

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

FACULTAD DE BIOLOGIA

Departamento de Microbiología y Biología Celular

Departamento de Microbiología del
Colegio Universitario de Las Palmas.

ENZIMAS MODIFICADORES DE AMINOGLICOSIDOS EN
ENTEROBACTERIAS DE ORIGEN HOSPITALARIO

* * *

559347
184014

Memoria presentada para optar al Grado
de Doctor por la Licenciada en Biología
MARGARITA ROSA GONZALEZ MARTIN

La Laguna, Julio, 1990

ZOILO GONZALEZ LAMA, Profesor Titular de Microbiología del Colegio Universitario de Las Palmas.

C E R T I F I C A:

Que la Tesis para optar al Grado de Doctor en Biología que lleva por título "Enzimas modificadores de aminoglicósidos en *Enterobacterias* de origen hospitalario", ha sido realizada por la Licenciada en Biología Margarita Rosa González Martín, bajo mi dirección en el Departamento de Ciencias Clínicas (Microbiología) del Colegio Universitario 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 Gran Canaria, Julio de mil novecientos noventa

Deseo expresar mi agradecimiento a todas las personas que han contribuido a la realización de este trabajo.

Al Prof. Dr. D. Zoilo González Lama, director de esta Tesis, que me ha animado de forma constante a lo largo de estos años.

Al Prof. Dr. D. Hugo López y a la Prof. Dra. Dña. Evora Santana por sus enseñanzas en el campo de la Microbiología.

Al Prof. Dr. D. Rafael Gómez Lus y a los miembros del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de Zaragoza, en especial a M^a José Rivera por sus consejos y orientación.

A mis compañeros del Departamento de Microbiología que de una forma u otra me han prestado su ayuda.

Al personal del Servicio de Microbiología y del Hospital Insular por su cooperación.

A los Departamentos de Bioquímica, Fisiología y Farmacología del Colegio Universitario de Las Palmas por su colaboración, y al Departamento de Informática y Sistemas por permitirme la impresión de esta Tesis.

A Mayte y a Pablo por su ayuda incondicional y por su apoyo en los instantes de desaliento.

A Alfredo por su inestimable asesoramiento y colaboración a la hora de dar forma a esta Memoria, por hacer llevaderos los momentos más duros de esta Tesis y sobre todo por su compañía.

A Lina y a toda mi familia que me han apoyado en todo momento.

A Isabel, Antonio, Mayte, Pablo, Alfredo, a todos mis amigos por su amistad y ánimo, y a todos aquellos que han hecho posible la realización de este trabajo.

*A la memoria de Carmen, mi madre,
a mi padre y a Alfredo.*

INDICE

INTRODUCCION	1
REVISION Y ANTECEDENTES.....	4
1.-TAXONOMIA	5
1.1- <i>CARACTERISTICAS GENERALES</i>	5
1.1.1.- <i>Propiedades bioquímicas</i>	5
1.1.2.- <i>Estructura antigénica</i>	6
1.2- <i>CLASIFICACION</i>	10
1.2.1.- <i>Propiedades bioquímicas utilizadas para la clasificación</i>	10
1.2.2.- <i>Clasificación</i>	10
2.-AMINOGLICOSIDOS	31
2.1- <i>HISTORIA</i>	31
2.2- <i>ESTRUCTURA QUIMICA, CLASIFICACION Y PROPIEDADES</i>	32
2.3- <i>ESPECTRO DE ACCION</i>	41
2.4- <i>MECANISMOS DE ACCION</i>	43
2.4.1.- <i>Transporte de los aminoglicósidos al interior celular</i>	44
2.4.2.- <i>Acción de los aminoglicósidos</i>	48
2.5- <i>MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS AMINOGLICOSIDOS</i>	49
2.5.1.- <i>Resistencia ribosómica</i>	50
2.5.2.- <i>Resistencia por alteración del transporte</i>	51
2.5.3.- <i>Resistencia por modificación del antibiótico</i>	52
2.6- <i>TOXICIDAD</i>	55
3.-ENZIMAS MODIFICADORES DE AMINOGLICOSIDOS.....	56
3.1- <i>INTRODUCCION Y NOMENCLATURA</i>	56
3.2- <i>FOSFOTRANSFERASAS</i>	57
3.3- <i>ACETILTRASFERASAS</i>	70
3.4- <i>NUCLEOTIDILTRANSFERASAS</i>	82
3.5- <i>ORIGEN Y EVOLUCION DE LOS ENZIMAS</i>	87
3.6- <i>METODOS DE DETECCION DE LOS ENZIMAS MODIFICADRES</i>	91
4.-PLASMIDOS DE RESISTENCIA.....	94

MATERIAL Y METODOS.....	101
5.-IDENTIFICACION BIOQUIMICA.....	102
6.-MEDIOS DE CULTIVO.....	103
6.1- MEDIOS DE AISLAMIENTO	103
6.2- MEDIOS DE PROPAGACION	104
6.3- MEDIOS PARA EL ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD A ANTIBIOTICOS	106
6.4- MEDIOS PARA LA CONJUGACION, TRANSFORMACION Y EXTRACCION DE PLASMIDOS	106
7.-ESTUDIOS DE SENSIBILIDAD A ANTIBIOTICOS.....	107
7.1- ANTIBIOGRAMA	107
7.2- CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA	109
8.-OBTENCION DE EXTRACTOS ENZIMATICOS.....	111
9.-ENSAYO DE ENZIMAS MODIFICADORES DE AMINOGLICOSIDOS.....	112
10.-TRANSFERENCIA DE ADN PLASMIDICO.....	119
10.1- CONJUGACION	119
10.2- TRANSFORMACION	120
11.-ANALISIS DEL ADN PLASMIDICO.....	121
11.1- EXTRACCION DE ADN PLASMIDICO	121
11.2- ELECTROFORESIS DE ADN EN GEL DE AGAROSA	123
11.3- REACTIVOS PARA EL ANALISIS DE ADN PLASMIDICO	123
12.-ISOELECTROENFOQUE	127

RESULTADOS Y DISCUSION.....	129
CONCLUSIONES	79
ANEXOS	183
BIBLIOGRAFIA	252

INTRODUCCION



INTRODUCCION.-

Durante más de dos décadas (1960-1980) los antibióticos aminoglicósidos han sido el arma más importante contra las cada vez más frecuentes infecciones por *Enterobacterias* y *Pseudomonas*. A partir de 1980 la introducción de nuevos β -lactámicos obligó a reconsiderar el papel terapéutico que en el futuro deberían jugar los aminoglicósidos. Sin embargo, el rápido desarrollo de resistencia a β -lactámicos, incluso a la cefalosporinas de 3^a generación, así como la eficacia de la utilización de los aminoglicósidos en medios hospitalarios y en las terapias de combinación han preservado la importancia de su papel terapéutico.

Los mayores inconvenientes de estos antibióticos son su escasa reactividad intrínseca, su toxicidad y el desarrollo de resistencia a estos antibióticos.

La constante exposición de la flora bacteriana en el hombre y en animales a los antibióticos ha favorecido la selección de organismos resistentes y su diseminación en la población humana. Entre los diferentes tipos de resistencia a los aminoglicósidos, la modificación enzimática parece ser el más importante desde el punto de vista clínico. Los mecanismos bioquímicos de modificación enzimática son de tres clases: N-acetilación, O-nucleotidilación y O-fosforilación. Los enzimas acetilasas catalizan la transferencia de acetato de la acetyl-coenzima A a un grupo amino del antibiótico. La O-nucleotidilación consiste en utilizar trifosfato de adenosina u otros nucleótidos como sustratos para modificar grupos hidroxilos de los aminoglicósidos. Las fosforilasas catalizan la

transferencia de un grupo fosforilo a un hidroxilo diana.

Hasta 1983 la mayoría de la resistencia a los aminoglicósidos se debía a la presencia de un enzima sólo. Sin embargo, los datos de investigaciones recientes demuestran que las combinaciones de los enzimas modificadores son cada vez más frecuentes (122). Los patrones enzimáticos pueden ser diferentes de unos países a otros y dependen principalmente de la política de antibióticos (95).

Los genes que codifican a estos enzimas modificadores son fundamentalmente plasmídicos y en muchos casos constituyen un importante problema clínico ya que pueden ser responsables de grandes epidemias nosocomiales de organismos resistentes (99).

Cada vez con mayor frecuencia la resistencia a los aminoglicósidos se encuentra asociada a la de otros antibióticos como β -lactámicos (69), tetraciclinas (154), sulfamidas (28), ..., en plásmidos de multirresistencias. Esto es importante porque el uso de un tipo de antibióticos puede seleccionar la resistencia a otro, aunque los mecanismos sean diferentes.

Por todo esto consideramos de interés escoger una población de *Enterobacterias* procedentes de muestras clínicas del Hospital Insular, resistentes a uno ó más aminoglicósidos, identificar los diferentes enzimas modificadores que causan resistencias a estos antibióticos, determinar los patrones enzimáticos, caracterizar los plásmidos que codifican a estos enzimas y especificar los patrones de resistencias que contienen y transfieren.

REVISION Y ANTECEDENTES

1.-TAXONOMIA.-

En este estudio hemos elegido aislados clínicos de cepas de la Familia *Enterobacteriaceae*.

Las *Enterobacteriaceae* ó enterobacterias constituyen una amplia familia de bacilos gram-negativos que son huéspedes habituales del intestino del hombre y de los animales, y que en ocasiones pueden intervenir en procesos patógenos intra ó extraintestinales. Su importancia médica y económica, así como el rápido tiempo de generación, la habilidad para crecer en medios definidos y la facilidad de manipulación genética las hace el objeto de intensos estudios de laboratorio.

1.1.- CARACTERISTICAS GENERALES (14,146).-

Las enterobacterias se definen como bacilos rectos gram-negativos de 0.3-1.0 μ m de ancho por 1.0-6.0 μ m de largo, con extremidades redondeadas. Pueden ser móviles por flagelos peritricos, excepto *Tatumella*, ó no móviles. No forman esporas ó microquistes.

1.1.1.- Propiedades bioquímicas:

Las enterobacterias son aerobias y anaerobias facultativas. No son ácido-alcohol resistentes. Crecen bien en medios de peptona, extracto de carne y MacConkey. Algunas crecen con D-glucosa como única fuente de carbono. Otras requieren vitaminas y/ó aminoácidos. Son quimiorganotrofas con metabolismo respiratorio y fermentativo. No son halófilas, no necesitan ni favorece su crecimiento el NaCl. Producen ácido y, generalmente, gas

durante la fermentación de la D-glucosa, otros carbohidratos y alcoholes polihidroxílicos. Son catalasa-positivas excepto *Shygella dysenteriae* O grupo 1, y oxidasa negativas. Reducen los nitratos a nitritos excepto algunas estirpes de *Erwinia* y *Yersinia*. El contenido de Guanina-Citosina (G+C) de su ADN oscila entre 38 y 60 moles%.

Estas características sirven para diferenciar a los miembros de la Familia *Enterobacteriaceae* de otros bacilos gram-negativos, de las Familias *Vibrionaceae*, *Pasteurellaceae* y *Pseudomonaceae* (tabla 1).

La familia *Vibrionaceae* está constituida por bacilos curvos con flagelación polar, aerobios y anaerobios facultativos que son oxidasa-positivos y descomponen la glucosa por fermentación.

Los miembros de la familia *Pasteurellaceae* son oxidasa-positivos y requieren fuentes de nitrógeno orgánico.

La familia *Pseudomonaceae* consta de bacilos móviles con un flagelo polar, aerobios estrictos, oxidasa-positivos y que utilizan la glucosa por oxidación.

1.1.2.- Estructura antigénica:

Las enterobacterias pueden presentar diversos antígenos (figura-1):

Antígeno somático ó antígeno O: La pared celular de las bacterias gram-negativas está formada por una capa fina de peptidoglicano recubierta de una gruesa capa de lipopolisacárido. Los lipopolisacáridos de

TABLA-1.- Algunas diferencias características de las *Enterobacteriaceae* con algunas familias relacionadas.

	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Vibrionaceae</i>	<i>Pasteurellaceae</i>	<i>Pseudomonaceae</i>
Diámetro celular μm	0.3-1.5	0.3-1.3	0.2-0.3	
Bacilos rectos	+	D	+	
Bacilos curvos	-	D	-	
Movilidad	D	+	-	+
Oxidasa	-	+	+	+
Requerimiento de una fuente de nitrógeno	-	-	+	
Metabolismo	Ferment.	Ferment.	Ferment.	Oxidativo

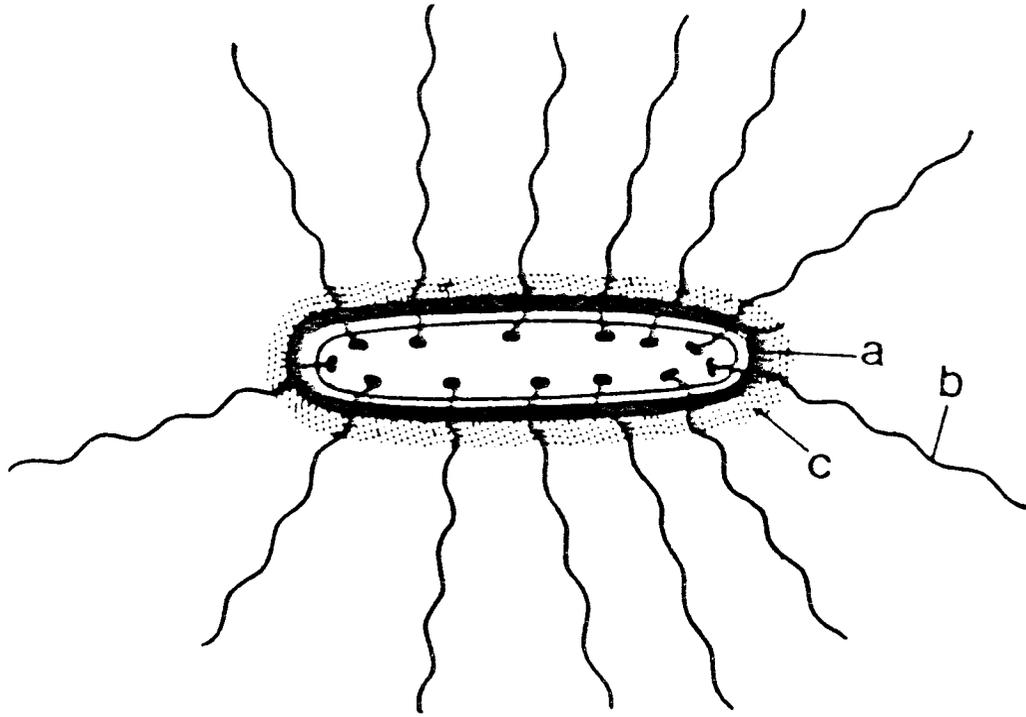


FIGURA-1.- Antígenos de las *Enterobacterias*:

- a) antígeno O
- b) antígeno H
- c) antígeno K

la membrana externa están constituido por tres regiones.

La fracción mas interna se denomina Lípido A y corresponde a la endotoxina.

La fracción central está compuesta por oligosacáridos y ácido ketodesoximanulosantónico(KDO). Al ser común en la mayoría de los bacilos gram-negativos explica la existencia de reacciones cruzadas.

La fracción externa la constituyen cadenas terminales de monosacáridos conocidos también como cadenas del lado O. Son variables y responsables de la especificidad.

El antígeno O corresponde a las fracciones central y externa, y es termoestable.

Antígeno capsular ó antígeno K: Algunas especies de enterobacterias pueden presentar además de la membrana plasmática y la pared celular otra capa de mucopolisacáridos, ya sea en forma de cápsulas bien definidas ó de una fina capa mucosa. En esta capa se encuentran antígenos superficiales ó antígenos K de naturaleza polisacárida. También existen antígenos capsulares de naturaleza proteica en las cepas con pili o fimbrias, que intervienen en la capacidad de adherencia.

Antígeno flagelar o antígeno H: Las cepas móviles presentan antígenos flagelares protéicos y termolábiles, de importancia en la clasificación en serotipos.

1.2.- CLASIFICACION (14,93,146).-

La clasificación de las Enterobacterias en tribus, géneros y especies se efectúa fundamentalmente por sus propiedades bioquímicas.

1.2.1.- *Propiedades bioquímicas utilizadas para la clasificación:*

Las principales pruebas bioquímicas que se estudian para la clasificación son: producción de indol, de gas y de ácido cuando fermenta la glucosa, de sulfuro de hidrógeno (H₂S); utilización de citrato y malonato como fuentes de carbono; movilidad; licuación de la gelatina; fermentación butilenglicólica (Voges-Proskauer), fermentación ácido-mixta (rojo de metilo); crecimiento en presencia de cianuro potásico (CNK); producción de enzimas como ADNasa, Ureasa, Lisina-descarboxilasa (LDC), Fenilalanina-desaminasa, β -galactosidasa, Ornitina-descarboxilasa (ODC), Arginina-dihidrolasa (ADH); fermentación de azúcares como glucosa, adonitol, sacarosa, lactosa, manitol, melobiosa, rafinosa, ramnosa, salicina, sorbitol, trealosa, xilosa, dulcitol, inositol, arabinosa, maltosa y celobiosa.

La identificación bioquímica puede confirmarse y proseguirse más adelante mediante análisis de los antígenos O, K y H, que permiten determinar los serotipos.

1.2.2.- *Clasificación:*

Con el paso de los años, muchos taxonomistas con ideas distintas han intervenido en la clasificación de la familia *Enterobacteriaceae*, y no debe sorprender que aún exista discordancia en cuanto a nombres de familias y géneros.

Tradicionalmente se ha subdividido a la familia *Enterobacteriaceae* en tribus. Una de las clasificaciones más aceptada es la del Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (8a ed. 1974). Sin embargo en la novena edición de este manual se han eliminado todas las tribus en la división taxonómica de esta gran familia y es esta clasificación la que vamos a seguir. En la figura-2 podemos ver los 16 géneros reconocidos en el Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (9ªed. 1984) relacionados por semejanza de su ADN cromosómico.

*CITROBACTER (14,93,146,149,172):

Los miembros del género *Citrobacter* dan pruebas positivas al citrato, producción de gas en la fermentación de la glucosa, movilidad, ONPG y fermentación de la arabinosa, manitol, ramnosa, sorbitol, trealosa y xilosa. Las especies de *Citrobacter* son negativas para la ADNasa, lisina-descarboxilasa, fenilalanina-desaminasa, Voges-Proskauer y fermentación del inositol.

Se aceptan tres especies *C.freundii*, *C.diversus* y *C.amalonicus*. Las tres especies se identifican bien con la fermentación del adonitol, producción de H₂S y de indol, crecimiento en presencia de cianuro-potásico (CNK) y la utilización del malonato (tabla-2). *C.amalonicus* es adonitol, H₂S y malonato negativos, pero indol y CNK positivos. *C.diversus* es adonitol, indol y malonato positivo, y H₂S y CNK negativos. *C.freundii* es adonitol, indol y generalmente malonato positivos, y H₂S y CNK negativos.

Se aíslan rara vez de procesos patológicos, en especial de infecciones urinarias y respiratorias, meningitis y abscesos cerebrales en

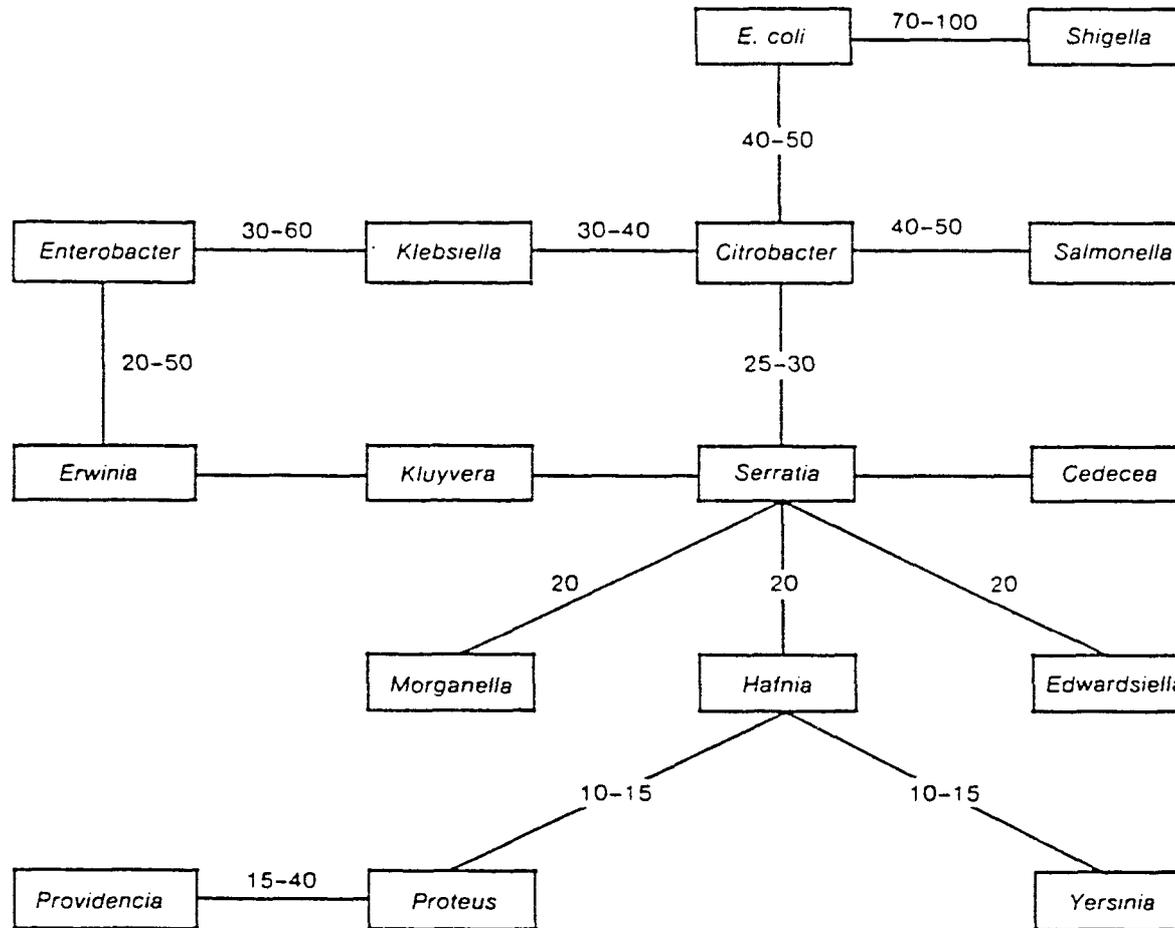


FIGURA-2.- Similitud del ADN de los géneros de Enterobacterias. El número representa el porcentaje aproximado de relación.

TABLA-2.- Diferenciación bioquímica de las especies de *Citrobacter*.

PRUEBA	ESPECIE		
	<i>C.amalonaticus</i>	<i>C.diversus</i>	<i>C.freundii</i>
Ferment. del Adonitol	-	+	-
Producción de H ₂ S	-	-	+
Producción de Indol	+	+	-
Crecimiento en KCN	+	-	+
Utilización de Malonato	-	+	V

-: ≤ 9% de las estirpes positivas

+: ≥ 90% de las estirpes positivas

V: 10-89% de las estirpes positivas.

recién nacidos, bacteriemias y de infecciones oportunistas en los hospitales. Muchas veces es difícil establecer su significación patológica.

***EDWARDSIELLAS (14,93,146,149,172).-**

Sólo la especie *E.tarda* tiene importancia clínica. Esta especie es positiva para la producción de gas por la fermentación de la glucosa, H₂S, indol, lisina-descarboxilasa, movilidad y ornitina-descarboxilasa. Es característica la no fermentación del manitol.

No forman parte de la flora intestinal normal del hombre pero se han aislado rara vez en personas sanas y en casos de diarreas e infecciones generalizadas (sepsis, meningitis) sin que se haya podido demostrar con certeza su acción patógena.

***ENTEROBACTER (14,93,146,149,172).-**

Se caracterizan por ser positivos para el citrato, producción de gas por la fermentación de la glucosa, movilidad, ornitina-descarboxilasa, Voges-Proskauer, ONPG y fermentación de la sacarosa, arabinosa, manitol, melobiosa, rafinosa, ramnosa, trealosa y xilosa. La mayoría no sintetizan ADNasa y son negativas para H₂S, indol y fenilalanina-desaminasa. Taxonómicamente se reconocen ocho especies, aunque sólo son cinco las importantes clínicamente.

Para la identificación de las diferentes especies de *Enterobacter* se utilizan las pruebas de fermentación de adonitol y sorbitol, producción de arginina-dihidrolasa, crecimiento en presencia de cianuro-potásico y lisina- y ornitina-descarboxilasa (tabla-3).

TABLA-3.- Diferencias bioquímicas entre las especies de *Enterobacter*

PRUEBAS	ESPECIES				
	<i>E.aerogenes</i>	<i>E.agglomerans</i>	<i>E.cloacae</i>	<i>E.georgiae</i>	<i>E.zakazakii</i>
Fermentación del Adonitol	+	-	V	-	-
Arginina dihidrolasa	-	-	+	-	+
Crecimiento en KCN	+	V	+	-	+
Lisina descarboxilasa	+	-	-	+	-
Ornitina descarboxilasa	+	-	+	+	+
Fermentación del Sorbitol	+	V	+	-	-

-: ≤ 9% de las estirpes positivas

+: ≥ 90% de las estirpes positivas

V: del 10 al 89% de las estirpes positivas

E.aerogenes es positiva para todas las pruebas excepto la de arginina. *E.cloacae* da positivo para la de arginina, ornitina, CNK y sorbitol, y negativo para la de lisina y mayoritariamente para la del adonitol. *E.bergoviae* es lisina y ornitina positivos, y negativo para el adonitol, arginina, CNK y sorbitol. *E.sakazakii* es arginina, ornitina y CNK positivos y adonitol, lisina y sorbitol negativos. Esta especie está pigmentada de amarillo y da una reacción positiva tardía de producción de ADNasa. *E.agglomerans* es negativa o variable para las reacciones anteriores. Está mal definida taxonómicamente y realmente está constituida por varios grupos genéticamente diferentes como demuestra la hibridación de ADN. Esta diversidad hace difícil una identificación bioquímica exacta. Para fines prácticos las estirpes de *Enterobacter* que dan arginina, lisina y ornitina negativos se identifican como *E.agglomerans*.

Pueden producir ocasionalmente infecciones oportunistas en el tracto urinario, vías respiratorias y heridas, e incluso bacteriemias y sepsis.

*ESCHERICHIA (14,93,146,148,149,172).-

Durante muchos años *E.coli* era la única especie de este género. Actualmente se reconocen cuatro especies más. Aun no se ha comprobado la patogenicidad de estas nuevas especies. *E.coli* es típicamente positiva para la producción de gas en la fermentación de la glucosa, el indol, lisina, arabinosa, manitol, ONPG, trealosa y xilosa. Los aislados son generalmente negativos para la producción de ADNasa, H₂S fenilalanina-dasaminasa, ureasa, Voges-Proskauer, inositol y CNK. *E.coli* puede utilizar por fermentación el

manitol y el mucato pero no la celobiosa ni el arabitol.

E.coli forma la mayor parte de la flora comensal aerobia y anaerobia facultativa del tubo digestivo. Como patógeno primario puede producir infecciones intestinales con diarrea. Como patógeno oportunista se aísla de infecciones urinarias, bacteriurias asintomáticas, infecciones biliares, peritoneales, meningéas, de heridas, bacteriemias y sepsis.

*KLEBSIELLA (14,93,146,149,172).-

Los miembros del género *Klebsiella* dan típicamente positivo al adonitol y negativo a la arginina, ADNasa, H₂S, movilidad, ornitina y fenilalanina. Dan positivo a la fermentación de la arabinosa, manitol, melibiosa, rafinosa, salicina, sorbitol, trealosa y xilosa. Se reconocen siete especies de *Klebsiella* pero sólo cinco son clínicamente importantes. Estas cinco especies pueden diferenciarse por la producción de indol, utilización del malonato, ONPG y Voges-Proskauer (tabla-4). *K.oxytoca* se distingue por ser positiva al indol. *K.ozaenae* es negativa para el malonato y el Voges-Proskauer. *K.pneumoniae* es indol negativo pero malonato, ONPG y Voges-Proskauer positivo. *K.rhinoscleromatis* es indol y ONPG negativo. *K.planticola* es la especie más reciente, parecida a *K.pneumoniae* y *K.oxytoca* pero se distingue de ellas por su habilidad para fermentar la glucosa a 5°C pero no a 45°C.

K.pneumoniae se identificó como patógeno respiratorio y se aísla con frecuencia como agente causal de infecciones hospitalarias respiratorias y urinarias; ocasionalmente da enteritis en niños pequeños. *K.oxytoca* se identifica a veces como agente etiológico de infecciones

TABLA-4.- Diferenciación bioquímica entre la especies de *Klebsiella*

PRUEBAS	ESPECIES				
	<i>K.oxytoca</i>	<i>K.ozaenae</i>	<i>K.planticola</i>	<i>K.pneumoniae</i>	<i>K.rhinoscleromatis</i>
Fermentación de la glucosa a 50°C	-	-	+	-	-
Producción de Indol	+	-	V	-	-
Utilización del malonato	+	-	+	+	+
ONPG	+	V	+	+	-
Voges-Proskauer	+	-	+	+	+

-: ≤ 9% de las estirpes positivas

+: ≥ 90% de las estirpes positivas

V: del 10 al 89% de las estirpes positivas

urinarias y sepsis. *K. ozaenae* y *K. rhinoscleromatis* son patógenos de las vías respiratorias altas. *K. ozaenae* está asociada con los casos de otitis media. *K. rhinoscleromatis* es productor exclusivo del rinoscleroma.

*MORGANELLA (14,93,146,149,172).-

Contiene una única especie *M. morgani* que había sido anteriormente incluida en el género *Proteus*. Esta especie es típicamente positiva para el indol, movilidad, ornitina-descarboxilasa, fenilalanina-desaminasa, ureasa y crecimiento en CNK. Aparte de la glucosa, raramente fermenta otros azúcares.

M. morgani se relaciona principalmente con infecciones urinarias aunque también causan otros tipos de infecciones.

*PROTEUS (14,93,146,149,172).-

Los miembros del género *Proteus* son positivos para la movilidad, fenilalanina-desaminasa, ureasa, CNK y fermentación de la xilosa. Son negativos para el adonitol, arginina, lisina y para la fermentación de los azúcares a excepción de la glucosa y la xilosa. Se reconocen cuatro especies de *Proteus* aunque sólo tres causan enfermedades en los hombres. Las tres especies de *Proteus* se diferencian por la producción de indol y ornitina-descarboxilasa (tabla-5). *P. mirabilis* es indol negativa y ornitina positiva. *P. penneri* es indol y ornitina negativo. *P. vulgaris* es indol positivo y ornitina negativo. *P. penneri* es resistente al cloranfenicol mientras que *P. mirabilis* y *P. vulgaris* son sensibles.

Son responsables de infecciones urinarias, de heridas, sepsis,

TABLA-5.- Diferenciación bioquímica de las especies de *Proteus*.

PRUEBA	ESPECIES		
	<i>P.mirabili</i>	<i>P.penneri</i>	<i>P.vulgaris</i>
Producción de Indol	-	-	+
Ornitina descarboxilasa	+	-	-
Resistencia Cloranfenicol	S	R	S
<p>-: ≤ 9% de las estirpes positivas S:sensible</p> <p>+: ≥ 90% de las estirpes positivas R: resistente</p> <p>V: 10-89% de las estirpes positivas</p>			

meningitis,

***PROVIDENCIA (14,93,146,149,172).-**

Los miembros de éste género se caracterizan por dar positivo a la utilización de citrato, producción de indol, movilidad, fenilalanina-desaminasa y crecimiento en CNK. Son típicamente negativos para la arginina-dihidrolasa, ADNasa, H₂S, lisina- y ornitina-descarboxilasa, Voges-Proskauer y ONPG. No suelen fermentar otros azúcares además de la glucosa. Las diferentes especies de *Providencia* pueden distinguirse bioquímicamente por la fermentación del adonitol, trealosa y presencia de ureasa (tabla-6). *P.alcalifaciens* es adonitol positiva y, trealosa y ureasa negativa. *P.rettgeri* es adonitol y ureasa positiva pero trealosa negativa. *P.stuartii* es adonitol negativo, trealosa positivo y ureasa positiva ó negativa.

Las especies de *Providencia* se asocian principalmente con infecciones urinarias pero pueden causar otros tipos de infecciones.

***SALMONELLA (14,93,147,173).-**

La mayoría de los aislados de *Salmonella* se caracterizan por reacciones positivas a la movilidad, fermentación del manitol y sorbitol; y negativas a la presencia de ADNasa, indol, fenilalanina-desaminasa, ureasa, crecimiento en CNK, Voges-Proskauer, ONPG, utilización del malonato y fermentación del adonitol, sacarosa, lactosa, rafinosa y salicina. La producción de H₂S es una característica variable del género.

Kauffmann (1969)(171) ha dividido al género *Salmonella* en cuatro subgéneros (tabla 7): I, II, III y IV. El subgénero III de *Salmonella*

TABLA-6.- Diferenciación bioquímica de las especies de *Providencia*.

PRUEBAS	ESPECIES		
	<i>P.alcalifaciens</i>	<i>P.rettgeri</i>	<i>P.stuartii</i>
Fermentación del Adonitol	+	+	-
" de la Trealosa	-	-	+
Hidrólisis de la Urea	-	+	V

-: ≤ 9% de las estirpes positivas
 +: ≥ 10% de las estirpes positivas
 V: del 10 al 89% de las estirpes positivas

TABLA-7.-Reacciones bioquímicas de los subgéneros de *Salmonella*.

PRUEBAS	SUBGENEROS			
	I	II	III	IV
Fermentación del Dulcitol	+	+	-	-
" de la Lactosa	-	-	+	-
" de la Salicina	-	-	-	+
Utilización del Malonato	-	+	+	-
Crecimiento en K G C	-	-	-	+
Licuación gelatina	-	+	+	+

-: ≤ 9% de las estirpes positivas

+: ≥ 10% de las estirpes positivas

se llamó originalmente *S.arizonae*. Esta especie presenta importantes diferencias bioquímicas con las *Salmonella* típicas, fermentan la lactosa, dan positivo al test de ONPG, no fermentan al ducitol y con frecuencia utilizan el malonato. Actualmente se habla más del grupo Arizona que de *S.arizonae*.

En la clasificación de Kauffman-White el género *Salmonella* se divide en más de 1000 serotipos que contienen diferentes combinaciones de antígenos. La identificación de estos serotipos depende de la detección de los antígenos O (somáticos) y H (flagelar) por medio de aglutinación con antisueros específicos. Atendiendo al antígeno O las *Salmonella* se dividen en 66 grupos. Dentro de cada grupo O se dividen en serogrupos por sus antígenos flagelares.

Las *Salmonella* son organismos patógenos para el hombre y animales. En el hombre puede dar lugar a enterocolitis, fiebres tifoidea y paratifoidea, y bacteriemias.

*SERRATIA (14,93,146,149,172).-

Las especies que constituyen este género se caracterizan por las reacciones negativas a la presencia de arginina-dihidrolasa, producción de H₂S, fenilalanina-desaminasa y ureasa. Producen tres tipos de enzimas hidrolíticas extracelulares: ADNasa, gelatinasa y lipasa. Además son positivas a la utilización de citratos, movilidad, Voges-Proskauer, ONPG y fermentación del manitol y la trealosa. Se reconocen cuatro especies de importancia clínica y que se diferencian por la presencia de ornitina-descarboxilasa y fermentación de adonitol, arabinosa y sorbitol (tabla-8).

TABLA-8.- Diferenciación bioquímica de las especies de *Serratia*.

PRUEBAS	ESPECIES			
	<i>S.liquefaciens</i>	<i>S.marcescens</i>	<i>S.odorífera</i>	<i>S.rubidaea</i>
Fermentación del Adonitol	-	V	V	+
" de la Arabinosa	+	-	+	+
" del Sorbitol	+	+	+	-
Ornitina descarboxilasa	+	+	V	-

-: ≤ 9% de las estirpes positivas

+: ≥ 90% de las estirpes positivas

V: del 10 al 89% de las estirpes positivas

S.liquefaciens es realmente una colección de especies tan relacionadas que difícilmente pueden ser separadas en el laboratorio. Por esta razón se debe hablar del grupo de *S.liquefaciens* más que de especie. Los miembros del grupo de *S.liquefaciens* se diferencian de las otras especies en que son adonitol negativas y arabinosa, ornitina y sorbitol positivas. *S.marcescens* es ornitina y sorbitol positiva y arabinosa negativa. *S.odorifera* es arabinosa y sorbitol positiva, y variable para el adonitol y ornitina. La diferencia de *S.odorifera* con el grupo de *S.liquefaciens* es bioquímicamente difícil, sin embargo, *S.odorifera* tiene un olor picante característico descrito como mohoso, a patata ó a vegetales. *S.rubidea* da positivo al adonitol y a la arabinosa, y negativo a la ornitina y el sorbitol.

Las *Serratias* se han aislado desde una simple cistitis hasta en infecciones de la sangre y del sistema nervioso central.

Las cepas hospitalarias se caracterizan porque son resistentes a gran número de antibióticos.

*SHIGELLA (14,93,148,171).-

Según análisis del ADN éste género podría incluirse dentro del género *Escherichia* pero por consideraciones médicas se les mantiene separados. Los miembros del género *Shigella* son negativos al adonitol, citrato, ADNasa, producción de gas en la fermentación de la glucosa, H₂S, lisina, movilidad, fenilalanina, sacarosa, ureasa, Voges-proskauer, inositol, CNK, lactosa, malonato, salicina y xilosa. Son positivos para la fermentación de la glucosa y la reducción de nitratos. Se conocen cuatro especies de *Shigella*: *S.dysenteriae*, *S.flexneri*, *S.boydii* y *S.sonnei* (tabla-9).

TABLA-9.- Diferenciación bioquímica de las especies de *Shigella*.

PRUEBAS	ESPECIES			
	<i>S.disenteriae</i>	<i>S.flexneri</i>	<i>S.boydii</i>	<i>S.sonnei</i>
Fermentación del Manitol	-	+	+	+
ONPG	V	-	V	+
Ornitina descarboxilasa	-	-	-	+
Serogrupo	A	B	C	D

-: \leq 9% de las estirpes positivas
 +: \geq 90% de las estirpes positivas
 V: del 10 al 89% de las estirpes positivas

S.dysenteriae es manitol y ornitina negativo. *S.flexneri* es manitol positivo y, ONPG y ornitina negativo. *S.boydii* tiene las mismas reacciones excepto que ocasionalmente (10%) da ornitina positivo. *S.sonnei* es positivo para el manitol, ONPG (90%) y ornitina. Son necesarias para la identificación correcta de estas especies las pruebas serológicas ya que *S.flexneri* y *S.boydii* con frecuencia presentan pruebas bioquímicas idénticas.

Las infecciones por *Shigella* se limitan casi siempre al tracto intestinal, rara vez causan otros tipos de infecciones. Es el agente causal de la disentería bacilar.

*TATUMELLA (14,93,146,149,172).-

El género *Tatumella* es nuevo y presenta una sólo especie *T.ptyseos*. Esta especie se ha situado taxonómicamente en la familia *Enterobacteriaceae* por estudios de hibridación de ADN, a pesar de sus características poco comunes como es la sensibilidad a la penicilina y la presencia de flagelos polares o laterales. Los aislados de *T.ptyseos* son poco reactivos cuando se cultivan a 35-37°C pero su reactividad aumenta a 25°C. Dan negativas a la mayoría de la pruebas empleadas excepto la presencia de fenilalanina-desaminasa y la fermentación de la sacarosa. Ocasionalmente algunos aislados son positivos a la fermentación de la melobiosa, rafinosa y salicina. Una fenilalanina-desaminasa con un indol y ureasa negativo son un indicio de *Tatumella*.

Esta especie se ha aislado de una variedad de cultivos clínicos incluyendo hemocultivos. Es considerado un patógeno humano raro pero potencialmente significativo.

***YERSINIA (14,58,93,172).-**

Todos los miembros de este género son negativos para la arginina-dihidrolasa, utilización de citrato, ADNasa, H₂S, movilidad, fenilalanina-deaminasa, Voges-Proskauer y malonato. Son positivas a la fermentación del manitol y la trealosa. Seis especies de este género tienen importancia clínica: *Y.enterocolitica*, *Y.frederiksenii*, *Y.kristensenii*, *Y.intermedia*, *Y.pestis* y *Y.pseudo tuberculosis* (tabla-10).

Y.enterocolitica es positiva para la prueba de ornitina descarboxilasa y fermentación de la sacarosa; es negativa para la de fermentación de la melibiosa, rafinosa y ramnosa. *Y.frederiksenii* es característicamente positiva para la de ornitina-descarboxilasa y la fermentación de la ramnosa y sacarosa. *Y.kristensenii* es positiva para la ornitina-descarboxilasa y negativa para la fermentación de la rafinosa, ramnosa y sacarosa. *Y.intermedia* es ornitina-descarboxilasa, ramnosa y sacarosa positiva y fermenta a la rafinosa y melibiosa a 25°C. *Y.pestis* presenta la mayoría de los pruebas negativas, sin embargo mas del 90% de las estirpes fermentan la arabinosa, manitol, trealosa y xilosa. *Y.pestis* es ureasa negativa. Esta prueba es importante para diferenciarla de *Y.pseudotuberculosis* que es ureasa positiva.

Y.pestis es el agente etiológico de la peste. *Y.pseudotuberculosis* puede dar lugar a apendicitis, enteritis y a una forma de septicemia fulminante. *Y.enterocolitica* puede ser causa de diarreas, ileítis, adenitis mesentérica y abscesos hepáticos ó esplénicos, asi como cuadros septicémicos.

TABLA-10.-Diferenciación bioquímica de las especies de *Y.pestis*

PRUEBAS	ESPECIES					
	<i>Y.enterocolitica</i>	<i>Y.frederiksenii</i>	<i>Y.kristensenii</i>	<i>Y.pestis</i>	<i>Y.pseudotuberculosis</i>	<i>Y.intermedia</i>
Fermentación de la Melibiosa	-	-	-	V	V	V
Ornitino descarboxilasa	+	+	+	-	-	+
Fermentación de la Rafinosa	-	V	-	-	V	V
" " " Ramnosa	-	+	-	-	V	+
" " " Sacarosa	+	+	-	-	-	+
Ureasa	V	V	V	-	+	V

-: ≤ 9% de las estirpes positivas

+: ≥ 10% de las estirpes positivas

V: del 10 al 89% de las estirpes positivas

2.-AMINOGLICOSIDOS.-

2.1.-HISTORIA (49,50).-

Los aminoglicósidos son el resultado de un plan coordinado de búsqueda de nuevas sustancias con actividad antibiótica para corregir la ineficacia del primer grupo de antibióticos, las penicilinas, frente a gram negativos. El estudio y análisis de más de 10000 actinomicetos del suelo permitió a Waskman en 1943 aislar una cepa, el *Streptomyces griseus*, productora del primer amino glicósido, la ESTREPTOMICINA (1944). Posteriormente se obtuvo la NEOMICINA procedente de *Streptomyces fradiae*, descubrimiento comunicado independientemente por Waskman y Umezawa en 1949.

Ocho años más tarde Umezawa y colaboradores aislaron la KANAMICINA de *Streptomyces kanameticus*. La PAROMOMICINA fué desarrollada por investigadores del grupo Parke Davis en 1959 y, por otro lado, el grupo de Upjohn en 1961 aporta la ESPECTINOMICINA.

En 1963 Weinstein descubre la GENTAMICINA en *Micromonospora purpurea*. En 1968 la TOBRAMICINA se aísla de *Streptomyces tenevrius*. La SISOMICINA se obtiene de *Micromonospora inyoensis* en 1970. A partir de *Streptomyces lividus*, en 1971, se extrae la LIVIDOMICINA.

En la actualidad existe una gran cantidad de antibióticos aminoglicósidos casi siempre derivados de las moléculas originales. Derivados semisintéticos de la KANAMICINA-A son la AMIKACINA y la NETILMICINA.

2.2.-ESTRUCTURA QUIMICA, CLASIFICACION Y PROPIEDADES.-

Los aminoglicósidos son alcoholes cíclicos aminosustituídos (aminociclitoles) unidos mediante enlaces glicosídicos a azúcares aminados (aminoazúcares). Los enlaces glicosídicos son puentes de oxígeno entre el grupo OH de un átomo de carbono de un azúcar y un grupo hidroxilo del aminociclitol. La única excepción a esta estructura general es la ESPECTINOMICINA (figura-3) que no contiene azúcar, es decir es un aminociclitol puro. El resto de los aminoglicósidos se dividen en pseudodisacáridos, pseudotrisacáridos y pseudotetrasacáridos dependiendo del número de azúcares unidos al aminociclitol (tabla-11) (65).

Los pseudodisacáridos están constituídos por el aminociclitol fortamina unido a un aminoazúcar en posición 6. Se les conoce también como el grupo de la fortimicina e incluye a los siguientes aminoglicósidos: FORTIMICINA A (astromicina), B, C y D, ESPORAMICINA A, ISTAMICINAS A y B, DACTIMICINA (2"-formidoil-astromicina) y 3-O-demetil FORTIMICINAS A y B (figura-4).

Los pseudotrisacáridos se componen de un aminociclitol al que se le unen dos aminoazúcares. El aminociclitol puede ser la estreptidina ó la 2-desoxiestreptamina. La ESTREPTOMICINA está formada por la estreptidina unida a una hexosa y a una pentosa (figura-5). De la 2-desoxiestreptamina derivan tres clases de aminoglicósidos: los monosustituídos en posición 4 (grupo APRAMICINA) (figura-6), los 4,5-disustituídos (grupo BUTIROSINA y RIBOSTAMICINA) (figura-7) y los 4,6-disustituídos (grupo KANAMICINA y grupo GENTAMICINA) (figuras-8 y -9 respectivamente).

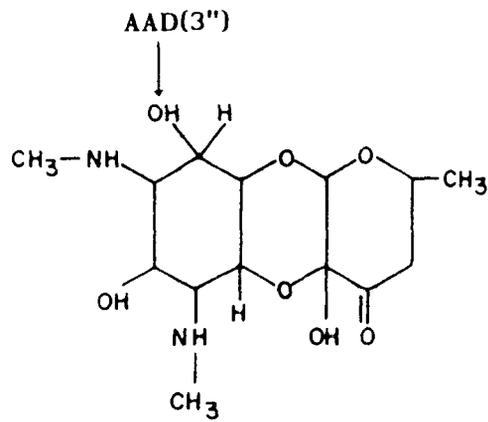


FIGURA-3.- Estructura de la [espectinomicina y dihidroespectinomicina].

