental importation into the UK of *Escherichia coli* expressing a plasmid-mediated AmpC-type β -lactamase exposed during an outbreak of SHV-5 extended in a Leeds hospital. *J Antimicrob Chemother* 40:823-831.
32. NESVERA, J., HOCHMANNOVA, J., PATEK, M. (1998): An integron of class 1 is present on the plasmid pCG4 from gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol Lett* 169:391-395.
33. PARTRIDGE, S. R., BROWN, H. J., STOKES, H. W., HALL, R. M. (2001): Transposons Tn1696 and Tn21 and their integrons In4 and In2 have independent origins. *Antimicrob Agents Chemother* 45:1263-1270.
34. REINER, R. (1982): Antibiotics. An introduction. Ed. Roche, Basle, Switzerland. George Thieme Verlag, Stuttgart, West Germany.
35. RIVERA, M. J., VITORIA, M. A., NAVARRO, M., ROBLEDANO, L., CHOCARRO, P., GÓMEZ-LUS, R. (1984): Hospital dissemination among gram-negative bacillus strains of an inc. M plasmid encoding an AAC(3) and a TEM-1 beta-lactamase. *Drugs Exptl Clin Res* 11:789-795.
36. RUBENS, C. E., MCNEILL, W. F., FARRAR, W. E. (1979): Transposable plasmid deoxyribonucleic acid sequence in *Pseudomonas aeruginosa* which mediates resistance to gentamicin and four other antimicrobial agents. *J Bacteriol* 139:877-882.
37. SALAUZE, D., OTAL, I., GÓMEZ-LUS, R., DAVIES, J. (1990): Aminoglycoside acetyltransferase 3-IV(*aacC4*) and hygromycin 4-I phosphotransferase (*hphB*) in bac-

- teria isolated from human and animal sources. *Antimicrob Agents Chemother* 34:1915-1920.
38. SALYERS, A. A. (1999): Toward an expanded view of the virulence factors. *Clin Microbiol Newsletter* 21:9-11.
 39. SERAL, C., CASTILLO, J., GARCÍA, C., RUBIO, M. C., GÓMEZ-LUS, R. (2001): Distribution of resistance genes *tet(M)*, *aph (3')*-III, *cat*_{pC194} and the integrase of Tn1545 in clinical *Streptococcus pneumoniae* harbouring *erm(B)* and *mef (A)* genes in Spain. *J Antimicrob Chemother* 47:863-866.
 40. SCHREIBER, W., MATHYS, F. K. (1987): *Historia de las infecciones*. Ed. Roche, Basle, Switzerland: 56-75.
 41. SMITH, D. I., GÓMEZ-LUS, R., RUBIO CALVO, M. C., DATTA, N. (1975): Third type of plasmid conferring gentamicin resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 8:227-230.
 42. SOARES, S., KRISTINSSON, K. G., MUSSEY, J. M., TOMASZ, A. (1993): Evidence of the introduction of a multiresistant clone of serotype 6B *Streptococcus pneumoniae* from Spain to Iceland in the late 1980s. *J Infect Dis* 168:158-163.
 43. TRIEU-CUOT, P., DERLOT, E. (1993): Enhanced conjugative transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol Lett* 109:19-23.
 44. VAHAGOBLU, H., OZTURK, R., AYGUN, G., et al. (1997): Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum β -lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother* 41:2265-2269.
 45. WATANABE, T. (1971): The origin of R factors. *Annals NY Acad Sci* 182:126-140.
 46. WIDMER, A. (2001): Resistance to antibiotics: What can be done? *ESCMID Newsletter* 2:29-30.
 47. YURIEVA, O., KHOLODII, G., MINAKHIN, L. (1997): Intercontinental spread of promiscuous mercury-resistance transposons in environmental bacteria. *Mol Microbiol* 24:321-329.



