

RESISTENCIA A
AMINOGLUCÓSIDOS EN
ENTEROBACTERIACEAE

FEDERICO GRÜNBAUM

Barcelona, 30 de Enero de 2011.

La Dra. Beatriz Mirelis Otero, Profesora Titular Universitaria del Departamento de Genética y de Microbiología de la Universidad Autónoma de Barcelona y Jefe Clínico del Servicio de Microbiología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau y **El Dr. Ferran Navarro Risueño**, Profesor Asociado Médico del Departamento de Genética y de Microbiología de la Universidad Autónoma de Barcelona y Jefe Clínico del Servicio de Microbiología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

Certifican que:

La presente tesis titulada “**Resistencia a aminoglucósidos en *Enterobacteriaceae***” presentada por **Federico Grünbaum Blanch** para optar al grado académico de Doctor por la Universidad Autónoma de Barcelona, ha sido elaborada bajo nuestra dirección y cumple con los requisitos necesarios para su tramitación y posterior defensa delante del tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firmamos este documento a los efectos oportunos.

Dr. Ferran Navarro

Servei de Microbiologia
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau
Sant Quintí, 89
08041 Barcelona

Dra. Beatriz Mirelis

Servei de Microbiologia
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau
Sant Quintí, 89
08041 Barcelona

“Unfortunately, the number of ways to do something wrong
always exceeds the number of ways to do it right.”

Garry Kasparov

AGRADECIMIENTOS

Siendo un niño de 8 años descubrí que había doctores que no eran médicos y médicos que no eran doctores. Preso de la confusión, recurrí a mi padre Jorge, que solía dar respuesta a todas mis dudas. Él me explicó qué era una Tesis Doctoral, con sus hipótesis y defensa. Desde entonces sueño con realizar una tesis doctoral. A él, a mi madre Marta y a mi hermana Dana quiero darles las gracias por haberme dado una familia en la que un niño de 8 años felizmente podía alternar el sueño de realizar una tesis doctoral, participar en un campeonato mundial de ajedrez, dar conciertos de piano o jugar en River Plate, con el 9 en la espalda.

Veinticinco años después, uno de esos sueños se ha convertido en realidad. En estos años fueron muchas las personas que me han ayudado a conseguir este sueño, aún más de las que hoy puedo recordar. Quisiera agradecer a todas ellas la enorme contribución que han hecho a mi felicidad. Algunas de ellas son:

Mi tío Tito, el Prof. Alberto Grünbaum, quien desde siempre fue un estímulo constante con sus acertijos matemáticos, sus historias académicas y su tácita invitación al exilio voluntario. Gracias por nuestras charlas con merlot, discutiéndolo todo. Gracias por haberme ayudado tanto, material y espiritualmente.

Mis amigos de la guardia de los miércoles del Hospital de Enfermedades Infecciosas Francisco Javier Muñiz de Buenos Aires, encabezados por el Dr. Guillermo Iriberry. Allí hice mis primeras tinciones de Gram y Ziehl-Neelsen, descubriendo un mundo nuevo a través del microscopio.

Mis amigos del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, encabezados por el Dr. Pere Coll, donde me enseñaron todo lo que sé de microbiología. Especialmente a la Dra. Beatriz Mirelis y el Dr. Ferran Navarro, mis directores de tesis. Gracias por confiar en mí el estudio del problema de la interpretación del antibiograma de aminoglucósidos y gracias por respetar mi manera de intentar resolverlo.

Mis amigos del área de I+D del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, encabezados por la Dra. Elisenda Miró, dónde me enseñaron todo lo que sé de genética y biología molecular. Sin ellos aún estaría intentado no destrozarse los geles de agarosa al hacer los pocillos.

Gracias a la Dra. Alba Rivera por su inestimable ayuda con cientos de antibiogramas, gracias por su sonrisa. Gracias a Cristina Diez por cientos de datos del Trak, gracias por sus bromas. Gracias al Dr. Ignasi Gich por haber enseñado todo lo que sé del SPSS, gracias por su amistad.

Gracias a Mar por llenar de duendes el camino.