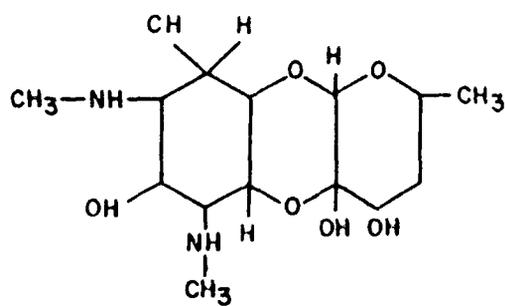


TABLA-11.- Antibióticos aminoglicósidos-aminociclitolos.

1.- Pseudodisacáridos:

Aminociclitol fortamina 6-monosustituído:

FORTAMICINA A

DACTIMICINA (Dact)

2.- Pseudotrisacáridos:

2.1. Aminociclitol estreptidina:

ESTREPTOMICINA (Sm)

2.2. Aminociclitol 2-desoxiestreptamina:

2.2.1. 4-monosustituído:

APRAMICINA (Ap)

2.2.2. 4,5-disustituído:

BUTIROSINA (Bt)

RIBOSTAMICINA (Rm)

2.2.3. 4,6-disustituído:

* grupo kanamicina:

KANAMICINAS A, B, C (Km)

TOBRAMICINA (Tm)

DIBEKACINA (DKB)

AMIKACINA (AN)

HABEKACINA

* grupo gentamicina:

GENTAMICINAS C_{1a}, C₁, C₂, A, B (Gm)

SISOMICINA (Ss)

NETILMICINA (Nt)

5-EPISISOMICINA (5-epi)

ISEPAMICINA (Is)

3.- Pseudotetrasacáridos:

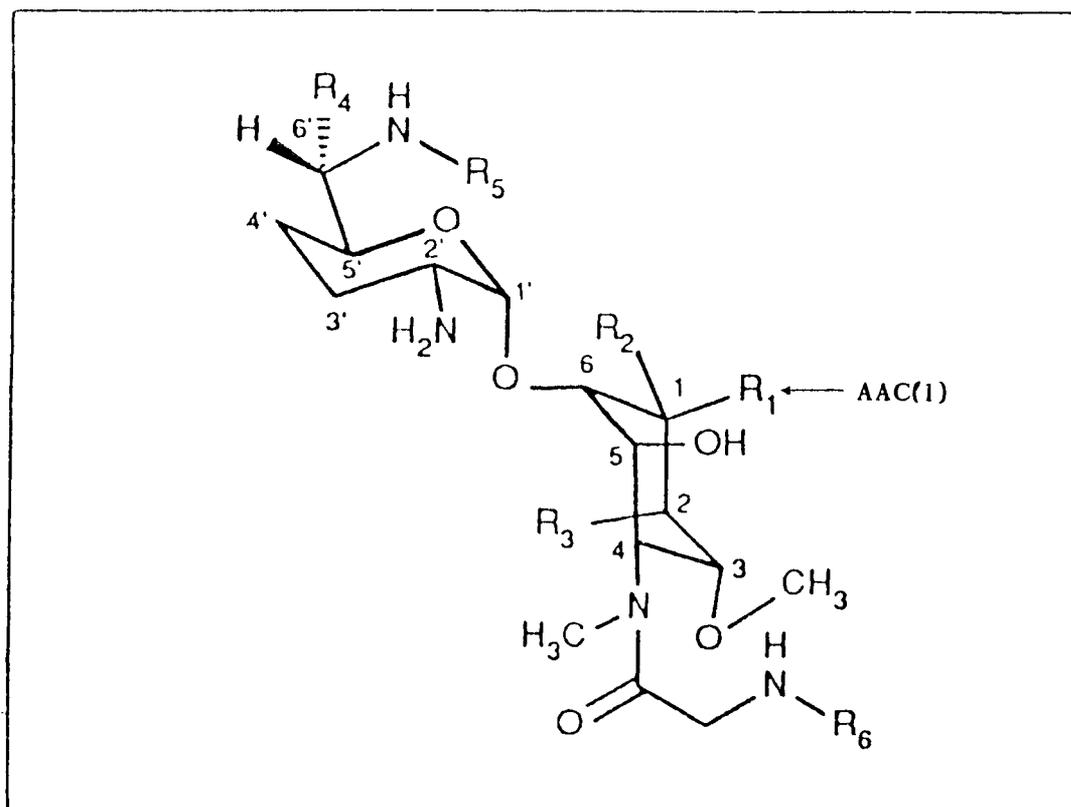
Aminociclitol 2-desoxiestreptamicina disustituídos
en posiciones 4,5:

NEOMICINA (Nm)

LIVIDOMICINA B (Lm)

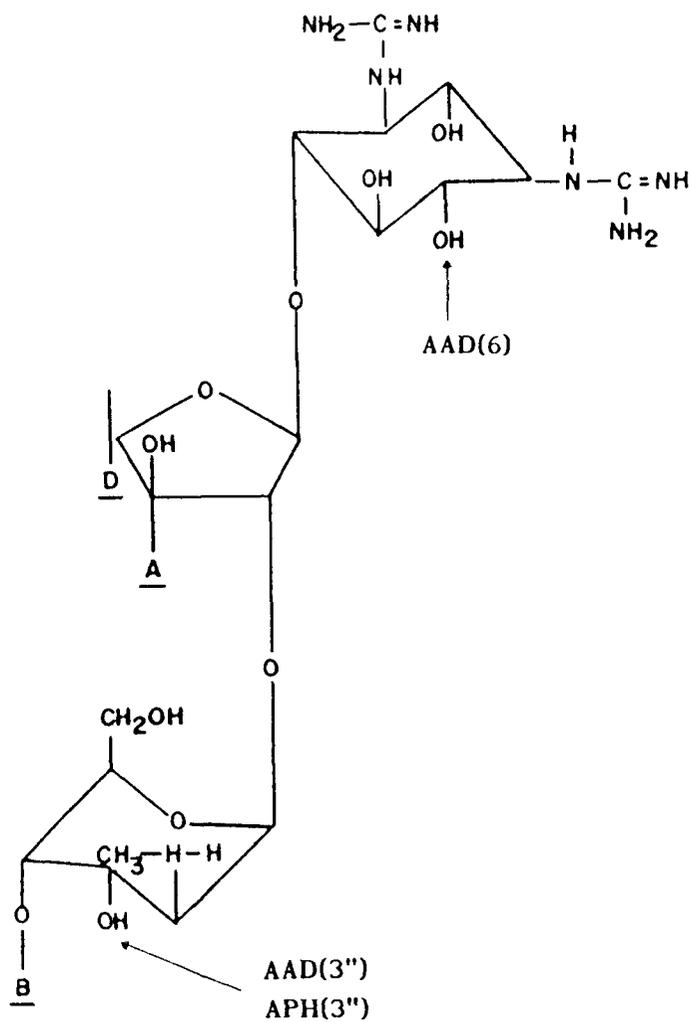
PAROMOMICINA (Pm)

Entre paréntesis se muestra las abreviaturas utilizadas.



	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-4.- Estructura de las fortamicinas.



	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>D</u>
Estreptomicina A	CHO	H	CH_3
Estreptomicina B	CHO	Manosa	CH_3
Dihidroestreptomicina	CH_2OH	H	CH_3
Hidroestreptomicina	CHO	H	CH_2OH

FIGURA-5.- Estructura de la estreptomicina y derivados.

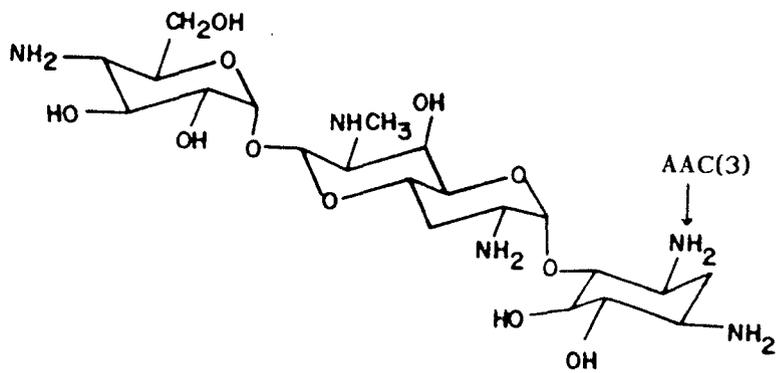
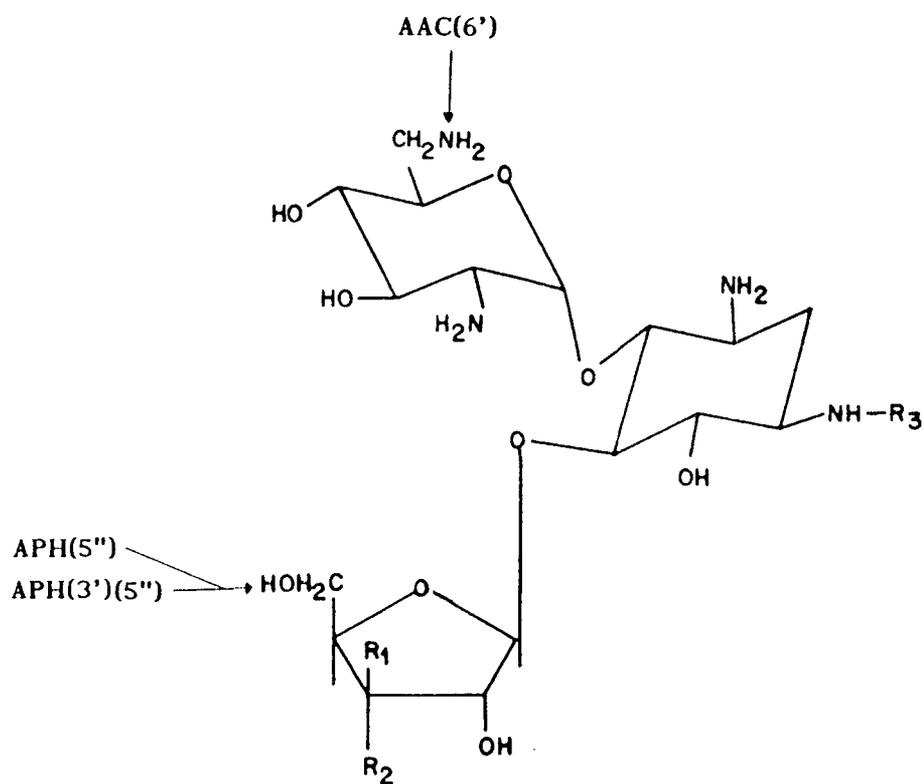
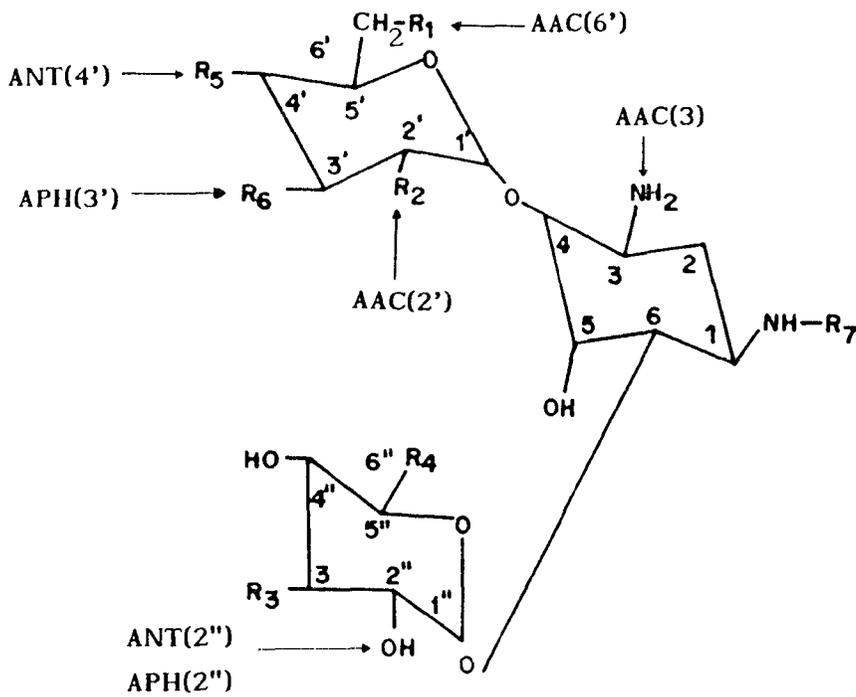


FIGURA-6.- Estructura de la apramicina.



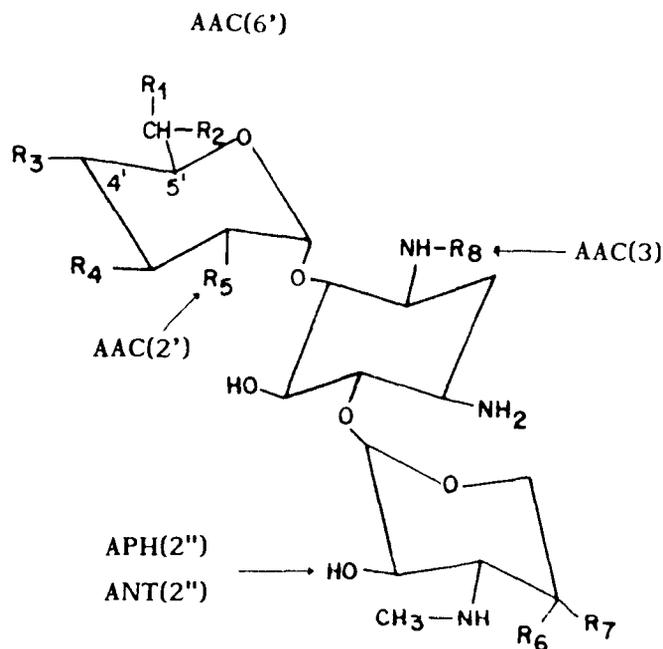
	$\frac{R_1}{}$	$\frac{R_2}{}$	$\frac{R_3}{}$
Ribostamicina	H	OH	H
Butirosina A	OH	H	$-\text{CO}(\text{CHOH})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$
Butirosina B	H	OH	$-\text{CO}(\text{CHOH})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$

FIGURA-7.- Estructura de la butirosina y ribostamicina.



	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6	R_7
Kanamicina A	NH_2	OH	NH_2	CH_2OH	OH	OH	H
Kanamicina B (kanendomicina)	NH_2	NH_2	NH_2	CH_2OH	OH	OH	H
Kanamicina C	OH	NH_2	NH_2	CH_2OH	OH	OH	H
Dibecacina	NH_2	NH_2	NH_2	CH_2OH	OH	H	H
Amicacina	NH_2	OH	NH_2	CH_2OH	OH	OH	NH-CO-CH-CH_2 OH NH_2
Tobramicina	NH_2	NH_2	NH_2	CH_2OH	OH	H	H

FIGURA-8.- Estructura del grupo de la kanamicina.



	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6	R_7	R_8
Gentamicina A	H	OH	OH	OH	NH ₂	H	OH	H
Gentamicina B	H	NH ₂	H	OH	OH	OH	CH ₃	H
Gentamicina C _{1a}	H	NH ₂	H	H	NH ₂	OH	CH ₃	H
Gentamicina C ₂	CH ₃	NH ₂	H	H	NH ₂	OH	CH ₃	H
Gentamicina C ₁	CH ₃	NH-CH ₃	H	H	NH ₂	OH	CH ₃	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-9.- Estructura del grupo de la gentamicina.

Los pseudotetrasacáridos se caracterizan por presentar tres azúcares. El aminociclitol, la 2-desoxiestreptamina, es disustituído en las posiciones 4 y 5 (grupo NEOMICINA, LIVIDOMICINA, PAROMOMICINA) (figura-10).

Estos antibióticos comparten numerosas propiedades (49,142):

su caracter básico

actividad potente contra gram negativos

actividad bactericida rápida y completa

su mecanismo de acción

su farmacocinética

sinergismo con β -lactámicos y otros antibióticos que actúan sobre la pared bacteriana.

Desafortunadamente también presentan aspectos negativos:

actividad ligera contra gram positivos

no absorción intestinal

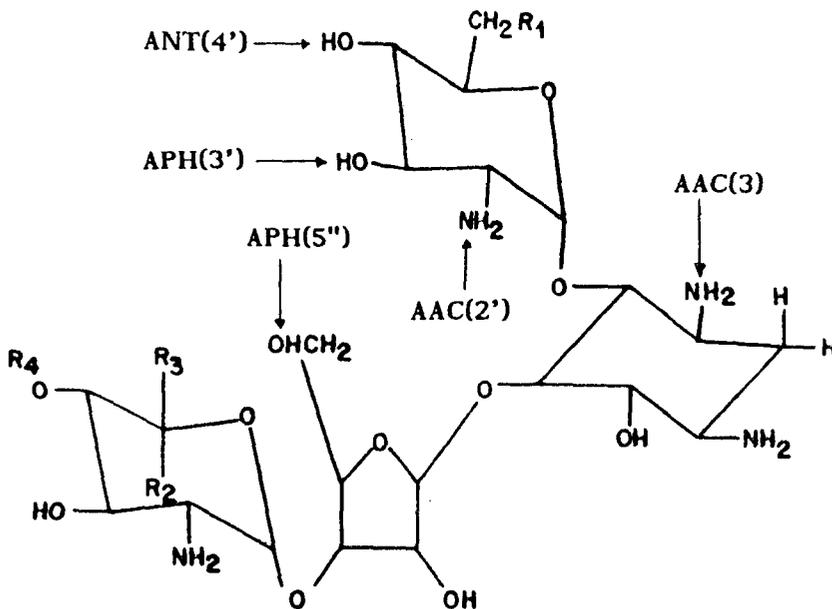
eliminación por filtración glomerular

ototoxicidad y nefrotoxicidad.

2.3.- ESPECTRO DE ACCION.-

En general se puede afirmar que los aminoglicósidos son efectivos contra la mayoría de los gérmenes aerobios incluso contra algunos anaerobios que son capaces de crecer en aerobiosis (59).

Los bacilos gram negativos aerobios, incluyendo *Enterobacterias*, *Pseudomonas*, y otros bacilos gram negativos no fermentadores suelen ser sensibles a los modernos aminoglicósidos (genta-



	R_1	R_2	R_3	R_4
Neomicina A (neamina)		Véase fórmula		
Neomicina B	NH_2	CH_2NH_2	H	H
Neomicina C (framisetina)	NH_2	H	CH_2NH_2	H
Paromomicina I y aminosidina	OH	CH_2NH_2	H	H
Paromomicina II	OH	H	CH_2NH_2	H
Lividomicina A	OH	CH_2NH_2	H	Manosa
Lividomicina B	OH	CH_2NH_2	H	H

FIGURA-10.- Estructura de la neomicina, paromomicina y lividomicina.

micina, tobramicina, netilmicina y amikacina).

Los bacilos gram negativos aerobios, como *Listeria monocytogenes* y los cocos gram positivos y negativos aerobios son relativamente sensibles con la excepción de *Streptococcus sp.*, si bien nunca será un aminoglicósido el tratamiento de elección como fármaco único. Los enterococos presentan cierta resistencia a los aminoglicósidos, sin embargo la combinación con un β -lactámico actúa de forma sinérgica excepto cuando el nivel de resistencia a los aminoglicósidos es muy alto (CMI >2000mg/l) (20).

La estreptomina y amikacina son los más activos contra *Mycobacterium tuberculosis*. La amikacina es además eficaz en el tratamiento de infecciones por micobacterias del grupo *M.fortuitum -M.chelonae* y *M.avium* (56). Algunas cepas de *Nocardia sp.* son relativamente sensibles a la amikacina y netilmicina. In vitro, los micoplasmas son relativamente sensibles a los aminoglicósidos.

La paromomicina presenta actividad antiparasitaria frente a *Entamoeba histolytica*, *Taenia saginata* y *Hymenolepis nana*. La higromicina B se utiliza como tenicida en cerdos. La neomicina y la kanamicina son también tenicidas pero en menor grado.

2.4.-MECANISMOS DE ACCION.-

Para que un aminoglicósido pueda impedir el crecimiento de una bacteria es necesario que se adhiera a su superficie externa, atraviese la pared y la membrana citoplasmática, llegue al interior celular y alcance las

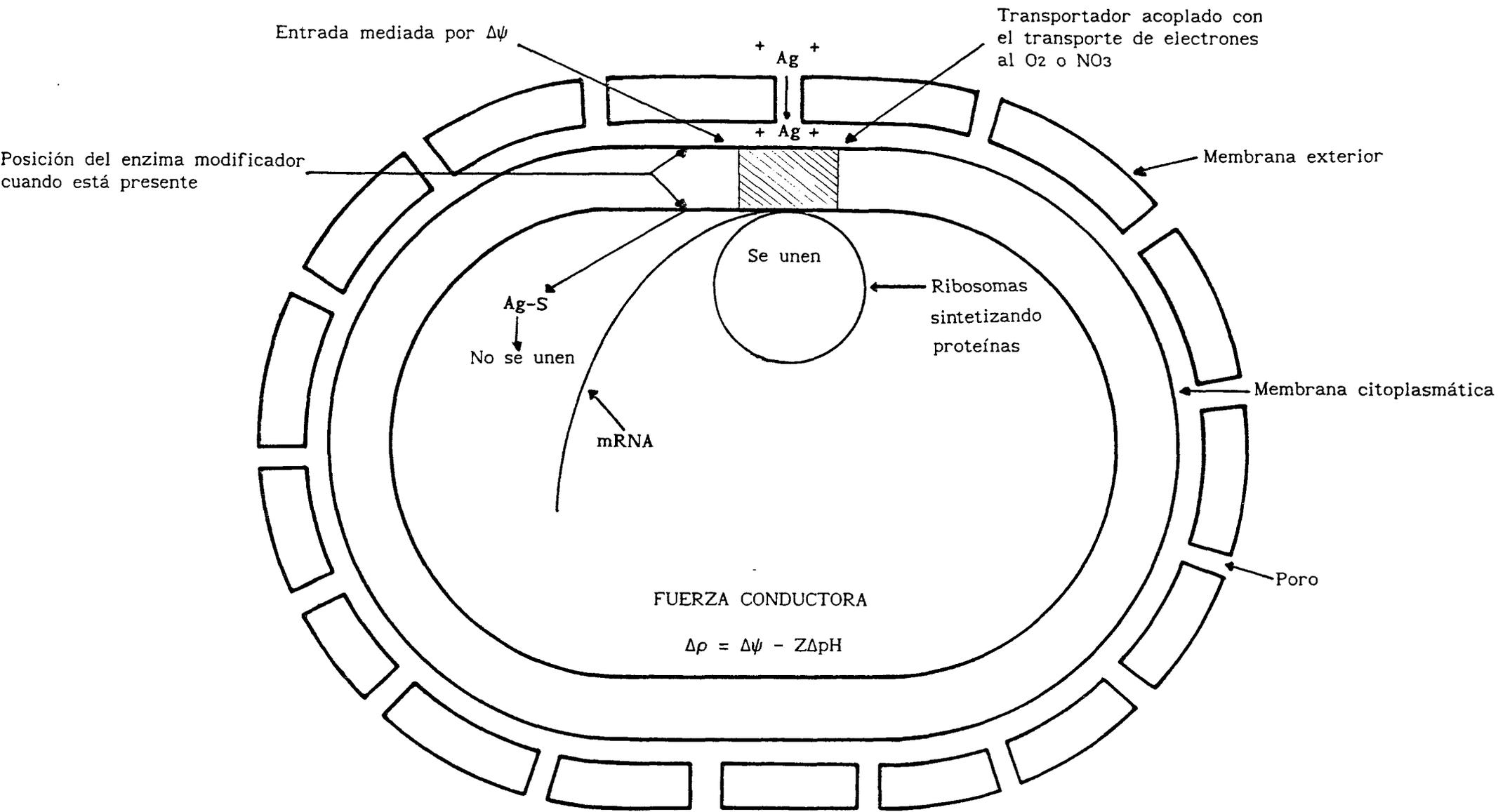
subunidades ribosómicas.

2.4.1.- Transporte de los aminoglicósidos al interior de la célula.

Los aminoglicósidos penetran en la célula bacteriana por un proceso que consta de tres fases (figura-11) (15,54,175):

ETAPA I (EPI): En la primera etapa el antibiótico pasa a través de la pared celular y de las capas extracelulares. Los aminoglicósidos son policationes con cargas positivas a pH fisiológico. Se unen a los sitios aniónicos distribuidos en la superficie celular. Esta unión iónica no depende de energía. Los sitios de unión son principalmente los lipopolisacáridos, cabezas polares de los fosfolípidos y posiblemente algunas proteínas de la membrana exterior en bacterias gram negativas, y los ácidos teicoicos y fosfolípidos en bacterias gram positivas.

En la células gram negativas el transporte se realiza mediante difusión hidrofílica a través de poros formados por porinas de la membrana exterior (126). Normalmente los poros son demasiados pequeños para dejar pasar moléculas del tamaño de los aminoglicósidos. Pero si estos modifican a las porinas por su fuerte carga catiónica, el poro se agranda y permite el paso del antibiótico. Sin embargo, del análisis in vitro de porinas con aminoglicósidos han surgido críticas ya que mutantes *ompF*, defectivos en porinas, no parecen ser resistentes a los aminoglicósidos. En *Pseudomonas aeruginosa* hay un importante mecanismo adicional de entrada. El lipopolisacárido de *P.aeruginosa* es particularmente rico en residuos fosfatos y, aparentemente, está estabilizado por iones de Mg^{+2} . Los aminoglicósidos pueden desplazar a estos iones uniéndose a los residuos de fosfatos y



$\Delta\rho$ = fuerza protón motriz
 $\Delta\psi$ = potencial de membrana (negativo en el interior)
 $Z\Delta pH$ = gradiente de pH (alcalino en el interior)

FIGURA.-11.- Modelo del proceso de entrada y acción bactericida de los aminoglicósidos.

desorganizando la membrana exterior. Esta desorganización permitirá la entrada directa de los aminoglicósidos ("self-permeabilization" ó autopromotor) (65) y otras moléculas a las capas interiores de la pared celular y membrana citoplasmática (205).

En bacterias gram positivas la difusión probablemente se realice a través de los grandes intersticios llenos de agua que se forman en la capa de peptidoglicano.

Las estructuras extracelulares como la cápsula de glicocálix pueden tener algún efecto menor sobre la entrada de los aminoglicósidos. La mayoría de estas estructuras son polisacáridos aniónicos que actúan uniéndose a los aminoglicósidos y retardando su absorción. La importancia de esta unión dependerá de las condiciones de pH y fuerza iónica bajo las que se encuentran el antibiótico y el polisacárido. Es probable, que en condiciones fisiológicas, estas uniones tengan poca importancia.

ETAPA II (EDP-I): En la segunda etapa el aminoglicósido atraviesa la membrana citoplasmática. Los aminoglicósidos se unen en condiciones fisiológicas, conservando sus cargas, a un transportador aniónico no saturable y son impulsados a través de la membrana por la diferencia de potencial, $\Delta\Psi$, creada por las cargas negativas del interior celular (15,54,174). Esta fase es dependiente de energía (35,114) y es necesario que la membrana esté suficientemente activada. Probablemente se necesite un nivel umbral mínimo de $\Delta\Psi$ para que ocurra un transporte significativo. El nivel mínimo requerido de $\Delta\Psi$ depende de la concentración de antibiótico (17). Hay una relación directa entre la magnitud de la $\Delta\Psi$ y la velocidad de entrada y acción

bactericida de los aminoglicósidos (35).

La naturaleza del transportador no se ha determinado aún. Es posible que los aminoglicósidos utilicen los transportadores de otras sustancias con estructuras parecidas pero no se han obtenido resultados positivos. Otra posibilidad es que sean sustancias intermediarias del transporte de electrones ya que mutaciones en algunas de estas sustancias (citocromos (5,18), quinonas (17,19), nitrato reductasa (18)) afectan al transporte. Damper y Epstein (35) ponen en duda la existencia de estos transportadores y creen que la entrada se debe únicamente a la diferencia de potencial a través de la membrana.

ETAPA III (EDP-II): En la tercera etapa el aminoglicósido se une al ribosoma, cesa la síntesis proteica y se inicia la muerte de la célula. Esta etapa es dependiente de energía.

Los aminoglicósidos son transferidos desde el transportador a sitios específicos de unión ("targets" ribosómicos) que son proteínas ribosomales. Para que se inicie esta fase es necesario la presencia de ribosomas sensibles interviniendo en la síntesis proteica (54). Desde el momento en que los aminoglicósidos se unen a los ribosomas, se produce la disgregación de los polisomas, la acumulación de complejos aberrantes de ARNm y ribosomas 70S, y la inhibición de la síntesis proteica. La inhibición va acompañada de un aumento de la velocidad de acumulación de los aminoglicósidos. La causa puede ser que la degradación de los polisomas libera ribosomas 70S a los que pueden unirse los aminoglicósidos manteniéndose un gradiente de antibiótico entre el exterior y el interior de

la célula (17,59), ó a una alteración de la permeabilidad de la membrana (54).

2.4.2.- *Acción de los aminoglicósidos.*

El mecanismo de acción de los aminoglicósidos está perfectamente establecido. Actúan uniéndose al ribosoma, causan diversos errores de lectura de los ARNm (55) e inhibición de la síntesis proteica, y un efecto bactericida que no se conoce con exactitud.

Es necesario para la actividad de estos antibióticos la presencia de un grupo amino (50). La unión al ribosoma se llevaría a cabo por medio de estos aminogrupos.

Los aminoglicósidos se pueden unir tanto a la subunidad 30S como a la 50S por medio de las proteínas (55,177,202) o del ARN ribosómico (170). La unión provoca una alteración en el ribosoma que afecta al reconocimiento del aminoacil-ARNt, a la translocación, a la liberación de los polipeptidos y errores de lectura.

El caso de la estreptomicina está bien estudiado. La estreptomicina se une a la subunidad 30S. Esta unión requiere la presencia de las proteínas S3, S5 y S12, y es estimulada por las proteínas S9 y S14(S10) (55). La estreptomicina no impide la formación del complejo de iniciación (30S-ARNm-f-met-ARNt) pero ocasiona la liberación del f-met-ARNt. Además promueve la unión arbitraria de aminoacil-ARNt e inhibe la liberación del ARNt desacilado. Afecta también a la liberación de los péptidos. Por tanto, la estreptomicina afecta aspectos de todas las fases de la síntesis

proteicas (iniciación, elongación y terminación) y causa errores de lectura.

El resto de los aminoglicósidos actúa de forma similar variando el lugar de acción y fase de la síntesis de proteínas sobre la que actúan. La alteración de la proteína L6 de la subunidad 50S causa resistencia a la gentamicina (1,202). La resistencia a la neamina está relacionada con mutantes de las proteínas S17, S5 y S2 (55,202). La metilación del ARNr 16S se asocia con la resistencia a la kanamicina (170).

Algunos aminoglicósidos (higromicina B) pueden actuar sobre ribosomas eucariotas e inhiben la síntesis proteica (51,55,202).

La acción bactericida de los aminoglicósidos no se explica sólo con el efecto sobre la síntesis de proteínas. K.Matsunaga y col. (117) han demostrado que los aminoglicósidos pueden inhibir la iniciación de la replicación del ADN posiblemente por la interrupción de la unión del ADN a la membrana. Los efectos de los aminoglicósidos sobre las membranas se han encontrado en muchos casos (40,111,176,197,205). Probablemente el resultado de todos estos fenómenos juntos provoca la acción bactericida.

2.5.-MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS AMINOGLICOSIDOS.-

El uso de los antibióticos para combatir a los microorganismos conlleva la selección de cepas resistentes. Los aminoglicósidos no se han librado de este importante problema y después de un período brillante de éxitos como antimicrobianos debido a su novedad, se produce la aparición de resistencias que limitan sus esperanzas terapéuticas. Una de las carac-

terísticas de esta resistencia es su rapidez de aparición y desarrollo (207).

Se han identificado tres mecanismos de resistencia a los aminoglicósidos: alteración del ribosoma, alteración del sistema de transporte y modificación enzimática del antibiótico.

2.5.1.-Resistencia ribosómica:

Alteraciones de las proteínas ó del ARN ribosómico dificultan la unión de los aminoglicósidos a los ribosomas y pueden ocasionar resistencia a estos antibióticos.

La resistencia a la kanamicina estaba relacionada con la metilación del ARNribosómico 16S en *Streptomyces tenebrarius* (170).

Alteraciones de las proteínas S12, S3 y S5 producen resistencia a la estreptomina (15,55).

Mutantes resistentes a la gentamicina presentan la proteína ribosomal L6 transformada (1).

Lesiones en los genes que codifican las proteínas S5 y S12 y modificaciones en la S17 causan resistencia a la neamina (15,55).

Cambios que afectan a la proteína ribosómica S5 se relacionan con cepas resistentes a la espectinomicina.

Los aminoglicósidos que contienen deoxiestreptamina pueden unirse a diferentes puntos del ribosoma y es difícil aislar mutantes resistentes por causas ribosómicas (54).

Las alteraciones ribosómicas son sucesos mutacionales que ocurren raramente y, por tanto, tienen poco significado terapéutico. Sin embargo, el que cepas productoras de aminoglicósidos presenten, como mecanismos de defensa, ribosomas resistentes elevan el nivel de importancia de este mecanismo de resistencia (170).

2.5.2.-Resistencia por alteración del transporte.-

Esta resistencia se caracteriza por ser de amplio espectro e incluir a la mayoría de los aminoglicósidos.

La difusión pasiva a través de la membrana externa en gram negativos puede limitarse o anularse por alteraciones de las proteínas de membrana (188) (porinas (65), HI (78)) o del lipopolisacárido (62,65).

El transporte de aminoglicósidos requiere en sus dos últimas fases (EDP-I y EDP-II) un consumo de energía. Esta energía es proporcionada por la fosforilación oxidativa. Cualquier alteración que afecte a la generación de esta energía ó a la fuerza protón-motriz de la bacteria podrá originar resistencia a los aminoglicósidos.

Se han aislado mutantes resistentes que presentan un potencial de membrana disminuído por deficiencia en diferentes proteínas implicadas en la cadena respiratoria: Citocromo d (16), cit.aa3 (5), cit.c552 (18),

nitrato-reductasa (18), subunidad γ de la ATP-sintasa(F₁F₀) (80), quinonas (17,19).

Las bacterias anaerobias facultativas como los estreptococos, con una cadena incompleta de transportadores de electrones, son resistentes de forma natural a los aminoglicósidos, aunque a bajo nivel (65). Condiciones anaeróbicas (114) o pH ácidos disminuyen la eficacia de los aminoglicósidos (35).

La resistencia por alteración del transporte es un fenómeno localizado e incapaz de extenderse en forma de epidemia. Sin embargo, se ha encontrado resistencia a los aminoglicósidos transferida por plásmidos en cepas que no presentaban actividad modificadora ni ribosomas resistentes a estos antibióticos (36). Además, las cepas con este tipo de resistencia, aunque de bajo crecimiento por sus mutaciones metabólicas, pueden aparecer en enfermos graves y causar fallos de la terapia antibiótica.

2.5.3.-Resistencia por modificación del antibiótico.-

Las resistencias a los aminoglicósidos causadas por los enzimas modificadores son las más frecuentes en clínica. La síntesis de estos enzimas es constitutiva, es decir, independiente de la presencia ó no de antibiótico. El antibiótico modificado no se une a los ribosomas y no puede inhibir la síntesis de proteínas (54). Además se observa una reducción del transporte de los aminoglicósidos al interior celular (17,44). El mecanismo exacto por el que estos enzimas causan resistencia no se tiene muy claro. Algunos autores proponen que los enzimas inactivan a los aminoglicósidos y estos no pueden ejercer su acción letal. Se basan en que los aminoglicósidos

modificados no pueden unirse a los ribosomas (165) y en que la posesión de enzimas no parece impedir la entrada de antibióticos en la etapa II (EDP-I) (44,165).

Sin embargo y a pesar de la correlación positiva que existe entre la resistencia y la presencia de enzimas modificadores, la resistencia no se debe simplemente a una inactivación del antibiótico. Una serie de investigadores han llegado a esta conclusión apoyándose en varias observaciones. Cuando una bacteria posee enzimas modificadores de aminoglicósidos no se detecta antibiótico modificado en el medio extracelular, sólo en el interior. Se excluye por tanto la detoxificación del medio como mecanismo de resistencia. Además se ha demostrado que al menos algunos enzimas modificadores se encuentran en la cara externa (44) ó en la cara interna (136) de la membrana citoplasmática.

También se ha observado que la presencia de enzimas se asocia a una reducción del transporte de aminoglicósidos (17,44). Los resultados demuestran que la etapa III o EDP-II es la que disminuye (17,44). La resistencia vendría determinada por la competencia entre la velocidad de entrada (fase II ó EDP-I) y la de modificación del aminoglicósido. Si el enzima tiene gran afinidad por su sustrato la modificación del aminoglicósido comienza a bajas concentraciones de antibióticos y podrá superar a la velocidad de entrada. La bacteria será resistente. Por el contrario, si el enzima tiene poca afinidad la cantidad de antibiótico que entra superará a la velocidad de modificación y habrá antibiótico suficiente sin modificar para ejercer su acción letal. Aunque la bacteria presente actividad enzimática modificadora de aminoglicósido es sensible a estos antibióticos (201).

La cantidad de actividad enzimática es importante en la expresión del nivel de resistencia para sustratos que son poco modificados por el enzima. Hay mutantes con un incremento de la actividad enzimática por aumento del número de copias del plásmido que codificaba dicha enzima. Estos mutantes eran resistentes a aminoglicósidos a los que la cepa original era sensible (11). Por otro lado, el uso de diferentes tropolonas que inhiben la actividad de la ANT(2") por competencia con el ATP, hacen que una bacteria resistente a causa de este enzima se transforme en sensible (3,159).

Un esquema de como los enzimas modificadores de aminoglicósidos causan resistencia en las cepas que los contienen sería el siguiente (figura-11): El aminoglicósido atraviesa la membrana externa de las bacterias gram negativas y se une a un transportador en la membrana plasmática. Ya sea antes ó después de atravesar la membrana el antibiótico es modificado por el enzima. El aminoglicósido modificado no se puede unir al ribosoma y, de alguna manera aún no determinada, su velocidad de entrada es reducida. Para gram positivos el proceso parece ser similar.

Este mecanismo de resistencia es muy eficaz para la bacteria que lo posee, pues sólo necesita inactivar el antibiótico que penetra en la célula, que es sólo una ínfima parte del presente en el medio. Los organismos menos afortunados que no sintetizan estos enzimas no son ayudados por la detoxificación del antibiótico que hay en el medio. Por esto, el crecimiento de las estirpes resistentes a los aminoglicósidos presentan poco ó ningún efecto inóculo (36).

La información genética para la síntesis de estos enzimas se

encuentra frecuentemente en plásmidos y en transposones y con menor frecuencia en el cromosoma.

2.6.-TOXICIDAD.-

Los aminoglicósidos producen una serie de alteraciones en la células de mamíferos. La expresión más grave de estos efectos es la toxicidad que causan en el riñón y en el oído interno. El mecanismo por el que ocurre esta toxicidad no está perfectamente definido. La interacción de los aminoglicósidos con los fosfolípidos, ATPasa (107), fosfolipasa lisosomal (22), con el metabolismo oxidativo de los neutrófilos (163), la perturbación de las membranas (6) y otros efectos pueden ser la causa de esta toxicidad.

La ototoxicidad se manifiesta tanto en la porción coclear como en la vestibular. La toxicidad vestibular es irreversible y el porcentaje de pacientes que la presenta oscila entre el 1 y el 5%. La toxicidad sobre la función coclear suele ser leve, afecta a la zona de las altas frecuencias y puede aparecer incluso semanas después de haber retirado el antibiótico. Es irreversible al menos en la mitad de los casos (59).

El aminoglicósido tras ser filtrado por el glomérulo es captado en gran parte por las células del epitelio tubular renal. El mecanismo de captación consiste en la unión por fuerzas electroestáticas al fosfatidilinositol de la membrana. Tras ser internalizado por pinocitosis se forman vesículas que se unirán a los lisosomas. La nefrotoxicidad inicial es tubular, y posteriormente se pueden dar casos de glomerulosis secundarias (59).

La alteración última y más llamativa inducida por los aminoglicósidos en la ultraestructura del riñón es la acumulación de material osmiófilo y lamelar (cuerpos mieloides) en los lisosomas de las células del túbulo proximal (22). Se han realizado estudios de la frecuencia de nefrotoxicidad causada por los aminoglicósidos y se ha estimado entre el 10 y el 25% (46).

3.-ENZIMAS MODIFICADORES DE AMINOGLICOSIDOS

3.1.-INTRODUCCION Y NOMENCLATURA.-

El mecanismo más frecuente de resistencia adquirida a los aminoglicósidos es debido a enzimas modificadores. Estos enzimas son capaces de llevar a cabo tres reacciones generales: N-acetilación, O-fosforilación y O-nucleotidilación. Para cada una de estas reacciones hay varias series de enzimas que atacan a grupos aminos ó hidroxilos específicos. Los enzimas pueden diferir por los sustratos que modifican.

La nomenclatura de estos enzimas ha seguido el siguiente patrón. Los enzimas que acetilan se denominan acetilasas ó acetiltransferasas y las siglas correspondientes son AAC ("aminoglycoside-acetyltransferase"). Los que fosforilan reciben el nombre de fosfotransferasas ó fosforilasas y las siglas APH ("aminoglycoside-phosphoryltransferase"). Los que nucleotidilan se llaman nucleotidiltransferasas ó adenilasas y las siglas ANT ("aminoglycoside-nucleotidyltransferase") ó AAD ("aminoglycoside-adenylyltransferase").

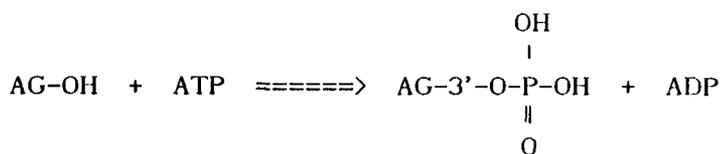
El sitio de modificación se indica por un número colocado entre paréntesis después de la designación del enzima. Por ejemplo, un enzima fosforilante del grupo hidroxilo en posición 3' sería APH(3'). En general las posiciones del aminociclitol son numeradas del 1 al 6; las del aminoazúcar en la posición 4 del aminociclitol, del 1' al 6'; y las del aminoazúcar en posición 5 ó 6 del aminociclitol, del 1" al 6".

En la denominación final de algunos enzimas nos podemos encontrar números romanos que nos indican diferentes perfiles de sustratos. Por ejemplo, APH(3')-I fosforila a la lividomicina pero no a la butirosina, y la APH(3')-II fosforila a la butirosina pero no a la lividomicina.

Algunos enzimas pueden modificar dos posiciones diferentes. La APH(3') modifica a la lividomicina en posición 5" ya que este antibiótico no tiene grupo OH en posición 3'. Por esta razón algunos autores la denominan APH(3')(5"). Lo más usual es indicar sólo el principal sitio de modificación.

3.2.-FOSFOTRANSFERASAS.-

Los enzimas fosfotransferasas ó fosforilasas catalizan la fosforilación de grupos OH de los aminoglicósidos. Pueden utilizar como donadores del grupo fosforilo el ATP, CTP, GTP ó UTP.



Un esquema de lo que puede ocurrir en el centro activo de estas enzimas lo podemos observar en la figura-12.

Las fosfotransferasas pueden modificar las posiciones 3', 5", 6, 4, 3" y 2".

* APH(3'): Las fosforilasas 3' fosforilan el grupo OH de la posición 3' de la aminohexosa de la Km y aminoglicósidos estructuralmente relacionados y la posición 5" de la Lm. Hasta ahora, siete tipos de APH(3') se han distinguido basándose en el rango de sustratos "in vitro" y en la secuencia génica.

** APH(3')-I: Se encontró por primera vez en un *E.coli* que contenía un plásmido de resistencia de *Shigella sonnei* (199). Este enzima fosforila el grupo OH en posición 3' de la Km, Nm, Pm y Rm y en posición 5" de la Lm; no fosforila el OH en posición 3' de la Bt. Las cepas productoras de APH(3')-I son resistentes a la Km, Nm, Pm, Rm y Lm.

La APH(3')-I se ha podido aislar de diferentes organismos: *Enterobacterias* (15,81,130,199), *Pseudomonas aeruginosa* (15,115), *Acinetobacter* (42), *Haemophilus* (161), *Campylobacter* (133); pero no de gram positivos (189). El gen que la codifica se ha encontrado en plásmidos y en transposones (42,212).

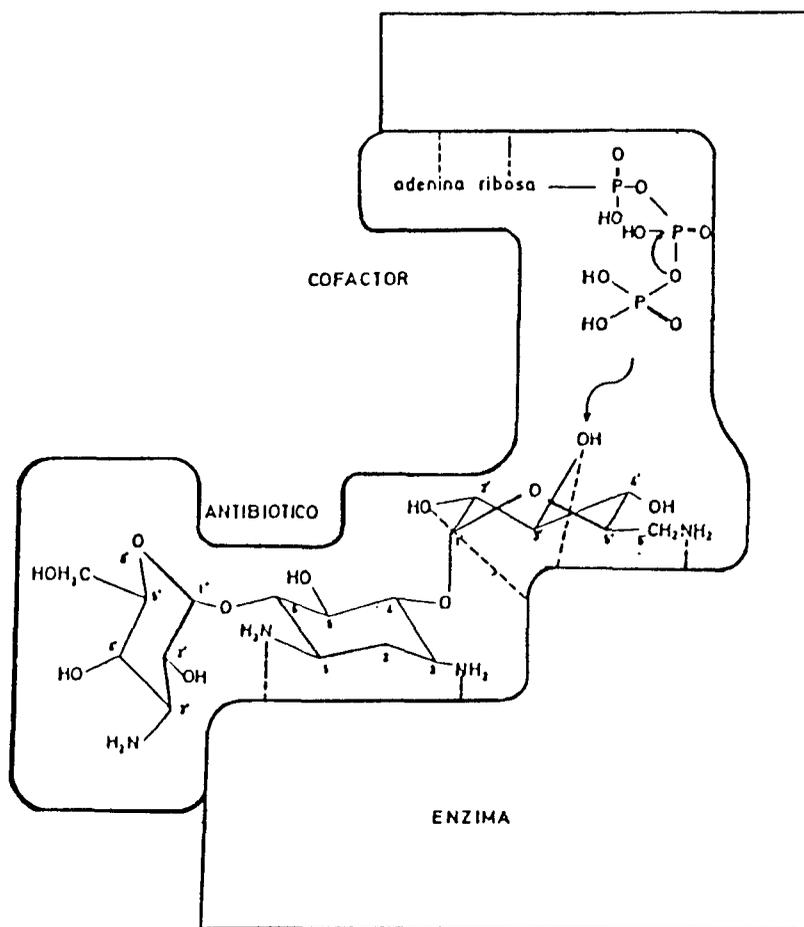


FIGURA-12.- Esquema de cómo puede funcionar el centro activo del enzima APH(3').

Matsushashi y col. (115) observaron diferencias en peso molecular, pH óptimo y afinidades por el ATP, Km y Lm en enzimas de diferentes fuentes. El peso molecular de la APH(3')-I de una estirpe de *E.coli* era de 54Md y de dos *P.aeruginosa* eran de 27 y 62Md.

De *Haemophilus parainfluenzae* se aisló una variante, APH(3')-Ib, para la que la Km era un sustrato más débil (140). Diferentes estirpes pueden codificar diferentes APH(3')-I. Estudios con sondas genéticas demostraron la diversidad de los genes que codifican este enzima en las diferentes especies (212).

****APH(3')-II:** Independientemente, Yagisawa y col. (50,198) y Brzezinska y col. (50,198) describieron otra fosforilasa a la que denominaron APH(3')-II (50). Este enzima es capaz de fosforilar el grupo OH en posición 3' de la Km, Rm, Pm, Nm y Bt pero no el OH en posición 5" de la Lm. Los organismos que presentan este enzima son resistentes a la Km, Rm, Pm, Nm y Bt, y sensibles a la Lm.

La APH(3') se ha aislado de *Enterobacterias* (50,63,137) *Pseudomonas aeruginosa* (63,115,132), *Acinetobacter* (124) y de *Bacillus circulans* (21,34) (un productor del aminoglicósido butirosina).

El gen que codifica este enzima, *aphA-2*, se ha encontrado en plásmidos (11,137) y en transposones (Tn5) (15,115).

Matsushashi y col (15,115). han determinado el peso molecular

entre 25000 y 27000 daltons, y el pH óptimo en 8.4. Los valores obtenidos de enzimas de *Enterobacterias* y de *Pseudomonas* no presentan diferencias significativas. Al contrario que la APH(3')-I, las APH(3')-IIs de diferentes fuentes muestran propiedades similares (115,140).

A niveles práctico la diferenciación por el método radioenzimático de la actividad APH(3')-I y APH(3')-II se basa en la diferencia de incorporación del cofactor radioactivo en la Bt y en la Lm. Cuando la incorporación de radioactividad en la Lm es cinco veces mayor que en la Bt se dice que es la APH(3')-I. El caso inverso es la APH(3')-II. Los resultados obtenidos con este criterio se han comprobado con sondas genéticas y han correlacionado positivamente (212). Sin embargo, cuando el nivel de radioactividad incorporada es similar en los dos antibióticos se pensaba que ambos enzimas estaban presentes. En un estudio con sondas genéticas y el ADN de estirpes que por el criterio anterior se pensaba tenían las dos actividades enzimáticas, sólo se consiguió hibridación con la sonda de la APH(3')-I. Es posible que más de un tipo génico codifique a la APH(3')-II, pero es poco probable ya que únicamente se ha encontrado en un transposón, Tn5. Otra explicación es que se trate de un nuevo enzima relacionado con el gen de la APH(3')-I. La fosforilasa que causa resistencia a la Bt y a Lm es la APH(3')-III pero no se ha encontrado en *Enterobacterias*. El ADN de una estirpe *P.aeruginosa* con APH(3')-III no hibridaba con ninguna de las dos sondas. Es posible que el método radioenzimático no sea exacto para diferenciar las subclases de APH(3').

En *Enterobacterias* la presencia de APH(3')-II se ha asociado

con la resistencia a la bleomicina (Bleo) (64). Este fenotipo puede ayudarnos a detectar la APH(3')-II en cepas resistentes a la Bt y Lm.

Se encontró una APH(3')-II que fosforilaba a la AN sin causar resistencia (137). Cepas mutantes con una actividad enzimática elevada debido a un aumento del número de copias del plásmido (11) que la codificaba, eran resistentes a la AN. Esto es un indicativo de la importancia que puede tener la dosis génica en la resistencia a antibióticos mediada por enzimas modificadores (113).

En *Acinetobacter spp.* (97) se ha aislado una APH(3') que causa resistencia a la AN. Las características de esta fosforilasa son similares a la de la APH(3')-II. Quizás sea un nuevo enzima pero es más probable que se trate de una mutante con la actividad del enzima incrementada.

****APH(3')-III:** Umezawa y col. (200) encontraron una enzima en *P.aeruginosa* que fosforilaba a la Km, Pm, Rm, Bt y Lm y causaba resistencia a los mismos antibióticos. Posteriormente en *Staphylococcus* se detectó una fosforilasa con el mismo perfil de sustratos, y se llamó APH(3")-III.

Inicialmente se pensó que este enzima era exclusivo de gram positivos pues sólo se aislaba de *Staphylococcus* (31,48,175) y *Streptococcus* (25,29,33). Sin embargo, el enzima encontrado en *P.aeruginosa* presenta el mismo perfil de sustrato. Además se ha obtenido en diferentes especies de *Campylobacter* (96,178) y en *Branhamella catarrhalis* (155) una actividad

similar a la APH(3')-III y estos organismos son gram negativos. Estudios de hibridación de ADN han demostrado una homología del gen que codifica a la APH(3')-III, aphA-3, de *Campylobacter spp.* con el de cocos gram positivos (134). Esto sugiere una transferencia de genes de gram positivos a gram negativos en condiciones naturales.

La APH(3')-III puede fosforilar a la AN. En algunos casos esta fosforilación no inactiva al antibiótico y la cepa es sensible (31,32). Una APH(3')-III de *S.aureus* (31,32) tenía una Km para la AN un orden de magnitud mayor que la de la Km, y es probable que esta diferencia explique la sensibilidad a la AN. En otros casos la fosforilación de la AN va acompañada de inactivación y la cepa es resistente (48).

El gen aphA-3 se ha encontrado en diferentes plásmidos (47, 206), en el cromosoma (48,175) y en un transposón (Tn1545) (29).

Diferentes autores han determinado el peso molecular, punto isoeléctrico (pI) y pH óptimo. Umezawa y col. (200) analizaron el enzima aislado de *P.aeruginosa* y encontraron que el pH óptimo variaba entre 5 y 8 dependiendo del sustrato, y el peso molecular por filtración era de 25500 daltons.

Collatz y col. (25,26) estudiaron la APH(3')-III de *Streptococcus* y observaron que no había una clara dependencia del pH entre 5 y 9; el pI oscilaba entre 4.8(\pm 0.1) y 5.1(\pm 0.2). El peso molecular dependía del procedimiento de purificación. Utilizando la filtración a través de

Sephadex G.200 se calculaba el peso molecular en 22500 y con Sephadex G.100 en 32500. Esta diferencia se puede explicar porque la filtración con Sephadex G.200 superfino produce una subestimación del peso molecular debido a uniones del enzima con la matriz del gel.

Trieu-Cuot y Courvalin (190) determinaron la secuencia de nucleótidos del gen *aphA-3* en *S.faecalis*. El producto que correspondía a esta secuencia génica era una proteína de 29200 daltons y podría contener un 32% de ácido glutámico. Esta cantidad de ácido glutámico puede interferir en la desnaturalización de las proteínas con SDS y llevaría a una sobreestimación del peso molecular cuando se determina por electroforesis en presencia de este detergente. Esto sería la explicación de que el peso molecular calculado por Collatz y col. sea de 32500 daltons.

Ubukata y col. (193) estimaron el peso molecular y el punto isoelectrico de enzimas extraídas de *S.aureus* y *S.epidermidis*, obteniendo los valores de 31000 daltons y 4.1 que no diferían mucho de los obtenidos por Collatz y col.

****APH(3')-IV:** Varios autores (106,140,153) han denominado a la APH(3')-III que fosforila a la AN como APH(3')-IV. Herbert y col. (189) aislaron una APH(3') de *Bacillus circulans* que fosforilaba a la Km y a la Bt pero no a la Lm. Se podría confundir con la APH(3')-II pero se diferencia en que la II así como la I y la III fosforilan a la Gm A+B sin causar resistencia, y la de *Bacillus circulans* no tiene esta capacidad. A esta fosforilasa también la llamaron APH(3')-IV.

****APH(3')-V:** Thompson y Gray (191) describieron una fosforilasa 3' en *Streptomyces fradiae* (productor de la Nm) que no tenía actividad ni con la Bt ni con la Lm y la denominaron APH(3')-V.

****APH(3')-VI:** Martín y col. (180) secuenciaron el gen de una fosforilasa de *Acinetobacter baumannii* a la que denominaron APH(3')-VI. El peso molecular de este enzima era 30319.

****APH(3')-VII:** Tenover y col. (180) describieron la secuencia génica de una fosfotransferasa de *Campylobacter jejuni* a la que nombran como APH(3')-VII. El gen *aphA-7* contiene 753 pares de bases y codifican una proteína de 251 aminoácidos que corresponde a 29691 daltons. El estudio de homología con los genes de las otras APH(3') reveló una identidad del 45.6% con el *aphA-3*.

Tenover y Elvrum (179) detectaron en *Campylobacter spp.* un enzima con actividad contra la Bt, Gm, Tm ó Lm. Es una actividad APH(3') que no se puede incluir en ninguno de los subtipos conocidos.

Trie-Cuot y col. (191) han comparado la secuencia génica de los cinco primeros tipos de APH(3'). A nivel de nucleótidos no hay una homología significativa desde el punto de vista estadístico. Pero cuando se analiza la secuencia de aminoácidos se observa cierta estructura relacionada. Este parecido unido a la similitud en la actividad enzimática y a pesos moleculares casi idénticos indica que han divergido de un antecesor común (189).

*APH(5''): Yamaguchi y col (210) encontraron un enzima que fosforilaba el grupo OH en posición 5'' de la Lm, Nm, Pm, pero no de la Km, Sm y Gm. Umezawa y col (198) comprobaron que el enzima APH(3')-I era el que fosforilaba el grupo OH en posición 5'' y no un nuevo enzima. Kida y col. (94) hallaron en *P.aeruginosa* un enzima que fosforilaba a la Rm preferentemente en posición 5'' pero también en 3'. Aunque esta actividad no se ha estudiado a fondo, se denomina APH(5'') al enzima que fosforila al grupo OH en posición 5'' de la ribosa de la Rm (37,143). Sólo se ha detectado en bacterias gram negativas (65).

*APH(4): Leboul y col. (151) aislaron de *Streptomyces hygroscopicus* un enzima que fosforilaba a la higromicina B.

Posteriormente Rao y col. (151) extrajeron de *E.coli* una fosforilasa activa contra higromicina B y derivados (destomicina). El lugar de acción de este enzima era el grupo hidroxilo en posición 4 de la hiosamina (ciclitol) y se le llama APH(4).

Los dos enzimas aislados tenían un perfil similar sugiriendo una posible relación. Sin embargo estudios del peso molecular han determinado en 60000 daltons el del enzima de *Streptomyces* y en 41500 el de *E.coli*.

El gen que codifica la APH(4) en *E.coli* era plasmídico.

***APH(3"):** Ozanne y col. (198) pusieron de manifiesto la existencia de un enzima que podía fosforilar a la estreptomicina en el hidroxilo en posición 3". Se la llamó APH(3").

Kobayashi y col. (198) encontraron posteriormente un enzima similar en *P.aeruginosa*.

La APH(3") fosforila el grupo hidroxilo en posición 3" de la Estreptomicina y derivados. No actúa con la espectinomicina ni con ningún otro aminoglicósido. Se ha aislado de gram negativos, gram positivos y micobacterias. El gen que codifica a la APH(3") se ha encontrado en plásmidos (77) y en transposones (tn5) (60).

***APH(6):** Walker y col. (140,141) informaron de un enzima de *Streptomyces* que fosforilaba a la estreptomicina y dihidroestreptomicina, y la llamaron estreptomicin-6-kinasa. Se ha podido aislar de *Streptomyces* productores de estreptomicina (141,168).

Kida y col. (39) comunicaron que el extracto de *P.aeruginosa* GN573 fosforilaba el grupo hidroxilo en posición 6 del anillo de estreptidina de la estreptomicina y la denominaron APH(6). Este enzima tenía un pH óptimo de 8.0 y un pI de 4.7. La relación con la Sm-6-kinasa de *Streptomyces spp.* no se ha establecido. La APH(6) no se ha encontrado en *Enterobacterias*.

Sugiyama y col. (176) purificaron y estudiaron la Sm-6-kinasa de *S.griseus* HUT6037. El peso molecular se estimó entre 36000 y 38000 daltons, y el pI de 6.6.

***APH(2'')**: Cataliza la fosforilación del grupo 2'' hidroxilo de la aminohexosa de la Gm, Km y Tm. Se ha aislado de *S.aureus* (45,102) y *S.epidermidis* (4,181) y de diferentes especies de *Streptococcus* (53,125). No se ha encontrado en gram negativos. La actividad fosforilasa APH(2'') siempre va acompañada de actividad acetilasa tipo AAC(6').

Dowding (45) consiguió separar las dos actividades por electroforesis en geles de poliacrilamida. Le Goffic y col. (102) hablan de las dos actividades como enzimas diferentes de *S.aureus* purificados por cromatografía e isoelectroenfoque. Los pesos moleculares de ambas enzimas eran iguales, 28000, y el pI de 5.7 para la acetilasa y de 5.8 para la fosforilasa. Intentos posteriores de repetir la separación de estas dos actividades no han dado resultado. Le Goffic y col. (104) explicaron que podría tratarse de un enzima oligomérica ya que no puede atravesar los filtros de Amicon XM100 aunque el peso molecular seguía estimándose en 28000. Actualmente se considera un enzima bifuncional APH(2'')-AAC(6').

Courvalin y col. (30) no pudieron separar las dos actividades por filtración en gel, determinaron el peso molecular en 31000 y el pI en 5.3. El pH óptimo para la actividad acetilasa era aproximadamente de 7 mientras que para la actividad fosforilasa no había variación entre pH 5 y 8.

Ubukata y col. (193) han purificado y caracterizado diferentes enzimas de *S.aureus* y *S.epidermidis*. Determinaron el peso molecular del enzima bifuncional en 56000 y el pI en 4.1. Los pesos moleculares de otros enzimas fosfotrasferasas (190) y acetilasas estudiados están alrededor de 30000, aproximadamente la mitad.

Rouch y col. (156) clonaron el gen *aacA-aphD* de *S.aureus* en *E.coli* donde expresaba resistencia a la Gm, Tm y Km. El análisis de la secuencia de nucleótidos mostró que podía determinar una proteína de 479 aminoácidos con peso molecular de 56.9 Kdal..

Ferreti y col. (53) analizaron el gen que codifica la AAC(6')-APH(2") en *S.faecalis*. La secuencia de nucleótidos codifica una proteína de 479 aminoácidos y peso molecular de 56850. La secuencia de aminoácidos presenta dos regiones homólogas con otras proteínas estudiadas. Por clonación se han logrado dos segmentos génicos que especifican independientemente las dos actividades, fosfotrasferasas y acetilasas. Los datos obtenidos por estos trabajos sugieren que el gen que codifica al enzima bifuncional es el resultado de una fusión génica.

El gen que codifica a la AAC(6')-APH(2") se ha encontrado en el cromosoma (84,92), en plásmidos (4,47) y en transposones (Tn4001 (108), Tn4031 (181)).

La actividad fosforilasa APH(2") presenta como sustrato principal a la Gm y Ss, y como secundarios a la Tm y Km (102,140). Sin

embargo, también se ha visto que fosforila a la AN y Nt (47,164) en algunos casos y es la causa de resistencia a estos antibióticos (164).

3.3.-ACETILTRANSFERASAS.-

Las acetiltransferasas ó acetilasas transfieren el acetato del acetil-coenzima A a un aminogruppo del antibiótico. Estos enzimas modifican sólo los aminoglicósidos que contienen 2-desoxiestreptamina ó fortamina, quedando excluídos estreptomicina y espectinomycin. La acetilación puede producirse en tres grupos aminos distintos, situados en posición 3, 2' y 6'. Recientemente se ha descrito una nueva acetilasa que modifica la posición 1.

***AAC(6')**: Cataliza la acetilación del grupo amino en posición 6' (figura-13). Todos los componentes con un grupo amino libre en posición 6' pueden ser modificados (Nm, KmA y B, Tm, Gm_{cl}a, Ss, Nt, DKB, Bt, AN y Rm).

Okamoto y Suzuki (8) informaron que un extracto enzimático de *E.coli* K-12 R-5 transportando un plásmido R, inactivaba a la Km por acetilación. Umezawa y col. (8) aislaron el producto de la acetilación de la KmA y demostraron que era acetilada en el grupo amino en posición 6'. Benveniste y Davies (8) aislaron y purificaron este enzima de *E.coli* 677 con un plásmido R. Encontraron que acetilaba a la KmA y B, NmB y C, Gm_{cl}a y Gm₂, y las hibrimicinas. No acetilaba ni a la Pm ni a la GmA.

KANAMICINA A

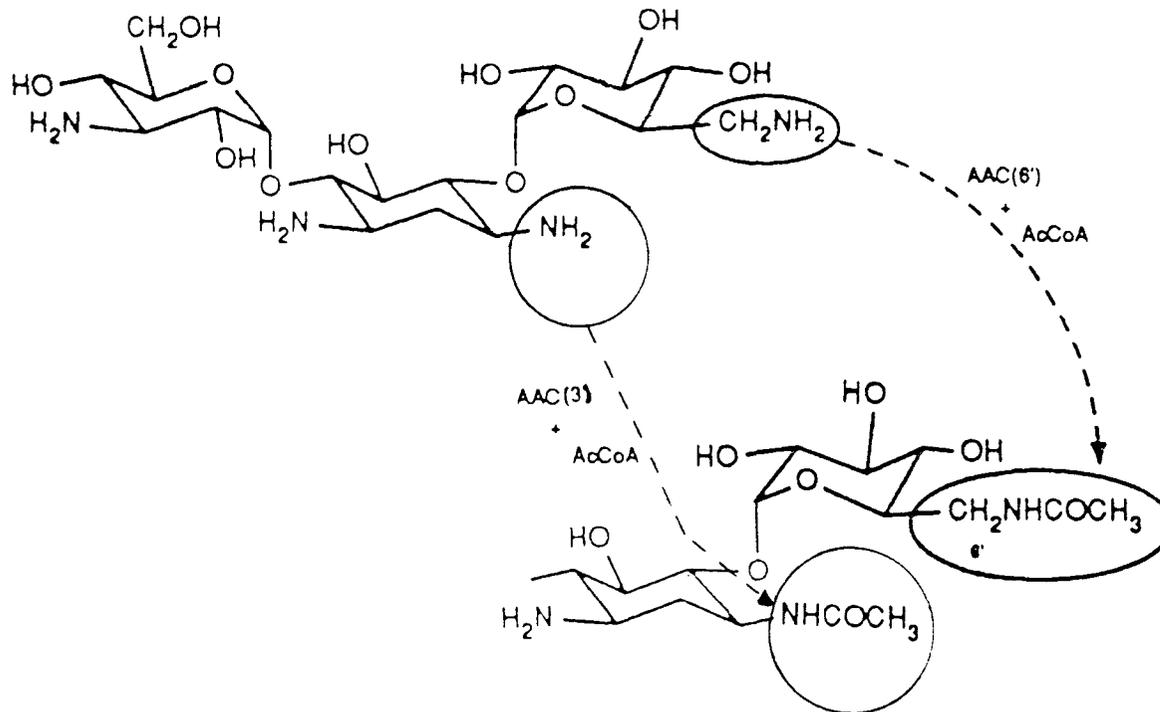


FIGURA-13.- Acetilación de la kanamicina por los enzimas AAC(6') y AAC(3).

Jacoby (82) describe una Km-acetiltransferasa de *P.aeruginosa* que causaba resistencia a la Km, AN, Bt, Tm y Ss, pero no a la Gm, y que podía transmitirse a otras estirpes de *Pseudomonas* por conjugación.

Le Goffic y col. (68) denominaron AAC(6')-II a un enzima aislada de *Moraxella*.

Kawabe y col.(90) identificaron otra enzima de *P.aeruginosa* que acetilaba a la KmA, KmB, DKB, 6'-Me-DKB pero no a la KmC, AN ni Gmcl_{1a}, y la llamaron AAC(6')-III.

Kawabe y col. (91) detectaron en *P.aeruginosa* una acetilasa que producía resistencia a la AN, DKB y Km.

Haas y col. (75) determinaron una AAC(6') en *P.aeruginosa* con muy baja actividad para la Bt y AN similar a la AAC(6')-III de Kawabe y col.

Mitsubishi (68) clasificó a las AAC(6') en cuatro categorías basandose en el perfil de sustrato. La AAC(6')-I modifica a la KmA y B y a la Nm. La AAC(6')-II inactiva a la KmA y B, Nm, Gmcl_{1a} y Gmc₂. La AAC(6')-III es activa contra los sustratos de la clase II además de la DKB. La AAC(6')-IV modifica a todos los sustratos de la III más la AN.

Otra clasificación (140) seguida en Europa y Norteamérica considera como AAC(6')-I al enzima aislado de *E.coli* K-12 R-5 por Umezawa y col. (8) con pl de 5.4. AAC(6')-II es el enzima obtenido de *Moraxella* por Le

Goffic y col. (68) con perfil de sustrato algo diferente al de la I y con pl de 7.6. AAC(6')-III es el enzima que tiene poca actividad contra la AN encontrado en *P.aeruginosa* y causa resistencia a la Gm, Nt y Tm. La actividad enzimática que acompaña a la APH(2") en *Staphylococcus* es la AAC(6')-IV y tiene poca actividad con la Nm.

Actualmente (64,166) se ha simplificado la clasificación y se reconocen dos subclases. La AAC(6')-I confiere resistencia a la AN, Tm, DKB, Nt, Km y Nm. La AAC(6')-II determina resistencia a la Gm, Tm, DKB, Nt, Nm y Km, no inactiva a la AN. Ambas subclases causan resistencia a la 5-epi-sisomicina (64,204). La Pm no es sustrato porque posee un grupo OH en posición 6' en vez del amino necesario. La AAC(6')-I puede acetilar y producir resistencia a la isepamicina (61).

Esta última clasificación no es seguida por todos los autores y es posible encontrar artículos recientes con los tipos del I al IV (186).

Las AAC(6')s se han encontrado en gram negativos y en gram positivos. En *Staphylococcus* y *Streptococcus* frecuentemente se encuentra la actividad AAC(6') asociada con la APH(2") en el enzima bifuncional. Las características de este enzima ya las vimos cuando estudiamos la APH(2"). La actividad acetilasa actúa con la Km, Tm, Gm, AN y Nt (206) y tiene poca afinidad por la Nm. Las cepas que contienen a la AAC(6')-APH(2") son resistentes a la Gm, Tm y Km (109,181) y a veces a la AN y Nt (206 también. El grupo amino en posición 6' de la fortimicina y derivados es también acetilado por la bifuncional causando resistencia a estos antibióticos (66,74).

Los genes que codifican a las AAC(6')s, *aacA*, se han encontrado en plásmidos (88,166), en transposones (Tn1331 (127), Tn2424 (121)) y en el cromosoma (83).

Tran Van Nhieu y Collatz (185) estudiaron el gen que codifica a la AAC(6')-IV, *aacA-4*. Este gen constaba de 600 pares de bases y codificaba a un enzima de 22.4 Kd con pI de 5.35. Posteriormente los mismos autores (186) analizaron la relación entre las AAC(6')-4 codificadas por diferentes plásmidos mediante hibridación de ADN e inmunoensayo. Encontraron poca homología del ADN y escasa reactividad inmunológica cruzada, sugiriéndose que existen al menos dos tipos diferentes de genes para las AAC(6')-4 que median la resistencia a la AN.

Nobuta y col. (127) secuenciaron el gen de una AAC(6') de *Klebsiella pneumoniae* resistente a la AN y correspondía a un péptido de 23Kd.

Shaw y col. (166) estudiaron el gen de una AAC(6')-II de *P.aeruginosa*. Este gen mediaba la resistencia a la Gm, Tm y Nt pero no a la AN ó Im. Compararon la secuencia con la obtenida por Tran Van Nhieu y Collatz (185) obteniendo un 82% de homología. Estos autores proponen que los dos genes surgieron de un antecesor común y que el proceso de selección y diseminación ha conducido a las diferencias actuales observadas en el espectro de resistencia.

*AAC(2'): Acetila el grupo amino en posición 2' de la Gm, KmB y C, Tm, DKB, Nm, Pm, Lm, Bt, Rm y Ss pero no a la KmA ni AN por carecer de este grupo (39,143). La presencia de este enzima produce resistencia (64) a la Gm, Tm, Nt, Nm (79), DKB (167), Ss (167) y Lm.

La primera AAC(2') se aisló de *Providencia stuartii* (39). Este enzima parece estar asociado principalmente con *Providencia* (139,140) aunque también se ha obtenido de *Proteus* (139,140).

El enzima se purificó parcialmente mediante cromatografía en Sephadex G-100 y parecía una proteína pequeña (39).

El gen que codifica a la AAC(2') no se ha localizado en plásmidos. Davies y Smith (39) hacen referencia a una cita que habla de AAC(2') aislada de *Proteus* y codificada por plásmidos. Sin embargo, Phillips y Shannon (140) no encontraron este dato en dicha cita.

Se ha encontrado una AAC(2') en *Streptomyces spectabilis* productor de la espectinomicina. Mitsuhashi (140) propone que el enzima aislado de *Streptomyces spectabilis* se denomine AAC(2')-I y el de *Providencia* AAC(2')-II.

*AAC(3): Acetilan el amino en posición 3 del anillo de 2-deoxiestreptamina (figura-13). Se clasifican basándose en el perfil de sustrato y espectro de resistencia. Se han identificado hasta siete isoenzimas diferentes (203).

****AAC(3)-I:** Mitsuhashi y col. (198) informaron que el sobrenadante de una estirpe *P.aeruginosa* inactivaba a las Gm_{cl}, c₁ y c₂ por acetilación. Brezezinska y col. (39,198) describieron una actividad similar también en *P.aeruginosa* e identificaron como Gm acetilada al antibiótico modificado. Este enzima acetilaba a la Gm y a la Ss pero no a la Km.

La AAC(3)-I se ha aislado de *Pseudomonas* y *Enterobacterias*. Modifica a la Gm, Ss y Fm y en menor grado a la Km, Tm, DKB y Nt. Las cepas que la sintetizan presentan un fenotipo típico de resistencia a la Gm, Ss y Fm. Sólo otro enzima, la bifuncional AAC(6')-APH(2"), produce resistencia a la Fm y derivados (74). La AAC(3)-I modifica a la Fm y derivados en el grupo amino en posición 1 de la fortamina ya que no presenta ningún amino en posición 3 (66,131). Algunos autores (65,116) hacen referencia a que el grupo amino modificado es el 4 pero se debe a que han numerado en diferente orden los carbonos de la fortamina (figura-4).

Williams y Northrop (39) purificaron la AAC(3)-I. Tenía un peso molecular de 63000 ± 6300 y estaba compuesta por cuatro subunidades idénticas de 17000 ± 1700 . La actividad no variaba a pH entre 5.5 y 8.5. La K_M y V_M para la Gm_{cl} era de $0.3 \pm 0.08 \mu M$ y $3.0 \pm 0.15 U/mg$ respectivamente, y para la Tm de $2.3 \pm 0.2 \mu M$ y $0.48 \pm 0.02 U/mg$. Esta diferencia explicaría que siendo la Tm un sustrato para la AAC(3)-I no sea modificada con la suficiente velocidad para impedir su efecto bactericida.

Le Goffic y col. (103) calcularon el pI de la AAC(3)-I en 7.4.

El término AAC(3)-Ia (140) se ha usado para el fenotipo Gm^R,Nt^R encontrado en *P.aeruginosa*. La base enzimática de este fenotipo no se conoce.

El gen de la AAC(3)-I, aacC-1, se encuentra principalmente en plásmidos y con mucha frecuencia en plásmidos conjugativos (70).

****AAC(3)-II:** Le Goffic y col. (103) encontraron una acetilasa en una estirpe de *Klebsiella* que causaba resistencia a la Gm, Ss, Tm y Km y era transferida a *E.coli* por conjugación. El grupo que modificaba era el amino en posición 3. Determinaron el pI en 6.4. Debido a la diferencia de pI y del perfil de resistencia que ocasionaba, la denominaron AAC(3)-II.

Este enzima se ha aislado principalmente de *Enterobacterias* (203). Es activo con la Gm, Tm, DKB, KmA y B (23). Causa resistencia a los mismos sustratos excepto a la KmB (68). Es curioso que presentando mayor actividad enzimática con la KmB que con la KmA produce resistencia sólo a éste último (68).

Vliegenthart y col. (203) secuenciaron el gen aacC-2 que codifica a la AAC(3)-II. Contiene 858 pb que corresponden a un polipéptido de 30.6 Kd.

****ACC(3)-III:** Biddlecome y col. (10) encontraron en *P.aeruginosa* PST un enzima que acetilaba a la Gm, Ss, Km, Nm, Pm y Tm pero no tiene actividad con la AN y Bt. La cepa era resistente a la Gm, Ss, Tm,

Km y Pm. Aunque la Nm es un sustrato la cepa sólo era medianamente resistente (CMI: 8g/l) a este antibiótico. Sugirieron que quizás la AAC(3)-III había surgido por mutación de la AAC(3)-I. Los intentos de transferir la resistencia fracasaron, concluyendo que el gen que la codifica puede ser cromosómico.

La AAC(3)-III es activa con la Gm, Ss, Tm, DKB, Nm, Pm, Km y 5-episisomicina pero no con la AN y Bt (64,79). Las bacterias que presentan este enzima son resistentes a la Gm, Ss, Tm, DKB, Nt, Nm, Pm, Km y 5-episisomicina (64,203). La AAC(3)-III es la única AAC(3) que inactiva a la 5-episisomicina (64,68), por lo que este antibiótico es útil para una clasificación correcta.

Bräu y col. (203) han secuenciado el gen de la AAC(3)-III, aacC-3. Vliegthart y col. (203) compararon la secuencia de este gen con el aacC-2 y no encontraron diferencias significativas que justificaran la disparidad de sustratos. La explicación que Vliegthart y col. (203) dan es que Bräu y col.(203) no incluyeron el perfil de sustrato necesario para identificar inequívocamente a la AAC(3)-III. Es posible que el fenotipo de resistencia de la cepa que ellos estudiaron fuera el resultado de una AAC(3)-II y una APH(3') y que el gen que ellos clonaron sea el aacC-2.

La AAC(3)-III se aísla principalmente de bacilos gram negativos. Sin embargo, Uduo y col. (196) informaron de una AAC(3)-III en *Mycobacterium fortuitum*. Este enzima tenía el mismo perfil de sustrato que la AAC(3)-II pero como no incluyeron la Ap podría tratarse de una AAC(3)-IV.

****AAC(3)-IV:** Davies y O'Connor (38) encontraron una enzima en bacterias aisladas de animales que acetilaba a los sustratos de la AAC(3)-III y a la Ap. La Km no era tan buen sustrato como la Gm, Tm, Nm ó Ap. La apramicina es modificada en el grupo amino en posición 3 como el resto de los antibióticos. Se le llamó AAC(3)-IV. La resistencia se transmitía por conjugación, deduciéndose que el gen era plasmídico.

Hedges y Shannon (79) aislaron una AAC(3)-IV de una estirpe de *E.coli* de origen animal que venía codificada en el transposón Tn800 y confería resistencia a la Ap, Gm, Tm, KmA y Nm.

Chaslus-Dancla y col. (24) determinaron una AAC(3)-IV que tenía poca actividad con la Pm.

Al principio las bacterias que presentaban AAC(3)-IV eran de origen animal. Sin embargo, actualmente se han aislado en *Enterobacterias* de origen humano (65,67).

La AAC(3)-IV sólo se ha aislado de *Enterobacterias*. Uduo y col. (196) encontraron una AAC(3) en *Mycobacterium fortuitum* cuyo perfil era el de una AAC(3)-III pero no descartaron que fuera una AAC(3)-IV.

****AAC(3)-V:** Gómez-Lus y col. (71) utilizaron este término por primera vez para definir a una acetilasa que tenía como sustratos y causaba resistencia a la Gm, Tm, DKB, Ss y Nt. Se diferenciaba de la AAC(3)-II en

que no producía resistencia a la Km. No se trataba de una AAC(3)-III porque la Nm, Pm, Rm y Lm no eran sustratos. Se distingue de la AAC(3)-IV porque no tiene actividad con la Ap.

Este enzima se ha aislado de diferentes *Enterobacterias* y es codificado por plásmidos conjugativos (7,155). El gen de la AAC(3)-V, aacC-5, se ha encontrado en transposones (Tn2922 (112) y Tn1699 (7)).

Barg (7) construyó una sonda para el gen aacC-5. Estudios de hibridación con el DNA de organismos productores de las siguientes enzimas ANT(2"), AAC(3)-I, II, III y IV, ANT(4"), AAC(6')-I, APH(3')-I y IV y AAC(2'), dieron resultados negativos.

****AAC(3)-VII:** Pérez-González y col. (135) estudiando a una estirpe de *Streptomyces rimosus forma paromomycinus* encontraron una acetilasa que modificaba a la Pm, NmB y C, LmA, KmA y B, GmC_{1a}, y C₁, Tm, Ss, Nt G-418. La AN, Bt, HygB, kasugamicina, Rm, Sm y Sp no eran sustratos. La llamaron AAC(3)-VII pero su perfil de sustrato es igual al de la AAC(3)-III. Secuenciaron (108) el gen que la codificaba, aacC-7, y constaba de 1495pb. El gen aacC-7 estaba localizado en un fragmento de 864 pb y correspondía a un polipéptido de 31070 daltons, que correlacionaba con el peso molecular de 32000 daltons obtenido por medios físicos.

Estudios de hibridación de ADN con los genes de la AAC(3)-III y IV mostraron una gran homología, 59 y 41% respectivamente. No se detectó ningún parecido con la AAC(3)-I.

La similitud (59%) entre la AAC(3)-III y la VII correlaciona bien con el perfil similar de sustratos.

****Otras AAC(3):** Uduo y col. (194) encontraron dos actividades acetilasas en *Mycobacterias* de rápido crecimiento. Uno de los perfiles era Tm, Pm, Lm y Km como los mejores sustratos y Fm, Gm y AN como sustratos menores. El otro perfil era más pequeño y englobaba a la Gm y Tm como los sustratos mejores, a la Pm y Km como sustratos menores y la Lm, AN y Fm no eran sustratos. Estos autores proponían que son nuevas AAC(3) pero no han utilizado todos los sustratos necesarios para descartar los otros perfiles de AAC(3).

***AAC(1):** Lovering y col. (65) describen un enzima que acetila a la Ap en posición 1 y a la Nm y Rm en posición 1 y 6'. La llamaron AAC(1).

Anteriormente Hedges y Shannon (79) habían encontrado una acetilasa que tenía como sustratos a la Ap, Nm y Pm. No lograron determinar el grupo que se modificaba y no la identificaron. Es posible que pueda tratarse de un enzima parecido al de Lovering y col. (65). La síntesis del enzima era dirigida por un gen cromosómico.

Sales y Cunliffe (158) caracterizaron una acetilasa de *Micromonospora inyoensis*. La Nm y derivados eran buenos sustratos y también la Ap, mientras que la Gm y Km no. *M.inyoensis* sintetizaba la Ss pero este

antibiótico tampoco era acetilado. Los autores no excluyeron la posibilidad de que este enzima actuara en posición 1 del anillo II.

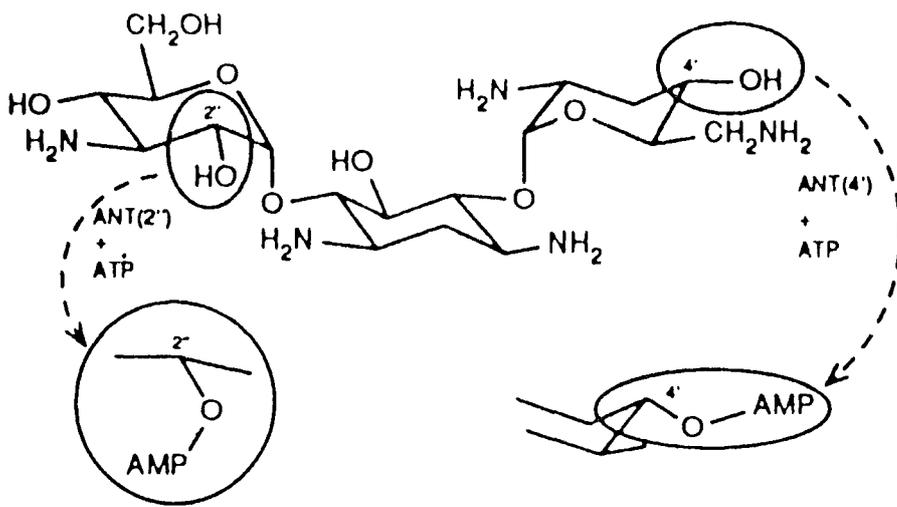
3.4.- NUCLEOTIDILTRANSFERASAS.-

Las adenilasas ó nucleotidiltransferasas catalizan la transferencia del nucleótido del ATP y otros nucleótidos a un grupo hidroxilo del aminoglicósido. La nucleotidilación puede producirse en las siguientes posiciones: 2", 4', 3", 9 y 6.

*ANT(2").- Benveniste y Davies (198) encontraron en una estirpe de *E.coli*, que portaba un plásmido de resistencia de *Klebsiella*, actividad adenilasa para la GmC1a, C2 y C1 y Km. La cepa era resistente a la Gm, Tm y Km pero sensible a la Nm y AN (140). Este enzima cataliza la nucleotidilación de los aminoglicósidos en el grupo hidroxilo en posición 2" de la aminohexosa (figura-14). Puede utilizar ATP, GTP, CTP y UTP como cofactores y por esto se le debe llamar nucleotidiltransferasa, ANT(2"), más que adenilasa (140).

Smith y Smith (39) purificaron el enzima. El peso molecular que determinaron era de 35000 daltons por cromatografía en Sephadex G-100.

Las cepas que sintetizan este enzima son resistentes a la Km, Gm, Ss, Tm y DKB pero sensibles a la Nt (12,70).



TOBRAMICINA

FIGURA-14.- Adenilación de la tobramicina por los enzimas ANT(2'') y ANT(4').

Coombe y George (27) hallaron una adenilasa que actuaba sobre la Gm, Ss, Tm, Km y también sobre la AN. Purificaron el enzima y obtuvieron un peso molecular de 29000 daltons por cromatografía en Sephadex S-200 y un pH óptimo de 7.8-8. La actividad enzimática se trasfería por conjugación. La denominaron ANT(2'')-II. En este estudio la actividad adenilasa iba acompañada siempre de APH(3')-I. Aleddinoglu y Kocabiyik (2) encontraron también una ANT(2'') que causaba resistencia a la AN.

La ANT(2'') se ha aislado de *Enterobacterias* (2,129) y *Pseudomonas* (85). Gray y col. (72) informaron que *S.aureus* (SJ63) expresaba actividad ANT(2'').

El gen que codifica a la ANT(2'') se ha encontrado en plásmidos (118,129) y posiblemente en transposones (73).

Estudios de homología de los genes que especifican a la ANT(2'') parecen demostrar que hay heterogeneidad en las secuencias codificadoras (98).

***ANT(4').-** Adenilan los sustratos en posición 4' y también los grupos hidroxilos en posición ecuatorial 4'' (como la DKB) pero no los hidroxilos en posición polar 4'' (como la Gm).

Le Goffic y col. (101) extrajeron de *S.aureus* un enzima que adenilaba a la Km, AN, Tm, Lm, Bt, Rm y Nm, pero no a la Gm, Ss ó Ap. La

cepa era resistente a la Km, Nm, Pm, Tm y Bt y ligeramente resistente a la Lm y AN. El gen que mediaba esta resistencia era plasmídico. El estudio de los antibióticos modificados demostró que la posición adenilada era el hidroxilo en posición 4'. La denominaron AAD(4'). Ya que puede utilizar tanto ATP, GTP como UTP, el nombre más apropiado es ANT(4'). El pH óptimo variaba según el sustrato. Para la Tm era de 4.5 y para la AN de 6. El pI se calculó en 5.1. Posteriormente determinaron el peso molecular en 22000 daltons (100).

Santanam y col. (162) también encontraron la actividad AAD(4') en una estirpe de *S.epidermidis*. Observaron que la 4'-deoxykanamicina era un sustrato, no así la 4'-deoxybutirosina y señalaron la posibilidad de que el grupo hidroxilo en posición 4" podría ser modificado por el mismo enzima.

Le Goffic y col. (10) advirtieron que la DKB que carecía del grupo hidroxilo en 4' era modificada por la ANT(4'). Estudiando las moléculas de Tm y DKB propusieron que era el grupo hidroxilo en 2" el modificado. Estudiaron la estructura de la DKB modificada por la ANT(4') y la compararon con la DKB modificada por la ANT(2") (100). Los resultados indicaban una semejanza y concluyeron que la ANT(4') modificaba a la DKB en la posición 2".

Sin embargo, los estudios realizados por Schwotzer y col. (140) determinaron que la ANT(4') adenilaba el grupo 4" cuando estaba en posición ecuatorial.

La ANT(4') adenila los sustratos en posición 4' y también los ecuatoriales en 4", pero no los polares en 4". Otra posibilidad es la posición 2". Los sustratos de este enzima son Km, AN, DKB, Lm, Bt, Rm y Nm, pero no lo son la Gm, Ss, Nt y Ap. Las cepas que presentan este enzima son resistentes a la Km, Tm, Bt, Rm, Nm y ligeramente a la DKB, Lm y AN (165,193).

Ubukata y col. (193) purificaron y caracterizaron diferentes enzimas de *S.aureus* y *S.epidermidis*, entre ellas a la ANT(4')(4"). El peso molecular que calcularon fué de 36000 y el pI de 4.7. Estos datos difieren de los obtenidos por Le Goffic y col. (100,101), y por Santanam y col. (193) Estos últimos determinaron el peso molecular en 46770 y el pI en 5.0.

El gen que codifica a la ANT(4')(4"), aadD, se encuentra normalmente en plásmidos, pero también se ha detectado en el cromosoma (192).

ANT(4')(4") se ha aislado sólo de *S.aureus* y *S.epidermidis*. Ese hecho puede cambiar si se confirma la identificación de una ANT(4')(4") encontrada en *P.aeruginosa* (65).

***AAD(3").**- Umezawa y col. (198) describieron por primera vez un enzima que adenilaba a la Sm. El lugar de modificación era el grupo hidroxilo en posición 3" (39). Davies y col. (198) descubrieron que esta adenilasa también actuaba sobre la Sp pero en posición 9. Se la llama AAD(3")(9) e inactiva a la Sm y a la Sp. Puede usar ATP y dATP como cofactores pero no

los otros nucleótidos (140). Se ha aislado en gram negativos solamente (140).

El gen que codifica a la AAD(3'')(9), *aadA*, normalmente se localiza en plásmidos y se ha identificado también en transposones (Tn4 (39), Tn21, Tn2424, Tn2411 (121)).

***AAD(9):** La AAD(9) ó Espectin-adeniltransferasa es producida por *S.aureus* 1206 y es capaz de adenilar a la Sp pero no a la Sm. El sitio de modificación es el hidroxilo en posición 9 (39). Este enzima no ha sido estudiado en detalle. También se ha encontrado en *P.aeruginosa* (152).

***AAD(6).-** Kawabe y col. (89) observaron en *S.aureus* que la resistencia a la Sm y Sp era codificada por plásmidos diferentes. Ambos antibióticos eran adenilados aunque no determinaron la posición modificada. La Sm adenilada por *S.aureus* era diferente de la Sm adenilada en posición 3'' indicando que no se trataba de la AAD(3'') de *E.coli*. Posteriormente demostraron que se modificaba el grupo hidroxilo en posición 6 (39). Se le denominó AAD(6) y es capaz de adenilar a la Sm pero no a la Sp.

3.5.-ORIGEN Y EVOLUCION DE LOS ENZIMAS MODIFICADORES.-

La existencia de mecanismos tan eficaces de resistencia bacteriana a los aminoglicósidos, en especial la producción de enzimas modificadores, ha suscitado la cuestión de su origen y su diversidad. A

priori se ha descartado que los genes de resistencia estuviesen relacionados con funciones bioquímicas nuevas y diferentes. Era más probable que los determinantes de resistencia ya existiesen y que al cambiar de organismo hospedador, la misma función tuviese una aplicación diferente. Esta hipótesis sugiere que los organismos productores de aminoglicósidos y los determinantes plasmídicos de resistencia son las fuentes potenciales para las bacterias patógenas. Es evidente que los microorganismos deben poseer mecanismos protectores frente a los propios antibióticos que elaboran para resistir a un suicidio, de otro modo inevitable (tabla-12). *Bacillus circulans* NRRLB-3312 sintetiza la But y contiene una APH(3') con perfil similar a la APH(3')-II encontrada en *E.coli* (101). El gen que codificaba a esta fosfotransferasa fué clonado y expresado en *E.coli*. *Streptomyces fradie* productor de la Nm presenta actividad APH(3') y AAC(3) frente a este antibiótico (182).

En organismos productores de aminoglicósidos podemos encontrar mecanismos de resistencia de las cepas clínicas y viceversa. Sin embargo, existen excepciones. Las nucleotidilasas que se encuentran en aislados clínicos de gram negativos y gram positivos, no se han detectado en microorganismos productores de antibióticos. La nucleotidilación es una modificación enzimática de elevado gasto energético para la célula, consumiendo ATP. La procedencia real de las nucleotidilasas podría ser fosfotransferasas mutadas, ó bién antiguos restos de una forma reversible de activación ó inactivación de una molécula glicosídica, de función desconocida (65).

TABLA-12.- Microorganismos productores de aminoglicósidos y mecanismos de resistencia frente al antibiótico sistetizado.

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)

Recientemente se ha demostrado que AAC(3)-III_s de *M.fortuitum* y de *P.aeruginosa* eran inhibidas por el oxalacetato (195). Se piensa que el efecto inhibitorio se debe a una reacción de condensación entre el oxalacetato y el Acetil-Coenzima A para producir citrato. Es posible que los enzimas modificadores de aminoglicósidos posean afinidad por otros componentes además de los aminoglicósidos, y que tengan funciones metabólicas no relacionadas con la modificación de estos antibióticos. De hecho, los genes que codifican los enzimas son partes integrantes de los racimos de genes biosintéticos. Probablemente los enzimas actúan regulando las rutas biosintéticas. Es una realidad que la clonación de genes de resistencia en organismos productores ha mejorado visiblemente el rendimiento en la obtención de antibióticos (65).