ÍNDICE

1.	Introducción	1
2.	<i>Enterobacteriaceae</i>	5
3.	Aminoglucósidos	15
3.1	Definición	17
3.2	Historia y clasificación	17
3.3	Propiedades químicas de los aminoglucósidos	22
3.4	Propiedades farmacocinéticas de los aminoglucósidos	28
3.5	Mecanismo de acción de los aminoglucósidos	31
3.6	Resistencia a los aminoglucósidos	36
3.7	Enzimas modificadoras de aminoglucósidos (EMAG)	38
3.8	Interacciones aminoglucósido-EMAG	43
3.9	Usos clínicos de los aminoglucósidos	44
4.	Objetivos	47
5.	Materiales y Métodos	51
5.1	Características y ámbito del estudio	53
5.2	Estudio de la sensibilidad a los antibióticos	53
5.3	Detección y amplificación de los genes de EMAG	57
5.4	ERIC PCR	62
5.5	Electroforesis en campo pulsante	64
5.6	Análisis estadístico	68
5.7	Gráficos de estructuras químicas	69

6.	Resultados	71
6.1	Resultados demográficos	73
6.2	Procedencia, tipo y resultado de las muestras	74
6.3	Resultados del estudio de sensibilidad	75
6.4	Sensibilidad a los aminoglucósidos	83
6.5	Resultados de ERIC PCR y PFGE	85
6.6	Correlación entre CIM y disco difusión	86
6.7	Resultados de la detección de genes de EMAG	91
6.8	Sensibilidad, Especificidad y Valores Predictivos de los puntos de corte de disco difusión para el cribado de genes de EMAG	95
6.9	Correlación entre características fenotípicas del borde del halo de inhibición y genes de EMAG	103
7.	Discusión	107
7.1	Discusión de las especies aisladas	109
7.2	Discusión del estudio de sensibilidad	110
7.3	Discusión de la detección de genes de EMAG	117
7.4	Discusión de la sensibilidad y especificidad de los puntos de corte del CLSI y de sensibilidad disminuida, y las características fenotípicas de los halos de inhibición	118
7.5	Interpretación del antibiograma de disco difusión de aminoglucósidos en <i>Enterobacteriaceae</i>	123
8.	Conclusiones	137
9.	Bibliografía	141

1. INTRODUCCIÓN

Introducción

Desde su aparición, a mediados de la década de los cuarenta, los aminoglucósidos han ido perdiendo su lugar en el arsenal terapéutico para combatir las infecciones por enterobacterias y otras familias bacterianas, en parte debido al surgimiento de otros antibióticos de mayor espectro y menor toxicidad, como las cefalosporinas de 3^a y 4^a generación o las fluoroquinolonas, y en parte al incremento de resistencias, debidas fundamentalmente a la presencia de enzimas modificadoras de aminoglucósidos. Sin duda uno de los factores que han contribuido a este incremento en la resistencia a aminoglucósidos en enterobacterias, es la gran plasticidad que poseen las bacterias de esta familia para adquirir genes que les confieren resistencia a los antimicrobianos. Además, los genes de resistencia a aminoglucósidos se encuentran muy frecuentemente asociados a diferentes estructuras móviles como genes cassette integrados en integrones, transposones y plásmidos. Sin embargo, tras la aparición de cepas multiresistentes para las que las alternativas terapéuticas son muy limitadas, los aminoglucósidos recuperaron importancia en el tratamiento de infecciones, especialmente en el medio hospitalario.

En el laboratorio de Microbiología Clínica los aminoglucósidos representan un grupo de antimicrobianos para los que es difícil la interpretación del antibiograma.

El objetivo principal de este trabajo es el de conocer la prevalencia de aislados resistentes a aminoglucósidos durante el primer trimestre de 2006 en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona, estudiar las variables fenotípicas de los aislados resistentes y detectar los genes de resistencia implicados, con el fin de lograr una interpretación del antibiograma de aminoglucósidos en *Enterobacteriaceae*.

2. *ENTEROBACTERIACEAE*

Enterobacteriaceae

Como todas las bacterias gramnegativas, las enterobacterias poseen características comunes en lo que respecta a su pared celular, su membrana celular y sus estructuras internas. La pared celular está formada por una membrana citoplasmática que se encuentra rodeada por una pared dura y elástica, compuesta por péptidoglucano, responsable de darle forma a la célula. Por fuera de esta estructura se encuentra una membrana rica en lipopolisacáridos, hecho diferencial con respecto a las bacterias grampositivas (Figura 1)⁽¹⁾.

Además de darle forma a la célula la membrana sirve de continente a un citoplasma repleto de ribosomas, y a un material genético compuesto por ácido desoxirribonucleico (DNA) que forma un conglomerado compacto (nucleoide) que carece de membrana nuclear. También existe la posibilidad de que estas bacterias posean DNA extracromosómico como los plásmidos⁽¹⁾.