Como modelo para estudiar la evolución y transferencia genética de la resistencia a los aminoglicósidos en condiciones naturales se ha elegido a las APH(3') (190). La comparación de la secuencia de aminoácidos de los enzimas APH(3')-I del transposón Tn903 y APH(3')-II del transposón Tn5, detectados en gram negativos, y de la APH(3')-III de *Staphylococcus* y *Streptococcus*, de la APH(3')-IV de *Bacillus circulans* (productor de la butirosina) y de la APH(3')-V de *Streptomyces fradie* (productor de la neomicina) mostró que habían divergido de un antecesor común. El hecho de que el gen que codifica una APH(3')-III en *Campylobacter* es idéntico al de *Streptococcus* constituye una evidencia de transferencia de ADN entre gram positivos y gram negativos.

Los microorganismos productores de antibióticos constituyen una

fuente característica de plásmidos R. El mecanismo coherente de formación de estos plásmidos es el de transposición, a lo que contribuye también la gran variedad de transferencia genética interespecífica e intergenérica. El flujo genético parece iniciarse en los estreptomicetos productores de antibióticos, propagándose luego a otros microorganismos gram positivos y gram negativos. Este trasiego genético es corroborado por el hallazgo de genes idénticos (190) en gram positivos (*Staphylococcus* y *Streptococcus*) y en gram negativos (*Campylobacter spp.*(134)).

3.6.-METODOS DE DETECCION DE LOS ENZIMAS MODIFICADORES.-

La detección e identificación de los enzimas modificadores de aminoglicósidos se puede realizar por tres métodos principales.

***Método Microbiológico ó Bioensayo.-**

Se basa en la reducción de los halos de inhibición de los aminoglicósidos producida por el extracto enzimático de las bacterias resistentes.

Sobre un césped de una bacteria sensible se colocan diferentes discos de antibióticos. Sobre estos discos se añaden cantidades concretas de extracto enzimático. Dependiendo de la reducción ó no de los halos de inhibición de los diferentes aminoglicósidos, podemos tener una idea de que tipo de enzima actúa.

Una variación de este método y que da mejor resultado es incubar previamente el disco de antibiótico con el extracto, el cofactor adecuado (Acetil-coenzima A ó ATP) y el tampón durante 30 minutos a 37°C. Este método no diferencia las adenilasas de las fosforilasas porque ambos enzimas utilizan el ATP como cofactor.

***Método Radioactivo.-**

Este método se basa en la reacción específica que llevan a cabo los enzimas. Las acetilasas transfieren el acetilo del Acetil-Coenzima A al antibiótico. Si marcamos el Acetil-Coenzima A con C¹⁴ a nivel del acetato, la radioactividad pasará al antibiótico. En el caso de las adenilasas que llevan el adenilo del ATP al aminoglicósido, se utiliza ATP marcado con C¹⁴. Las fosforilasas transfieren el fosfato del ATP al antibiótico y se utiliza ATP marcado con P³².

La reacción se lleva a cabo mezclando el extracto enzimático, el cofactor marcado radioactivamente, el tampón y el antibiótico e incubando normalmente a 37°C durante 30 minutos. De cada mezcla de reacción se toma una cantidad de muestra y se coloca sobre cuadrados de papel de fosfocelulosa. Estos papelitos se introducen en agua a 80°C para detener la reacción enzimática, se lavan varias veces y se secan. Los aminoglicósidos por sus cargas positivas quedan adheridos al papel de fosfocelulosa, que tiene cargas negativas. Durante el lavado excepto el antibiótico todos los demás productos son eliminados. Una vez seco el papel se pasa a determinar la radioactividad. Según el cofactor utilizado y el perfil de aminogli-

cósidos marcados podemos identificar las diferentes clases, subclases y tipos de enzimas (76). El problema de esta técnica se da cuando existen varios tipos de enzimas cuyos perfiles de sustratos se solapan.

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

***Método Genético.-**

Se basa en la hibridación del ADN de la cepa a estudiar con sondas genéticas específicas de un enzima. Se han sintetizado sondas de muchos de los enzimas modificadores de aminoglicósidos. La hibridación positiva de una sonda determinada con el ADN (plasmídico o total) de la cepa en estudio indicaría la presencia del gen que codifica a ese enzima, y por tanto, la existencia del propio enzima. Este método es muy específico pues sólo detecta el enzima definido por la sonda.

La combinación del método radioenzimático con la utilización de sondas genéticas permite una identificación precisa de los diferentes enzimas.

4.-PLASMIDOS DE RESISTENCIA (57,128,183).-

Al principio se pensaba que la aparición de bacterias resistentes a las drogas era el resultado de una mutación espontánea que la presión ejercida por el uso de ese producto terminaba por seleccionar. Sin embargo, la frecuencia de mutación no justificaba la diversidad ni la rapidez de aparición de los mecanismos de resistencia.

Actualmente se sabe que muchos de los determinantes de resistencia existían en las bacterias, a veces implicados en otras funciones metabólicas. A partir de estos organismos se transfirieron a otros.

Un gran número de genes de resistencia se encuentra en ADN extracromosómico, al que llamamos plásmido. Los plásmidos son moléculas de ADN bicatenario que se multiplican independientemente en las células que los alojan, y se heredan con regularidad al dividirse estas.

Tras su descubrimiento se creyó, por algún tiempo, que los plásmidos constituían una rareza. Pero bien pronto salieron de su error. Se encuentran plásmidos en casi todas las especies bacterianas y probablemente en la mayoría de sus células. Constituyen sólo una pequeña parte del genoma celular, en general del 1 al 3%. El ADN es de 100 a 1000 veces más pequeño que el cromosoma. Esto explica el que en una misma bacteria puedan coexistir varios plásmidos. Su estructura es helicoidal y superenrollada, y aparece como si los dos extremos de la doble hélice estuvieran retorcidos antes de ser engarzados covalentemente. Esta conformación entrelazada es conocida como "circulo cerrado covalente" (ccc) de ADN.

***INCOMPATIBILIDAD**

Los plásmidos son unidades autorreplicables (replicones) e independientes de la replicación cromosómica. Unos dan lugar a una sólo copia de ADN, pero los hay que originan varias. Cada plásmido controla autónomamente el número de copias que debe haber en cada célula hospedadora. Para la replicación necesitan unirse a un sitio específico de la membrana citoplasmática. La competencia entre plásmidos emparentados por una misma posición en la membrana explica el concepto de **INCOMPATIBILIDAD** que sirve de base para su clasificación. Además, la membrana podría regular en parte la replicación y segregación de los plásmidos durante la división celular.

Las funciones codificadas por los plásmidos no son esenciales para el metabolismo normal de la bacteria. Sin embargo, le darán a la célula hospedadora una supervivencia ó ventaja en el crecimiento en determinadas condiciones ambientales. Los plásmidos de resistencia a una droga conceden a la célula que los poseen la capacidad de desarrollarse en presencia de concentraciones letales de esa sustancia.

***CURACION:**

Normalmente la división de los plásmidos es paralela a la división celular para transmitirse a las células hijas. En algunos casos existe pérdida espontánea ó inducida probablemente como resultado de un defecto de su replicación. A esta pérdida de plásmidos se le denomina **CURACION**. Este fenómeno puede ser el primer indicio para determinar la especificidad del plásmido y la naturaleza de las propiedades que confiere.

Las pérdidas espontáneas son frecuentes, pero en condiciones experimentales se pueden incrementar. Un método muy utilizado es realizar un cultivo en presencia de diferentes sustancias químicas que promueven una determinada frecuencia de curación. El naranja de acridina (160), el bromuro de etidio, la mitomicina C, la rifampicina, acriflavina, duodecil-sulfato-sódico (SDS) (160), etc. actúan inhibiendo la replicación del plásmido por unión selectiva con el ADN plasmídico. La novobiocina actúa inhibiendo la ADN_{girasa} necesaria para superenrollar las cadenas de ADN (120) .

***CONJUGACION:**

La capacidad de transferencia del ADN plasmídico desde unas especies bacterianas a otras, es una de las propiedades más interesante que presentan estas moléculas. Desde el punto de vista médico es muy importante por las implicaciones que tiene en la difusión de la resistencia múltiple a antibióticos entre especies bacterianas tanto patógenas como inócuas. El proceso de transferencia ha sido llamado **CONJUGACION**.

La transferencia del ADN durante la conjugación es un fenómeno complejo. Requiere el contacto entre las paredes celulares de las bacterias donadora y receptora, además de la síntesis de "pilis" sexuales por la célula donadora. La información genética necesaria para este proceso se encuentra en el propio plásmido.

Algunos de los plásmidos más grandes, de peso molecular superior a 20×10^6 Daltons , transportan los genes que facilitan a la célula hospedadora la transferencia del plásmido. A estos plásmidos se les llama

plásmidos conjugativos. Se denomina plásmido no conjugativo al que no posee la información necesaria para la transmisión por conjugación. Normalmente los plásmidos con peso molecular bajo suelen ser no conjugativos.

***MOVILIZACION:**

Se ha observado un fenómeno curioso en bacterias gram negativas portadoras de dos plásmidos, uno conjugativo y otro no. Consiste en que al transferirse el plásmido conjugativo se puede transmitir también el no conjugativo. A este suceso se le conoce como **MOVILIZACION**. El primero en la mayoría de los casos moviliza al segundo.

Existe un método que aprovecha la movilización, para cuando queremos transferir plásmidos no conjugativos de una cepa a otra. Para este método necesitamos diferentes elementos: una cepa donadora que posea el factor de transferencia (pD); otra cepa intermedia portadora de un plásmido no conjugativo (pI) con el fenotipo interesante; y por último una cepa receptora.

Este procedimiento facilita la transferencia de plásmidos en principio incapaces de transferirse. Incluso el mismo cromosoma bacteriano ó parte de él puede moverse si se integra en un plásmido conjugativo.

***TRANSDUCCION.-**

Otro proceso por el que se pueden transferir los plásmidos no

conjugativos es la **TRANSDUCCION**. El plásmido se inserta en el genoma de un fago que se encuentra en la bacteria donadora y es transmitido por el virus cuando infecta a otra bacteria (receptora).

***TRANSFORMACION.-**

Experimentalmente se pueden introducir plásmidos en las bacterias por **TRANSFORMACION**. Consiste en internar el ADN plasmídico en una bacteria receptora. Para ello la célula tiene que ser "competente", es decir, las paredes bacterianas deben estar permeabilizadas para que el ADN pueda atravesarlas y pasar al interior celular. En este proceso sólo se necesita el ADN plasmídico (no la célula donadora) y la célula receptora.

***TRANSPOSONES.-**

Los plásmidos dentro de la célula pueden sufrir modificaciones. Tienen la posibilidad de recombinarse, bien con el ADN cromosómico ó bien con otros plásmidos. La integración produce un cambio de los genes respecto a la situación original. Esta recombinación entre unidades de ADN cromosómico y plasmídico, está controlada por enzimas del tipo de las recombinasas y de las integrasas.

La integración es más ó menos estable. En ocasiones, durante la división celular, por defecto en la replicación ó en la segregación se pierde el plásmido y con él las características que aportaba.

Existen segmentos de ADN que por su estructura génica tienen la

capacidad de salirse de su posición e insertarse en otra. A estos elementos se les denomina **TRANSPOSONES**. Pueden formar parte tanto de plásmido como del genoma bacteriano y ser los responsables de la recombinación. Tienen un importante papel en la evolución de los plásmidos bacterianos, principalmente los de resistencia.

***TIPOS DE PLASMIDOS.-**

Los plásmidos pueden llevar información de propiedades muy variadas.

****Factores sexuales:** contienen los genes necesarios para que se lleve a cabo la conjugación.

****Factores col:** portan la información genética de las bacteriocinas (proteínas de determinadas bacterias letales para otras del mismo género ó semejantes).

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

****Factores de Resistencia:** conocidos también como plásmido R presentan determinantes genéticos responsables de la resistencia de ciertas bacterias. Los plásmidos R pueden promover la elaboración de enzimas degradantes ó modificadores, como es el caso de β -lactamasas en la resistencia a β -lactámicos y de fosfotransferasas, acetilasas ó nucleotidilasas en la resistencia a los aminoglicósidos.

Son interesantes desde el punto de vista clínico por las implicaciones en el uso de antibióticos. Su importancia aumenta cuando estos plásmidos R son conjugativos y causan muchas veces los fallos en la terapia antimicrobiana con antibióticos.

El uso intensivo e indiscriminado de antibióticos selecciona la población resistente de la flora normal. Esta puede transferir sus plásmidos R a algún microorganismo patógeno. Los antibióticos facilitan esta transferencia porque propician un medio ambiente en el que sólo las bacterias resistentes a los fármacos pueden desarrollarse. Destruyen la mayor parte de la flora normal del intestino y aumentan su capacidad de invasión por otras bacterias. Provocan condiciones de pH y oxigenación en el interior del intestino que favorecen una mayor frecuencia de conjugación y transmisión de plásmidos.

Como estas condiciones de selección se dan con mayor frecuencia en los hospitales, la adquisición de plásmidos por bacterias como *E.coli*, *P.aeruginosa*, *S.marcescens*, *Klebsiella* y *Proteus*, especies que son muy abundantes, plantea problemas epidemiológicos graves.

MATERIAL Y METODOS

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

Las muestras que llegaban al laboratorio se sembraban en Agar sangre y en Agar MacConkey y se incubaban en una estufa a 37°C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se elegían colonias aisladas y se procedía a su identificación bioquímica y al análisis de su sensibilidad a antibióticos.

El criterio de elección de las *Enterobacterias* de este trabajo fué que las cepas expresaran resistencia a uno ó más aminoglicósidos.

5.- IDENTIFICACION BIOQUIMICA.-

La identificación bioquímica se ha realizado utilizando el sistema API 20E. Este sistema es una versión miniaturizada y estandarizada de los procedimientos convencionales para la identificación bioquímica de *Enterobacteriaceae* y otras bacterias gram negativas.

Consiste en una combinación de microtubos a los que se ha añadido una serie de reactivos, que permiten llevar a cabo un mínimo de veinte pruebas bioquímicas diferentes a partir de una sólo colonia bacteriana.

6.- MEDIOS DE CULTIVO.-

6.1.- MEDIOS DE AISLAMIENTO.-

* Agar de MacConkey (Difco):

Composición:

Peptona	17,000g
Proteasa-Peptona	3,000g
Lactosa	10,000g
Sales biliares	1,500g
Cloruro sódico	5,000g
Agar	13,500g
Rojo neutro.....	0,030g
Cristal violeta.....	0,001g
pH (25°C):	7.1

Preparación:

Se rehidratan 50g del medio en un litro de agua destilada, calentando hasta su total disolución. Se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos. El medio se dispone en placas de 10cm de diámetro. Se espera a que solidifique y se incuba a 37°C durante 24 horas para asegurar su esterilidad.

* Agar Sangre:

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

Triptona.....	15,0g
Peptona de soja	5,0g

Cloruro sódico.....5,0g
 Agar15,0g
 pH (25°C):7,3

Preparación:

Se rehidratan 40g 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 10cm de diámetro y se espera a que se solidifique. Las placas se incuban a 37°C durante 24 horas para asegurar su esterilidad.

6.2.- *MEDIOS DE PROPAGACION.-*

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

Composición:

Infusión de cerebro de ternero 200,0g
 Infusión de corazón de buey.....250,0g
 Proteasa-Peptona 10,0g
 Dextrosa 2,0g
 Cloruro sódico 5,0g
 Fosfato disódico 2,5g
 Agar..... 15,0g
 pH (25°C):7,4

Preparación:

Se rehidratan 52g 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 10cm de diámetro, las

cuales una vez solidificadas, se incuban a 37°C durante 24 horas para asegurar su esterilidad.

*** Caldo de infusión de cerebro y corazón.**

Composición:

Infusión de cerebro de ternera.....	200,0g
Infusión de corazón de buey.....	250,0g
Proteasa-Peptona	10,0g
Dextrosa	2,0g
Cloruro sódico	5,0g
Fosfato disódico	2,5g
Agar	15,0g
pH (25°C):	7.4

Preparación:

Se rehidratan 37g 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.

*** Medios para la conservación de cepas:**

Composición:

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

Preparación:

Se resuspenden los ingredientes en un litro de agua destilada

calentando hasta su total disolución. Se dispensa el medio en tubos pequeños (10x90mm) con tapón de rosca. Se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos y se deja solidificar con los tubos inclinados. Se incuba a 37°C durante 24 horas para asegurar su esterilidad.

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

* Agar de Mueller-Hinton (Difco):

Composición:

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

Preparación:

Se rehidratan 38g 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 14cm de diámetro. Una vez solidificadas las placas, se incuban a 37°C durante 24 horas para asegurar su esterilidad.

6.4 MEDIOS PARA CONJUGACION, TRANSFORMACION Y EXTRACCION DE PLASMIDOS.-

* Medio LB ("Luria-Bertani"):

Composición:

Bactotriptona	10,0g
Extracto de levadura	5,0g
Cloruro sódico	5,0g

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.

*** Medio de MacConkey con antibiótico:**

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

El MacConkey con antibiótico se utiliza para seleccionar a los transconjugantes y a los transformantes. En la selección de los transconjugantes se utiliza MacConkey con ácido nalidíxico y un aminoglicósido. En la selección de los transformantes se utiliza sólo aminoglicósidos. La concentración de ácido nalidíxico en las placas es de 100mg/l, de Sm y Gm es de 10mg/l, de Nt, Km y AN es de 25mg/l y de Tm es de 5mg/l.

7.-ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD A ANTIBIOTICOS.-

7.1.- ANTIBIOGRAMA.-

En los laboratorios de Microbiología se plantea diariamente la necesidad de conocer la resistencia de un gran número de cepas a diferentes antibióticos de una manera rápida y fiable. Este problema se ha resuelto con el Antibiograma.

El procedimiento utilizado es el método de Kirby-Bauer de dilución en placa.

Se emplea un medio estandarizado, Agar de Mueller-Hinton (Difco), que carece de ácido para-amino-benzoico 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. Una vez seca, se colocan los discos de antibióticos. Después de incubar a 37°C durante 24 horas se miden los halos de inhibición que se hayan originado alrededor de los discos.

De acuerdo con los criterios de interpretación utilizados habitualmente, las bacterias se clasifican como (157):

Sensibles: Aquellas que son inhibidas fácilmente con las concentraciones de antibiótico que se alcanzan en sangre tras la administración de las dosis consideradas como normales.

Moderadamente sensibles: Las que se inhiben solamente con las concentraciones que se alcanzan en las zonas donde el antibiótico se concentra –sensibilidad condicionada (208)– ó con concentraciones que se alcanzan en sangre tras la administración de dosis más elevadas de las habituales.

Resistentes: Las que no se inhiben con las concentraciones que

se alcanzan en sangre tras administrar las dosis máximas que se pueden emplear en clínica.

Las características de los discos de antibióticos que se han empleado en este estudio se recogen en la tabla-13

7.2.- *CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA.-*

La concentración mínima inhibitoria (CMI) para una cepa y un antibiótico determinado se define como la menor concentración del producto a la que no hay crecimiento visible.

El cálculo de las CMIs se realiza con el método de macro-dilución en placa con el replicador de Steer.

Se preparan diluciones seriadas de cada antibiótico, tal que cada concentración sea la mitad de la anterior. Cada una de las soluciones de antibiótico se añade a matraces con 150ml de Agar de Mueller-Hinton esterilizado y enfriado hasta 55-60°C. Se agita y se vierte en placas de Petri de 10cm de diámetro. El intervalo de concentraciones empleado va desde 128 mg/l a 0,06mg/l.

Por otro lado se preparan suspensiones bacterianas en solución salina estéril hasta obtener una turbidez que coincida con la de un patrón McFarland del 0,5. Se rellenan los pocillos del replicador con 400µl de

TABLA-13 .- Características de los discos de antibióticos utilizados en el antibiograma. Entre paréntesis se indica la abreviatura de los nombres de los antibióticos.

ANTIBIOTICOS	ABREV.	CARGA	DIAMETRO DE LAS ZONAS		
			R	I	S
AMIKACINA	(AN)	30	14	15-16	17
AMPICILINA	(AM)	10	11	12-13	14
DIBEKAMICINA	(DKB)	10	12	13-14	15
GENTAMICINA	(Gm)	10	12	13-14	15
KANAMICINA	(Km)	30	13	14-17	18
A.NALIDIXICO	(AN)	30	13	14-18	18
NETILMICINA	(Nt)	30	12	13-14	15
SISOMICINA	(Ss)	10	12	13-14	15
ESTREPTOMICINA	(Sm)	10	11	12-14	15
TETRACICLINA	(TE)	30	14	15-18	19
TICARCILINA	(TIC)	75	11	12-14	15
TOBRAMICINA	(Tm)	10	12	13-14	15

estas suspensiones. Mojando el cabezal del replicador en los pocillos se va inoculando cada placa. Todo se realiza en condiciones asépticas.

Las placas se incuban en un estufa a 37°C durante 18-24 horas. Pasado este tiempo, la menor concentración de antibiótico que no presenta crecimiento se toma como CMI. Se considera como crecimiento visible a partir de tres colonias.

8.-OBTENCION DE EXTRACTOS ENZIMATICOS.-

Se inocula 100ml 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 Instrumenrs Inc.). Se recoge en tubos de centrifuga de 200ml. Se centrifuga durante 10 minutos a 8000rpm en una centrifuga Sorvall RC5B refrigerada a 4°C. Se desecha el sobrenadante y se lava el sedimento resuspendiéndolo en 10ml de 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 2ml de tampón de sonicado frío. Se transfiere a un tubo de vidrio y se introduce en un baño de 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 Instruments Inc. EEUU). Se dan pulsos de sonicación de 40 segundos

con intervalos de 20 entre ellos, hasta totalizar 3 ó 4 minutos.

Una vez efectuada la sonicación se transfiere con pipetas Pasteur a los tubos de centrifuga de 10ml. Se centrifuga 30 minutos a 20000 rpm. Se recoge el sobrenadante, se reparte en alícuotas y se congela hasta su posterior utilización.

9.- ENSAYO DE ENZIMAS MODIFICADORES DE AMINOGLICOSIDOS.-

La actividad de los enzimas modificadores se puede detectar por medio del ensayo de fijación en papel de fosfocelulosa, ideado por Davies y col. (76), que mide la transferencia de radioactividad desde un cofactor adecuado al antibiótico.

La mezcla de reacción consta de tampón, cofactor marcado, extracto enzimático y antibiótico. La parte marcada del cofactor pasará al antibiótico por acción del enzima modificador. Haciendo uso de la propiedad de los aminoglicósidos de ser fuertemente básicos (debido a sus grupos aminos) y estar cargados positivamente a pH comprendido entre 5 y 9, podrán enlazarse fácilmente a un papel de fosfocelulosa cargado negativamente. Si impregnamos un papel de fosfocelulosa con la mezcla de reacción, después de producida ésta, y lavamos con agua, la medida de radioactividad nos dará el informe necesario. Si se detecta radioactividad significa que existía un enzima modificador.

TECNICA:

Los componentes del ensayo se mezclan en tubos de 1x7mm colocados en baños de hielo. Dependiendo del tipo de actividad que queramos detectar variarán los componentes del ensayo.

* Ensayo de Fosforilación:

10μl de tampón de fosforilasa

10μl de la solución de P³²-ATP

10μl de extracto enzimático

2μl de solución de antibiótico de 10mg/ml

* Ensayo de Nucleotidilación:

10μl de tampón de adenilasa

10μl de solución de C¹⁴-ATP

10μl de extracto enzimático

2μl de solución de antibiótico de 1mg/ml

* Ensayo de acetilación:

10μl de tampón de acetilasa

10μl de solución de C¹⁴-Acetil-Coenzima-A

10μl de extracto enzimático

2μl de solución de antibiótico de 1mg/ml

Se deben colocar siempre en cada serie de ensayo, tubos control en los que se mezclan todos los componentes excepto el extracto enzimático ó el antibiótico.

Agitamos los tubos y los ponemos a incubar en un baño a 30°C durante 30 minutos. Pasado este tiempo, volvemos a colocar los tubos en un

baño de hielo y transferimos 20 μ l de cada tubo a un cuadrado (1cm²) de papel de fosfoCelulosa 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 con unos 500ml 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 no empleado, se desecha. Los papeles se lavan tres ó cuatro veces con agua destilada fría y luego se secan con lámparas de rayos infrarrojos.

Los papeles se colocan en viales que contienen 5 ó 10ml de la solución de contador de centelleo, y se cuentan (Becman 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 retirando muestras a diversos tiempos para contarlas. Las variaciones de actividad por cambios de la concentración de sustratos se pueden estudiar realizando el ensayo con diferentes concentraciones de antibiótico.

REACTIVOS:

*Tampón de sonicado: Tris-HCl 10mM, MgCl₂ 10mM, NH₄Cl 25mM, β -mercaptoetanol 0,6mM, 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:1,1168g/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	2ml
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		10,69g
Agua destilada	csp	100ml
Ditiotreitol 0,5M	0,10ml
DDT		3,86g
Agua destilada	csp	50ml

Agua destilada 15,00ml

Acido maleico 1M

Preparación:

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

*Tampón de adenilasa:

Composición:

Tris-HCl 1M 2,00ml

MgCl₂ 1M 1,25ml

NH₄Cl 2M 6,00ml

Ditiotreitol 0,5M 0,10ml

Agua destilada 15,00ml

Acido maleico

Preparación:

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

*Tampón de acetilasa:

Composición:

Tris-HCl 1M 25ml

MgCl₂ 1M 5ml

Ditiotreitol 0,5M 1ml

Agua desionizada 40ml

Preparación:

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

*Solución de P³²-ATP:

Composición:

ATP 50mM pH:7,2.....15μl

ATP 0,2756g

Agua destilada 10ml

P³²-ATP.....10-100μl

El isótopo de fósforo P³² tiene una vida media muy corta. Pasado un mes de la fecha de marcage del ATP hay que añadir 10μl más por cada semana que pase. Sólo se puede llegar hasta 100μl ya que pasado éste tiempo el P³² ha perdido su actividad.

Agua desionizada.....1ml

Preparación:

Se mezcla y se mide la actividad de la preparación. Se considera útil una actividad de unas 20000cpm/μl de solución. Si da menos debe añadirse más P³²-ATP. Para un ensayo prospectivo se puede utilizar con menos actividad.

*Solución de C¹⁴-ATP (10μi/ml):

Composición:

ATP 0,1M..... 25μl

ATP 5,072g

Agua	100ml
C ¹⁴ -ATP (25μCi/ml)	1,000ml
Agua desionizada	1,475ml

Preparación:

Mezclar y comprobar actividad.

***Solución de C¹⁴-Acetil-Coenzima A:**

Composición:

C ¹⁴ -Acetil-Co-A (50-60Ci/mol).	
Acetil-Co-A trilitium	3,52mg
Agua desionizada	6ml

Preparación:

El C¹⁴-Acetil-Co-A viene liofilizado en envases con 50-60Ci/mol de actividad. A este envase se le añade 2ml de agua y se agita. Pesamos los 3,52mg de Acetil-Co-A sin marcar y lo disolvemos en 4ml de agua. A continuación se mezclan las dos suspensiones y se comprueba la actividad de la solución.

***Solución de antibióticos:**

Ensayo de fosforilasas:.....	10mg/ml
Ensayo de adenilasas y acetilasas.....	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 deja agitando toda la noche.

10.- TRANSFERENCIA DE ADN PLASMIDICO.-

10.1.- CONJUGACION.-

El proceso se inicia inoculando tubos de 5ml de LB con cultivos frescos de la cepa donadora y receptora. Se incuban en una estufa a 37°C durante 24 horas. Pasado este tiempo se toman 50µl del cultivo de la donadora y 100µl del cultivo de la receptora y se depositan sobre una placa de medio rico (119) que puede ser de agar de infusión de cerebro y corazón ó agar con soja tríptica (Difco). Se mezclan bien sin extender por toda la placa. Se incuban en una estufa a 37°C durante 24 horas. Se recoge todo lo que ha crecido y se resuspende en 5ml de solución salina. De esta suspensión se toman 100µl y se extiende en placas de MacConkey con ácido nalidíxico y un aminoglicósido. La extensión se realiza con una pipeta Pasteur doblada. Se incuban en una estufa a 37°C durante 24 horas.

A las colonias aisladas se le hace un antibiograma. En caso de un crecimiento denso se hará un aislamiento previo al antibiograma. La cepa receptora de conjugación es un *E.coli* K.12 resistente al ácido nalidíxico y lactosa positivo. Con algunas de las cepas resistentes al ácido nalidíxico

se utilizó, como receptora para la conjugación, una estirpe de *E.coli* resistente a 1000 μ g/ml de estreptomicina.

10.2.- TRANSFORMACION.-

Se ha empleado el procedimiento de transformación con Cloruro cálcico (110).

Se inocula 10ml de medio LB con una colonia de la bacteria a transformar y se incuba a 37°C durante 18 horas.

En un erlenmeyer de 250ml de capacidad y con 150ml de LB se introduce 1ml del cultivo crecido. Se incuba a 37°C con agitación hasta una densidad de 5×10^7 cells/ml (D.O550=0,5).

Se transfiere a tubos estériles de centrifuga de 200ml de capacidad y se deja en hielo durante 10 minutos. Se centrifuga a 8000 rpm durante 5 minutos y a 4°C. Se descarta el sobrenadante y se resuspende en 1/2 del volumen inicial de una solución fría de 100mM Cl₂Mg y 10mM de Tris-Cl. Se mantiene a 4°C hasta el día siguiente (12-24 horas). Ahora ya tenemos a la célula receptora competente, es decir, preparada para poder adquirir al ADN.

La mezcla de transformación consta de 200 μ l de células competentes, 10-15 μ l de la solución de ADN (en Te: 10mM Tris a pH=8 y 1mM de EDTA, ó en agua destilada).

Esta mezcla se mantiene en hielo de 30 a 45 segundos. Luego se introduce en un baño a 42°C durante 3 minutos. Se saca y se deja 15 minutos a 4°C. Se añaden 700ml de LB y se incuba 1 ó 2 horas a 37°C. Gotas de 100µl de este cultivo se depositan en placas de MacConkey con un aminoglicósido. Se cultiva a 37°C de 24 a 48 horas.

A las colonias que hayan crecido se les hace un antibiograma para confirmar la adquisición de la resistencia y una extracción de plásmidos para identificar el plásmido introducido.

11.- ANALISIS DEL ADN PLASMIDICO.-

11.1.- EXTRACCION DE ADN PLASMIDICO.-

La extracción de ADN plasmídico se llevo a cabo por el Método de Lisis Alcalina de Kado y Liu (87).

Se prepara un cultivo de la célula en estudio en 5ml de medio LB y se incuba a 37°C durante 18 horas.

Se centrifuga 1,5ml del cultivo en tubos Eppendorf a 14000 rpm durante 3 minutos en una cetrífuga Eppenforf 5415. Se elimina el sobrenadante. Se añade al mismo tubo 1,5ml más de cultivo y se repite la centrifugación. Se elimina el sobrenadante completamente.

Se resuspende el sedimento en 200µl de TEK y luego se le añade

400µl de la solución de lisis de Kado. Se mezcla por inversión y se incuba en un baño a 55°C durante 30 minutos.

Pasado este tiempo se le añade 600µml de fenol:cloroformo (1:1) y se mezcla en el agitador de tubos. Se centrifuga 7 minutos a 14000 rpm.

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

Se añaden 100µl de la solución de acetato potásico 3M y pH:4,8. Se mezcla por inversión del tubo y se mantiene 10 minutos en un baño de hielo. Luego se centrifuga 5 minutos a 14000 rpm.

Del sobrenadante se cogen 400 µl evitando tocar el precipitado y se transfieren a un nuevo tubo Eppendorf.

Se añaden 800µl 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 conseguido mejores resultados manteniendolos a -20°C hasta el día siguiente. Posteriormente se centrifugan 7 minutos a 14000 rpm.

Se elimina con precaución el Etanol, evitando perder el precipitado de ADN. Se añaden 500µl de Etanol al 70% a temperatura ambiente y se mezcla por inversión. Se centrifuga 5 minutos a 14000 rpm y se elimina con precaución el Etanol. Para que se evapore completamente mantenemos los tubos abiertos en una estufa a 45°C durante 10 minutos. Una vez estén secos

los tubos se le añade de 30 a 50 μ l de agua fría destilada y estéril ó de TE.

11.2.- ELECTROFORESIS DE ADN EN GEL DE AGAROSA (87,110).-

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 se depositará la muestra. Se utiliza una concentración de agarosa del 0,7%.

La electroforesis se lleva a cabo sumergiendo el gel en tampón TAE en una cubeta horizontal 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 luz ultravioleta con un transiluminador LKB 2011 MACROVUE.

Los geles se fotografían con una cámara Polaroid MP-a y carretes Polaroid 667. Algunas fotografías se tomaron con una cámara NIKON y película pancromática de 400-650ASA (DIN 27-29).

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

*TEK: Tampón de Tris-base 40mM y EDTA 2mM.

Composición:

Trisma-base	4,85g
EDTA	0,75g
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. La solución se prepara 10 veces concentrada.

***Solución de lisis de Kado:** Tris-base 50mM y SDS al 3% pH:12,6.

Composición:

a) NaOH 4M:

NaOH16g

Agua destilada csp100ml

Disolver y distribuir en alícuotas. Conservar a -20°C.

b) Solución base de Kado:

Trizma-base 0,6g

SDS 3,0g

Agua destilada csp 100ml

Disolver y conservar a 4°C.

Preparación:

A 100ml de la solución base de Kado se le añade 200µl de NaOH 4M. Agitar y ajustar el pH a 12,6. Debe utilizarse inmediatamente.

***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 destilada28,5ml

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

Composición:

EDTA 0,25M 200,0ml
EDTA 93g
Agua destilada csp 1000ml
Trizma-base 242,0g
Acido acético glacial57,1ml
Agua destilada csp.....1000,0ml

Preparación:

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

Para obtener un litro de TAE, se mezclan 20ml de TAE 50x con 980ml 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 IM 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 (fenol).

Se mezcla de nuevo con un volumen igual de Tris IM a pH:8 y se repite el proceso anterior. Este procedimiento se repetirá tantas veces como 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 IM 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 IM a pH:8.

Se añaden las cantidades necesarias de cloroformo y alcohol isoamílico. Luego se le añade un poco de Tris IM a pH:8 de manera que cubra toda la superficie y con un grosor de 1cm. 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 H₂O

Se almacena a 4°C.

12.- ISOELECTROENFOQUE:

El isoelectroenfoque es una técnica de separación de proteínas en función de sus puntos isoeléctricos (pIs) en un gradiente de pH y voltaje. Cada proteína migra hacia la zona del gradiente cuyo pH corresponde al de su pI, con lo que la carga neta se hace cero quedando inmovilizada en el campo eléctrico. Esta técnica es muy valiosa para la identificación de isoenzimas ya que una diferencia de sus pIs de 0,02 unidades de pH es suficiente para la separación.

Nosotros utilizamos geles de poliacrilamida con un rango de pH de 3 a 9 adquiridos a LKB. Los electrodos que se emplean son tiras de papel de filtro grueso (2mm de espesor y 8mm de ancho) que se empapan en las soluciones correspondientes. La solución catódica es hidróxido sódico 1M y la solución anódica es ácido ortofosfórico 1M.

La aplicación de la muestra se efectúa mediante fragmentos de papel Whatmann 3MM (5x10mm). Los fragmentos de papel se sumergen en la muestra con ayuda de unas pinzas limpias y se colocan en los pocillos

situados en la zona catódica del gel, dejando una separación de unos 8mm entre ellos.

El enfriamiento se lleva a cabo con un caudal de agua a 10°C cuyo flujo oscila entre 4 y 10 l/min.

La fuente de alimentación que se emplea es la LKB Biochrom 2103 Power Supply. Se aplica una potencia máxima de 40 vatios. Inicialmente la intensidad es muy elevada (unos 50mA) pero desciende rápidamente a medida que se forma el gradiente de pH. El voltaje se debe ir aumentando lentamente hasta que se alcance la máxima potencia. Se aplica una diferencia de potencial de 1000 voltios y se permite el desarrollo del proceso durante una hora.

Una vez finalizado el isoelectroenfoque, el gel se secciona en trozos de 1x0,5mm. Cada fragmento se introduce en tubo de ensayo con 40μl del tampón de sonicado.

El ensayo radioenzimático se realiza añadiendo 20μl del tampón apropiado, 10μl del cofactor marcado con radioactividad y 2μl de la solución de antibiótico. Se incuba 30 minutos a 30°C. Se recogen 40 μl de esta mezcla de reacción y se depositan sobre cuadrados de papel de fosfoCelulosa. El proceso que sigue ya se ha descrito anteriormente en el ensayo enzimático.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los objetivos básicos de nuestro trabajo son la detección e identificación de los enzimas modificadores de aminoglicósidos que causan resistencia a estos antibióticos, y la localización en plásmidos de los genes que codifican estos enzimas en estirpes de *Enterobacterias* procedentes de pacientes del Hospital Insular.

La identificación de las *Enterobacterias* se realizó por el sistema API 20E. La elección de las estirpes bacterianas se basó en que fueran resistentes a uno o más aminoglicósidos. Se recogieron 141 aislados que cumplían este requisito. A cada uno se le asignó un número de identificación para su reconocimiento.

Encontramos 16 especies diferentes de *Enterobacterias*: 49 *E.coli*, 17 *K.pneumoniae*, 15 *K.oxytoca*, 1 *K.ozaenae*, 13 *E.cloacae*, 5 *E.zakazakii*, 1 *E.aerogenes*, 11 *S.marcescens*, 6 *S.liquefaciens*, 8 *C.freundii*, 1 *C.diversus-levinea*, 4 *P.stuartii*, 1 *P.rettgeri*, 5 *P.mirabilis*, 4 *M.morganii*, 1 *Salmonella*.

La resistencia a los aminoglicósidos se determinó inicialmente con antibiogramas. Los resultados se exponen en la tabla-A (anexo). En la realización de los antibiogramas se emplearon 8 aminoglicósidos (Tm, Gm, Sm, Nt, AN, Ss, Km y DKB), ampicilina (AM), tetraciclina (TE), ticarcilina (TIC) y ácido nalidíxico (NA).

Para valorar el nivel de resistencia se calcularon las CMI de

14 aminoglicósidos: Tm, Sm, Gm, Nt, AN, Ss, Km, DKB, Rm, Pm, Ap, Nm, Sp, Is. Las CMI_s críticas para considerar a una bacteria resistente, moderadamente sensible ó sensible a los diferentes aminoglicósidos se definen en la tabla-14. Los resultados de las CMI_s se muestran en la tabla-B (anexo).

En algunos aislados no correlacionan las CMI_s calculadas con los resultados obtenidos con el antibiograma. Este problema lo encontramos principalmente con la Nt y DKB. Cuando los valores de CMI_s para estos antibióticos están entre 8 y 32µg/ml es frecuente que las estirpes muestren en el antibiograma halos que rondan los límites de sensibilidad/sensibilidad-moderada. Una justificación a este fenómeno es que el antibiograma es más sensible al efecto inóculo y el espesor de las placas de Mueller-Hinton puede influir. En la obtención de las CMI_s, la concentración de antibiótico es homogénea y al ser los aminoglicósidos antibióticos bactericidas, el efecto inóculo, dentro de unos límites, no altera significativamente el valor de la CMI.

La Gm, Tm, Nt, DKB y AN son los aminoglicósidos utilizados con más frecuencia en medios hospitalarios para el tratamiento de infecciones por *Enterobacterias*. El análisis de la CMI₅₀ y CMI₉₀ (tabla-15) de estos antibióticos demuestra que la AN es el antibiótico más eficaz. El 96,45% de los organismos estudiados inhiben su crecimiento a una concentración de AN de 4µg/ml. Sólo 4 estirpes, n^{os} 21, 37, 44 y 69, son resistentes a la AN y además con niveles bajos, CMI: 64µg/ml. Estos bajos porcentajes de resistencia a la AN, a pesar de su uso, se han encontrado también en otros Hospitales (9,210). Price y col. (143) pronosticaron que la resistencia a la AN surgiría lentamente ya que hay pocos mecanismos que causen resistencia

TABLA-14.- CMIs (en mg/l) críticas para considerar a una *Enterobacteria* sensible (S), mederadamente sensible (I) ó resistente (R).

ANTIBIOTICOS	S	I	R
Gentamicina	≤4	8	≥16
Tobramicina	≤4	8	≥16
Netilmicina	≤4	8	≥16
Amikacina	≤16	32	≥64
Sisomicina	≤4	8	≥16
Dibekamicina	≤4	8	≥16
Neomicina	≤4	8	≥16
Paromomicina	≤4	8	≥16
Ribostamicina	≤4	8	≥16
Kanamicina	≤4	8	≥16
Estreptomycin	≤8	16	≥32
Espectinomicina	≤20	40-80	≥80
Apramicina	<16	16	>16

TABLA-15.- CMI₅₀ y CMI₉₀ (en mg/l) de las estirpes de *Enterobacterias*.

ANTIBIOTICOS	CMI ₅₀	Nº.org.	CMI ₉₀	Nº.org.
Gm	64	74	≥128	141
Tm	8	32	32	127
Nt	16	90	64	127
DKB	16	76	128	134
AN	2	117	4	136
Is	1	104	2	131

a este antibiótico.

La Gm es el menos eficaz; 87 estirpes presentan CMI's superiores a 16µg/ml, de las que 36 son >128µg/ml.

Comparando las CMI₅₀ y CMI₉₀ (tabla-15) de la Tm, DKB y Nt observamos que son muy similares. Al determinar el número de estirpes sensibles, moderadamente sensibles y resistentes a estos antibióticos obtenemos que hay más resistentes a la Tm y DKB que a la Nt (tabla-16).

Todas las estirpes de *S.marcescens* y 5 de 6 de *S.liquefaciens* son resistentes a la mayoría de los aminoglicósidos, excepto a la AN, Ap e Is. Las multirresistencias de los aislados clínicos de *Serratia* son frecuentes (83,88).

Una vez analizadas las resistencias nos interesaba determinar si los diferentes aislados presentaban actividad enzimática modificadora de aminoglicósidos. La detección de los enzimas se realizó mediante el ensayo radioenzimático con unos pocos aminoglicósidos. Dependiendo del tipo de actividad utilizamos unos antibióticos u otros:

FOSFORILASAS: Sm, Nm, Km

ADENILASAS: Sm, Sp, Gm, Km, Tm

ACETILASAS: Gm, Km, Tm

Todas las cepas de este estudio presentaban actividad enzimática.

TABLA-16.- Número de estirpes sensibles (S), moderadamente sensibles (I) y resistentes (R) a Tm, DKB, Nt, Gm y AN.

ANTIBIOTICOS	S	I	R
Tm	50	18	73
DKB	48	9	84
Nt	62	28	51
Gm	53	0	88
AN	137	0	4

A continuación se pasó a la identificación de los enzimas presentes en cada estirpe. Para la tipificación se utiliza una gama mayor de sustratos que dependen también del tipo de actividad que hayamos detectado:

FOSFORILASAS: KmA, KmB, Km (complejo), Nm, Bt, Lm, Pm, Rm, AN, Sm, Gm (complejo).

ADENILASAS: Gm (complejo), Ss, Tm, AN, KmA, KmB, Km (complejo), Nm, Pm, Bt, Lm, Rm, Sm, Sp, Nt DKB.

ACETILASAS: GmC₁, GmC_{1a}, Gm (complejo), Ss, KmA, KmB, Km (complejo), Tm, DKB, Nm, Bt, Lm, Pm, Rm, AN, Nt, Ap, 2'-N-Nt, 6'-N-Nm, Dactinomicina.

A las estirpes que eran resistentes sólo a Sm ó a Sm y Sp, no se les hace el perfil, pues en la detección preliminar quedan definidos los enzimas que presentan.

Los perfiles de sustrato de las cepas con actividad fosforilasa se muestran en la tabla-C (anexo); con actividad adenilasa en la tabla-D (anexo); y con actividad acetilasa en la tabla-E (anexo).

Los valores expresados en estas tablas son porcentajes aproximados de actividad. Para obtener estos valores, consideramos los centelleos por minutos (cpm) exhibidos por un determinado antibiótico menos las del blanco como el valor 100, y a la actividad del blanco como 0. El resto de los valores se calculan con una regla de tres:

B: actividad del blanco

Ax: actividad del aminoglicósido de referencia

Ay: actividad del aminoglicósido que vamos a calcular

$$\% = \frac{A_y - B}{A_x - B} = \text{porcentaje de actividad}$$

En los perfiles de fosforilasas la actividad de la Nm es el valor 100 y en los de adenilasas y acetilasas la de la Gm (complejo) o la de GmC1a.

Hemos elegido varias estirpes como ejemplos de los diferentes perfiles y actividades enzimáticas encontradas, y de cómo se interpretan los resultados.

Como ejemplo de actividad fosforilasa escogemos a la estirpe n° 39. La actividad en cpm y los porcentajes calculados se muestran en la tabla-17. Observamos que los antibióticos con un grupo hidroxilo en posición 3' son modificados y dan valores altos, mientras que la Gm, que no posee este grupo, no es modificada y no presenta actividad (740 cpm, 3% actividad). Detectamos también una pequeña actividad con la Sm (2310 cpm, 13%). Dedujimos, por tanto, que en el extracto de este microorganismo hay dos enzimas fosforilasas, uno que actúa sobre el grupo hidroxilo en 3', la APH(3'), y otro que fosforila a la Sm (que no tiene grupo hidroxilo en 3'), la APH(3").

Analizamos las CMI's para comprobar la veracidad de estos resultados. Este aislado presenta el siguiente patrón de resistencia: Sm, Km, Rm, Pm y Nm. Al ser resistente a la Sm confirmamos la presencia de la APH(3"). La resistencia a Km, Nm, Pm y Rm es típica de los organismos con APH(3') (64,132). Los datos obtenidos con el método radioenzimático coin-

TABLA-17.- Perfil enzimático de la actividad fosforilasa del aislado n° 39.

ANTIBIOTICOS	CPM	%	% RELATIVO
Blanco	250	0	0
KmA	5060	29.53	30
KmB	9930	59.43	59
Nm	16530	100	100
Bt	9690	57.96	58
Lm	1540	7.95	8
Pm	11890	71.47	71
Rm	10240	61.34	61
AN	1590	8.22	8
Sm	2310	12.64	13
Gm	740	3	3

Los valores se han calculado considerando la actividad de la Nm como 100%.

ciden con las CMIs.

De los 141 aislados, en 84 se detecta la APH(3') y casi todos ellos exhiben el fenotipo de resistencia "Km, Rm, Pm, Nm". Sólo la estirpe n° 178 presentaba actividad fosforilasa del tipo APH(3') y basándonos en las CMIs, era resistente a la Km, moderadamente sensible a la Rm y Pm, y sensible a la Nm.

Examinando las CMIs comprobamos que la mayoría de las cepas con resistencia a la Km, Rm, Pm y Nm, sintetizan la APH(3'). En tres aislados (n°s 132, 154 y 203) con este patrón no detectamos actividad fosforilasa.

A pesar de estas excepciones los resultados obtenidos con el método radioenzimático correlacionan con la CMIs. Por tanto, podemos basarnos en las resistencias para aventurar el mecanismo de inactivación por medio de la APH(3').

Hemos observado que la actividad de las APH(3'') es significativamente menor que la de las APH(3'). Por esta razón, al hallar el porcentaje, el valor con la Sm en muchos aislados aparece muy disminuído. Al comparar con otros sustratos se podría pensar que la Sm no es modificada y, sin embargo, se le asigna a la estirpe una APH(3''). Esto se debe a que consideramos que hay modificación de la Sm por fosforilación con actividades que son superiores a unas 7 u 8 veces el blanco.

Detectamos APH(3'') en 85 aislados, de los que 29 sólo tenían a este enzima como única actividad fosforilasa, y 17 como único enzima

modificador de aminoglicósidos.

Como ejemplo de actividad adenilasa seleccionamos la de la estirpe n° 173.

Los enzimas nucleotidilasas son muy inestables in vitro (12) y pierden rápidamente su actividad. Normalmente los extractos de las estirpes con estos enzimas expresan cpm bastante bajas. Añadiendo ditiotreitol (12) conseguimos mejores actividades. A pesar de esta dificultad la estirpe n° 173 expresó unos niveles de actividad enzimática considerables y ésta fué la causa de su elección como ejemplo.

En la tabla-18 presentamos los valores en cpm y porcentajes obtenidos con el extracto de la cepa n° 173. Los valores para Gm, Ss, Nt, Tm, DKB y Km, con un grupo hidroxilo en 2", son elevados, mientras que para Nm, que no presenta este grupo, es muy bajo (446 cpm, 6%). Sospechamos que el enzima es una ANT(2") (13,98). No puede ser una ANT(4') porque la Gm, Ss y Nt son modificadas y carecen de grupo hidroxilo en posición 4'.

Esta estirpe es resistente , según sus CMIs, a Tm, Gm, Ss, Km y DKB, y sensible a Nt, AN, Rm, Pm y Nm. Este fenotipo de resistencia es característico de los microorganismos con ANT(2") (64,97). Confirmamos, por tanto, la presencia de este enzima.

Es notable que la estirpe modifique a la Nt con una actividad del 99% (6152 cpm), y sin embargo, sea sensible a este antibiótico con una CMI de 1µg/ml.

TABLA-18.- Perfil enzimático de la actividad adenilasa de la estirpe n° 173.

ANTIBIOTICOS	CPM	%	% RELATIVO
Blanco	123	0	0
Gm	6223	100	100
Ss	11216	181.75	182
Tm	6011	96.52	97
AN	512	6.37	6
Km	8496	137.26	137
Nm	473	5.73	6
Pm	258	2.21	2
Rm	240	1.91	2
Sm	1567	23.67	24
Sp	859	12.06	12
Nt	6152	98.83	99
DKB	6627	106.62	107

Los valores se han calculado considerando a la actividad de la Gm como 100%

Bongaerts y Molendijk (12) explicaron este hecho, típico de las ANT(2"), basándose en la relación V_{max}/K_m de la actividad de este enzima con la Nt. Esta relación es una medida relativa de la eficacia fisiológica de la modificación enzimática del antibiótico. Al comparar la de la Nt con la de otros sustratos, observaron que era muy baja y por tanto justificaba la sensibilidad de las estirpes a este antibiótico. Es posible también que la Nt modificada por nucleotidilación en posición 2" conserve su capacidad antimicrobiana (86).

El extracto del aislado n° 173 adenilaba a la Sm y Sp aunque con menos actividad, y la cepa era resistente a estos dos antibióticos. Deducimos, por tanto, la presencia de otra adenilasa, la AAD(3").

De los 141 microorganismos estudiados, sólo en 9 se detectó ANT(2"). Todos eran resistente a Gm, Ss, Tm, DKB y Km, y sensibles a la Nt y AN. La actividad AAD(3") se localizó en 69 estirpes y todas eran resistentes a Sm y Sp.

Estudiando las CMIs, el patrón de resistencia Gm, Ss, Tm, DKB y Km, y sensibilidad a la Nt se correspondía con las estirpes con ANT(2"). Sin embargo encontramos 22 aislados que eran resistentes a la Sm y Sp y no presentaban actividad adenilasa. Sabiendo lo lábiles que son estas enzimas, pensamos que puede haber un fallo del sistema de detección. Otra explicación es que la resistencia no sea enzimática. Existen mecanismos de resistencia a la Sm y Sp debidos a alteraciones de proteínas ribosómicas (15,55). Este tipo de resistencia no la hemos estudiado.

Encontramos 83 aislados (59,6% del total), con actividad acetilasa. Como ejemplo, elegimos seis cepas porque detectamos seis perfiles enzimáticos diferentes. Las estirpes seleccionadas son la n° 15 como ejemplo de la AAC(3)-I, la n° 43 de la AAC(3)-II, la n° 26 de la AAC(3)-III, la n° 47 de la AAC(3)-V, la n° 69 de la AAC(6')-I y la n° 197 de la AAC(6')-II (tabla-19).

Analicemos el perfil de la cepa n° 43. Hay actividad con la Gm, Ss, Km, Tm, DKB y Nt. Descartamos la AAC(2') y la AAC(6') porque la 2'-Nt y la 6'-Nt son acetiladas. Por tanto es una AAC(3). Como tiene actividad y es resistente a la Gm, Ss, Km, Tm, DKB y Nt, concluimos que es un enzima AAC(3)-II (203).

El perfil de la cepa n° 47 es similar al anterior pero la Km no es sustrato. Estudiando la CMI vemos que esta cepa es resistente a la Gm, Ss, Tm, DKB y Nt. Por tanto se trataba de un enzima AAC(3)-V.

Algunos autores (140,203) dudan de que la AAC(3)-II y AAC(3)-V sean enzimas diferentes, ya que los perfiles enzimáticos son muy similares. Si sólo analizamos la actividad con la Km, por una diferencia de 5 al 15% no vamos a definir un nuevo enzima. Pero estudiando como se refleja esta modificación en el fenotipo de resistencia obtenemos la clave para distinguir los dos enzimas. La cepa n° 43 es resistente a Km (CMI 32 mg/l) y la cepa n° 47 es sensible (CMI 4 mg/l). La cepa n° 43 no presenta ninguna otra actividad modificadora de aminoglicósidos que pudiera explicar la resistencia a la Km. Por tanto, es la resistencia a la Km lo que utilizamos para distinguir a los dos enzimas (64).

TABLA-19.- Perfiles enzimáticos de las actividades acetilasas.

I.- Perfil de la cepa n° 15

ANTIBIOTICOS	CPM	%	% RELATIVO
Blanco	311	0	0
Gm	18453	100	100
Ss	8014	42.45	42
KmA			
KmB			
Km	691	2.09	2
Tm	9454	50.39	50
DKB	7647	40.43	40
Nm	302	0	0
Pm	324	0	0
Rm	322	0	0
AN	460	0	0
Nt	1516	6.64	7
Ap	417	0	0
2'-Nt			
6'-Nt			
Dact			

Los valores se han calculado considerando la actividad de la Gm como 100%

TABLA-19.- Perfiles enzimáticos de las actividades acetilasas (continuación).

II.- Perfil de la cepa n° 26.

ANTIBIOTICOS	CPM	%	% RELATIVO
Blanco	255	0	0
Gm	45744	100	100
Ss	31358	67.37	68
KmA			
KmB			
Km	16656	36.03	36
Tm	36098	78.79	79
DKB	32760	71.45	71
Nm	17501	37.91	38
Pm	3033	6.10	6
Rm	29027	63.25	63
AN	1370	6.19	6
Nt	34027	74.24	74
Ap	3033	6.10	6
2'-Nt	14793	32.34	32
6'-Nt	21898	48.14	48
Dact	1055	2.32	2

Los valores se han calculado considerando la actividad de la Gm como 100%

TABLA-19.- Perfiles enzimáticos de las actividades acetilasas
(Continuación).

III.- Perfil de la cepa n° 43.

ANTIBIOTICOS	CPM	%	% RELATIVO
Blanco	610	0	0
Gm	70770	100	100
Ss	30190	42.03	42
KmA	12510	14.70	15
KmB	22750	31.40	31
Km			
Tm	34120	47.64	48
DKB	42000	58.90	59
Nm	3400	3.75	4
Pm	3000	3.18	3
Rm	710	0	0
AN	1680	1.3	1
Nt	8230	15.96	16
Ap	1160	1.02	1
2'-Nt	23250	36.14	36
6'-Nt	29810	41.48	41
Dact	1720	1.36	1

Los valores se han calculado considerando la actividad de la Gm como 100%

TABLA-19.- Periles enzimáticos de las actividades acetilasas
(Continuación).

IV.- Perfil de la cepa n° 47.

ANTIBIOTICOS	CPM	%	% RELATIVO
Blanco	317	0	0
Gm	37491	100	100
Ss	24251	64.38	64
KmA			
KmB			
Km	2344	5.45	5
Tm	25313	67.24	67
DKB	11459	29.97	30
Nm	1509	3.2	3
Pm	1056	1.98	2
Rm	1462	3.08	3
AN	1472	3.1	3
Nt	11924	31.22	31
Ap	1472	3.1	3
2'-Nt	5159	13.88	14
6'-Nt	7237	19.47	19
Dact	850	1	1

Los valores se han calculado considerando la actividad de la Gm como 100%

TABLA-19.- Perfiles enzimáticos de las actividades acetilasas
(Continuación).

V.- Perfil de la cepa n° 69

ANTIBIOTICOS	CPM	%	% RELATIVO
Blanco	750	0	0
Gm	22140	100	100
Ss	18500	82.98	83
KmA	34110	155.96	156
KmB	26890	122.2	122
Km			
Tm	35740	163.58	164
DKB	34820	159.28	159
Nm	22740	102.8	103
Pm	2050	6.07	6
Rm	14077	62.3	62
AN	11830	51.79	52
Nt	14090	62.36	62
Ap	1690	4.39	4
2'-Nt	26410	119.96	120
6'-Nt	3840	14.44	14
Dact	3100	10.98	11

Los valores se han calculado considerando la actividad de la Gm como 100%

TABLA-19.- Perfiles enzimáticos de las actividades acetilasas
(Continuación).

VI.- Perfil de la cepa n° 197

ANTIBIOTICOS	CPM	%	% RELATIVO
Blanco	212	0	0
Gm	37223	100	100
Ss	24272	65.01	65
KmA			
KmB			
Km	41938	112.73	113
Tm	37826	101.62	102
DKB	40802	109.67	110
Nm	25831	69.21	69
Pm	1037	2.22	2
Rm	38141	102.48	102
AN	28017	75.12	75
Nt	25646	68.72	69
Ap	744	1.43	1
2'-Nt			
6'-Nt			
Dact			

Los valores se han calculado considerando la actividad de la Gm como 100%

Cuando las cepas contenían APII(3') junto con la actividad AAC(3), no podíamos emplear la resistencia a la Km como base para diferenciar a la AAC(3)-II de la -V. En estos casos nos fundabamos sólo en la actividad con la Km. Así, las cepas n° 208, n° 205 y n° 200 mostraban una actividad del 38%, del 29% y del 32% respectivamente con la Km, y se les asignó un enzima AAC(3)-II.

El perfil de la cepa n° 26 es similar al de la cepa n° 43. Modifica a los mismos sustratos y además a la Nm. Se ha descrito una acetilasa, la AAC(3)-III, que modifica a la Gm, Ss, Tm, Km y Pm en la estirpe de *P.aeruginosa* PST (10). Este microorganismo exhibía una sensibilidad moderada a la Nm y era resistente a todos los demás. La cepa n° 26 no presenta actividad con la Pm, es sensible a la Nm y moderadamente sensible a la Km. A pesar de que no coincide exactamente con el perfil del enzima encontrado en *P.aeruginosa* PST, nos decidimos a identificarla como AAC(3)-III ya que ni la AAC(3)-I, -II ni -V actúan sobre la Nm, y no podía tratarse de una AAC(3)-IV (23) porque la Ap no era un sustrato y la cepa era sensible a este antibiótico.

Examinando el perfil de la cepa n° 69 observamos una diferencia significativa con los anteriores. La actividad con la 6'-Nt (3840 cpm, 14%) es mucho más baja que con la 2'-Nt (26410 cpm, 120%) y con la Nt (43045 cpm, 62%). La carencia de un grupo amino libre en posición 6' impide que el antibiótico sea modificado. Nos encontramos ante una AAC(6') (88). Además, la Pm, que no contiene grupo amino en posición 6' (79) tampoco es modificada. La Km es mejor sustrato que la Gm. La AN también es modificada. Estudiando las CMI's obtenemos que esta estirpe es resistente a la AN

(CMI:64mg/l) y sensible a la Gm (CMI:0,5mg/l). La identificamos como AAC(6')-I (64,166).

Con esta actividad enzimática observamos de nuevo como un antibiótico es modificado, la Nm (22740 cpm; 103%), y la estirpe es sensible (MICs: 4mg/l). Benveniste y Davies (8) comprobaron que algunos aminoglicósidos acetilados conservaban su actividad antimicrobiana. Así, la N-acetil-KmA, N-acetil-NmB y N-acetil-GmC_{1a} retenían cierta actividad antibiótica aunque no tan potente como el producto no acetilado. Otros autores han detectado AAC(6') que modifica a la Nm pero sin inactivarla (63).

Con frecuencia se describe a la resistencia como un fenómeno de todo o nada basandose en las determinaciones de las CMIs, cuyas medidas no exceden de 16 ó 32mg/ml. Radika y Northrop (150) mostraron que la resistencia es relativa y viene determinada por las características cinéticas del enzima que media la resistencia. Además, el que un antibiótico sea sustrato de un enzima no significa necesariamente que la bacteria productora del enzima sea resistente. Para ello es necesario que el antibiótico sea un "buen sustrato", es decir, una relación V_{max}/K_m alta (12,150).

La cepa n^o 15 es resistente a Gm y Ss y sensible a Tm, Km, Nt, DKB, AN, Rm, Pm, Nm y Ap. El perfil que expresa es el de una AAC(3)-. Aunque no disponemos de la 2'-Nt y 6'-Nt, al no ser sustrato la Nm ni la Km podemos descartar las actividades AAC(2') y AAC(6'), por tanto, concluimos que era un enzima AAC(3). Al ser sólo resistente a Gm y Ss, decidimos que es una AAC(3)-I. En este perfil no pudimos contar con la dactimicina que nos

hubiera confirmado este resultado, ya que, este antibiótico es modificado únicamente por la AAC(3)-I y por el enzima bifuncional AAC(6')-APH(2") (116).

Analizamos el perfil de acetilasa de la cepa n^o 197 y estudiamos las CMIs calculadas. La Pm no era sustrato y la Nm y Km si. La actividad con la Km era más elevada que con la Gm. La AN también era modificada pero no inactivada pues la cepa era sensible a este antibiótico. Se nos planteó el problema de que tampoco disponíamos de la 2'-Nt y de la 6'-Nt. Podíamos pensar que nos encontrábamos ante una AAC(3)-III, sin embargo, la actividad con la Km (113%) y Nm (69%) era mayor que la de las estirpes con AAC(3)-III (36% con la Km y 37% con la Nm). A esto se le añadía la actividad con la AN (75%). Concluimos que se trataba de una AAC(6'). Como la estirpe era sensible a la AN y resistente a la Gm, clasificamos al enzima como una AAC(6')-II (64,166).

Con el examen del perfil enzimático y de resistencias de la cepa n^o 21 no pudimos clasificar la acetilasa presente. El aislado era resistente a casi todos los aminoglicósidos utilizados, excepto a la Ap, a la que era sensible, y a la Is, a la que era moderadamente sensible. Mostraba actividad con los aminoglicósido ensayados excepto con Pm y Ap. La actividad con la 2'-Nt es doble de la actividad con la 6'-Nt por lo que supusimos se trataba de una AAC(6'). Sin embargo, la cepa era resistente tanto a la AN como a la Gm. Es posible que nos encontrásemos ante una nueva AAC(6') ó con dos acetilasas juntas en un mismo aislado y que ocasionaran este perfil. Mas adelante explicaremos como determinamos los enzimas asignados a esta estirpe.

Inicialmente la estirpe n° 16 presentaba un fenotipo de resistencia y un perfil enzimático similar al de la cepa n° 21. Sin embargo, esta estirpe perdió espontáneamente parte de su resistencia. La cepa presentaba anteriormente unas CMI's para la AN, Km y Rm de 64, 128 y 128mg/l respectivamente, y ahora de 1, 8 y 1mg/l. El perfil enzimático también ha variado y ahora corresponde al de una AAC(3)-V. Este aislado presentaba, por tanto, dos actividades acetilasas.

Basándonos en lo explicado con los ejemplos, determinamos los enzimas encontrados en las 83 estirpes que presentaban actividad acetilasa. El enzima acetilasa más frecuente es la AAC(3)-V que se detectó en 62 aislados (74,7% de las acetilasas). La AAC(3)-III se localizó en 6 estirpes (7,2%); la AAC(3)-II en 8 (9,6%); la AAC(3)-I en uno (1,2%) la AAC(6')-I en 4 (4,8%) y la AAC(6')-II en 2 (2,4%).

Las AAC(3) son uno de los mecanismos más frecuentes de resistencia a los aminoglicósidos en Europa. En las estirpes aisladas de nuestro hospital, el 54,3% presentaban resistencia a los aminoglicósidos producidas por AAC(3).

La Is es un aminoglicósido nuevo que está en fase de experimentación. La potencia y espectro de actividad es similar al de la AN excepto en que es menos modificado por el enzima AAC(6')-I (122). Por ahora se ha observado que la Is es modificada por la AAC(6')-I. Aunque no disponemos de los datos de modificación enzimática, estudiando las CMI's comprobamos los resultados de otros autores (122). Sólo cuatro estirpes

presentaban una CMI de 8mg/l encontrándose ésta en el rango de sensibilidad moderada. Estas cuatro cepas, n^{os} 21, 37, 44 y 69, eran resistentes a la AN (CMI \geq 64mg/l) y presentaban actividad AAC(6')-I.

Antes de 1983 la mayoría de las resistencias a la Gm, Tm, Nt, DKB ó AN tenían su origen en la presencia de un sólo enzima modificador: acetilasa, fosforilasa ó adenilasa (122). Sin embargo, los resultados de investigaciones más recientes demuestran que cada vez tienen más importancia las combinaciones de enzimas modificadores (167,211). La frecuencia de las combinaciones observadas en algunos países son del 17,6% en Bélgica, 23,0% en EEUU, 41,5% en Italia y del 66,8% en Argentina (122).

La coexistencia de varios enzimas modificadores se da también en nuestra colección de *Enterobacterias*. La frecuencia es del 73,05%. Las combinaciones encontradas y el número de cepas que las presentan, se muestran en la tabla-20.

Dejando a un lado los enzimas APH(3'') y AAD(3'') y las resistencias a la Sm y Sp, en la tabla-21 reflejamos los patrones enzimáticos más significativos y las resistencias que originan.

La combinación más frecuente es AAC(3)-V con APH(3'). Estos dos enzimas en una misma cepa, ocasionan la resistencia a Tm, Gm, Nt, Ss, DKB, Km, Rm, Pm y Nm. La combinación de AAC(6')-II, AAC(3)-II ó AAC(3)-III con APH(3') producen el mismo patrón de resistencia.

TABLA-20.- Patrones enzimáticos encontrados en las *Enterobacterias* estudiadas y número de cepas que presentan cada patrón.

Nº org.	PATRON ENZIMATICO			
17	APH(3")			
6	AAD(3")			
2	APH(3')			
1	AAC(6')-I			
2	ANT(2")			
1	AAC(3)-I			
3	AAC(3)-II			
1	AAC(3)-II			
5	AAC(3)-V			
4	APH(3")	AAD(3")		
11	APH(3")	APH(3')		
1	AAD(3")	APH(3')		
3	AAD(3")	ANT(2")		
1	AAD(3")	AAC(6')-I		
1	APH(3")	AAC(6')-I		
6	AAC(3)-V	APH(3')		
5	AAC(3)-V	AAD(3')		
1	AAC(3)-V	APH(3")		
8	APII(3')	AAD(3")	APH(3")	
1	ANT(2")	APH(3')	APH(3")	
2	AAD(3")	APH(3')	AAC(6')-II	
5	APH(3')	APH(3")	AAC(3)-II	
4	APH(3')	AAD(3")	AAC(3)-III	
1	APH(3")	APH(3')	AAC(3)-III	
13	APH(3")	APH(3')	AAC(3)-V	
13	AAD(3")	APH(3')	AAC(3)-V	
6	APH(3")	AAD(3")	AAC(3)-V	
3	ANT(2")	APH(3")	AAD(3")	APH(3')
1	APH(3")	AAC(3)	APH(3')	AAC(6')-I
13	APH(3')	AAD(3")	APH(3")	AAC(3)-V

TABLA-21.- Principales patrones enzimáticos y las resistencias que originan en los microorganismos que los poseen.

PATRONES ENZIMATICOS	RESISTENCIAS
APH(3') AAC(3)-V	
APH(3') ANT(2")	
APH(3') AAC(6')-II	Tm Gm Ss Nt DKB Km Rm Pm Nm
APH(3') AAC(3)-II	
APH(3') AAC(3)-III	
APH(3') AAC(3) AAC(6')-I	Tm Gm Ss Nt DKB AN Km Rm Pm Nm

La presencia de AAC(6')-I, AAC(3) y APH(3') en una misma cepa genera un patrón de multirresistencia con grandes implicaciones en terapéutica. La estirpe que contiene esta combinación es resistente a la Tm, Gm, Ss, Nt, DKB, AN, Km, Rm, Pm y Nm. Además presenta una APH(3") que causa resistencia a la Sm. Afortunadamente sólo se detectó en un aislado.

La presión selectiva ejercida por el uso de los aminoglicósidos es uno de los factores que contribuye a que se desarrolle un determinado tipo de mecanismo de resistencia a esta clase de antibióticos. En las cepas de nuestro estudio, el uso hospitalario de la Km, anteriormente, y de la Gm, Tm y Nt, posteriormente, ha generado la combinación AAC(3)-V + APH(3').

La información genética para la síntesis de estos 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.

El siguiente paso que realizamos fué la conjugación. Utilizamos como receptora a la estirpe de *E.coli* K-12 resistente al ácido nalidíxico. En la colección de *Enterobacterias* hay 118 que ^{no} eran resistentes al ácido nalidíxico. Conseguimos que 98 estirpes transmitieran su resistencia por conjugación a *E.coli* K-12.

Disponíamos de otra estirpe receptora, un *E.coli* resistente a 1mg/ml de Sm. Con esta receptora se conjugaron dos cepas, n° 21 y n° 198.

A las estirpes que no se conjugaron le realizamos una

extracción de ADN plasmídico e intentamos transformar a la estirpe de *E.coli* HB101. Conseguimos transformar con ADN de las cepas n^{os} 37 y 43.

La estirpe n^o 10 perdió espontaneamente su resistencia a los aminoglicósidos. Estas pérdidas de resistencias son un indicio de que estaban codificadas por genes plasmídicos.

La resistencia se localizó en plásmidos en 109 cepas, es decir en un 73%. Los plásmidos eran conjugativos en 100 cepas es decir en el 71% de las bacterias estudiadas.

Para conocer las resistencias transmitidas se hicieron antibiogramas y se determinaron las CMI de los transconjugantes. Los resultados se muestran en las tablas-A y -B (anexo) junto con los de las cepas donadoras. Para identificar a los transconjugantes, al número de la cepa donadora le añadimos una letra. Si la receptora fue el *E.coli* K-12 resistente al ácido nalidíxico, la letra es T; si fue el *E.coli* resistente a 1mg/ml de Sm se usa la S. A los transformantes se le añade la letra H. En los casos que salieron dos ó más transconjugantes ó transformantes, a la letra le acompaña ún número, por ejemplo 130T1 y 130T2.

Para comprobar que los plásmidos transmitidos codificaban la síntesis de enzimas modificadores de aminoglicósidos, llevamos a cabo el método radioenzimático con los transconjugantes. Utilizamos uno ó dos antibióticos para detectar la actividad enzimática. Las actividades detectadas se encuentran en la tabla-F (anexo) junto con la lista de enzimas encontradas en cada cepa.



Examinando las actividades de los transconjugantes, tenemos que la actividad AAC(3) se transfirió de 52 cepas, la AAC(6')-I de 3, la ANT(2") de 7 y la APH(3') de 84. El enzima APH(3') es el que se transfiere con más frecuencia.

Comparando las CMI's de los transconjugantes con las de las donadoras, advertimos que hay una tendencia de los transconjugantes a mostrar niveles de resistencias más altos.

Recordemos el caso de la cepa n° 178. Este aislado presentaba actividad fosforilasa del tipo APH(3'), y sin embargo, era moderadamente sensible a la Pm y Rm y sensible a la Nm. Al conjugarla conseguimos dos transconjugantes, 178T1 y 178T2. El 178T1 exhibía un patrón de resistencia más amplio, "Tm, Gm, Ss, Nt, DKB, Km, Pm, Rm, Nm", y actividad acetilasa y fosforilasa. El 178T2 presenta un patrón de resistencia más corto, "Km, Rm, Pm, Nm", y actividad fosforilasa únicamente. Ambos fosforilaban a la Nm y además mostraban CMI's para la Nm, Pm y Rm superiores a 128mg/l. La estirpe n° 178 sintetiza un enzima que modifica a la Nm, Pm, Rm y Km. En los transconjugantes esta modificación implica inactivación del antibiótico pero en la donadora no. Las causas de esta diferencia no se han determinado. Es posible que en el aislamiento de los transconjugantes hayamos realizado una presión selectiva escogiendo la forma más eficaz del enzima. Aunque, ya decía Le Goffic y col (101) que los valores de CMI dependen no sólo de la afinidad y velocidad de inactivación enzimática del antibiótico, sino también de la velocidad de acumulación por la célula entera. Si en la cepa n° 178 la velocidad de entrada de la Nm, Pm y Rm en el interior de la bacteria es mayor que la velocidad de inactivación, puede quedar suficiente

antibiótico activo como para ejercer su función bactericida y acabar con la célula. En los transconjugantes, la velocidad de entrada del antibiótico puede ser menor que la de inactivación, el enzima inactiva todo el antibiótico que entra y esto explicaría el que sean resistentes.

En otros casos la actividad enzimática expresada por los transconjugantes nos ha revelado el tipo de enzima modificador presente en la estirpe donadora. La cepa n° 169 era resistente a Tm, Sm, Gm, Ss, Km, DKB, Rm, Pm, Nm y Sp. Mediante el ensayo radioenzimático sólo encontramos actividad fosforilasa. Al ser resistente a Tm, Gm y DKB, y sensible a Nt, sospechamos que había una adenilasa pero la actividad que detectábamos era tan baja que no podíamos asegurarlo. De la conjugación obtuvimos dos transconjugantes, el 169T1 y el 169T2. El 169T1 era resistente a la Sm, Km, Pm, Nm y Sp y presentaba actividad adenilasa. La 169T2 era resistente a la Tm, Sm, Gm, Ss, DKB, Km, Pm, Rm, Nm y Sp y muestra actividad fosforilasa con la Gm. Confirmamos nuestra sospecha de que la cepa n° 169 sintetizaba una adenilasa. El perfil enzimático de la 169T2 correspondía al de una ANT(2") y se exhibe en la tabla-D (anexo).

Con la estirpe n° 154 también utilizamos al transconjugante para detectar y definir la adenilasa que causaba la resistencia.

Las estirpes n^{os} 74, 127 y 128 , resistentes a Km, Nm, Pm y Rm, expresaban una actividad tan baja de fosforilación que no podíamos utilizarla para comprobar el mecanismo de resistencia a estos antibióticos. Sin embargo, los transconjugantes daban un buen nivel de actividad fosforilasa y los empleamos para realizar los perfiles que les asignamos a

las cepas donadoras (tabla-D, anexo).

Prince y Jacoby (145) describieron una estirpe de *P.aeruginosa* que era resistente a la Gm pero en el extracto enzimático no se detectaba actividad modificadora de aminoglicósidos. La resistencia venía codificada en un plásmido. Clonaron el gen de resistencia a la Gm en un plásmido con gran número de copias de *E.coli*. El extracto enzimático de las bacterias portadoras de este plásmido híbrido poseía una actividad enzimática claramente mayor que la estirpe de *P.aeruginosa*. Por amplificación del número de copias del gen, el producto génico fué detectado con certeza. Bongaert y Kaptijn (11) encontraron una estirpe de *E.coli* resistente a la AN a causa de una APH(3')-II. La resistencia se debía a un aumento del número de copias de un plásmido.

En la explicación del incremento de actividad que muestran algunos de nuestros transconjugantes, no podemos aplicar el aumento del número de copias, pues el plásmido es el mismo. Lo que si podemos pensar es que en *E.coli* K-12 algunos plásmidos se expresan con mayor productividad reflejándose en el aumento de actividad enzimática y del nivel de resistencia (CMIs más altas).

Estudiando las resistencias y actividades enzimáticas observamos que 73 estirpes transmitieron íntegramente a la estirpe receptora su resistencia a los aminoglicósidos.

Las estirpes n^{os} 41, 132 y 190 sólo transmitieron la resistencia a la Sm. La estirpe n^o 154 que presentaba actividad APH(3') y

ANT(2"), cedió la ANT(2"). La n° 106 que contenía los enzimas AAD(3"), APH(3') y AAC(3)-V, traspasó la AAD(3") y APH(3') pero no la AAC(3)-V.

La cepa n° 105 sintetiza AAC(3)-III, APH(3') y AAD(3"). Con la conjugación conseguimos dos transconjugantes. El 105T1 expresaba actividad APH(3') y AAD(3"), y el 105T2 APH(3'). No logramos transferir la resistencia por la AAC(3)-III. Con las estirpes n°s 89 y 103 ocurrió lo mismo.

Otras 15 cepas también originaron dos transconjugantes. En 13, uno de los transconjugantes expresaba todas las resistencias y actividades de la donadora, y el otro , sólo una parte.

Con las cepas n°s 178 y 204 uno de los transconjugantes presentaba una parte de las actividades y el segundo la otra. Así, el 178T1 era resistente a los mismos antibióticos que la donadora excepto a la Sm y mostraba actividad AAC(3) y APH(3'). El 178T2 era resistente a la Sm, Km, Nm, Pm y Rm y con actividad APH(3') y APH(3"). La cepa n° 204 presentaba actividad AAC(3)-V y APH(3"). El transconjugante 204T1 adquirió la APH(3") y el 204T2 la AAC(3)-V.

De la cepa n° 130 derivaron tres transconjugantes. El 130T1 era resistente a la Sm y contenía una APH(3"). El 130T2 mostraba actividad APH(3'), APH(3") y AAC(3), y la 130T3, sensible a la Sm, expresaba actividad APH(3') y AAC(3).

Con la finalidad de caracterizar los plásmidos existentes en la población de *Enterobacterias*, analizamos y relacionamos las resistencias de

los diferentes transconjugantes. Si una cepa donadora transmitía su resistencia a los aminoglicósidos originando un sólo tipo de transconjugante, considerábamos el fenotipo del transconjugante como el del plásmido transferido.

Cuando se originaban dos transconjugantes sabíamos que habían dos plásmidos implicados, pero no siempre era posible delimitar las resistencias de cada uno. Cojamos como ejemplo los transconjugantes de la cepa n° 204. El 204T1 es resistente a Sm y el 204T2 a Tm, Gm, Nt, Ss, DKB, TIC y AM. En este caso los dos plásmidos quedan perfectamente definidos. Ahora estudiemos los transconjugantes de la cepa n° 149. El 149T1 es resistente a Tm, Sm, Gm, Nt, Ss, Km, DKB, TIC, AM y TE; y el 149T2 a Sm, TIC y AM. Se podría deducir que el fenotipo del 149T2 pertenece a un plásmido y que el del 149T1 se debe a la presencia del plásmido de la 149T2 junto con otro. En un principio pensamos que suprimiendo las resistencias del primero podríamos entresacar las resistencias del otro plásmido. Pero desistimos de ello cuando analizando los transconjugantes de la cepa n° 179 obtuvimos dos plásmidos diferentes que codificaban la resistencia a la Sm. El 179T1 era resistente a Sm, TIC y AM, y el 179T2 a Tm, Gm, Nt, Ss, Km, DKB y Sm. Para este resultado hay dos explicaciones. Una de ellas es que la célula donadora posea dos plásmidos diferentes que codifican resistencia a la Sm. Otra explicación es que la bacteria contenga tres plásmidos, uno que lleva la resistencia a Tm, Gm, Ss, Nt y DKB, otro a Sm, y otro a TIC y AM, y que transfiriera dos plásmidos a cada transconjugante. La resolución de esta incognita implicaría poder separar los tres plásmidos en transconjugantes o transformantes diferentes, pero no lo hemos conseguido.

Basándonos en lo anterior conseguimos elaborar 30 patrones de resistencia. Para designar cada patrón utilizamos las iniciales PR con un número. La lista de patrones, las resistencias que les corresponden y el número de transconjugantes en el que se localizan, se muestran en la tabla-22.

Examinando las resistencias de los transconjugantes vemos que 28 habían captado la resistencia a los aminoglicósidos únicamente mientras que 90 ofrecían resistencia a otros tipos de antibióticos además de a los aminoglicósidos.

Observamos que la resistencia a la TIC, AM, MA y TE se transfiere con cierta frecuencia junto con la de los aminoglicósidos. De 76 donadoras resistentes a TIC y AM, 68 transmitieron esta resistencia junto con la de los aminoglicósidos. Además, 16 traspasan la resistencia al MA junto con la de AM y TIC.

La resistencia a la TE acompaña a la de los aminoglicósidos en 44 (37,3%) transconjugantes, de los que 39 (33%) son asimismo resistentes a la AM y TIC, y 17 (14,6%) a AM, TIC y MA. Diversos autores han descrito plásmidos que codifican resistencia a los aminoglicósidos junto con la de otros antibióticos como β -lactámicos (52,69,169,184,203), tetraciclinas (96,154) y sulfamidas (28,41,123).

La importancia de la difusión de plásmidos R que confieren resistencia a aminoglicósidos y otros antibióticos es incuestionable, ya que

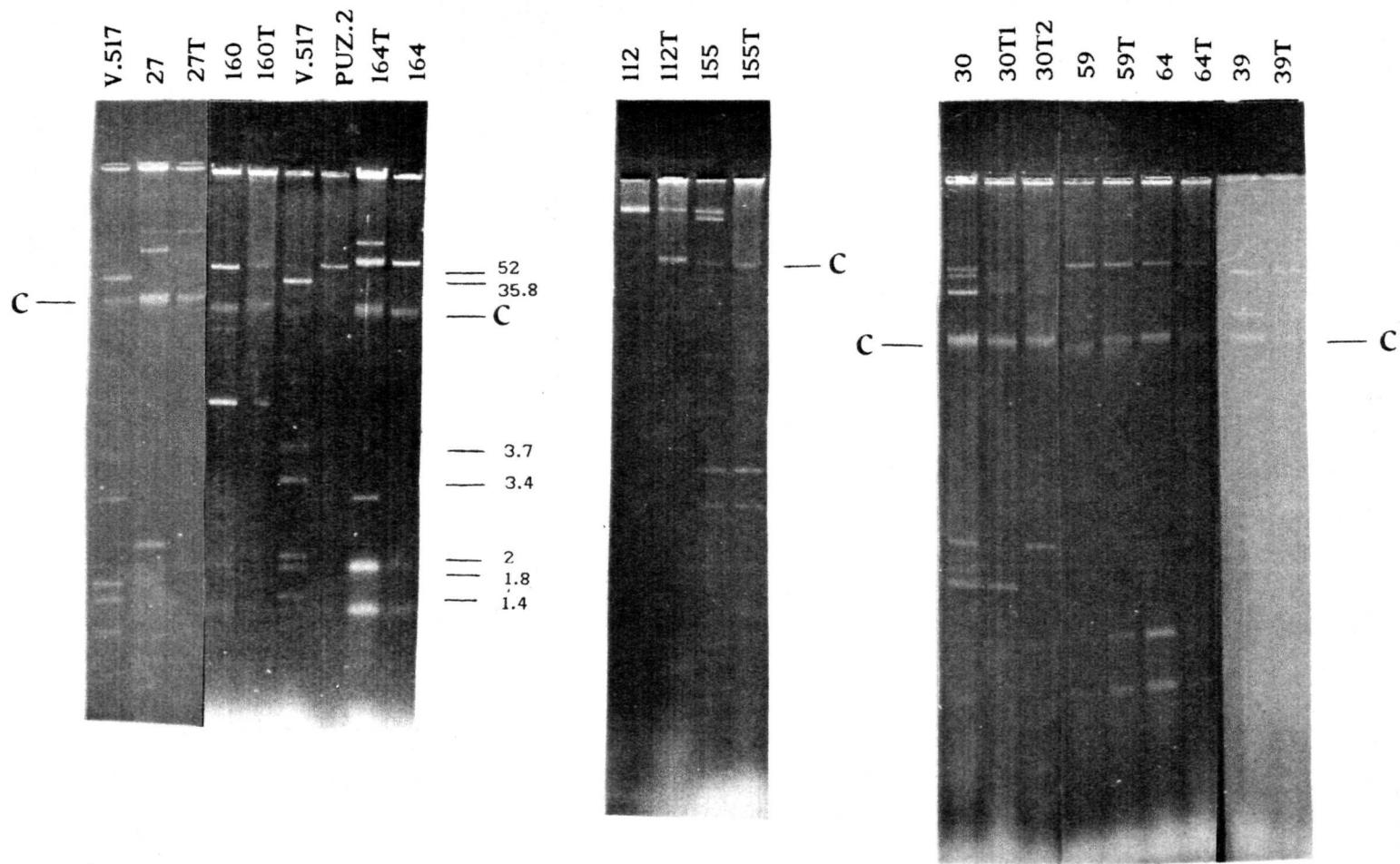
TABLA-22.- Patrones de resistencia (PR) y número de transconjugantes en que se localizan

	PATRON DE RESISTENCIA	Nº TRANSC.
PR1	Tm Sm GmNt Ss KmDKB TIC AM TE MA	6
PR2	Tm Sm GmNt Ss KmDKB TIC AM TE	7
PR3	Tm GmNt Ss KmDKB TIC AM TE	5
PR4	Tm GmNt Ss KmDKB TIC AM TE MA	6
PR5	Tm Sm GmNt Ss KmDKB TIC AM	3
PR6	Tm Sm GmNt Ss KmDKB TIC AM MA	3
PR7	Tm Sm GmNt Ss DKB TIC AM TE MA	4
PR8	Tm GmNt Ss KmDKB TIC AM MA	1
PR9	Tm Sm GmNt Ss DKB TIC AM	2
PR10	Tm GmNt Ss DKB TIC AM	4
PR11	Tm GmNt Ss DKB TIC AM TE MA	1
PR12	Tm Sm GmNt Ss KmDKB	7
PR13	Tm Sm Gm Ss KmDKB TIC AM TE	1
PR14	Tm Sm Gm Ss KmDKB TIC AM	1
PR15	Tm Gm Ss KmDKB TIC AM	1
PR16	Tm GmNt Ss KmDKB	2
PR17	Tm Sm Nt Ss KmDKB TIC AM AN	1
PR18	Tm Sm Nt Ss KmDKB AN	1
PR19	Tm Sm GmNt Ss KmDKB TIC AM TE AN	1
PR20	Sm Km TIC AM TE	8
PR21	Sm Km TIC AM	13
PR22	Sm Km AM TE	2
PR23	Sm TIC AM	11
PR24	Sm AM TE	1
PR25	Sm AM	2
PR26	Sm TE	1
PR27	Sm Km	3
PR28	Km	6
PR29	Sm	9
PR30	Km AM TE	1

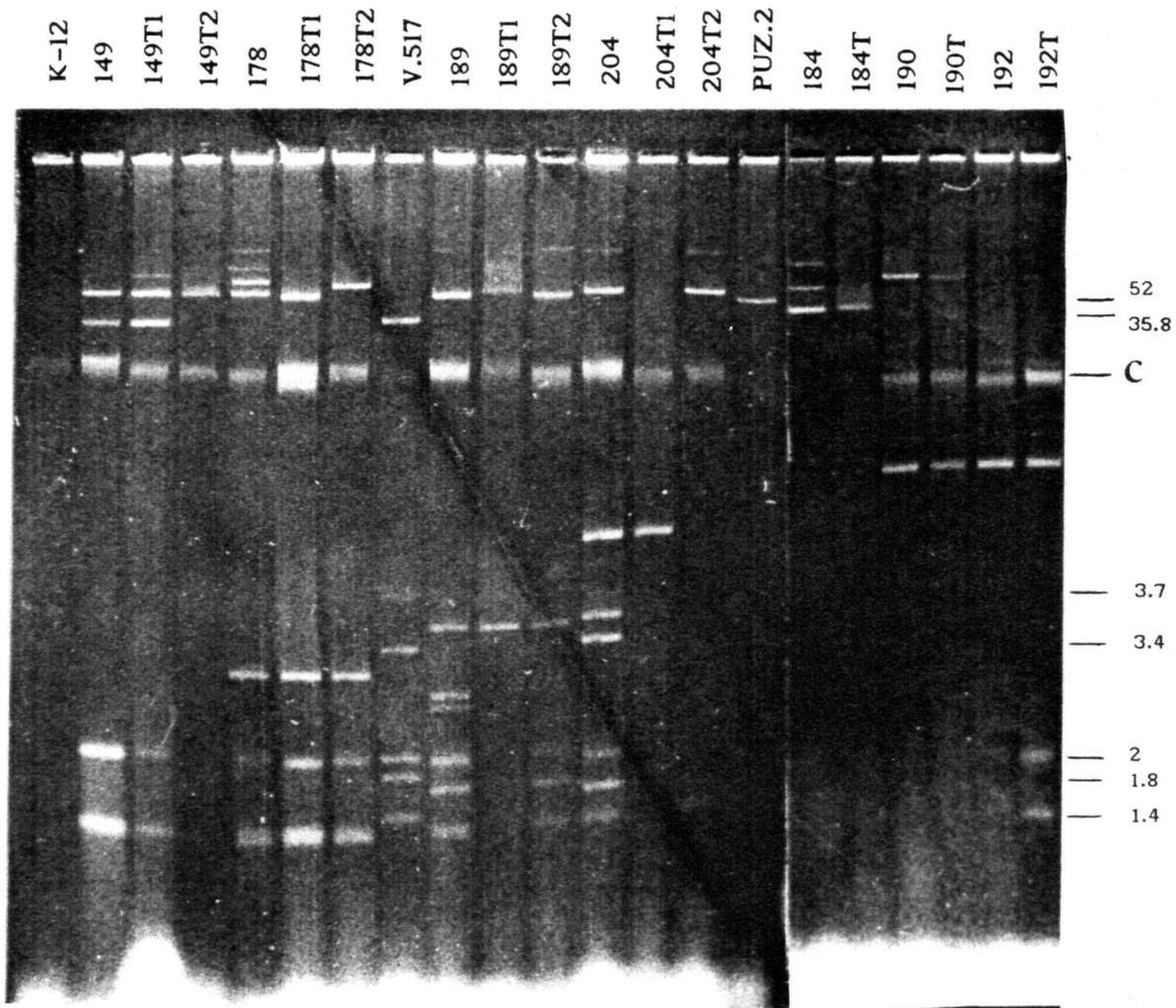
el uso de una clase de antibióticos puede seleccionar la resistencia a otros. Esto es particularmente importante con los β -lactámicos. La resistencia a la AM se ha extendido de tal manera que un gran porcentaje de aislados clínicos son resistente a éste fármaco. Los plásmidos de resistencia a las cefalosporinas, inicialmente afectaban a las de primera generación y algunas de segunda. Desde hace pocos años se han detectado plásmidos de resistencia a cefalosporinas de tercera generación (69). Esto es significativo porque algunos de estos nuevos plásmidos transportaban también resistencia a los aminoglicósidos. Aunque en los transconjugantes que hemos obtenido no encontramos resistencia a cefotaxima, si que observamos un 14% de resistencia a MA, un 57,6% de resistencia a TIC y un 63,12% de resistencia a AM. Cuando los genes de resistencia a los aminoglicósidos y β -lactámicos se encuentran en un mismo plásmido ó transposón, aunque los mecanismos bioquímicos de resistencia sean diferentes, se produce una resistencia cruzada. Por este motivo y a la vista de nuestros resultados consideramos necesario llevar un seguimiento y control de los plásmidos de multiresistencia que aparecen en los hospitales.

Para completar el estudio de los plásmidos realizamos la extracción de ADN plasmídico y electroforesis en geles de agarosa. Ante la imposibilidad de presentar fotografías de todas las extracciones de ADN plasmídico de donadoras y transconjugantes hemos elegido algunos ejemplos (fotografías 1, 2, 3 y 4).