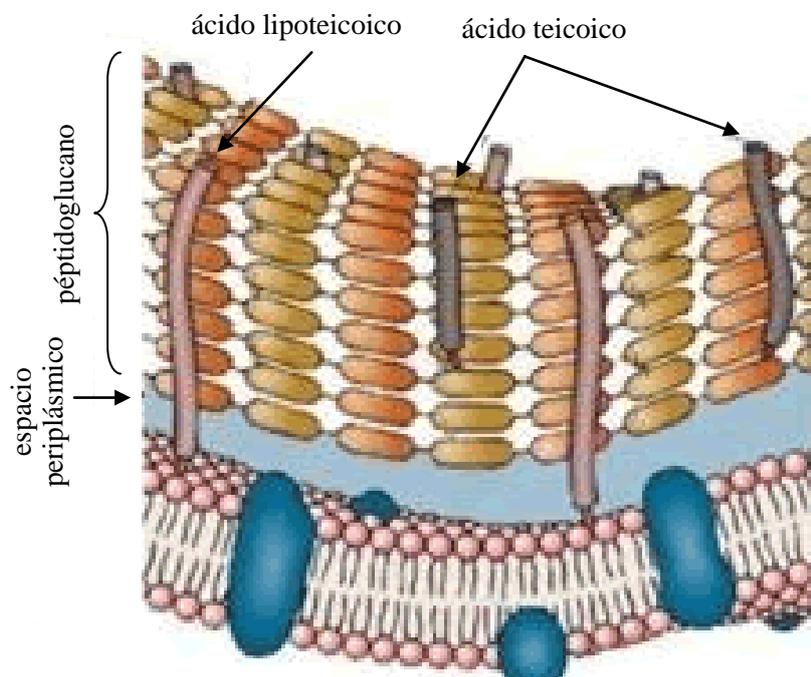


Figura 1: Pared celular de bacterias gramnegativas
(http://www.educa.madrid.org/web/cc.nsdelasabiduria.madrid/Ejercicios/2b/Biologia/Microbiologia/estructuras_bacterias.htm)

Enterobacteriaceae

Tradicionalmente, la definición de la familia *Enterobacteriaceae* ha sido la siguiente: bacilos gramnegativos, de 0,3 a 1,0 μm de longitud, no esporulados, a veces capsulados, con flagelos peritricos en las especies móviles, anaerobios facultativos, quimio-organotrofos, poseedores a la vez de un metabolismo respiratorio y fermentativo, fermentadores de la glucosa (con o sin producción de gas), catalasa positivas, oxidasa negativas, nitrato reductasa positivas, capaces de crecer en medios de cultivo no selectivos (p. ej., agar sangre) o selectivos (p. ej., agar MacConkey), no halófilos, poseedores del antígeno de Kunitz (también conocido como ECA, del inglés *Enterobacterial Common Antigen*), y con un contenido de G+C comprendido entre 38 y 60%. Existen, sin embargo, algunas excepciones puntuales a esta definición⁽¹⁻³⁾

El nombre de la familia *Enterobacteriaceae* fue acuñado por Rahn en 1937, y si bien fue ampliamente utilizado durante años⁽⁴⁾, en 1979 Lapage sostuvo que esa nomenclatura era incorrecta⁽⁵⁾. Él consideraba ilegítimo el nombre *Enterobacteriaceae* y propuso *Enterobacteraceae* (sin “i”). Se basaba en que etimológicamente derivaba de *Enterobacter* (un género de la familia) y el sufijo *-aceae*, que denota “familia”, y no *-iaceae (sic)*⁽⁵⁾. Pero estas reglas del Código Internacional de Nomenclatura no existían cuando Rahn había planteado el nombre de la familia⁽⁶⁾. Una Comisión Judicial del Comité Internacional de Bacteriología Sistemática determinó finalmente que la nomenclatura válida era *Enterobacteriaceae* (Rahn 1937), y su género tipo sería *Escherichia* (según Castellani y Chalmers 1919), como queda reflejado en las Listas Aprobadas de Nombres Bacterianos de 1980 donde figura dentro de los *nomina conservanda familiarum* (nombres de familias conservados)⁽⁷⁾. De hecho, *Enterobacteriaceae* figura dentro de la versión corregida de las Listas Aprobadas de Nombres Bacterianos. Una explicación etimológica fue expuesta por Brenner en la 7ª edición de “Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology”, aquí se propuso *enterobacterium* para denotar “bacteria intestinal” y el sufijo *-aceae* para “familia”. Esta etimología sí explicaría el por qué del nombre *Enterobacteriaceae*⁽⁸⁾.