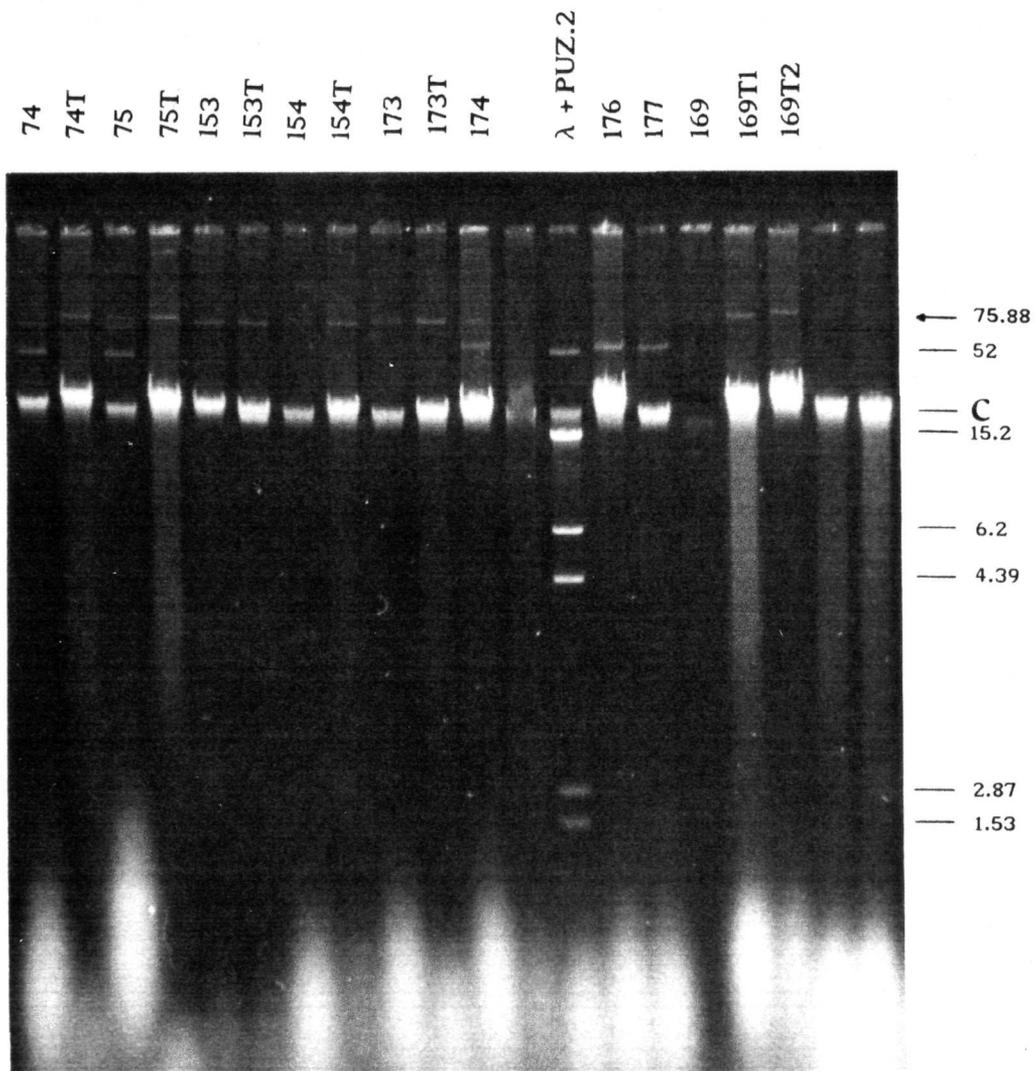
Nos encontramos ante una población heterogénea de plásmidos con pesos moleculares desde 1,3 a 102 Md. Con mucha frecuencia las cepas donadoras presentaban más de un plásmido y sorprendentemente, también



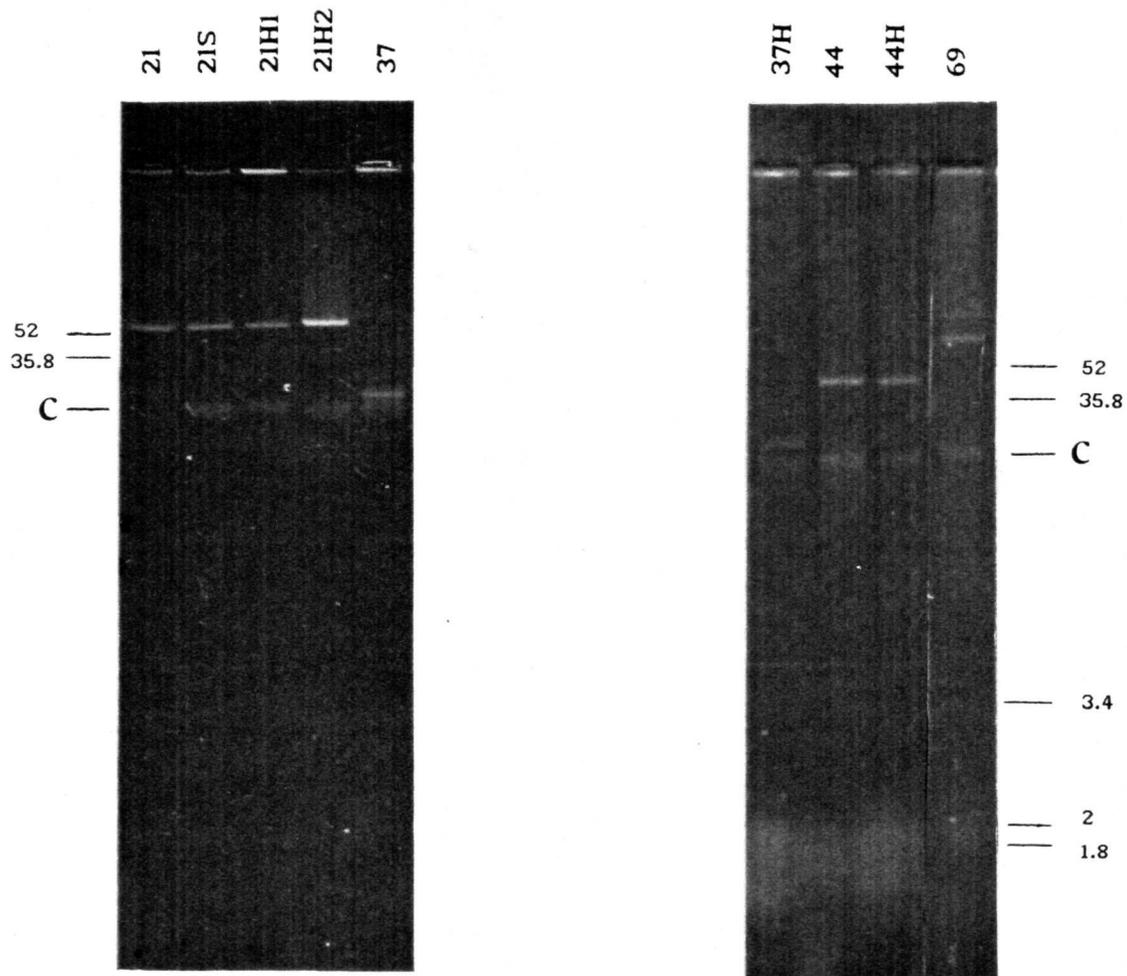
FOTOGRAFIA-1.- Electroforesis de la extracción de ADN plasmídico de las estirpes señaladas.



FOTOGRAFIA-2.- Electroforesis de la extracción de ADN plasmídico de las estirpes señaladas.



FOTOGRAFIA-3.- Electroforesis de la extracción de ADN plasmídico de las estirpes con actividad enzimática ANT(2").



FOTOGRAFIA-4.- Electroforesis de la extracción de ADN plasmídico de las estirpes con actividad enzimática AAC(6').

algunos de sus transconjugantes.

Los transconjugantes de las cepas n^{os} 27 y 160 expresan únicamente actividad acetilasa. La estirpe n^o 27 poseía tres plásmidos con los siguientes pesos moleculares: 89,1, 63,1 y 2,3Md (Fotografía-1). El transconjugante contenía un sólo plásmido de 89,1Md. El aislado n^o 160 llevaba tres plásmidos de 45,2, 12,3 y 4,3Md (Fotografía-1) y expresaba actividad AAC(3)-II. El transconjugante 160T contenía el plásmido de 45,2Md y la actividad enzimática.

La cepa n^o 184 mostraba tres plásmidos de 97,7, 66,1 y 52Md (Fotografía-2) y sintetizaba APH(3'). El transconjugante adquirió el plásmido de 52Md y la actividad fosforilasa.

La estirpe n^o 190 con las enzimas APH(3') y APH(3'') y dos plásmidos (Fotografía-2), transfirió los dos plásmidos a la transconjugante, pero sólo la actividad APH(3''). Es posible que los genes que codifican el enzima APH(3') se encuentren en el cromosoma.

El aislado n^o 192 cedió las actividades APH(3') y APH(3'') y los tres plásmidos (5,4, 1,8, 1,4) (Fotografía-2) que contenía, al transconjugante.

El transconjugante 112T mostraba un plásmido de 52Md (Fotografía-1) y los enzimas APH(3'), APH(3'') y AAD(3'') igual que la donadora.

La cepa n^o 155 con los enzimas APH(3'), APH(3'') y AAD(3'') y

cuatro plásmidos (Fotografía-1) transmitió los plásmidos de bajo peso molecular (4,1 y 3,3) y los enzimas APH(3') y APH(3").

El transconjugante 39T exhibía las mismas enzimas, APH(3') y APH(3"), y dos (64,6 y 3,6) (Fotografía-1) de los cuatro plásmidos de la donadora.

La cepa n° 30 contenía cuatro plásmidos (Fotografía-1) y actividades AAC(3)-V, APH(3') y APH(3"). El transconjugante 30T1 captó los plásmidos de 45,7 y 2,3Md y las actividades APH(3') y AAC(3); el 30T2, los plásmidos de 45,7 y 2,95Md y todas las actividades de la donadora. El plásmido de 45,7Md y los enzimas AAC(3) y APH(3') son comunes en ambos transconjugantes, por lo que asignamos a este plásmido los genes de estos enzimas. Como el 30T2 tiene actividad APH(3") y un plásmido de 2,95Md que no se encontraban en el 30T1, concluimos que en este plásmido de bajo peso molecular se encuentra el gen de la APH(3").

El transconjugante 164T presentaba las mismas actividades enzimáticas (AAC(3)-V y APH(3')) y tres plásmidos (52, 1,74 y 1,68Md) (Fotografía-1) de los cinco que llevaba la donadora.

Las cepas n°s 59 y 64 mostraban tres plásmidos iguales (Fotografía-1). Sin embargo, la n° 59 expresaba actividad AAC(3)-V y AAD(3"), y la n° 64 AAC(3)-V, APH(3') y APH(3"). Los transconjugantes tenían los tres plásmidos y las mismas actividades que sus respectivas donadoras.

El aislado n° 149 contenía cuatro plásmidos (Fotografía-2) y

los enzimas AAC(3)-V, APH(3'), APH(3'') y AAD(3''). El transconjugante 149T1 presentaba los cuatro plásmidos y todos los enzimas, mientras que el 149T2 sólo tenía un plásmido de 54,95Md y la actividad APH(3''). Dedujimos que el gen de la APH(3'') se encuentra en este plásmido.

La estirpe n° 178 exhibía cinco plásmidos (Fotografía-2) y los enzimas AAC(3)-V, APH(3') y AAD(3''). El transconjugante 178T1 adquirió cuatro plásmidos y las actividades AAC(3) y APH(3'), y el 178T2 cuatro plásmidos y las actividades APH(3') y AAD(3''). Los plásmidos de bajo peso molecular aparecen en los dos transconjugantes así como el enzima APH(3'). La diferencia residía en que el 178T1 presentaba el plásmido de 59,56Md y el enzima AAC(3); y el 178T2 el de 74,13Md y el enzima AAD(3''). Por tanto, inferimos que el gen de la AAC(3) se encuentra en el plásmido de 59,56Md y el de la AAD(3'') en el de 74,13Md. El gen del enzima APH(3') puede que esté en uno de los plásmidos de bajo peso molecular.

A la vista de todos estos resultados concluimos que los genes de los enzimas AAC(3), APH(3''), APH(3') y/o AAD(3'') se localizan en plásmidos de peso molecular variado.

Al intentar identificar algún plásmido determinado con una actividad enzimática concreta, sólo tuvimos éxito con las estirpes que presentaban ANT(2''). La fotografía-3 muestra los plásmidos encontrados en las cepas n^{os} 74, 75, 153, 154, 169, 173 y 174, y en sus transconjugantes. Detectamos un plásmido de 75,88Md común en todos ellos. Estudiando los patrones de resistencia vemos que el más repetido es Tm, Gm, Ss, Km, DKB, TIC y AM. En algunos transconjugantes se acompaña de resistencia a Sm, Nm y

TE. Estas resistencias se podrían justificar por la presencia de otros plásmidos. Facinelli y Calegari (52) estudiando un plásmido aislado de *K.pneumoniae* observaron que a un núcleo de resistencia a Sm, AM y carbenicilina se le podía añadir resistencia al cloranfenicol, TE, Km ó Gm sin un cambio apreciable en el peso molecular. Así que, otra explicación a las resistencias añadidas, es que se encuentren en el mismo plásmido que el gen de la ANT(2") aunque no varíe el peso molecular del mismo.

Groot y col (73) describen varios plásmidos portadores de multiresistencias que codificaban a la ANT(2"). Uno de estos plásmidos presentaba un patrón de resistencia similar al obtenido por nosotros y el peso molecular era de 120Kpb (79,2Md).

Sólo nueve estirpes presentaban ANT(2"), de las que siete transfirieron por conjugación los genes que codificaban a este enzima. Otros autores (73,129) han descrito epidemias de *Enterobacterias* con plásmidos de resistencia conjugativos que codificaban a la ANT(2"). Aunque en las *Enterobacterias* aisladas de nuestro hospital la incidencia de este enzima es bastante baja (6,38%), los plásmidos que la codifican pueden ser una fuente de resistencia.

Estudiando los plásmidos encontrados en las estirpes con AAC(6')-I observamos que todos son de alto peso molecular pero diferentes entre ellos (fotografía-4). La cepa n° 21 presenta y transmite un plásmido de 61,66Md; la n°44 de 48,98Md; la n° 69 de 83,18Md y la n° 37 de 20,89. El plásmido de la cepa n° 37 no se transmitió por conjugación sino por transformación.

Nos llama la atención que la resistencia a la AN sea solamente 2,8% y que estuviese codificada, en los cuatro aislados, por plásmidos; tres de éstos eran conjugativos. Una característica notable de la resistencia a la AN en *Enterobacterias* es su baja frecuencia a pesar de que los enzimas que median la resistencia pueden transferirse por conjugación y en transposones de multiresistencias, y de que el uso de otros antibióticos como Tm, DKB ó Nt pueden seleccionarla. Incluso se ha descrito un caso en el que el uso de la AN redujo la incidencia de resistencia a la Gm y Tm (144). Price (144) sugieren que no es justificable darle a la AN el status de aminoglicósido de reserva por el peligro de que surja la resistencia ya que este antibiótico tiene un espectro de acción mayor que cualquier otro aminoglicósido. Aun así no debemos olvidar que también se han descrito casos de plásmidos epidémicos con resistencia a la AN en *Enterobacterias* (186,187).

Para finalizar este estudio vamos a explicar el caso de la cepa n° 21. Este aislado de *C.freundii* presentaba un antibiograma bastante espectacular, era resistente a todos los aminoglicósidos utilizados además de a TIC, AM, TE y NA. Cuando estudiamos los enzimas modificadores encontramos APH(3'), APH(3'') y un perfil de acetilasa (tabla-E en anexo) que no logramos identificar con un enzima acetilasa concreto. Se nos ocurrió la posibilidad de que la bacteria sintetizara dos enzimas acetilasas y que el perfil observado fuera la suma de las dos actividades. Ya se habían descrito otros casos en el que una misma estirpe presentaba dos acetilasas (122,209).

Pensamos que un isoelectroenfoque nos podría dar una idea de los enzimas presentes. El resultado (figura-15) fue que obtuvimos tres picos de actividad: uno a pH:5,38, otro a 6,7 y otro a 7,43. Mas de un enzima se

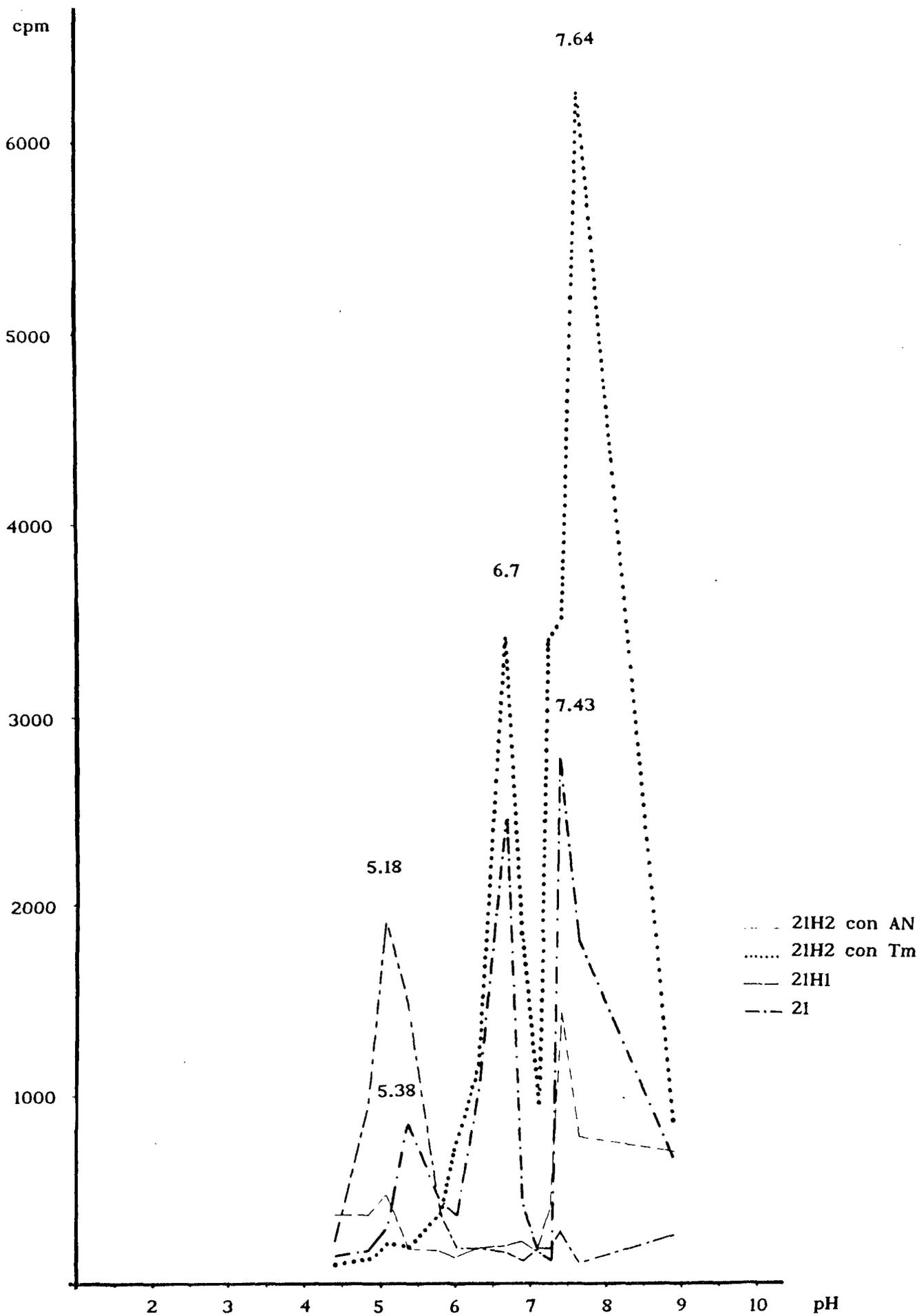


FIGURA-15.- Actividades obtenidas del isoelectroenfoque realizado a la estirpe 2I y sus transformantes, 2IH1 y

detectaban en el extracto de la cepa n° 21.

En la extracción de ADN plasmídico encontramos un sólo plásmido de 61,66Md. Como esta cepa era resistente al ácido nalidíxico no la pudimos conjugar con *E.coli* K-12 NA^R. Utilizamos el ADN plasmídico obtenido para transformar a *E.coli* HB101 y conseguimos dos tipos de transformantes, 2IH1 que era resistente a la AN, Tm, Nt, Km y DKB, y sensible a la Gm, y 2IH2 que era sensible a la AN, Tm, Nt y DKB y resistente a la Gm, Km y TIC. Habíamos separado dos patrones de resistencia.

Los perfiles enzimáticos de los transformantes eran diferentes. El 2IH1 mostraba un perfil típico de AAC(6')-I y el 2IH2 de una AAC(3). Por las actividades con los diferentes antibióticos dedujimos que era una AAC(3)-V, sin embargo las CMI's son mas bajas que las producidas por este enzima y se asemejan a las de una AAC(3)-I. El 2IH2 contenía también actividad APH(3') y APH(3").

Como el isoelectroenfoco mostró tres picos de actividad, quisimos determinar qué enzima correspondía a cada uno. Con la 2IH1 encontramos el pico de actividad a pH:5,38. La 2IH2 mostraba un pico a 7,43 cuando se utilizaba la AN como sustrato, y dos picos, 6,7 y 7,6, cuando se utilizó la Tm. Examinando la bibliografía encontramos que Umezawa y col. (8) determinaron el punto isoeléctrico de una AAC(6')-I en 5,4; Tran Van Nhieu y Collatz (185) el de una AAC(6')-IV en 5,3; Le Goffic y col (103) el de una AAC(3)-I en 7,4 y el de una AAC(3)-II en 6,4. A la vista de estos datos y de nuestros resultados es posible que en la estirpe n° 21 estén presentes tres enzimas acetilasas pero la confirmación de esto necesita más estudios.

Lo que podemos asegurar es que este aislado contiene, al menos, dos acetilasas: AAC(6') y AAC(3).

Conseguimos conjugar esta estirpe con *E.coli* resistente a 1mg/ml de Sm. El transconjugante contenía todas las resistencias y actividades enzimáticas de la donadora.

Un caso parecido fué descrito por Woloj y col. (209). Ellos detectaron dos acetilasas, AAC(6') y AAC(3), por medio de los transconjugantes y transformantes. Lograron también transferir las dos actividades juntas a un receptor por conjugación. Encontraron dos plásmidos implicados, uno de 120Kpb (79,2Md) que llevaba la resistencia a Gm, y otro de 11Kpb (7,26Md) con la resistencia a AN.

Otro dato curioso de la estirpe n° 21 es que tanto los dos transformantes como el transconjugante exhibían en la extracción de ADN plasmídico, un único plásmido de igual peso molecular al obtenido con la donadora (61,66Md) (fotografía-4). Basandonos en este resultado, dedujimos que la estirpe n° 21 contiene dos plásmidos de igual peso molecular con información genética diferente. Además estos dos plásmidos pueden ser transferidos juntos por conjugación.

Afortunadamente, aislados como estos no se describen con frecuencia, pero nos hacen reflexionar sobre la necesidad de llevar un control en el uso de antibióticos y un seguimiento de los plásmidos de resistencia que pueden aparecer en las estirpes bacterianas, sobre todo en las de origen clínico.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES.-

Hemos estudiado los enzimas modificadores de aminoglicósidos, las resistencias que originan y los plásmidos que los codifican en *Enterobacterias* procedentes de muestras clínicas, llegando a las siguientes conclusiones:

1.- Todos los microorganismos presentaban enzimas modificadores de aminoglicósidos.

2.- En nuestro estudio, los enzimas modificadores que causan resistencia a los aminoglicósidos en las *Enterobacterias* son: APH(3"), AAD(3"), APH(3'), ANT(2"), AAC(3) y AAC(6').

3.- El principal mecanismo de resistencia a los aminoglicósidos de uso clínico, Tm, Nt, DKB y Gm, es el enzima AAC(3)-V.

4.- El enzima AAC(6')-I es la causa de resistencia a la AN en nuestra colección de *Enterobacterias*.

5.- La combinación de varios enzimas modificadores originan patrones de multirresistencia importantes. La combinación más frecuente en las estirpes estudiadas es la AAC(3)-V + APH(3'), produciendo resistencia a la Tm, Gm, Nt, DKB, Km, Rm, Pm y Nm.

6.- No siempre la presencia de un enzima modificador de aminoglicósidos en una bacteria implica resistencia a estos antibióticos.

7.- La conjugación es una causa importante de la transferencia de los genes que codifican los enzimas modificadores. Es un fenómeno frecuente en las estirpes de *Enterobacterias* estudiadas por lo que estas constituyen una fuente potencial de resistencia a los aminoglicósidos.

8.- Las estirpes donadoras pueden transmitir por conjugación toda ó parte de su resistencia a las receptoras, y uno ó varios plásmidos.

9.- La resistencia a los aminoglicósidos está asociada con la resistencia a β -lactámicos, transmitiéndose juntas por conjugación.

10.- Un plásmido conjugativo de 75,88Md se relaciona con la resistencia mediada por el enzima ANT(2").

11.- Los genes que codifican los enzimas modificadores en las estirpes estudiadas se localizan en una población heterogénea de plásmidos con pesos moleculares que van desde 1,3 a 102Md.

12.- La cepa n°21 presenta dos enzimas acetilasas, una AAC(6')-I y una AAC(3). Es posible que pueda presentar dos formas de AAC(3).

13.- La cepa n° 21 además de las acetilasas, presenta actividad fosforilasa APH(3'') y APH(3'). La reunión de estos enzimas determinan, en la estirpe que los contiene, resistencia a todos los aminoglicósidos de uso clínico y a la mayoría de los empleados en este trabajo. Sólo es sensible a la Ap y medianamente sensible a la Is.

14.- La mayoría de los microorganismos de este estudio son sensibles a la Is. Sólo los que presentan AAC(6')-I expresan una sensibilidad moderada a este antibiótico.

ANEXOS

Tabla-A.- Resultados de los antibiogramas.

ESTIRPE	N°	ANTIBIOTICOS													
		Tm	Sm	Gm	Nt	AN	Ss	Km	DKB	NA	TIC	CTX	MA	AM	TE
<i>Serratia marcescens</i>	1	I	R	R	S	S	I	R	I	R	R	S	R	R	R
<i>Serratia marcescens</i>	3	S	R	R	S	S	I	R	S	R	R	R	R	R	R
<i>Providencia stuartii</i>	5	R	R	R	I	S	I	R	I	R	R	S	R	R	R
<i>Citrobacter freundii</i>	6	S	R	R	S	S	I	R	S	S	R	S	S	R	R
	6T	R	R	R	I	S	R	R	I	R	R	S	S	R	R
<i>Enterobacter aerogenes</i>	8	S	S	R	S	S	I	S	S	S	R	S	S		
<i>Serratia marcescens</i>	9	I	R	R	I	S	S	R	I	R	R	S	R	R	R
<i>Proteus mirabilis</i>	10	R	S	R	R	S	R	R	R	S	R	S	S		
<i>Serratia marcescens</i>	11	I	R	R	I	S	R	R	S	R	R	S	R	R	R
<i>Klebsiella oxytoca</i>	12	I	S	R	S	S	R	S	S	S	R	S	R	R	R
	12T	R	S	R	R	S	R	S	I	R	R	S	R	R	R
<i>Proteus mirabilis</i>	15	S	R	R	S	S	I	S	S	S	R	S	S		
<i>Enterobacter cloacae</i>	16	I	R	R	S	S	R	S	S	S	R	S	S	R	R
	16T	R	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	S	R	S
<i>Klebsiella ozaenae</i>	17	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R		

S: Sensible R: Resistente I: Sensibilidad moderada

Tabla-A.- Resultados de los antibiogramas (Continuación).

ESTIRPE	N°	ANTIBIOTICOS													
		Tm	Sm	Gm	Nt	AN	Ss	Km	DKB	NA	TIC	CTX	MA	AM	TE
<i>Citrobacter freundii</i>	21	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R
	21H1	R	R	S	R	I	S	R	I	S	S	S	S	S	S
	21H2	S	R	R	S	S	I	R	S	S	R	S	S	R	R
	21S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R	I
<i>Klebsiella oxytoca</i>	22	I	R	R	S	S	R	R	S	S	R	S	S	R	R
	22T	S	R	R	S	S	R	R	S	R	R	S	S	R	R
<i>Klebsiella oxytoca</i>	23	I	R	R	S	S	R	R	S	S	R	S	S	R	R
	23T	I	R	R	I	S	R	R	S	R	R	S	S	R	R
<i>Escherichia coli</i>	24	I	S	R	R	S	R	R	S	S	R	S	S	R	R
	24T	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R
<i>Klebsiella oxytoca</i>	25	S	R	R	S	S	R	S	S	S	R	S	I	R	R
	25T	R	R	R	R	S	R	I	R	R	R	S	R	R	R
<i>Citrobacter freundii</i>	26	I	R	R	S	S	R	S	S	S	R	S	I	R	R
	26T	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	R

S: Sensible R: Resistente I: Sensibilidad moderada

Tabla-A.- Resultados de los antibiogramas (Continuación).

ESTIRPE	N°	ANTIBIOTICOS													
		Tm	Sm	Gm	Nt	AN	Ss	Km	DKB	NA	TIC	CTX	MA	AM	TE
<i>Serratia liquefaciens</i>	27	R	R	R	I	S	R	S	I	S	R	S	S	R	S
	27T	I	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	S	R	S
<i>Escherichia coli</i>	28	R	S	R	S	S	R	R	S	S	R	S	S	R	R
	28T	R	S	R	I	S	R	R	I	R	R	S	S	R	I
<i>Enterobacter cloacae</i>	29	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R		
<i>Citrobacter freundii</i>	30	R	R	R	I	S	R	R	I	S	R	S	S	R	R
	30T1	R	S	R	I	S	R	R	I	R	R	S	I	R	I
	30T2	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	I	R	I
<i>Serratia liquefaciens</i>	33	R	R	R	I	S	R	R	I	R	R	S	R	R	R
<i>Serratia liquefaciens</i>	36	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	S	I	R	R
	36T	I	R	R	I	S	R	R	I	R	R	S	I	R	R
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	37	R	S	S	R	R	S	R	R	S	S	S	S	R	S
	37H	I	R	S	R	I	S	R	I	S	S	S	S	S	S
<i>Escherichia coli</i>	39	S	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R	S
	39T	S	R	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	R	S

S: Sensible R: Resistente I: Sensibilidad moderada

Tabla-A.- Resultados de los antibiogramas (Continuación).

ESTIRPE	N°	ANTIBIOTICOS													
		Tm	Sm	Gm	Nt	AN	Ss	Km	DKB	NA	TIC	CTX	MA	AM	TE
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	40	S	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R	R
	40T	S	R	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	R	R
<i>Escherichia coli</i>	41	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S
	41T	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	43	R	S	R	R	S	R	I	R	S	R	S	S	R	R
	43H	I	R	R	I	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Enterobacter zakazakii</i>	44	R	R	S	R	R	I	R	R	S	R	S	S	R	S
	44T1	R	R	S	R	R	I	R	R	R	R	S	S	R	S
	44T2	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
	44H	I	R	S	R	I	S	R	I	S	R	S	S	R	S
<i>Providencia stuartii</i>	45	R	R	R	R	S	R	R	I	R	R	S	R	R	R
<i>Enterobacter cloacae</i>	47	I	R	R	S	S	R	S	S	S	R	S	S	R	S
	47T	I	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	S	R	S
<i>Serratia marcescens</i>	49	R	R	R	I	S	R	R	I	R	R	S	R	R	R
<i>Klebsiella oxytoca</i>	50	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S

S: Sensible R: Resistente I: Sensibilidad moderada

Tabla-A.- Resultados de los antibiogramas (Continuación).

ESTIRPE	N°	ANTIBIOTICOS													
		Tm	Sm	Gm	Nt	AN	Ss	Km	DKB	NA	TIC	CTX	MA	AM	TE
<i>Escherichia coli</i>	51	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
<i>Escherichia coli</i>	52	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S
	52T	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S
<i>Serratia marcescens</i>	54	R	R	R	I	S	R	R	I	R	R	S	R	R	R
<i>Escherichia coli</i>	55	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R
	55T	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	57	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
<i>Citrobacter freundii</i>	58	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S
	58T	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S
<i>Klebsiella oxytoca</i>	59	I	R	R	I	S	R	S	I	S	R	S	S	R	R
	59T	I	R	R	S	S	R	S	S	R	R	S	S	R	R
<i>Escherichia coli</i>	60	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
	60T	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R
<i>Enterobacter cloacae</i>	61	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R

S: Sensible R: Resistente I: Sensibilidad moderada

Tabla-A.- Resultados de los antibiogramas (Continuación).

ESTIRPE	N°	ANTIBIOTICOS													
		Tm	Sm	Gm	Nt	AN	Ss	Km	DKB	NA	TIC	CTX	MA	AM	TE
Escherichia coli	63	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R
	63T	S	R	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	R	R
Morganella morganii	64	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	S	S	R	R
	64T	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S
Proteus mirabilis	66	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	S	S	R	S
	66T	R	S	R	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S
Escherichia coli	67	S	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R	S
	67T	S	R	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	R	S
Enterobacter cloacae	69	R	R	S	R	I	S	R	R	S	S	S	S	R	S
	69T1	R	R	S	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S
	69T2	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	I	S
Escherichia coli	71	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S
	71T	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S

S: Sensible R: Resistente I: Sensibilidad moderada

Tabla-A.- Resultados de los antibiogramas (Continuación).

ESTIRPE	N°	ANTIBIOTICOS													
		Tm	Sm	Gm	Nt	AN	Ss	Km	DKB	NA	TIC	CTX	MA	AM	TE
Escherichia coli	72	S	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R	S
	72T	S	R	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	R	S
Escherichia coli	73	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R
	73T	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S
Klebsiella oxytoca	74	R	R	R	S	S	S	R	I	S	I	S	S	R	S
	74T	R	R	R	S	S	S	R	S	R	I	S	S	R	S
Klebsiella oxytoca	75	R	R	R	S	S	S	R	R	S	R	S	S	R	S
	75T	R	R	R	S	S	I	R	R	R	R	S	S	R	S
Escherichia coli	76	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S
	76T	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R
Escherichia coli	77	R	R	R	I	S	R	R	R	S	S	S	S	R	S
	77T	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S
Escherichia coli	78	I	R	R	R	S	I	R	S	S	R	R	R	R	R
	78T	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	I

S: Sensible R: Resistente I: Sensibilidad moderada

Tabla-A.- Resultados de los antibiogramas (Continuación).

ESTIRPE	N°	ANTIBIOTICOS												
		Tm	Sm	Gm	Nt	AN	Ss	Km	DKB	NA	TIC	CTX	MA	AM
Escherichia coli	79	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R
	79T1	R	S	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R
	79T2	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R
Escherichia coli	80	S	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R
	80T	S	R	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	R
Citrobacter freundii	82	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
	82T	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
Escherichia coli	84	S	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R
	84T	S	R	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	R
Escherichia coli	85	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R
	85T	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S
Escherichia coli	87	S	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R
	87T	S	R	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	R

S: Sensible R: Resistente I: Sensibilidad moderada

Tabla-A.- Resultados de los antibiogramas (Continuación).

ESTIRPE	N°	ANTIBIOTICOS													
		Tm	Sm	Gm	Nt	AN	Ss	Km	DKB	NA	TIC	CTX	MA	AM	TE
Escherichia coli	89	I	R	R	S	S	I	R	S	S	R	S	S	R	S
	89T1	S	R	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S
	89T2	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S
Escherichia coli	90	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S
	90T	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S
Escherichia coli	92	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
Enterobacter cloacae	101	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	101T	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
Enterobacter cloacae	102	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
	102T	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
Escherichia coli	10	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	S	S	R	S
	103T1	S	R	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S
	103T2	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S

S: Sensible R: Resistente I: Sensibilidad moderada



Tabla-A.- Resultados de los antibiogramas (Continuación).

ESTIRPE	N°	ANTIBIOTICOS													
		Tm	Sm	Gm	Nt	AN	Ss	Km	DKB	NA	TIC	CTX	MA	AM	TE
<i>Escherichia coli</i>	105	I	R	R	S	S	R	R	S	S	R	S	S	R	S
	105T1	S	R	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	R	S
	105T2	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S
<i>Escherichia coli</i>	106	S	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S	R	R	R
	106T	S	R	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S
<i>Serratia marcescens</i>	107	R	R	R	S	S	R	R	S	R	R	S	R	R	R
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	112	S	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R	R
	112T	S	R	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	R	R
<i>Escherichia coli</i>	113	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
	113T	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R
<i>Serratia marcescens</i>	114	I	R	R	S	S	I	R	S	R	R	R	R	R	R
<i>Escherichia coli</i>	118	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S		
<i>Enterobacter cloacae</i>	119	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
	119T	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S

S: Sensible R: Resistente I: Sensibilidad moderada

Tabla-A.- Resultados de los antibiogramas (Continuación).

ESTIRPE	N°	ANTIBIOTICOS													
		Tm	Sm	Gm	Nt	AN	Ss	Km	DKB	NA	TIC	CTX	MA	AM	TE
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	120	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
	120T	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S
<i>Escherichia coli</i>	121	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R
<i>Escherichia coli</i>	123	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S		
<i>Escherichia coli</i>	124	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S		
<i>Escherichia coli</i>	127	S	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R	S
	127T	S	R	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	R	S
<i>Escherichia coli</i>	128	S	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R	S
	128T	S	R	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	R	S
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	129	S	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R	R
	129T1	S	R	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	R	R
	129T2	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	R	R

S: Sensible R: Resistente I: Sensibilidad moderada

Tabla-A.- Resultados de los antibiogramas (Continuación).

ESTIRPE	N°	ANTIBIOTICOS													
		Tm	Sm	Gm	Nt	AN	Ss	Km	DKB	NA	TIC	CTX	MA	AM	TE
<i>Enterobacter cloacae</i>	130	S	R	R	S	S	I	R	S	S	R	S	I	R	S
	130T1	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
	130T2	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	S
	130T3	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	S
<i>Escherichia coli</i>	131	S	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R	R
	131T	S	R	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	R	R
<i>Providencia stuarti</i>	132	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S	R	S
	132T	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
<i>Morganella morganii</i>	133	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S
<i>Escherichia coli</i>	135	S	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R	S
	135T	S	R	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	R	S
<i>Escherichia coli</i>	144	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	S	R	R	R
	144T1	S	R	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	R	S
	144T2	R	R	R	I	S	R	R	R	R	R	S	S	R	S
<i>Serratia liquefaciens</i>	146	I	R	R	I	S	R	R	S	R	R	S	R	R	R

S: Sensible R: Resistente I: Sensibilidad moderada

Tabla-A.- Resultados de los antibiogramas (Continuación).

ESTIRPE	N°	ANTIBIOTICOS													
		Tm	Sm	Gm	Nt	AN	Ss	Km	DKB	NA	TIC	CTX	MA	AM	TE
<i>Escherichia coli</i>	147	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	S	I	R	R
	147T1	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	I	R	R
	147T2	R	S	I	R	S	R	R	I	R	R	S	I	R	R
<i>Escherichia coli</i>	148	S	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S		
<i>Escherichia coli</i>	149	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R
	149T1	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R
	149T2	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S
<i>Enterobacter zakazakii</i>	150	I	R	R	S	S	R	S	I	S	R	R	R	R	R
	150T	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	R
<i>Enterobacter zakazakii</i>	151	R	R	R	I	S	R	S	I	S	R	R	R	R	R
	151T	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	R
<i>Enterobacter zakazakii</i>	152	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R
	152T	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	I	R	S
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	153	R	I	R	S	S	S	I	I	S	R	S	S	R	R
	153T	R	S	R	S	S	R	R	R	R	R	S	S	R	S

S: Sensible R: Resistente I: Sensibilidad moderada

Tabla-A.- Resultados de los antibiogramas (Continuación).

ESTIRPE	N°	ANTIBIOTICOS													
		Tm	Sm	Gm	Nt	AN	Ss	Km	DKB	NA	TIC	CTX	MA	AM	TE
<i>Escherichia coli</i>	154	I	R	I	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R	S
	154T	I	R	R	S	S	S	R	I	R	R	S	S	R	S
<i>Escherichia coli</i>	155	S	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R	S
	155T	S	R	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	R	S
<i>Serratia liquefaciens</i>	156	I	R	R	I	S	R	R	I	R	R	R	R	R	R
<i>Escherichia coli</i>	157	I	R	R	S	S	R	R	S	S	R	S	S	R	S
	157T1	S	R	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	R	S
	157T2	R	R	R	I	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S
<i>Enterobacter cloacae</i>	160	R	S	R	I	S	R	R	R	S	S	S	R	R	R
	160T	R	S	R	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	161	S	R	R	S	S	I	R	S	S	S	S	S	R	S
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	163	S	I	R	S	S	R	R	S	S	R	S	I	R	R
	163T	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	164	R	S	R	I	S	R	R	I	S	R	S	R	R	R
	164T	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R

S: Sensible R: Resistente I: Sensibilidad moderada

Tabla-A.- Resultados de los antibiogramas (Continuación).

ESTIRPE	N°	ANTIBIOTICOS													
		Tm	Sm	Gm	Nt	AN	Ss	Km	DKB	NA	TIC	CTX	MA	AM	TE
<i>Enterobacter zakazakii</i>	165	R	R	R	I	S	R	R	I	S	R	S	R	R	R
	165T	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	S
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	166	I	R	R	S	S	I	S	S	R	R	S	R	R	R
<i>Serratia marcescens</i>	167	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	S	R	R	R
	167T	R	R	R	R	S	R	R	I	R	R	S	R	R	S
<i>Morganella morganii</i>	169	R	R	R	S	S	I	R	I	S	R	S	S	R	R
	169T1	S	R	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	R	R
	169T2	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R
<i>Enterobacter cloacae</i>	171	I	R	R	S	S	R	R	S	S	R	S	S	R	R
	171T1	R	R	R	I	S	R	S	I	R	R	S	S	R	S
	171T2	R	R	R	S	S	R	R	S	R	R	S	S	R	R
<i>Klebsiella oxytoca</i>	173	R	R	R	S	S	I	R	R	S	R	S	S	R	S
	173T	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	S	S	R	S
<i>Citrobacter freundii</i>	174	R	R	I	S	S	S	R	I	S	R	S	S	R	S
	174T	R	R	R	S	S	S	R	I	R	R	S	S	R	S

S: Sensible R: Resistente I: Sensibilidad moderada

Tabla-A.- Resultados de los antibiogramas (Continuación).

ESTIRPE	N°	ANTIBIOTICOS													
		Tm	Sm	Gm	Nt	AN	Ss	Km	DKB	NA	TIC	CTX	MA	AM	TE
<i>Serratia liquefaciens</i>	175	R	R	R	I	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R
<i>Escherichia coli</i>	176	R	S	I	S	S	S	R	R	S	R	S	S	R	S
<i>Escherichia coli</i>	177	R	S	I	S	S	S	R	R	S	R	S	S	R	S
<i>Klebsiella oxytoca</i>	178	I	R	R	S	S	R	R	S	S	R	S	R	R	R
	178T1	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R
	178T2	S	R	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	R	R
<i>Escherichia coli</i>	179	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	S	S	R	S
	179T1	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S
	179T2	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S
<i>Klebsiella oxytoca</i>	180	I	R	R	S	S	I	S	S	S	R	S	S	R	S
<i>Escherichia coli</i>	181	R	R	R	I	S	R	R	I	S	S	S	S	S	S
	181T	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S
<i>Klebsiella oxytoca</i>	182	I	R	R	I	S	R	R	I	S	R	S	S	R	S
	182T	R	R	R	R	S	R	S	I	R	R	S	S	R	S

S: Sensible R: Resistente I: Sensibilidad moderada

Tabla-A.- Resultados de los antibiogramas (Continuación).

ESTIRPE	N°	ANTIBIOTICOS													
		Tm	Sm	Gm	Nt	AN	Ss	Km	DKB	NA	TIC	CTX	MA	AM	TE
<i>Klebsiella oxytoca</i>	183	S	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R	R
	183T	S	R	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	R	R
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	184	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R	S
	184T	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	R	S
<i>Escherichia coli</i>	187	R	R	R	I	S	R	R	R	R	S	S	S	S	R
<i>Enterobacter cloacae</i>	189	I	R	R	S	S	I	R	I	S	R	R	R	R	R
	189T1	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R
	189T2	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	190	S	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R	R
	190T	S	R	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	R	R
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	191	S	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R	S
	191T	S	R	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	R	S
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	192	S	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R	S
	192T	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S

S: Sensible

R: Resistente

I: Sensibilidad moderada

Tabla-A.- Resultados de los antibiogramas (Continuación).

ESTIRPE	Nº	ANTIBIOTICOS													
		Tm	Sm	Gm	Nt	AN	Ss	Km	DKB	NA	TIC	CTX	MA	AM	TE
Klebsiella oxytoca	193	R	S	R	I	S	R	R	I	S	R	S	S	R	R
	193T	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R
Klebsiella oxytoca	193R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R
	193RT	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R
Citrobacter diversus	194	I	R	R	I	S	R	R	I	S	S	S	S	R	S
	194T	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S
Serratia marcescens	197	R	R	R	I	S	R	R	I	R	R	R	R	R	S
Enterobacter cloacae	198	I	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R
	198S	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	S	S	R	S
Morganella morganii	200	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	S	S	R	S
	200T	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	S	R	S
Escherichia coli	201	R	S	R	I	S	R	R	I	S	R	S	S	R	R
	201T	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R
Proteus mirabilis	202	R	R	R	R	S	R	I	I	S	R	S	I	R	R
Providencia stuartii	203	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	S	S		

S: Sensible R: Resistente I: Sensibilidad moderada

Tabla-A.- Resultados de los antibiogramas (Continuación).

ESTIRPE	N°	ANTIBIOTICOS													
		Tm	Sm	Gm	Nt	AN	Ss	Km	DKB	NA	TIC	CTX	MA	AM	TE
<i>Providencia rettgeri</i>	204	R	R	R	I	S	R	S	I	S	S	S	S	R	S
	204T1	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
	204T2	R	S	R	R	S	R	S	I	R	R	S	S	R	S
<i>Salmonella spp.</i>	205	I	R	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S	R	S
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	206	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S	R	S
	206T	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S
<i>Serratia marcescens</i>	207	S	R	R	S	S	R	R	S	R	R	S	R	R	R
<i>Citrobacter freundii</i>	208	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S	R	S
	208T	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S
<i>E.coli</i> K-12 NA	T	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
<i>E.coli</i> Sm	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>E.coli</i> HB101	H	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

S: Sensible

R: Resistente

I: Sensibilidad moderada

Tabla-B.- CMIs de las estirpes de *Enterobacterias*

Cepa n ^o	CMI (mg/l)													
	Tm	Sm	Gm	Nt	AN	Ss	Km	DKB	Rm	Pm	Ap	Nm	Sp	Is
1	32	64	>128	32	4	128	>128	32	>128	>128	8	>128	>128	2
3	32	128	>128	32	1	128	>128	32	>128	>128	8	>128	>128	2
5	16	>128	128	32	1	128	>128	32	>128	>128	8	>128	>128	2
6	16	>128	64	16	2	128	>128	16	>128	>128	2	128	>128	0.5
6T	32	>128	>128	64	1	>128	>128	64	>128	>128	8	>128	>128	0.5
8	4	32	64	4	1	64	4	8	1	2	2	2	32	0.5
9	32	>128	>128	32	4	128	>128	32	>128	>128	2	128	>128	2
10	0.5	16	0.25	0.5	1	0.5	2	1	1	2	4	2	>128	0.5
11	32	>128	>128	32	4	128	>128	32	>128	>128	2	128	>128	1
12	32	2	>128	64	1	>128	8	32	1	2	2	1	32	0.5
12T	16	4	>128	32	2	>128	16	64	8	4	4	1	16	0.5
15	2	128	128	4	2	128	2	4	2	2	2	1	>128	2
16*	16	128	>128	16	64	128	128	32	128					
16	16	128	>128	16	1	128	8	32	1	2	2	4	>128	1
16T	32	4	>128	64	1	>128	16	32	4	4	4	0.5	16	0.5

* CMIs presentadas por la estirpe n^o 16 inicialmente, luego perdería parte de estas resistencias.

Tabla-B.- CMI's de las estirpes de *Enterobacterias* (Continuación).

Cepa n ^o	CMI (mg/l)													
	Tm	Sm	Gm	Nt	AN	Ss	Km	DKB	Rm	Pm	Ap	Nm	Sp	Is
17	0.5	64	0.5	2	1	0.5	2	1	1	2	8	4	>128	1
21	>128	32	>128	>128	64	>128	>128	>128	>128	>128	2	>128	>128	8
21S	>128	>128	>128	>128	128	>128	>128	>128	>128	>128	8	>128	8	32
21H1	8	>128	1	64	32	16	>128	32	>128	2	2	4	16	4
21H2	4	>128	64	8	1	64	>128	8	>128	>128	2	>128	16	0.25
22	16	>128	>128	16	2	>128	>128	32	>128	>128	2	128	>128	1
22T	16	>128	>128	16	0.5	>128	>128	32	>128	>128	4	>128	>128	0.5
23	16	>128	>128	16	1	128	>128	16	>128	128	2	128	>128	0.5
23T	16	>128	>128	32	0.5	>128	>128	32	>128	>128	4	>128	>128	0.5
24	>128	4	>128	>128	1	>128	>128	>128	>128	>128	8	>128	32	2
24T	>128	4	>128	128	0.5	>128	>128	>128	>128	>128	8	>128	16	0.5
25	16	>128	>128	16	1	>128	4	16	1	4	8	1	>128	1
25T	32	>128	>128	64	2	>128	16	64	8	4	8	1	>128	1
26	16	>128	>128	16	2	128	8	16	64	4	2	2	>128	1
26T	64	>128	>128	32	0.5	>128	16	64	4	2	4	0.5	>128	0.25
27	8	64	64	16	1	128	8	16	1	2	2	1	>128	0.5
27T	32	4	>128	32	0.5	>128	16	32	4	2	4	0.5	16	0.5

Tabla-B.- CMI's de las estirpes de *Enterobacterias* (Continuación).

Cepa n ^o	CMI (mg/l)													
	Tm	Sm	Gm	Nt	AN	Ss	Km	DKB	Rm	Pm	Ap	Nm	Sp	Is
28	16	4	>128	16	1	>128	>128	128	>128	>128	4	>128	32	2
28T	64	4	>128	64	0.5	>128	>128	64	>128	>128	4	>128	16	0.25
29	1	64	1	0.5	1	0.5	2	1	1	8	4	2	128	1
30	32	>128	>128	32	2	>128	>128	32	>128	>128	8	>128	128	1
30T1	32	4	>128	64	0.5	>128	>128	64	>128	>128	8	>128	16	0.25
30T2	64	>128	>128	64	1	>128	>128	64	>128	>128	4	>128	16	0.5
33	16	64	>128	32	2	>128	>128	32	>128	>128	8	>128	128	2
36	16	>128	128	16	2	128	>128	32	>128	>128	2	>128	128	0.5
36T	64	>128	>128	64	0.5	>128	>128	64	>128	>128	4	>128	128	0.5
37	32	2	1	64	64	32	>128	64	>128	4	2	4	32	8
37H	8	>128	1	64	32	8	>128	16	>128	2	2	2	8	4
39	2	>128	1	1	4	2	>128	2	>128	>128	8	128	128	2
39T	0.5	>128	0.5	0.5	2	0.25	>128	0.5	>128	>128	4	128	16	0.5
40	2	128	1	0.5	1	1	>128	1	>128	>128	4	64	32	0.5
40T	2	>128	0.5	0.5	1	0.5	>128	2	>128	>128	4	>128	16	0.5
41	0.5	>128	0.5	0.25	1	1	2	2	1	4	8	1	128	1
41T	0.5	>128	0.25	0.25	1	0.5	2	1	4	4	4	1	16	0.5

Tabla-B.- CMIs de las estirpes de *Enterobacterias* (Continuación).

Cepa n ^o	CMI (mg/l)													
	Tm	Sm	Gm	Nt	AN	Ss	Km	DKB	Rm	Pm	Ap	Nm	Sp	Is
43	64	8	>128	128	2	>128	32	128	1	2	4	1	64	0.5
43H	8	>128	>128	16	0.5	128	16	16	1	2	2	0.5	16	0.25
44	32	64	1	>128	64	32	>128	128	>128	4	4	4	>128	8
44T1	128	>128	2	128	64	64	>128	128	>128	4	4	8	>128	16
44T2	0.5	64	0.5	0.5	0.5	0.25	2	2	4	4	8	0.5	>128	0.5
44H	16	>128	1	64	32	8	>128	16	>128	2	2	1	16	4
45	16	>128	>128	32	2	>128	>128	32	>128	>128	8	128	>128	2
47	8	32	64	8	1	64	4	16	1	2	2	1	>128	0.5
47T	16	4	128	32	0.5	>128	8	32	4	2	8	0.5	16	0.25
49	32	>128	>128	32	2	128	>128	32	>128	>128	4	128	>128	1
50	0.5	64	0.5	0.5	1	0.5	2	0.5	2	2	2	8	16	0.5
51	0.5	>128	0.5	0.25	1	0.5	2	1	2	4	4	16	>128	0.5
52	0.5	>128	0.25	0.5	1	0.5	2	1	2	2	2	8	32	0.5
52T	0.5	>128	0.25	0.25	1	0.25	2	1	4	4	4	1	16	0.5
54	16	128	128	16	2	128	>128	32	>128	>128	4	128	>128	2
55	0.5	>128	0.25	0.5	1	0.5	2	1	2	2	2	8	16	0.5
55T	0.5	>128	0.5	0.5	1	0.25	2	1	4	4	4	0.5	16	1

Tabla-B.- CMI's de las estirpes de *Enterobacterias* (Continuación).

Cepa n ^o	CMI (mg/l)													
	Tm	Sm	Gm	Nt	AN	Ss	Km	DKB	Rm	Pm	Ap	Nm	Sp	Is
57	0.25	64	0.25	0.5	1	0.5	2	0.5	1	2	2	2	16	0.5
58	0.5	128	0.25	1	1	0.5	2	1	2	128	4	2	32	0.25
58T	0.5	>128	1	0.5	1	0.25	2	1	4	4	4	0.5	16	0.5
59	8	>128	64	16	1	64	4	16	2	4	2	1	>128	0.5
59T	8	>128	64	8	1	64	8	16	2	1	2	0.5	>128	0.5
60	0.5	64	0.25	0.5	1	0.5	2	1	1	2	2	8	16	2
60T	0.5	128	0.5	0.25	0.5	0.5	2	1	4	4	4	0.5	16	1
61	0.5	>128	0.5	0.5	2	1	4	1	4	4	4	8	64	1
63	1	64	0.25	0.5	1	0.5	>128	1	>128	>128	2	64	>128	0.5
63T	0.5	64	0.25	0.25	0.5	0.25	>128	2	>128	>128	2	32	>128	0.5
64	16	>128	>128	32	2	>128	>128	32	>128	>128	2	128	>128	2
64T	128	>128	>128	128	0.5	>128	>128	128	>128	>128	8	>128	16	0.5
66	8	>128	>128	64	2	>128	>128	32	>128	>128	2	32	>128	0.25
66T	64	>128	>128	128	0.5	>128	>128	64	>128	>128	4	>128	16	0.5
67	4	>128	1	0.5	2	1	>128	2	>128	>128	4	>128	32	2
67T	2	>128	1	0.25	0.5	0.5	>128	0.5	>128	>128	4	>128	16	0.5

Tabla-B.- CMI_s de las estirpes de *Enterobacterias* (Continuación).

Cepa n ^o	CMI (mg/l)													
	Tm	Sm	Gm	Nt	AN	Ss	Km	DKB	Rm	Pm	Ap	Nm	Sp	Is
69	16	128	0.5	>128	64	64	>128	64	>128	2	2	4	>128	8
69T1	64	128	2	128	64	64	>128	64	>128	4	4	8	>128	16
69T2	0.5	>128	0.5	0.5	0.5	0.25	4	0.5	4	2	4	1	>128	0.25
71	1	128	0.5	0.5	2	0.5	2	1	2	2	2	2	16	0.5
71T	0.5	>128	0.5	0.25	0.5	0.25	2	0.5	4	2	8	0.5	16	0.5
72	4	>128	0.5	2	2	1	>128	2	>128	>128	4	>128	32	2
72T	2	>128	0.5	0.25	0.5	0.5	>128	0.5	>128	>128	8	>128	16	0.5
73	1	128	0.5	0.25	2	1	4	1	1	2	2	2	16	0.5
73T	0.5	>128	0.5	0.25	0.5	0.25	2	0.5	4	4	4	0.5	16	0.5
74	32	>128	32	1	2	32	>128	64	>128	>128	2	128	>128	0.5
74T	16	>128	64	0.5	0.5	16	>128	16	>128	>128	8	>128	16	0.25
75	32	>128	32	0.5	2	32	>128	32	>128	>128	2	128	>128	0.5
75T	128	>128	128	1	1	32	>128	128	>128	>128	4	>128	16	1
76	0.5	>128	0.5	0.5	2	1	4	1	4	4	4	8	32	2
76T	0.5	>128	0.5	0.25	1	0.5	1	1	8	4	4	2	16	0.5
77	32	>128	>128	32	2	>128	>128	32	>128	>128	4	128	64	1
77T	64	>128	>128	128	0.5	>128	>128	128	>128	>128	4	>128		0.25

Tabla-B.- CMI_s de las estirpes de *Enterobacterias* (Continuación).

Cepa n ^o	CMI (mg/l)													
	Tm	Sm	Gm	Nt	AN	Ss	Km	DKB	Rm	Pm	Ap	Nm	Sp	Is
78	32	>128	>128	128	2	>128	>128	128	>128	>128	2	>128	64	1
78T	128	4	>128	128	1	>128	>128	128	>128	>128	4	>128	16	0.5
79	32	>128	>128	64	2	>128	>128	128	>128	>128	2	>128	64	0.5
79T1	128	2	>128	128	0.5	>128	>128	>128	>128	>128	4	>128	16	0.5
79T2	64	>128	>128	64	0.25	>128	>128	128	>128	>128	4	>128	16	0.5
80	0.5	>128	0.5	0.5	2	1	>128	1	>128	128	4	64	32	1
80T	0.5	>128	0.5	0.25	0.5	0.25	>128	0.5	>128	>128	4	64	16	0.5
82	1	128	0.5	0.5	2	0.5	4	1	4	2	2	2	64	0.5
82T	0.5	64	0.25	0.25	1	0.25	2	0.5	2	2	4	0.5	16	1
84	0.5	>128	0.25	0.5	2	0.5	>128	1	>128	>128	2	64	16	0.5
84T	0.5	>128	0.5	0.25	0.5	0.25	>128	1	>128	>128	4	1281	16	0.25
85	1	8	0.5	0.5	2	1	>128	1	>128	>128	4	128	32	1
85T	0.5	2	0.5	0.25	0.5	0.25	>128	1	>128	>128	4	>128	16	0.5
87	1	128	0.5	0.5	2	1	>128	2	>128	>128	4	128	>128	1
87T	0.5	64	0.5	0.25	0.5	0.25	>128	1	>128	>128	4	>128	>128	0.5
89	8	>128	64	8	2	64	>128	8	>128	>128	4	>128	>128	1
89T1	2	128	0.5	0.25	0.5	0.25	>128	2	>128	>128	4	>128	>128	0.5
89T2	2	4	1	0.5	1	0.5	>128	4	>128	>128	4	>128	16	2

Tabla-B.- CMI_s de las estirpes de *Enterobacterias* (Continuación).

Cepa n ^o	CMI (mg/l)													
	Tm	Sm	Gm	Nt	AN	Ss	Km	DKB	Rm	Pm	Ap	Nm	Sp	Is
90	0.5	>128	0.5	0.5	2	1	2	1	4	4	4	8	32	1
90T	0.5	>128	0.25	0.25	0.5	0.5	1	1	4	4	4	0.5	16	0.5
92	0.5	>128	0.5	0.5	2	1	4	1	4	4	4	2	>128	1
101	0.5	128	0.5	0.5	2	1	2	1	4	2	2	2	>128	0.5
101T	0.5	64	0.5	0.5	1	0.25	1	1	4	4	8	1	>128	0.5
102	0.5	128	0.25	0.5	2	1	4	1	4	2	2	4	>128	0.5
102T	0.5	64	1	0.5	1	0.25	1	1	4	8	4	1	>128	0.5
103	16	>128	128	16	4	128	>128	16	>128	>128	4	>128	>128	2
103T1	1	64	0.5	0.25	0.5	0.25	>128	4	>128	>128	4	>128	>128	0.5
103T2	1	2	1	0.5	0.5	0.5	>128	1	>128	>128	8	>128	16	1
105	16	>128	128	32	4	128	>128	16	>128	>128	4	>128	>128	2
105T1	2	128	0.5	0.25	0.5	0.5	>128	2	>128	>128	2	>128	>128	0.5
105T2	1	8	1	1	1	1	>128	1	>128	>128	8	>128	8	0.5
106	8	128	64	8	2	64	>128	8	>128	>128	4	>128	>128	0.5
106T	2	>128	0.5	0.25	0.5	0.5	>128	4	>128	>128	4	>128	>128	0.5
107	16	128	128	32	2	128	>128	32	>128	>128	4	>108	>128	2
112	4	>128	0.5	0.5	2	1	>128	2	>128	>128	2	>128	>128	1
112T	0.5	>128	0.5	0.5	1	0.25	>128	1	>128	>128	4	>128	>128	1

Tabla-B.- CMI's de las estirpes de *Enterobacterias* (Continuación).

Cepa n ^o	CMI (mg/l)													
	Tm	Sm	Gm	Nt	AN	Ss	Km	DKB	Rm	Pm	Ap	Nm	Sp	Is
113	1	128	0.5	0.5	2	1	4	1	8	4	4	2	32	1
113T	1	128	1	0.25	2	0.5	4	1	8	4	8	2	16	1
114	8	128	128	16	4	128	>128	32	>128	>128	2	>128	>128	1
118	1	>128	0.5	0.5	2	1	4	1	8	4	4	2	32	1
119	0.5	64	0.25	0.5	2	1	2	1	4	2	2	4	>128	0.5
119T	1	128	0.5	0.25	1	0.5	2	1	4	2	4	2	>128	1
120	0.5	>128	0.25	0.5	4	1	2	2	4	4	4	2	16	1
120T	0.5	>128	1	0.5	2	0.5	4	1	4	4	8	2	16	2
121	1	>128	0.5	0.5	2	1	4	2	8	4	4	2	32	2
123	0.5	128	0.25	0.5	1	1	2	1	4	2	2	2	>128	1
124	1	>128	0.5	0.5	2	1	4	1	4	4	4	4	32	1
127	1	>128	0.5	1	2	1	>128	1	>128	>128	4	128	>128	1
127T	0.5	>128	0.5	0.25	0.5	0.25	>128	1	>128	>128	4	>128	16	0.25
128	1	>128	0.5	1	2	1	>128	1	>128	>128	4	64	>128	0.5
128T	0.5	>128	0.5	0.25	0.5	0.25	>128	1	>128	>128	4	128	16	0.5

Tabla-B.- CMI de las estirpes de *Enterobacterias* (Continuación).

Cepa n ^o	CMI (mg/l)													
	Tm	Sm	Gm	Nt	AN	Ss	Km	DKB	Rm	Pm	Ap	Nm	Sp	Is
129	2	64	0.5	1	2	1	>128	2	>128	>128	1	>128	>128	1
129T1	2	128	1	0.5	0.5	0.5	>128	2	>128	>128	4	>128	>128	1
129T2	2	2	0.5	0.25	0.5	0.5	>128	2	>128	>128	4	>128	16	1
130	8	>128	64	8	0.5	64	>128	8	>128	>128	2	128	>128	0.25
130T1	0.25	>128	0.5	0.25	0.5	0.25	2	0.5	4	2	4	0.5	16	0.5
130T2	64	>128	>128	128	0.5	>128	>128	64	>128	>128	4	>128	16	0.25
130T3	64	2	>128	128	0.5	>128	>128	64	>128	>128	8	>128	16	0.5
131	2	>128	0.5	0.25	2	0.5	>128	1	>128	>128	2	>128	32	1
131T	2	>128	0.5	0.25	0.5	0.5	>128	2	>128	>128	4	>128	16	0.5
132	16	>128	>128	>128	4	>128	>128	>128	>128	128	8	128	>128	4
132T	0.25	128	0.5	0.25	0.5	0.5	2	2	4	2	4	0.5	>128	0.5
133	0.5	64	0.25	0.25	1	1	>128	0.5	>128	>128	4	16	>128	0.5
135	0.5	128	0.5	0.5	2	1	>128	1	>128	128	4	64	64	0.5
135T	0.25	128	0.5	0.25	0.5	0.25	>128	0.5	>128	>128	4	64	16	0.5
144	32	128	>128	16	2	>128	>128	32	>128	>128	8	>128	>128	1
144T1	0.25	64	0.5	0.25	0.5	0.25	1	0.5	4	2	4	0.5	>128	0.25
144T2	64	>128	>128	32	2	>128	>128	64	>128	>128	8	>128	>128	1
146	8	64	128	64	4	128	>128	32	>128	>128	8	128	>128	2

Tabla-B.- CMI_s de las estirpes de *Enterobacterias* (Continuación).

Cepa n ^o	CMI (mg/l)													
	Tm	Sm	Gm	Nt	AN	Ss	Km	DKB	Rm	Pm	Ap	Nm	Sp	Is
147	128	>128	>128	>128	4	>128	>128	>128	>128	>128	8	>128	32	4
147T1	128	>128	>128	128	0.5	>128	>128	>128	>128	>128	4	>128	16	0.5
147T2	32	2	>128	64	0.5	>128	>128	32	>128	>128	4	>128	16	0.25
148	2	64	0.5	1	4	1	>128	1	>128	>128	8	128	>128	1
149	64	>128	>128	128	2	>128	>128	64	>128	>128	4	>128	>128	0.5
149T1	64	>128	>128	64	1	>128	>128	64	>128	>128	4	>128	>128	0.5
149T2	0.25	>128	0.25	0.25	0.5	0.25	1	0.5	4	2	4	0.5	16	0.25
150	16	>128	128	32	2	128	8	32	1	4	4	4	>128	1
150T	64	>128	128	32	1	>128	32	64	4	0.5	2	1	>128	0.5
151	16	>128	>128	32	2	>128	8	32	1	4	4	4	>128	1
151T	64	>128	>128	>128	0.5	>128	32	64	4	2	4	1	>128	0.5
152	16	>128	128	16	2	128	8	16	1	2	4	4	>128	1
152T	64	>128	>128	128	1	>128	32	64	4	2	4	0.5	8	0.5
153	16	16	32	1	2	16	64	64	1	4	4	4	>128	0.5
153T	128	128	128	1	2	128	>128	128	8	8	16	1	128	4
154	16	64	16	1	1	16	>128	32	>128	>128	4	64	>128	0.5
154T	16	64	32	0.25	0.5	>128	64	32	4	2	4	0.5	>128	0.25

Tabla-B.- CMI's de las estirpes de *Enterobacterias* (Continuación).

Cepa n ^o	CMI (mg/l)													
	Tm	Sm	Gm	Nt	AN	Ss	Km	DKB	Rm	Pm	Ap	Nm	Sp	Is
155	0.5	128	0.5	1	2	1	>128	1	>128	128	4	64	>128	1
155T	0.25	128	0.25	0.5	0.5	0.25	>128	0.5	>128	>128	8	64	16	0.5
156	16	128	128	32	2	128	>128	32	>128	>128	8	128	>128	2
157	16	>128	64	16	4	64	>128	16	>128	>128	8	>128	>128	2
157T1	1	128	0.25	0.25	0.5	0.5	>128	2	>128	>128	4	>128	>128	0.5
157T2	2	4	1	0.5	1	1	>128	1	>128	>128	8	>128	8	0.5
160	>128	8	>128	128	4	>128	>128	>128	4	4	4	4	32	1
160T	>128	4	>128	>128	0.5	>128	64	128	4	2	16	0.5	16	0.5
161	8	128	128	16	2	128	>128	32	>128	>128	2	128	32	0.5
163	16	32	128	32	2	128	>128	16	>128	>128	2	128	>128	0.5
163T	64	128	>128	64	1	>128	32	32	>128	>128	4	>128	>128	2
164	32	2	>128	32	1	>128	>128	32	>128	>128	2	128	16	0.5
164T	>128	4	>128	128	0.5	>128	>128	128	>128	>128	8	>128	16	0.5
165	16	>128	128	32	2	128	>128	16	>128	>128	4	128	>128	0.5
165T	128	>128	>128	128	2	>128	>128	128	>128	>128	16	>128	>128	4
166	8	>128	64	8	1	64	8	8	4	1	1	4	>128	0.5

Tabla-B.- CMI's de las estirpes de *Enterobacterias*

(Continuación).

Cepa n ^o	CMI (mg/l)													
	Tm	Sm	Gm	Nt	AN	Ss	Km	DKB	Rm	Pm	Ap	Nm	Sp	Is
167	64	128	>128	64	4	>128	>128	>128	>128	>128	8	>128	>128	4
167T	128	>128	>128	128	1	>128	>128	128	>128	>128	4	>128	>128	1
169	32	>128	128	1	4	128	>128	128	>128	>128	8	>128	>128	2
169T1	1	>128	0.5	0.25	0.5	0.5	>128	2	>128	>128	4	>128	>128	0.5
169T2	128	>128	>128	1	1	>128	>128	128	>128	>128	4	>128	>128	0.5
171	32	64	>128	32	2	>128	>128	32	>128	>128	4	>128	>128	2
171T1	32	64	>128	64	0.5	>128	32	32	4	2	4	0.5	>128	0.5
171T2	32	64	>128	64	0.5	>128	>128	32	>128	>128	4	>128	>128	0.5
173	64	64	64	1	1	64	128	128	32	8	2	2	>128	0.5
173T	128	64	128	1	0.5	64	>128	>128	4	2	4	0.5	>128	0.5
174	16	>128	32	0.5	2	16	>128	32	>128	>128	4	128	64	0.5
174T	32	>128	32	0.25	0.5	16	>128	32	>128	>128	8	>128	16	0.25
175	32	32	64	32	4	128	>128	128	>128	>128	2	128	>128	1
176	32	4	32	1	2	16	64	64	32	4	4	2	16	1
177	32	4	32	4	2	32	64	128	32	4	4	8	16	1
178	8	64	128	32	2	128	>128	16	32	16	2	4	>128	1
178T1	128	4	>128	>128	0.5	>128	>128	128	>128	>128	8	>128	16	0.5
178T2	8	>128	8	2	0.5	8	>128	8	>128	>128	8	>128	>128	1

Tabla-B.- CMI's de las estirpes de *Enterobacterias*

(Continuación).

Cepa n ^o	CMI (mg/l)													
	Tm	Sm	Gm	Nt	AN	Ss	Km	DKB	Rm	Pm	Ap	Nm	Sp	Is
179	32	>128	>128	64	2	>128	>128	64	>128	>128	4	128	32	1
179T1	0.5	>128	0.5	0.25	0.5	0.5	4	0.5	8	2	4	1	16	0.5
179T2	64	>128	>128	128	0.5	>128	>128	64	>128	>128	4	>128	16	0.5
180	8	128	128	16	0.5	64	4	16	4	2	1	2	>128	0.5
181	32	>128	>128	64	1	128	>128	32	>128	>128	2	64	16	0.5
181T	128	>128	>128	>128	1	>128	>128	128	>128	>128	8	>128	16	1
182	8	>128	>128	32	0.5	>128	>128	16	>128	>128	1	128	>128	1
182T	64	64	>128	64	1	>128	16	64	8	4	8	1	>128	0.5
183	2	>128	1	1	2	1	>128	1	>128	>128	2	128	>128	0.5
183T	1	>128	0.5	0.25	0.5	0.25	>128	1	>128	>128	4	>128	>128	0.5
184	1	4	1	0.5	1	0.5	>128	2	>128	>128	4	>128	16	0.5
184T	2	4	0.5	0.25	0.5	0.5	>128	2	>128	>128	4	>128	16	1
187	64	>128	>128	>128	2	>128	>128	128	>128	>128	4	>128	32	0.5
189	16	>128	128	32	0.5	>128	>128	16	>128	>128	2	>128	>128	0.5
189T1	128	4	>128	128	1	>128	>128	128	>128	>128	8	>128	16	0.5
189T2	32	>128	>128	64	0.5	>128	>128	32	>128	>128	4	>128	>128	0.5
190	4	128	1	0.5	2	4	>128	8	>128	128	2	>128	64	1
190T	8	128	2	0.5	2	2	>128	16	>128	>128	4	>128	32	4

Tabla-B.- CMI's de las estirpes de *Enterobacterias*

(Continuación).

Cepa n ^o	CMI (mg/l)													
	Tm	Sm	Gm	Nt	AN	Ss	Km	DKB	Rm	Pm	Ap	Nm	Sp	Is
191	8	>128	1	0.5	2	4	>128	8	>128	>128	2	>128	128	1
191T	8	128	2	0.5	2	2	>128	16	>128	>128	4	>128	32	1
192	8	128	1	0.5	2	4	>128	8	>128	>128	2	>128	64	1
192T	4	64	1	0.5	1	2	16	4	8	4	4	1	32	1
193	32	4	>128	32	2	>128	>128	32	>128	>128	4	>128	64	1
193T	128	4	>128	128	1	>128	>128	>128	>128	>128	4	>128	16	1
193R	1	128	0.25	1	2	0.5	8	1	32	16	2	2	>128	0.5
193RT	0.5	>128	1	0.25	1	0.25	1	1	4	16	8	1	>128	1
194	16	>128	128	16	1	>128	>128	64	>128	>128	2	128	>128	0.25
194T	128	>128	>128	128	0.5	>128	>128	128	>128	>128	8	>128	16	0.25
197	64	>128	128	32	8	128	>128	>128	>128	>128	2	>128	>128	2
198	8	64	64	16	2	128	8	16	4	2	2	2	>128	0.5
198S	64	>128	>128	64	8	>128	>128	64	4	32	8	4	16	4
200	64	>128	>128	>128	2	>128	>128	128	>128	>128	4	>128	>128	1
200T	>128	>128	>128	>128	1	>128	>128	>128	>128	>128	8	>128	8	0.5
201	16	8	128	16	2	128	>128	8	>128	>128	4	64	128	0.5
201T	64	8	>128	128	0.5	>128	>128	64	>128	>128	8	>128	32	0.5

Tabla-B.- CMI de las estirpes de *Enterobacterias* (Continuación).

Cepa n ^o	CMI (mg/l)													
	Tm	Sm	Gm	Nt	AN	Ss	Km	DKB	Rm	Pm	Ap	Nm	Sp	Is
202	64	32	128	64	4	>128	4	32	8	4	4	2	>128	1
203	32	128	>128	128	2	>128	>128	64	>128	>128	8	128	>128	0.5
204	16	128	128	32	2	>128	4	32	4	4	4	2	>128	0.5
204T1	1	128	1	1	1	0.5	2	1	8	4	8	1	16	1
204T2	16	4	>128	64	0.5	128	8	32	4	4	8	0.5	16	0.5
205	16	128	128	16	2	>128	>128	32	>128	>128	4	>128	64	1
206	128	>128	>128	128	2	>128	>128	128	>128	>128	8	>128	16	0.5
206T	>128	>128	>128	>128	1	>128	>128	>128	>128	>128	8	>128	16	0.5
207	16	128	128	16	2	128	>128	16	>128	>128	4	>128	>128	1
208	64	>128	>128	32	1	>128	>128	64	>128	>128	8	>128	64	0.5
208T	128	>128	>128	128	0.5	>128	>128	128	>128	>128	8	>128	16	0.5
S	1	>128	2	1	4	0.5	4	1	4	8	8	2	16	2
K-12	0.5	4	1	0.5	0.5	0.5	2	0.25	4	4	8	0.5	16	0.25
HB101	0.25	>128	0.5	0.25	0.5	0.25	1	0.25	1	2	2	0.5	8	0.25

Tabla-C.- Perfiles de fosforilasas.

Cepa N°	ANTIBIOTICOS										
	KmA	Km	KmB	Nm	Bt	Lm	Pm	Rm	AN	Sm	Gm
1	33		73	100	41	80	38	73	3	5	0
3	30		37	100	36	58	14	16	23	7	3
5	35		49	100	38	78	19	47	16	5	3
6	35		45	100	56	55	60	82	42	62	10
9	27		34	100	33	50	29	4	23	4	2
11	27		35	100	40	59	12	27	14	13	2
21		100		100			81	82	11	1	0
22		82		100			72	78	14	72	2
23		68		100			121	92	16	49	5
24		52		100			77	175	10	0	2
30	67		60	100	72	58	51	72	29	11	0
33	38		53	100	15	81	11	30	12	6	1
36	35		53	100	55	63	43	53	32	52	21
39	30		59	100	58	8	71	61	8	13	3

Los valores se han calculado considerando la actividad de la Nm como 100%

Tabla-C.- Perfiles de fosforilasas (Continuación).

ANTIBIOTICOS											
Cepa N°	KmA	Km	KmB	Nm	Bt	Lm	Pm	Rm	AN	Sm	Gm
40	38		24	100	39	63	52	50	23	31	8
45	22		32	100	29	65	13	17	3	6	0
49	28		34	100	41	51	31	26	11	8	3
54	26		27	100	39	44	8	23	12	5	1
63	31		36	100	45	60	92	38	26	31	7
64		57		100	51	142	81	51	11	48	5
66		52		100	15	32	60	65	3	21	2
67		50		100			104	79	10	61	1
72		45		100			112	81	14	21	2
74		50		100			70	50	16	78	3
75		48		100			72	54	18	106	4
77	26		45	100	27	71	44	40	11	122	3
78		49		100			76	57	14	17	3
79		46		100			79	110	15	20	5

Los valores se han calculado considerando la actividad de la Nm como 100%

Tabla-C.- Perfiles de fosforilasas (Continuación).

ANTIBIOTICOS											
Cepa N ^o	KmA	Km	KmB	Nm	Bt	Lm	Pm	Rm	AN	Sm	Gm
80		42		100			69	70	15	8	6
84		51		100			65	52	33	115	8
85	26		38	100	46	75	63	39	16	6	2
87	84		44	100	45	59	33	41	16	9	2
89	44		60	100	35	80	105	55	5	3	0
103		53		100			110	103	6	0	2
105		47		100			74	56	6	3	0
106	57		65	100	64	69	57	53	20	7	4
107	34		45	100	64	95	16	17	11	66	0
112	20		34	100	39	94	42	38	27	19	9
114	24		39	100	28	59	17	18	13	4	4
127		54		100			65	60	8	50	2
128		60		100			71	62	4	56	3
129	40		41	100	56	81	48	42	32	12	2

Los valores se han calculado considerando la actividad de la Nm como 100%

Tabla-C.- Perfiles de fosforilasas (Continuación).

ANTIBIOTICOS											
Cepa N°	KmA	Km	KmB	Nm	Bt	Lm	Pm	Rm	AN	Sm	Gm
130	39		30	100	39	43	42	28	27	20	7
131		71		100			117	144	15	13	8
133		35		100			57	56	7	11	3
135		59		100			115	99	17	10	9
144	30		41	100	32	63	80	39	10	9	2
146		121		100			136	163	15	0	3
147	33		32	100	44	71	72	45	13	21	3
148		47		100			81	70	5	15	2
149	29		53	100	39	70	53	43	5	20	2
155		72		100			131	125	21	4	3
156	26		33	100	28	42	26	28	14	6	3
157	43		52	100	46	66	80	60	5	3	1
161	35		39	100	25	40	29	38	33	56	32
163		60		100			93	90	28	10	7

Los valores se han calculado considerando la actividad de la Nm como 100%

Tabla-C.- Perfiles de fosforilasas (Continuación).

ANTIBIOTICOS											
Cepa N°	KmA	Km	KmB	Nm	Bt	Lm	Pm	Rm	AN	Sm	Gm
164	42		47	100	86	93	89	76	36	21	4
165	36		42	100	51	63	34	39	27	48	8
167		122		100			119	119	18	0	3
169		60		100	65	65	50	50	31	28	8
171		83		100			113	75	13	4	5
174		80		100			102	48	22	33	3
175		75		100			139	103	14	0	3
178		67		100			89	81	8	0	0
179		56		100			56	38	4	38	2
181		28		100			45	44	8	88	3
182		79		100			93	69	10	61	3
183		71		100			88	60	8	4	2
184		69		100			75	56	19	35	3
187		45		100			94	67	9	155	5

Los valores se han calculado considerando la actividad de la Nm como 100%

Tabla-C.- Perfiles de fosforilasas (Continuación).

ANTIBIOTICOS											
Cepa N ^o	KmA	Km	KmB	Nm	Bt	Lm	Pm	Rm	AN	Sm	Gm
189		58		100			57	56	5	82	2
190		70		100			115	128	64	29	35
191		93		100			72	76	10	1	2
192		46		100			64	68	16	7	6
193		45		100			66	69	6	1	1
194		44		100			74	66	5	0	1
197		66		100			70	68	6	0	2
200		100		100			84	82	10	7	2
205		100		100			81	80	10	75	3
206		40		100			93	50	26	75	20
207		71		100			104	89	6	0	2
208		33		100			74	56	18	28	4

Los valores se han calculado considerando la actividad de la Nm como 100%

Tabla-D.- Perfiles de adenilasas.

ANTIBIOTICOS	ESTIRPES								
	74	75	153	154*	169*	173	174	176	177
Gm	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Ss	134	192	170	199	125	182	70	72	160
Tm	80	113	143	87	76	97	36	78	80
AN	6	6	126	24	6	6	15	7	6
Km	77	113	171	151	104	137	52	138	119
Nm	3	8	107	23	4	6	22	10	8
Pm	7	10	46	9	6	2	10	7	8
Rb	11	3	29	6	9	2	16	11	9
Sm	463	532	0	82	33	24	5	6	6
Sp	128	105	6	56	21	12	8	7	6
Nt	90	92	28	137	45	99	31	38	35

Los valores se han calculado considerando la actividad de la Gm como 100%

* Valores obtenidos con los transconjugantes, 154T y 169T2.

Tabla-E.- Perfiles de acetilasas.

Antibióticos	Estirpes								
	1	3	5	6	8	9	10	11	12
GmC1	76	75	98	70	118	56	47	85	63
GmC1a	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Gm									
Ss	69	67	62	69	75	85	43	71	82
KmA	12	9	7	7	49	19	8	15	8
KmB	25	39	23	44	57	30	31	36	32
Km									
Tm	265	66	10	69	90	57	44	95	84
DKB	71	37	66	78	65	53	55	78	74
Nm	10	14	25	37	7	28	3	11	9
Pm	0	2	2	0	3	0	0	3	0
Bt	2	5	4	29	1	16	0	10	1
Lm	10	5	7	6	7	6	1	7	2
Rm	6	0	12	1	11	1	0	0	0
AN	0	6	0	4	0	9	1	6	1
Nt	28	23	15	24	9	22	11		23
Ap	2	0	0	1	0	2	0	0	0
2'-Nt	12	15	13	22	14	27	30	15	22
6'-Nt	11	16	14	26	25	13	17	25	36
5-Epi	22	23	28	15	9	32	20	21	14
Dact	3	3	2	0	5	2	0	4	1

Los valores se han calculado considerando la actividad de la Gm como 100%

Tabla-E.- Perfiles de acetilasas (continuación).

Antibióticos	Estirpes								
	15	16	21	2IH1	2IH2	22	23	24	25
GmCi		67							54
GmCi _a		100							100
Gm	100		100	100	100	100	100	100	
Ss	42	114	65	171	70	83	64	54	62
KmA		143							14
KmB		99							40
Km	2		91	347	12	3	7	11	
Tm	50	128	84	225	85	91	64	59	57
DKB	40	131	106	260	76	63	47	73	68
Nm	0	91	68	326	2	2	3	0	2
Pm	0	0	8	12	0	0	2	0	1
Bt		42							0
Lm		6							3
Rm	0	0	35	294	3	0	1	1	0
AN	0	34	48	258	3	2	4	2	3
Nt	7	26	91	185	34	19	19	45	14
Ap	0	11	8	7	3	2	2	0	1
2'-Nt		182	60						19
6'-Nt		45	30						27
5-Epi		209	103						14
Dact		6	4						2

Los valores se han calculado considerando la actividad de la Gm como 100%

Tabla-E.- Perfiles de acetilasas (continuación).

Antibióticos	Estirpes								
	26	27	28	30	33	36	37	43	44
GmC1				64	100	72	2	45	
GmC1a				100	100	100	100	100	
Gm	100	100	100						100
Ss	68	43	87	57	70	50	102	42	171
KmA				12	17	8	242	15	
KmB				33	28	30	88	31	
Km	36	31	6						241
Tm	79	29	98	65	89	69	93	48	166
DKB	71	18	58	73	77	71	162	59	176
Nm	38	3	2	2	12	1	147	4	287
Pm	6	1	0	0	0	0	8	3	
Bt				1	9	0	74	0	
Lm				0	4	1	7	0	
Rm	63	2	1	1	0	0	1	0	220
AN	28	3	2	2	11	1	53	1	202
Nt	74	14	38	21	22	12	37	16	181
Ap	6	1	0	0	0	0	0	0	13
2'-Nt	32			33	19	19	131	36	
6'-Nt	48			53	18	18	14	41	
5-Epi	17			24	35	9	190	22	
Dact	2			0	0	0	5	1	

Los valores se han calculado considerando la actividad de la Gm como 100%

Tabla-E.- Perfiles de acetilasas (continuación).

Antibióticos	Estirpes								
	45	47	49	54	59	64	66	69	77
GmC ₁	88		100	94	3	56	72	21	130
GmC _{1a}	100		100	100	100	100	100	100	100
Gm		100							
Ss	74	64	92	77	50	45	88	83	120
KmA	22		3	25	18	9	22	156	26
KmB	26		41	39	30	22	47	122	48
Km		5							
Tm	39	67	116	76	22	25	147	164	121
DKB	59	30	129	51	77	44	53	159	153
Nm	6	3	9	7	2	2	5	103	7
Pm	3	2	0	1	1	0	1	6	2
Bt	7		7	2	0	0	2	42	5
Lm	5		5	2	0	1	4	4	5
Rm	2	3	4	1	1	0	0	5	0
AN	3	3	8	5	2	0	8	52	5
Nt	17	31	25	18	16	13	38	62	27
Ap	0	3	0	0	0	0	2	4	4
2'-Nt	13	14	25	16	23	29	42	120	12
6'-Nt	0	19	49	11	28	38	60	14	30
5-Epi	21	11	21	14	11	12	28	195	28
Dact	3	0	5	0	1	0	3	11	8

Los valores se han calculado considerando la actividad de la Gm como 100%

Tabla-E.- Perfiles de acetilasas (continuación).

Antibióticos	Estirpes								
	78	79	89	103	105	106	107	114	130
GmC ₁				117			64	33	41
GmC _{1a}				100			100	100	100
Gm	100	100	100		100	100			
Ss	84	103	63	78	68	63	74	50	45
KmA				21			12	6	6
KmB				63			56	24	14
Km	60	46	3		40	1			
Tm	165	139	58	98	80	48	134	48	56
DKB	100	157	33	107	81	28	91	35	38
Nm	2	2	0	24	35	0	11	14	3
Pm	2	0	1	6	6	0	4	1	2
Bt				9			7	11	1
Lm				11			6	2	2
Rm	3	3	1	6	7	0	0	0	2
AN	4	4	1	16	20	0	8	3	1
Nt	92	90	13	16	48	12	20	14	7
Ap	6	8	2	6	6	0	2	0	1
2'-Nt				16			20	16	14
6'-Nt				27			21	8	26
5-Epi				13			27	18	13
Dact				9			1	4	1

Los valores se han calculado considerando la actividad de la Gm como 100%

Tabla-E.- Perfiles de acetilasas (continuación).

Antibióticos	Estirpes								
	132	144	146	147	149	150	151	152	156
GmC1		105		73	107	52			61
GmC1a		100		100	100	100			100
Gm	100		100				100	100	
Ss	84	73	73	53	70	43	98	49	67
KmA		21		15	9	8			8
KmB		39		42	62	14			30
Km	16		13				12	6	
Tm	74	96	111	40	57	45	110	73	75
DKB	109	101	95	82	83	23	54	32	62
Nm	12	7	9	0	4	1	5	1	11
Pm	22	3	0	0	0	1	4	1	6
Bt		2		0	0	0			0
Lm		1		0	2	0			7
Rm	13	0	9	0	0	0	6	3	0
AN	3	1	6	0	2	1	5	4	3
Nt	60	15	26	14	12	12	51	21	13
Ap	3	1	0	0	0	0	3	0	1
2'-Nt		7		16	13	13			15
6'-Nt		30		28	12	12			11
5-Epi		20		10	8	15			18
Dact		3		0	0	1			3

Los valores se han calculado considerando la actividad de la Gm como 100%

Tabla-E.- Perfiles de acetilasas (continuación).

Antibióticos	Estirpes								
	157	160	161	163	164	165	166	167	171
GmC ₁	73	77	95		77	49			
GmC _{1a}	100	100	100		100	100	100		
Gm				100				100	100
Ss	64	60	56	67	65	38	84	69	84
KmA	12	18	13		8	4			
KmB	24	66	34		53	16			
Km				2			1	12	20
Tm	92	62	67	84	77	38	73	108	96
DKB	46	191	65	57	80	34	65	85	96
Nm	11	3	3	0	2	4	0	16	2
Pm	2	4	1	0	0	0	0	2	2
Bt	2	0	2		0	0			
Lm	5	2	2		2	1			
Rm	0	0	0	0	0	0	0	13	3
AN	3	2	2	1	3	1	1	4	4
Nt	11	9	13	8	15	10	28	45	64
Ap	1	0	0	0	0	1	0	1	3
2'-Nt	9	13	12		15	8			
6'-Nt	16	24	13		35	14			
5-Epi	5	15	12		10	8			
Dact	3	0	2		1	1			

Los valores se han calculado considerando la actividad de la Gm como 100%

Tabla-E.- Perfiles de acetilasas (continuación).

Antibióticos	Estirpes								
	175	178	179	180	181	182	183	187	189
GmC									
GmC1a									
Gm	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Ss	62	74	65	62	84	67	93	51	51
KmA									
KmB									
Km	82	5	5	15	6	6	7	5	17
Tm	113	106	63	60	97	89	95	45	76
DKB	85	89	63	71	63	47	71	43	98
Nm	59	1	0	13	1	4	1	1	5
Pm	2	1	0	13	0	4	1	1	4
Bt									
Lm									
Rm	56	1	0	13	2	3	2	1	4
AN	26	3	2	11	3	6	4	2	6
Nt	63	32	20	22	32	16	22	21	50
Ap	1	0	0	14	0	4	2	0	5
2'-Nt									
6'-Nt									
5-Epi									
Dact									
Los valores se han calculado considerando la actividad de la Gm como 100%									

Tabla-E.- Perfiles de acetilasas (continuación).

Antibióticos	Estirpes								
	193	194	197	198	200	201	202	203	204
GmCi									
GmCia									
Gm	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Ss	107	73	65	94	81	75	85	84	58
KmA									
KmB									
Km	3	8	113	5	32	8	8	4	5
Tm	119	113	102	88	91	97	93	91	73
DKB	48	93	110	44	136	63	71	61	53
Nm	0	2	69	4	0	1	0	8	3
Pm	1	2	2	2	0	1	0	2	4
Bt									
Lm									
Rm	0	2	102	4	0	1	2	4	2
AN	2	4	75	3	2	3	3	5	3
Nt	26	22	69	21	53	7	37	28	14
Ap	2	1	1	3	2	0	0	0	3
2'-Nt									
6'-Nt									
5-Epi									
Dact									

Los valores se han calculado considerando la actividad de la Gm como 100%

Tabla-E.- Perfiles de acetilasas (continuación).

Antibióticos	Estirpes			
	205	206	207	208
GmC1				
GmC1a				
Gm	100	100	100	100
Ss	100	82	68	70
KmA				
KmB				
Km	29	5	3	38
Tm	102	82	109	87
DKB	110	121	65	104
Nm	3	1	6	5
Pm	1	2	0	3
Bt				
Lm				
Rm	3	3	6	5
AN	4	7	4	6
Nt	80	28	11	88
Ap	2	5	0	9
2'-Nt				
6'-Nt				
5-Epi				
Dact				

Los valores se han calculado considerando la actividad de la Gm como 100%

TABLA-F.- Enzimas encontradas en cada aislado y actividades detectadas en los transconjugantes.

CEPA N°	ENZIMAS			
1	AAD(3'')	APH(3')	AAC(3)-V	
3	APH(3'')	APH(3')	AAC(3)-V	
5	AAD(3'')	APH(3')	AAC(3)-III	
6	APH(3'')	APH(3')	AAC(3)-III	
6T	APH(3'')	APH(3')	AAC(3)	
8	AAC(3)-II			
9	AAD(3'')	APH(3')	AAC(3)-III	
10	AAC(3)-V			
11	AAD(3'')	APH(3'')	APH(3')	AAC(3)-V
12	AAC(3)-V			
12T	AAC(3)			
15	AAC(3)-I			
16	AAD(3'')	AAC(3)-V	AAC(6')-I*	
16T	AAC(3)			

* Actividad mostrada inicialmente, posteriormente perdería esta actividad.

TABLA-F.- Enzimas encontradas en cada aislado y actividades detectadas en los transconjugantes (Continuación).

CEPA N°	ENZIMAS			
17	AAD(3")			
21	AAC(3)	APH(3')	APH(3")	AAC(6')-I
21H1	AAC(6')			
21H2	AAC(3)	APH(3')		
22	APH(3")	APH(3')	AAC(3)-V	
22T	APH(3")	APH(3')	AAC(3)	
23	APH(3")	APH(3')	AAC(3)-V	
23T	APH(3")	AAC(3)		
24	APH(3')	AAC(3)-V		
24T	APH(3')	AAC(3)		
25	AAD(3")	APH(3")	AAC(3)-V	
25T	AAC(3)			
26	AAC(3)-III			
26T	AAC(3)			
27	AAD(3")	AAC(3)-V		
27T	AAC(3)			

TABLA-F.- Enzimas encontradas en cada aislado y actividades detectadas en los transconjugantes (Continuación).

CEPA N°	ENZIMAS			
28	APH(3')	AAC(3)-V		
28T	AAC(3)	APH(3')		
29	AAD(3'')			
30	APH(3'')	APH(3')	AAC(3)-V	
30T1	APH(3')	AAC(3)		
30T2	APH(3'')	APH(3')	AAC(3)	
33	AAD(3'')	APH(3'')	APH(3')	AAC(3)-V
36	AAD(3'')	APH(3'')	APH(3')	AAC(3)-V
36T	APH(3')	AAC(3)		
37	AAC(6')-I			
39	APH(3')	APH(3'')		
39T	APH(3')	APH(3'')		
40	APH(3')	APH(3'')		
40T	APH(3'')	APH(3')		
41	APH(3'')	AAD(3'')		
41T	APH(3'')			

TABLA-F.- Enzimas encontradas en cada aislado y actividades detectadas en los transconjugantes (Continuación).

CEPA N°	ENZIMAS			
43	AAC(3)-II			
44	AAD(3")	AAC(6')-I		
44T1	AAC(6')			
44T2	AAD(3")			
45	APH(3')	AAD(3")	AAC(3)-V	
47	AAD(3")	AAC(3)-V		
47T	AAC(3)			
49	APH(3')	AAD(3")	AAC(3)-V	
50	APH(3")			
51	APH(3")	AAD(3")		
52	APH(3")			
52T	APH(3")			
54	AAD(3")	APH(3")	APH(3')	AAC(3)-V
55	APH(3")			
55T	APH(3")			

TABLA-F.- Enzimas encontradas en cada aislado y actividades detectadas en los transconjugantes (Continuación).

CEPA N°	ENZIMAS		
57	APH(3")		
58	APH(3")		
58T	APH(3")		
59	APH(3")	AAD(3")	AAC(3)-V
59T	AAD(3")	AAC(3)	
60	APH(3")		
60T	APH(3")		
61	APH(3")		
63	AAD(3")	APH(3")	APH(3')
63T	AAD(3")	APH(3")	APH(3')
64	APH(3")	APJH(3')	AAC(3)-V
64T	APH(3")	APH(3')	AAC(3)
66	APH(3")	APH(3')	AAC(3)-V
66T	AAC(3)		
67	APH(3")	APH(3')	
67T	APH(3")	APH(3')	

TABLA-F.- Enzimas encontradas en cada aislado y actividades detectadas en los transconjugantes (Continuación).

CEPA N°	ENZIMAS			
69	APH(3")	AAC(6')-I		
69T1	AAD(3")	APH(3")	APH(3')	AAC(6')
69T2	AAD(3")			
71	APH(3")			
71T	APH(3")			
72	APH(3")	APH(3')		
72T	APH(3")	APH(3')		
73	APH(3")			
73T	APH(3")			
74	APH(3")	APH(3')	AAD(3")	ANT(2")
74T	ANT(2")	APH(3")	APH(3')	
75	APH(3")	APH(3')	AAD(3")	ANT(2")
75T	APH(3")	APH(3')	ANT(2")	
76	APH(3")			
76T	APH(3")			
77	APH(3")	AAD(3")	APH(3')	AAC(3)-V
77T	APH(3")	APH(3')	AAC(3)	

TABLA-F.- Enzimas encontradas en cada aislado y actividades detectadas en los transconjugantes (Continuación).

CEPA N ^o	ENZIMAS			
78	APH(3'')	APH(3')	AAC(3)-II	
78T	APH(3'')	APH(3')	AAC(3)	
79	APH(3'')	APH(3')	AAC(3)-II	
79T1	APH(3'')	APH(3')	AAC(3)	
79T2	APH(3'')	AAC(3)		
80	APH(3'')	APH(3')		
80T	APH(3'')	APH(3')		
82	APH(3'')			
82T	APH(3'')			
84	APH(3'')	APH(3')		
84T	APH(3'')	APH(3')		
85	APH(3')			
85T	APH(3')			
87	AAD(3'')	APH(3'')	APH(3')	
87T	APH(3'')	APH(3')		
89	AAD(3'')	APH(3'')	APH(3')	AAC(3)-V
89T1	APH(3'')	APH(3')		
89T2	APH(3')			

TABLA-F.- Enzimas encontradas en cada aislado y actividades detectadas en los transconjugantes (Continuación).

CEPA N°	ENZIMAS		
90	APH(3")		
90T	APH(3")		
92	APH(3")	AAD(3")	
101	AAD(3")		
101T	AAD(3")		
102	AAD(3")		
102T	AAD(3")		
103	APH(3')	AAD(3")	AAC(3)-III
103T1	AAD(3")	APH(3')	
103T2	APH(3')		
105	APH(3')	AAD(3")	AAC(3)-III
105T1	AAD(3")	APH(3')	
105T2	APH(3')		
106	AAD(3")	APH(3')	AAC(3)-V
106T	AAD(3")	APH(3')	
107	AAD(3")	APH(3')	AAC(3)-V

TABLA-F.- Enzimas encontradas en cada aislado y actividades detectadas en los transconjugantes (Continuación).

CEPA N ^o	ENZIMAS		
112	AAD(3'')	APH(3'')	APH(3')
112T	APH(3'')	APH(3')	
113	APH(3'')		
113T	APH(3'')		
114	AAD(3'')	APH(3')	AAC(3)-V
118	APH(3'')		
119	AAD(3'')		
119T	AAD(3'')		
120	APH(3'')		
120T	APH(3'')		
121	APH(3'')		
121T	APH(3'')		
123	APH(3'')	AAD(3'')	
124	APH(3'')		
127	APH(3'')	APH(3')	AAD(3'')
127T	APH(3'')	APH(3')	

TABLA-F.- Enzimas encontradas en cada aislado y actividades detectadas en los transconjugantes (Continuación).

CEPA N°	ENZIMAS			
128	APH(3'')	APH(3')	AAD(3'')	
128T	APH(3'')	APH(3')		
129	APH(3'')	APH(3')	AAD(3'')	
129T1	APH(3'')	APH(3')		
129T2	APH(3')			
130	APH(3'')	APH(3')	AAC(3)-V	
130T1	APH(3'')			
130T2	APH(3'')	APH(3')	AAC(3)	
130T3	AAC(3)			
131	APH(3'')	APH(3')		
131T	APH(3'')	APH(3')		
132	AAC(3)-V	AAD(3'')		
132T	AAD(3'')			
133	APH(3'')	APH(3')		
135	APH(3'')	APH(3')		
144	APH(3')	APH(3'')	AAD(3'')	AAC(3)-V
144T1	AAD(3'')			
144T2	APH(3'')	APH(3')	AAC(3)	

TABLA-F.- Enzimas encontradas en cada aislado y actividades detectadas en los transconjugantes (Continuación).

CEPA N°	ENZIMAS			
146	AAD(3")	APH(3')	AAC(3)-v	
147	APH(3")	APH(3')	AAC(3)-V	
147T1	APH(3")	APH(3')	AAC(3)	
147T2	APH(3')	AAC(3)		
148	APH(3')	APH(3")	AAD(3")	
149	APH(3")	APH(3')	AAD(3")	AAC(39-V)
149T1	APH(3")	APH(3')	AAC(3)	
149T2	APH(3")			
150	APH(3")	AAD(3")	AAC(3)-V	
150T	APH(3")	AAC(3)		
151	AAD(3")	APH(3")	AAC(3)-V	
151T	AAD(3")	AAC(3)		
152	AAD(3")	APH(3")	AAC(3)-V	
152T	APH(3")	AAC(3)		
153	AAD(3")	ANT(2")		
153T	AAD(3")	ANT(2")		

TABLA-F.- Enzimas encontradas en cada aislado y actividades detectadas en los transconjugantes (Continuación).

CEPA N°	ENZIMAS			
154	ANT(2")	AAD(3")	APH(3")	
154T	ANT(2")	AAD(3")	APH(3")	
155	APH(3')	AAD(3")	APH(3")	
155T	APH(3")	APH(3')		
156	AAD(3")	APH(3')	AAC(3)-V	
157	APH(3")	AAD(3")	APH(3')	AAC(3)-V
157T	APH(3")	APH(3')		
160	AAC(3)-II			
160T	AAC(3)			
161	APH(3")	APH(3')	AAC(3)-V	
161T	APH(3')	AAC(3)		
163	AAD(3")	APH(3")	APH(3')	AAC(3)-V
163T	APH(3")	APH(3')	AAC(3)	
164	APH(3')	AAC(3)-V		
164T	APH(3')	AAC(3)		
165	AAD(3")	APH(3")	APH(3')	AAC(3)-V
165T	APH(3")	APH(3')	AAC(3)	

TABLA-F.- Enzimas encontradas en cada aislado y actividades detectadas en los transconjugantes (Continuación).

CEPA N°	ENZIMAS			
166	AAD(3")	APH(3")	AAC(3)-V	
167	APH(3')	AAD(3")	AAC(3)-V	
167T	AAD(3")	APH(3')	AAC(3)	
169	APH(3")	AAD(3")	APH(3')	ANT(2")
169T1	APH(3")	APH(3')		
169T2	APH(3")	APH(3')	ANT(2")	
171	APH(3')	AAC(3)-V		
171T1	AAD(3")	AAC(3)		
171T2	APH(3")	APH(3')	AAC(3)	
173	ANT(2")	AAD(3")		
173T	AAD(3")	ANT(2")		
174	APH(3')	APH(3")	ANT(2")	
174T	APH(3")	APH(3')	ANT(2")	
175	AAD(3")	APH(3')	AAC(6')-II	
176	ANT(2")			
177	ANT(2")			

TABLA-F.- Enzimas encontradas en cada aislado y actividades detectadas en los transconjugantes (Continuación).

CEPA N°	ENZIMAS			
178	APH(3')	AAD(3")	AAC(3)-V	
178T1	APH(3')	AAC(3)		
178T2	APH(3')	AAD(3")		
179	APH(3")	APH(3')	AAC(3)-V	
179T1	APH(3")			
179T2	APH(3")	APH(3')	AAC(3)	
180	AAD(3")	AAC(3)-V		
181	APH(3")	APH(3')	AAC(3)-V	
181T	APH(3")	APH(3')	AAC(3)	
182	AAD(3")	APH(3')	APH(3")	AAC(3)-V
182T	AAC(3)			
183	APH(3')	APH(3")	AAD(3")	AAC(3)-V
183T	APH(3')	APH(3')		
184	APH(3')			
184T	APH(3')			
187	APH(3")	APH(3')	AAC(3)-V	

TABLA-F.- Enzimas encontradas en cada aislado y actividades detectadas en los transconjugantes (Continuación).

CEPA N°	ENZIMAS			
189	APH(3'')	APH(3')	AAD(3'')	AAC(3)-V
189T1	APH(3')	AAC(3)		
189T2	AAD(3'')	APH(3')	APH(3'')	
190	APH(3')	APH(3'')		
190T	APH(3'')	APH(3')		
191	APH(3')	AAD(3'')		
191T	APH(3'')	APH(3')		
192	APH(3'')	APH(3')		
192T	APH(3'')			
193	APH(3')	AAC(3)-V		
193T	APH(3')	AAC(3)		
193R	AAD(3'')			
193RT	AAD(3'')			
194	APH(3')	AAC(3)-V		
194T	APH(3'')	APH(3')	AAC(3)	
197	APH(3')	AAD(3'')	AAC(6')-II	

TABLA-F.- Enzimas encontradas en cada aislado y actividades detectadas en los transconjugantes (Continuación).

CEPA N°	ENZIMAS		
198 198S	AAD(3'') AAC(3)	AAC(3)-V	
200 200T	APH(3') AAC(3)	APH(3'')	AAC(3)-II
201 201T	APH(3') AAC(3)	AAC(3)-V	
202	AAC(3)-V		
203	AAC(3)-V		
204 204T1 204T2	AAC(3)-II APH(3'') AAC(3)		
205	APH(3'')	APH(3')	AAC(3)-II
206 206T	APH(3'') APH(3'')	APH(3') APH(3')	AAC(39-V) AAC(3)
207	AAD(3'')	APH(3')	AAC(3)-V
208 208T	APH(3') APH(3')	APH(3'') APH(3'')	AAC(3)-II AAC(3)

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA.-

- 1.- AHMAD,M.H., RECHENMACHER,A. and BÖCK,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. y Kuemmerle,H.P. (eds.). ECOMED.FED.REP. Germany. 1: 650-652.
- 3.- ALLEN,N.E., ALBORN,W.E., HOBBS,J.H. and KIRST,H.A.. (1982). 7-Hydroxytropolone: an inhibitor of aminoglycoside-2"-O-adenyltransferase *Antimicrob. Agents. Chemother.* 22: 824-831.
- 4.- ARCHER,G.L. and JOHNSTON,J.L.. (1983). Self-transmissible plasmids in *Staphylococci* that encode resistance to aminoglycosides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 24: 70-77.
- 5.- ARROW,A.S. and TABER.H.W.. (1986). Streptomycin accumulation by *Bacillus subtilis* requires both a membrane potential and cytochrome a₃. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29: 141-146.
- 6.- AU,S., WEINER,N. and SCHACHT,J.. (1986). Membrane perturbation by aminoglycoside as a single screen of their toxicity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30: 395-397.
- 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.- BETTS,R.F., VALENTI,W.N., CHAPMAN,S.W., CHONMAITREE,T., MOWRER,G., PINCUS,P., MESSNER,M. and ROBERTSON,R.. (1984). Five-year surveillance of aminoglycoside usage in a University Hospital. *Ann Inter Med.* 100: 219-222.
- 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* isolate. *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.- **BRENNER,D.J..** (1984).Facultatively anaerobic gram negative rods. En: *Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology*. Krieg,N.R. y Holt,J.G. (eds.). Williams and Wilkins. Baltimore/London, UK.pp:408-420.
- 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 an 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 c552 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 susceptibility and resistant bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 12: 163-177.
- 20.- **CALDERWOOD,S.A., WERNNERSTEN,D.M., MOELLERING,R.C. KUNZ,L.J. and KROGSTAD,D.J..** (1977). Resistance to six aminoglycosidic aminocyclitol antibiotics among enterococci: prevalence evolution and relationship to synergism with penicillin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 12: 401-405.
- 21.- **CARLIER,C and COURVALIN,P..** (1982). A plasmid which does not encoded the aminoglycoside phospho transferase in the butirosin-producing strain of *Bacillus circulans*. *J.Antibiot.* xxxv: 629-634.
- 22.- **CARLIER,M.B., 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.
- 23.- **CHASLUS-DANCLA,E., GERBAUT,G., MARTEL,J., LAGORCE, M., LAFONT,J. and COURVALIN,P..** (1987). Detection of a second mechanism of resistance to gentamicin in animal strains of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31: 1274-1277.
- 24.- **CHASLUS-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.

- 25.- 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. Baterial.* 156: 1373-1377.
- 26.- COLLATZ,E., CARLIER,C. and COURVALIN,P.. (1984). Characterization of high-level aminoglycoside resistance in a strain of *Streptococcus pneumoniae* *J. Gen. Microbial.* 130: 1665-1671.
- 27.- 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.
- 28.- COURTNEY,M.-A., MILLER,J.R., SUMMERSGILL,J., MELO,J., RAFF,M.J. and STREIPS,U.N.. (1980). R-factor responsible for an outbreak of multiply antibiotic-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 18: 926-929.
- 29.- COURVALIN,P. and CARLIER,C.. (1986). Transposable multiple antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Gen Genet.* 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 DAVIES,J.. (1977). Plasmid-mediated aminoglycoside phosphotransferase of broad substrate range that phosphorylates amikacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 11: 619-624.
- 32.- COURVALIN,P and FIANDT,M.. (1980). Aminoglycoside- modifying enzymes of *Staphylococcus aureus*: expression in *Escherichia coli*. *Gene* 9: 247-269.
- 33.- COURVALIN,P, SHAW,W.V. and JACOB,A.E.. (1978). Plasmid-mediated mechanism of resistance to aminoglycoside-aminocyclitol antibiotics and to chloramphenicol in group D *Streptococci*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 13: 716-725.
- 34.- COURVALIN,P., WEISBLUM,B. and DAVIES,J.. (1977). Aminoglycoside-modifying enzyme of an antibiotic- producing bacterium acts as a determinant of antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 74: 999-1003.
- 35.- DAMPER,P.D. and EPSTEIN,W.. (1981). Role of the membrane potential in bacteria resistance to aminoglycoside antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 20: 803-808.
- 36.- DAVIES,J.. (1980). Mechanisms of antibiotic resistance. En: *Current Concept of The Upjohn Company*.
- 37.- DAVIES,J. and COURVALIN,P.. (1977). Mechanisms of resistance to aminoglycosides. *Am J Med.* 62: 868-872.

- 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 Microbial.* 32: 469-518.
- 40.- DAVIS,B.D.. (1987). Mechanism of bactericidal action of aminoglycoside. *Antimicrob Rev.* 51: 341-350.
- 41.- DESAI,B., PANHOTRA,B.R. and AGARWAL,K.C.. (1981). Transferable drugs resistance in *Proteus* species. *Indian J Med Res.* 74: 192-195.
- 42.- DEVAUD,M., KAYSER,F.H. and BÄCHI,B.. (1982). Transposon-mediated multiple antibiotic resistance in *Acinetobacter* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 22: 323-329.
- 43.- DE VOS,G.F., FINAN,T.M., SIGNER,E.R. and WALKER,G. C.. (1984). Host-dependent transposon Tn5-mediated streptomycin resistance. *J. Bacteriol.* 159: 395-399.
- 44.- DICKIE,P., BRYAN,L.E. and PICKARD,M.A.. (1978). Effect of enzymatic adenylation of dihydrostreptomycin accumulation in *Escherichia coli* carrying an R-factor: model explaining aminoglycoside resistance by inactivating mechanisms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 14: 569-580.
- 45.- DOWDING,J.E.. (1977). Mechanisms of gentamicin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 11: 47-50.
- 46.- EISEMBERG,J.M., KOFFER,H., GLICK,H.A., CONNELL, M.L., LOSS,L.E., TALBOT,G.H., SHUSTERMAN,N.H. and STROM,B.L.. (1987). What is the cost of nephrotoxicity associated with aminoglycosides?. *Ann Inter Med.* 107: 900-909.
- 47.- 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: 1528-1532.
- 48.- EL SOLH,N., MOREAU,N. and EHRLICH,S.D.. (1986). Molecular cloning and analysis of *Staphylococcus aureus* chromosomal aminoglycoside resistance genes. *Plasmid* 15: 104-118.
- 49.- ESPLUGES J.. (1981). Aminoglicósidos. En: *Terapéutica antibiótica*. Belmonte,A. (ed.). RUAN S.A. Madrid, España. pp:65-74.
- 50.- ESTARREADO,V.M.. (1980). Contribución al estudio de algunos enzimas inactivantes de antibióticos aminoglicósidos producidos por plásmidos R. *Inmunologika.* 4: 26-54.
- 51.- EUSTICE,D.C. and WILHELM,J.M.. (1984). Mechanisms of action of aminoglycoside antibiotics in eucaryotics protein synthesis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 26: 53-60.

- 52.- **FACINELLI,B. and CALEGARI,L..** (1984). A Hospital epidemic caused by a multiple antibiotic resistant *Klebsiella pneumoniae*: implication of a conjugative R plasmid. *Boll Ist Sieroter Milan* 63: 111-117.
- 53.- **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.
- 54.- **FOSTER,T.J..** (1983). Plasmid-determined resistance to antimicrobial drugs and toxic metals ions in bacteria. *Microbiol Rev.* 47: 361-409.
- 55.- **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, Sydney, Toronto. pp:402-547.
- 56.- **GANGADHARAM,D.R., KESAVALU,L., RAO,P.N., PERUMAL,V.K. and ISEMAN, M.D..** (1988). Activity of amikacin against *Mycobacterium avium* complex under simulated in vivo conditions. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 886-889.
- 57.- **GARCIA-RODRIGUEZ,J.A..** (1987). Estructura Bacteriana. En: *Microbiología y Parasitología Medica*. Pumarola,A., Rodriguez-Torres,A., García-Rodríguez,A. y Piedrola-Angulo,G. (eds.). Salvat Editores S.A.. Barcelona. España. pp:35-36.
- 58.- **GARCIA-RODRIGUEZ,J.A..** (1987). Yersinia. En: *Microbiología y Parasitología Medica*. Pumarola,A., Rodriguez-Torres,A., García-Rodríguez,A. y Piedrola-Angulo,G. (eds.). Salvat Editores S.A.. Barcelona. España. pp:449-455.
- 59.- **GATELL,J.M..** (1988). Los aminoglicósidos. Bristol Meyer, S.A.E..
- 60.- **GENILLOUD,O., BLAZQUEZ,J., MAZODIER,P. and MORENO,F..** (1988). A clinical isolate of transposon Tn5 expressing streptomycin resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 170: 1275-1278.
- 61.- **GIAMARELLOU,H., PEPHANIS,A., FLORENTIN,I., PETRIKKOS,G., AVLAMIS,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.
- 62.- **GILLELAND,L.B., GILLELAND,H.E., GIBSON,J.A. and CHAPLIN,F.R..** (1989). Adaptative resistance to aminoglycoside antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol.* 29: 41-50.
- 63.- **GOMEZ-LUS,R..** (1982). Enzimas inactivantes de aminoglicósidos producidos por plámidos R. En: *Actas del VII Congreso Nacional de Microbiología*. Mira,J. y Zafra,J. (eds.). Sociedad Española de Microbiología. Madrid,España. pp:108-116.

- 64.- GOMEZ-LUS,R. (1989). Detección por antibiograma de los mecanismos de resistencia a aminoglicósidos. *Rev Esp Quimioterap.* 2(suppl 1): 23-25.
- 65.- GOMEZ-LUS,R. (1989). Enzimas modificantes de aminoglicósidos. *Rev Esp Quimioterap.* 11: 107-114.
- 66.- GOMEZ-LUS,R, GOMEZ-LUS,S., GOÑI,M.P., RIVERA,M.J., MARTIN,C. and RUBIO-CALVO,M.C.. (1989). Stability of dactimicin to aminoglycoside-modifying enzymes produced by 341 bacterial clinical isolates. *Drugs Exptl Clin Res.* XV: 129-132.
- 67.- 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 clínica de *Serratia marcescens*. *Rev Esp Quimioterap.* 2(suppl 1):43.
- 68.- 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, Berlín . Fed.Rep. Germany. pp:295-303.
- 69.- GOMEZ-LUS,R., OTAL,I., GOMEZ-LUS,M.L., SARRASECA, C., CASTILLO,J., GIL,J. and RUBIO-CALVO,M.C.. (1989). Comparative activity cefotetan against plasmid-encoded aminoglycoside-resistant *Enterobacteria* strains.*J. Chemother.* 1 (Suppl 4) : 281-293.
- 70.- GOMEZ-LUS,R., RIVERA,M.J. and VITORIA,M.A.. (1984). A growing clinical problem: plasmid- determined resistance to aminocyclitol-aminoglycosides in *Enterobacteria*. *Chemoterapia.* III: 368-370.
- 71.- GOMEZ-LUS,R., RUBIO-CALVO,M.C., LARRAD,M.C., NAVARRO,M., LASIERRA, P. and VITORIA,M.A.. (1980). 3-N-aminoglycoside-acetylating enzymes produced by R-plasmid-carrying bacteria isolated in General Hospital. En: *Current Chemotherapy and Infectious Diseases*. Nelson,J.D. y Grassi,C. (eds.). American Society for Microbiology. Washington D.C.,USA.1: 708-710.
- 72.- GRAY,G.S., HUANG,R.T. and DAVIES,J.. (1983). Aminocyclitol resistance in *Staphylococcus aureus*: presence of plasmids an aminocyclitol-modifying enzymes. *Plasmid* 9: 147-158.
- 73.- 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.
- 74.- 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.

- 75.- HAAS,M., BIDDLECOME,S., DAVIES,J., LUCE,C.E. and DANIELS,P.J.. (1976). Enzymatic modification of aminoglycoside antibiotics: a new 6-N'- acetylylating enzyme from a *Pseudomonas aeruginosa* isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 9: 945-950.
- 76.- HAAS,M. and DOWDING,J.E.. (1975). Aminoglycoside-modifying enzymes. En: *Methods in Enzymology*. Hash,J. (ed.). Academic Press. New York, USA. 43: 611-628.
- 77.- 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.
- 78.- 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.
- 79.- 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.
- 80.- HUMBERT,R. and ALTENDORF,K.. (1989). Defective γ - subunit of ATP synthase (F₁F₀) from *Escherichia coli* leads to resistance to aminoglycoside antibiotics. *J. Bacteriol.* 171: 1435-1444.
- 81.- 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.
- 82.- 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.
- 83.- JOHN,J.F., Mc NEILL,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: 587-591.
- 84.- JORDENS,J.Z. and HALL,L.N.. (1989). Chromosomally-encoded gentamicin resistance in "epidemic" methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: detection with a synthetic oligonucleotide probe. *J. Antimicrob. Chemother.* 23: 327-334.
- 85.- KABINS,S., NATHAN,C. and COHEN,S.. (1974). Gentamicin-adenylyl-transferase activity as a cause of gentamicin resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 5: 565-570.
- 86.- KABINS,S., NATHAN,C. and COHEN,S.. (1976). In vitro comparison of netilmicin and a semisynthetic derivative of sisomicin, and four other aminoglycoside antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 10: 136-145.
- 87.- KADO,C.I and LIU,S.T.. (1981). Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* 145: 1365-1373.

- 88.- KATOH-KANNO,R., KIMURA,M., IKEDA,T. and KIMURA,S.. (1986). Survey of modifying enzymes and plasmids in amikacin-resistant *Serratia marcescens*. *Microbiol Immunol.* 30: 509-519.
- 89.- KAWABE,H., INOUE,M. and MITSUHASHI,S.. (1974). Inactivation of dihydrostreptomycin and spectinomycin by *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 5: 553-557.
- 90.- 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. *Antimicrobial. Agents Chemother.* 7: 494-499.
- 91.- 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.
- 92.- KAYSER,F.H., HOMBERGER,F. and DEVAUD,M.. (1981). Aminocyclitol-modifying enzymes specified by chromosomal genes in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 19: 766-772.
- 93.- KELLY,M.T., BRENNER,T.J. and FARMER III,J.J.. (1985). *Enterobacteriaceae*. En: *Manual of Clinical Microbiology*. Lennet,E., Balowa,A., Hausler,W. and Shadomy,J. (eds.). American Society for Microbiology.Washington,D.C. USA. pp:263-277.
- 94.- KIDA,M., IGARASI,S., OKUTANI,T., ASAKO,T., HIRAGA,K. and MITSUHASI,S.. (1974). Selective phosphorylation of the 5"-hydroxy group of ribostamycin by a new enzyme from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 5: 92-94.
- 95.- KOCABIYICK,S., AKALIN,E. and ALAEDDINOGLU,G.. (1987). Aminoglycoside-resistance profiles of gentamicin-resistant strains of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas*. En: *Progress in Chemotherapy Antimicrobial Section*. Bercarda,B. y Kuemmerle,H.P. (eds.). ECOMED. Fed.Rep. Germany. 1:650-652.
- 96.- KOTARSKI,S.F., MERRIWETHER,T.L., TKALCEVIC,G.T. and GEMSKI,P.. (1986). Genetic studies of kanamycin resistance in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30: 225-230.
- 97.- LAMBERT,T., GERBAUD,G. and COURVALIN,P.. (1988). Transferable amikacin resistance in *Acinetobacter* spp. due to a new type of 3'-aminoglycoside-phosphotransferase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 15-19.
- 98.- 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.
- 99.- LEE,S.C., GERDING,D.N. and CLEARY,P.P.. (1986). Hospital distribution, persistence, and reintroduction of related gentamicin R plasmids. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29: 654-659.

- 100.-LE GOFFIC,F.. (1977). The resistance of *S.aureus* to aminoglycoside antibiotics and pristinamycin in France in 1976-1977. *Jnp J Antibiot.* XXX (suppl.): S.286-S.291.
- 101.-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.
- 102.-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.
- 103.-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.
- 104.-LE GOFFIC,F., MOREAU,N. and MASON,M.. (1977). Are some aminoglycoside antibiotics inactivating enzymes polifunctional?. *Ann Inst Pasteur Microbiol.* 128B: 465-469.
- 105.-LE GOFFIC,F., MOREAU,N., SOUSSY,C.J. and DUVAL,J.. (1977). How can DKB and tobramycin be inactivated on two diferent sites by the same enzyme?. *Ann Inst Pasteur Microbiol.* 128B: 459-463.
- 106.-LEVINE,J.F., MASLOW,M.J., LEIBOWITZ,R.E., POLLOCK, A.A., HANNA,B.A., SCHAEFLER,S., SIMBERKOFF,M.S. and RAHAL,J.J.. (1985). Amikacin-resistant gram negative bacilli: correlation of occurrence with amikacin use. *J Infect Dis.* 151: 295-300.
- 107.-LIPSKY,J.J. and LIETMAN,P.S.. (1980). Neomycin inhibition of adenosine tiphosphatase: evidence for a neomycin-phospholipid interaction. *Antimicrob. Agents Chemother.* 18: 532-535.
- 108.-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.
- 109.-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.
- 110.-MANIATIS,T. FRITSCH,E.F. and SAMBROOK,J.. (1982). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold. Spring Harbor Laboratory Press. New York, USA.
- 111.-MARTIN.N.L. and BEVERIDGE,T.J.. (1986). Gentamicin interaction with *Pseudomonas aeruginosa* cell envelope. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29: 1079-1087.
- 112.-MARTIN,C., GOMEZ-LUS,R., ORTIZ,J.M. and GARCIA-LOBO,J.M.. (1987). Structure and mobilization of an ampicillin and gentamicin resistance determinant. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31: 1266-1270.

- 113.-MARTINEZ,J.L., BLAZQUEZ,J., VICENTE,M.F., MARTINEZ-FERRER,M., REGUERA,J.A., CULEBRAS,E. and BAQUERO,F.. (1989). Influence of gene dosing on antibiotic resistance mediated by inactivating enzymes. *J. Chemother.* 1(suppl 4): 265-267.
- 114.-MATES,S.M., PATEL,L., KABACK,H.R. and MILLER,M.H.. (1983). Membrane potential in anaerobically growing *Staphylococcus aureus* and its relationship to gentamicin uptake. *Antimicrob. Agents Chemother.* 23: 526-530.
- 115.-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.
- 116.-MATSUHASHI,Y., YOSHIDA,T., HARA,T., KAZUNO,Y. and INOUE,S.. (1985). In vitro and in vivo antibacterial activities of dactimicin, a novel pseudodisaccharide aminoglycoside compared with those of other aminoglycoside antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 27: 589-594.
- 117.-MATSUNAGA,K., YAMAKI,H., NISHINURA,T. and TANAKA, N.. (1986). Inhibition of DNA replication of initiation by aminoglycoside antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30: 468-474.
- 118.-MAYER,K.H., HOPKINS,J.D., GILLEECE,E.S., CHAO,L. and O'BRIEN,T.F.. (1986). Molecular evolution, species distribution, and clinical consequences of an endemic aminoglycoside resistance plasmid. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29: 628-633.
- 119.-Mc COMBIE,W.R., HANSEN,J.B., ZYLSTRA,G.J., MAURER, B. and OLSEN,R.H.. (1983). *Pseudomonas* streptomycin resistance transposon associated with R-plasmid mobilization. *J. Bacteriol.* 155: 40-48.
- 120.-Mc HUGH,G.L. and SWARTZ,N.. (1977). Elimination of plasmids from several bacterial species by novobiocin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 12: 423-426.
- 121.-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.
- 122.-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:1.1-1.2.
- 123.-MUCHA,D.K. and FARRAND,S.K. (1986). Diversity of determinants encoding carbenicillin, gentamicin and tobramycin resistance in nosocomial *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30: 281-289.

- 124.-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.
- 125.-MURRAY,B.E., TSAO,J. and PANIDA,J.. (1983). *Enterococci* from Bangkok, Thailand, with high-level resistance to currently available aminoglycosides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 23: 799-802.
- 126.-NAKAE,R. and NAKAE,T.. (1982). Diffusion of aminoglycoside antibiotics across the outer membrane of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 22: 554-559.
- 127.-NOBUTA,K., TOLMASKY,M.E., CROSA,M.L. 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.
- 128.-NOVICK,R.P.. (1981). Plásmidos. *Investigación y Ciencia.* 53: 46-59.
- 129.-O'BRIEN,T.F., ROSS,D.G., GUZMAN,M.A., MEDEIROS A. A., HEDGES,R.W. and BOTSTEIN,D.. (1980). Dissemination of an antibiotic resistance plasmid in hospital patient flora. *Antimicrob. Agents Chemother.* 17: 537-543.
- 130.-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.
- 131.-OHASHI,Y., KABAWA,H., SATO,K., NAKAMURA,N., KURASHIGE,S. and MITSUHASHI,S.. (1980). In vitro and in vivo antibacterial activity of KW1070, a new aminoglycoside antibiotic. *Antimicrob. Agents Chemother.* 17: 138-146.
- 132.-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.
- 133.-OUELLETTE,M., GERBAUD,G., LAMBERT,T. and COURVALIN,P.. (1987). Acquisition by a *Campylobacter*-like strain of aph A-1, a kanamycin resistance determinant from members of the family *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31: 1021-1026.
- 134.-PAPADOPOULOU,B. and COURVALIN,P.. (1988). Dispersal in *Campylobacter* spp. of aphA-3, a kanamycin resistance determinant from gram- positive cocci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 945-948.
- 135.-PEREZ-GONZALEZ,J.A., LOPEZ-CABRERA,M., PARDO, J.M. and JIMENEZ,A.. (1989). Biochemical characterization of two cloned resistance determinants encoding of paromomycin acetyltransferase and a paromomycin phosphotransferase from *Streptomyces rimosus forma paromomycinus*. *J. Bacteriol.* 171: 329-334.

- 136.-**PERLIN,M.H. and LERNER,S.A..** (1981). Localization of an amikacin 3'-phosphotransferase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 147: 320-325.
- 137.-**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.
- 138.-**PERLIN,M.H. and LERNER,S.A..** (1986). High-level amikacin resistance in *Escherichia coli* due to phosphorylation and impaired aminoglycoside uptake. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29: 216-224.
- 139.-**PHILIPS,I. and SHANNON,K..** (1977). In vitro inhibitory activity and enzyme susceptibility of netilmicin and gentamicin. *Curr Chemother.* 11: 896-898.
- 140.-**PHILIPS,I and SHANNON,K..** (1984). Aminoglycoside resistance. *Br Med Bull.* 40: 28-35.
- 141.-**PIWOWARSKI,J.N. and SHAW,P.D..** (1979). Streptomycin resistance in a streptomycin- producing microorganism. *Antimicrob. Agents Chemtoher.* 16: 176-182.
- 142.-**PRICE,K.E..** (1986). Aminoglycoside Research 1975-1985: prospects for development of improved agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29: 543-548.
- 143.-**PRICE,K.E., DE FURIA,M.D. and PURSIANO,T.A..** (1976). Amikacin, an aminoglycoside with marked activity against antibiotic-resistant clinical isolates. *J Infec Dis.* 134(suppl.): S249-S261.
- 144.-**PRICE,K.E., KRESEL,P.A., FARCHIONE,L.A., SISKIN,S.B. and KARPOW, S.A..** (1981). Epidemiological studies of aminoglycoside resistance in the USA. *J. Antimicrob. Chemother.* 8(Suppl.A): 89-105.
- 145.-**PRINCE,A.S. and JACOBY,G.A..** (1982). Cloning the gentamicin resistance gene from a *Pseudomonas aeruginosa* plasmid in *Escherichia coli* enhances detection of aminoglycoside modification. *Antimicrob. Agents Chemother.* 22: 525-526.
- 146.-**PUMAROLA,A..** (1987). *Enterobacterias: caracteres generales.* En: *Microbiología y Parasitología Medica.* Pumarola,A., Rodríguez-Torres,A., García-Rodríguez,A. y Piedrola-Angulo,G. (eds.). Salvat Editores S.A.. Barcelona. España. pp:413-421.
- 147.-**PUMAROLA,A..** (1987). Salmonella. En: *Microbiología y Parasitología Medica.* Pumarola,A., Rodríguez-Torres,A., García-Rodríguez,A. y Piedrola-Angulo,G. (eds.). Salvat Editores S.A.. Barcelona. España. pp:422-430.
- 148.-**PUMAROLA,A..** (1987). Shigella y *Escherichia E.coli* productores de diarrea). En: *Microbiología y Parasitología Medica.* Pumarola,A., Rodríguez-Torres,A., García-Rodríguez,A. y Piedrola-Angulo,G. (eds.). Salvat Editores S.A.. Barcelona. España. pp:431-440.

- 149.-PUMAROLA,A.. (1987). Enterobacterias oportunistas. 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:441-448.
- 150.-RADIKA,K and NORTHROP,D.B.. (1984). Correlation of antibiotic resistance with V_{max}/K_m ratio of enzymatic modification of aminoglycosides by kanamycin acetyltransferase. **Antimicrob. Agents Chemother.** 25: 479-482.
- 151.-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 higromycin B resistance in *Escherichia coli*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 24: 689-695.
- 152.-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.
- 153.-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.
- 154.-RIVERA,M.J., VITORIA,M.A., NAVARRO,M., ROBLEDANO,L., CHOCARRO,P. and GOMEZ-LUS,R.. (1984). Hospital dissemination among gram-negative bacillus strains of an Inc M plasmid encoding an AAC(3) and a Tem-1 β -lactamase. **Drugs Exptl Clin Res.** X: 789-795.
- 155.-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. pp:88.
- 156.-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.
- 157.-ROY,C.. (1984). Interpretación de un antibiograma. **Enfermedades Infecciosas.** 1: 29-36.
- 158.-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.
- 159.-SALEH,N.A., ZWIEFAK,A., PECZYNSK-CZOCZ,W., MORDARSKI,M. and PULVERER,G.. (1988). New inhibitors for aminoglycoside-adenyltransferase. **Zbl Bakt Hyg.A** 270: 66-75.
- 160.-SALISBURY,V., HEDGES,R.W. and DATTA,N.. (1972). Two modes of "curing" transmissible bacterial plasmids. **J Gen Microbiol.** 70: 443-452.

- 161.-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.
- 162.-SANTANAM,P. and KAYSER,F.. (1976). Enzymatic adenylation by aminoglycoside 4'- adenylyltransferase and 2"-adenylyltransferase as a means of determining concentrations of aminoglycoside antibiotics in serum. *Antimicrob. Agents Chemother.* 10: 664-667.
- 163.-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* Berkarda,B. and Kuemmerle,H.P. (eds.). Ecomed. Fed.Rep.Germany. pp:317.
- 164.-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.
- 165.-SHANNOM,K. and PHILLIPS,I.. (1982). Mechanisms of resistance to aminoglycosides in clinical isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 9: 91-102.
- 166.-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.
- 167.-SHIMIZU,K., KUMADA,T., HSIEH,W., CHUNG,H., 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.
- 168.-SHINKAWA,H., SUGIYAMA ,M. and NIMI,O.. (1987). The nucleotide sequence of a streptomycin 6- phosphotransferase gene from a streptomycin producer. *J Gen Microbiol.* 133: 1289-1296.
- 169.-SHLAES,D.M., CURRIE-McCUMBER,C., EANES,M., ROTTER,G. and FLOYD,R.. (1986). Gentamicin- resistance plasmids in an intensive care unit. *Infection Control.* 7: 355-361.
- 170.-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.
- 171.-SLEIGH,J.D.. (1989). *Shigella*. En: *Practical Medical Microbiology*. Collee,J.G., Fraser,A.G. and Marmion,B.P. (eds.). Churchill Livingstone. Edinburgh, London, Melbourne and New York. pp:482-490.
- 172.-SLEIGH,J.D. and DUGUID,J.P.. (1989). *Enterobacteriaceae: Escherichia, Klebsiella, Proteus* and other enterobacteria. En: *Practical Medical Microbiology*. Collee,J.G., Fraser,A.G. and Marmion,B.P. (eds.). Churchill Livingstone. Edinburgh, London, Melbourne and New York. pp:432-455.

- 173.-SLEIGH,J.D. and DUGUID,J.P.. (1989). *Salmonella*. En: **Practical Medical Microbiology**. Collee,J.G., Fraser,A.G. and Marmion,B.P. (eds.). Churchill Livingstone. Edinburgh, London, Melbourne and New York. pp:456-481.
- 174.-STEFANI,S. and RUSSO,G.. (1989). Aminoglycoside resistance due to alteration of transport mechanisms. **J Chemother.** 1(suppl 4): 369-370.
- 175.-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.
- 176.-SUGIYAMA,M., SAKAMOTO,M., MOCHIZUKI,M., NIMI,O. and NOMI,R.. (1983). Purification and characterization of streptomycin-6-kinase, and enzyme implicated in self-protection of a streptomycin-producing microorganism. **J Gen Microbiol.** 129: 1683-1687.
- 177.-TANAKA,N., MATSUNAGA,K., HIRATA,A., MATSUHISA,Y. and NISHIMURA,T.. (1983). Mechanism of action of habekacin, a novel aminoacid-containing aminoglycoside antibiotic. **Antimicrob. Agents Chemother.** 24: 797-802.
- 178.-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.
- 179.-TENOVER,F.C. and ELVRUM,P.M.. (1988). Detection of two different kanamycin resistance genes in naturally occurring isolates of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 32: 1170-1173.
- 180.-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.
- 181.-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.
- 182.-HOMPSON,C.J., SKINNER,R.H., THOMPSON,J., WARD,J. M., HOPWOOD,D.A. and CUNDLIFFE,E.. (1982). Biochemical characterization of resistance determinants cloned from antibiotic-producing *Streptomyces*. **J. Bacteriol.** 151: 678-685.
- 183.-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.
- 184.-TOLMASKY,M.E., ROBERTS,M., WOLOJ,M. and CROSA,J.H.. (1986). Molecular cloning of amikacin resistance determinants from a *Klebsiella pneumoniae* plasmid. **Antimicrob. Agents Chemother.** 30: 315-320.

- 185.-TRAN VAN NHIEU,G. and COLLATZ,E.. (1987). Primary structure of an aminoglycoside 6'-N- acetyltransferase, AAC(6')-IV, fused in vivo with the signal peptide of 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.-TRAN VAN NHIEU,G., GOLDSTEIN,F.W., PINTO,M.E., ACAR,J.F. and COLLATZ,E.. (1986). Transfer of amikacin resistance by closely related plasmids in members of the family *Enterobacteriaceae* isolated in Chile. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29: 833-837.
- 188.-TRAUB,W.H. and BAUER,D.. (1987). Outer membrane protein alterations in *Serratia marcescens* resistant against aminoglycoside and β -lactam antibiotics. *Chemotherapy* 33: 172-176.
- 189.-TRIEU-CUOT,P., ARTHUR,M. and COURVALIN,P.. (1987). Origin, evolution and dissemination of antibiotic resistance genes. *Microbiol Sci.* 4: 263-266.
- 190.-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.
- 191.-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.
- 192.-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.
- 193.-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.
- 194.-UDUO,T., MIZUGUCHI,Y. and WALLACE,R.. (1987). Patterns and distribution of aminoglycoside- acetylating enzymes in rapidly growing *Mycobacteria*. *Am Rev Respir Dis.* 136: 338-343.
- 195.-UDUO,T., MIZUGUCHI,Y. and WALLACE,R. (1989). Does aminoglycoside-acetyltransferase in rapidly growing *Mycobacteria* have a metabolic function in addition to aminoglycoside inactivation?. *FEMS Microbiology Letters* 57: 227-230.
- 196.-UDUO,T., MIZUGUCHI,Y. and YAMADA,T.. (1986). Biochemical mechanisms of antibiotic resistance in a clinical isolate of *Mycobacterium fortuitum*. *Am Rev Respir Dis.* 133: 653-657.

- 197.-UMEDA,A., MURATA,K. and AMAKO,K.. (1986). Astromicin-induced membrane damage in *Serratia marcescens*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30: 398-402.
- 198.-UMEZAWA,H.. (1974). Biochemical mechanism of resistance to aminoglycosidic antibiotics. *Adv Carbohydr Chem Biochem.* 30: 183-225.
- 199.-UMEZAWA,H., OKANISHI,M., KONDO,S., HAMANA,K., UTAHARA,R. and MAEDA,K.. (1967). Phosphorylative inactivation of aminoglycosidic antibiotics by *Escherichia coli* carrying R factor. *Science* 157: 1559-1561.
- 200.-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.
- 201.-VASTOLA,A.P., ALTSCHAEFL,J. and HARFORD,S.. (1980). 5-epi-sisomicin and 5-epi-gentamicinB: substrates for aminoglycoside-modifying enzymes that retain activity against aminoglycoside-resistant bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 17: 798-802.
- 202.-VAZQUEZ,D.. (1981). Inhibidores de la síntesis de proteínas. *Investigación y Ciencia.* 62: 130-144.
- 203.-VLIEGENTHART,J.S., KETELAAR-VAN GAALEN, P. and VAN DE KLUNDERT,J.. (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.
- 204.-WAITZ,J.A., MILLER,G.H., MOSS,E. and CHIU,P.J.. (1978). Chemotherapeutic evaluation of 5-epi-sisomicin (Sch22591) a new semisynthetic aminoglycoside. *Antimicrob. Agents Chemother.* 13: 41-48.
- 205.-WALKER,S.G. and BEVERIDGE,T.J.. (1988). Amikacin disrupts the cell envelope of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027. *Can J Microbiol.* 34: 12-18.
- 206.-WEEMS,J.J., LOWRANCE,J.H., BADDOUR,L.M. and SIMPSON,W.A.. (1989). Molecular epidemiology, of nosocomial, multiply aminoglycoside resistant *Enterococcus faecalis*. *J. Antimicrob. Chemother.* 24: 121-130.
- 207.-WEINSTEIN,R.A., NATHAN,C. GRUESFELDER,R. and KABINS,S.A.. (1980). Endemic aminoglycoside resistance in gram-negative bacilli: epidemiology and mechanisms. *J Infec Dis.* 141: 338-345.
- 208.-WILKOWSKE,C.J. and HERMANS,P.E.. (1983). General principles of antimicrobial therapy. *Mayo Clin Proc.* 58: 6-13.
- 209.-WOLOJ,M., TOLMASKY,M.E., ROBERTS,M.C. and CROSA,J.H.. (1986). Plasmid-encoded amikacin resistance in multiresistant strains of *Klebsiella pneumoniae* isolated from neonates with meningitis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29: 315-319.



- 210.-YAMAGUCHI,M., KOSHI,T., KOBAYASHI,F. and MITSUHASHI,S.. (1972). Phosphorylation of lividomycin by *Escherichia coli* carrying an R factor. *Antimicrob.Agents Chemother.* 2: 142-146.
- 211.-YOUNG,E.J., SEWELL,S.M., KOZA,M.A. and CLARRIDGE,J.E.. (1985). Antibiotic resistance patterns during aminoglycoside restriction. *Am J Med Sci.* 290: 223-227.
- 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 enzymes 3'-aminoglycoside phosphotransferase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 27: 739-744.