Enterobacteriaceae

Como ya se comentó, el género tipo de *Enterobacteriaceae* es *Escherichia* (Castellani y Chalmers 1919). El primer aislado de *E. coli* correspondió a Theodor Escherich, en 1885 bajo el nombre de *Bacterium coli commune* en heces de neonatos. Luego fue renombrada como *Escherichia coli* y por muchos años fue considerada simplemente como una bacteria comensal del intestino grueso. No fue hasta 1935 cuando, a causa de un brote de diarrea en neonatos, se asoció a patología humana⁽⁹⁾.

La familia *Enterobacteriaceae* puede ubicarse dentro de la clase *Gammaproteobacterias* (phylum de las *Proteobacterias*, dominio de las *Eubacterias*) mediante el análisis de la secuencia 16S rRNA. Dentro de esta clase, la familia *Enterobacteriaceae* está filogenéticamente emparentada con las familias *Alteromonadaceae*, *Vibrionaceae*, *Aeromonadaceae* y *Pasteurellaceae*⁽²⁾.

En el seno de *Enterobacteriaceae*, los porcentajes de hibridación DNA-DNA obtenidos entre las especies de un mismo género son generalmente superiores al 70%. De la misma manera, un porcentaje similar se obtiene cuando las hibridaciones DNA-DNA se efectúan entre cepas tipo de especies tipo de los diversos géneros y la cepa tipo de *Escherichia coli*⁽²⁾. Las especies de los géneros *Edwardsiella*, *Hafnia*, *Photorhabdus*, *Plesiomonas*, *Proteus*, *Providencia*, *Yersinia* y *Xenorhabdus* son excepciones a esta regla. A la inversa, las homologías DNA-DNA muestran claramente que las cuatro especies del género *Shigella* y *Escherichia coli* forman una única genoespecie, y si bien la nomenclatura de *Escherichia coli* tiene prioridad, el género *Shigella* se conserva por razones epidemiológicas y médicas⁽²⁾.

En febrero de 1980, se publicaron en las Listas Aprobadas de Nombres Bacterianos sólo 19 géneros dentro de la familia *Enterobacteriaceae*. A la fecha, ese número ha aumentado de forma considerable, siendo 44 los géneros válidamente publicados⁽²⁾(Tabla 1). El número de especies dentro de la familia es más difícil de apreciar, ya que numerosas especies han sido reclasificadas dentro de otros géneros en forma de nuevas combinaciones. A la fecha el número de especies diferentes válidamente publicadas rondaría las 170⁽²⁾.

Enterobacteriaceae

Tabla 1: Géneros de *Enterobacteriaceae*.

<i>Alterococcus</i>	<i>Pantoea</i>
<i>Arsenophonus</i>	<i>Pectobacterium</i>
<i>Brenneria</i>	<i>Photorhabdus</i>
<i>Buchnera</i>	<i>Plesiomonas</i>
<i>Budvicia</i>	<i>Pragia</i>
<i>Buttiauxella</i>	<i>Proteus</i>
<i>Cedecea</i>	<i>Providencia</i>
<i>Citrobacter</i>	<i>Rahnella</i>
<i>Dickeya</i>	<i>Raoultella</i>
<i>Edwardsiella</i>	<i>Saccharobacter</i>
<i>Enterobacter</i>	<i>Salmonella</i>
<i>Erwinia</i>	<i>Samsonia</i>
<i>Escherichia</i>	<i>Serratia</i>
<i>Ewingella</i>	<i>Shigella</i>
<i>Hafnia</i>	<i>Sodalis</i>
<i>Klebsiella</i>	<i>Tatumella</i>
<i>Kluyvera</i>	<i>Thorsellia</i>
<i>Leclercia</i>	<i>Trabulsiella</i>
<i>Leminorella</i>	<i>Wigglesworthia</i>
<i>Moellerella</i>	<i>Xenorhabdus</i>
<i>Morganella</i>	<i>Yersinia</i>
<i>Obesumbacterium</i>	<i>Yokenella</i>

Estas bacterias explican aproximadamente el 80% de los aislamientos importantes de bacterias gramnegativas en el laboratorio de Microbiología Clínica y alrededor del 50% de todos los clínicamente importantes. Se ha calculado que aproximadamente un tercio de los aislamientos de septicemias, dos tercios de los gastrointestinales bacterianos y un 75% de los del tracto urinario son enterobacterias⁽³⁾.

Enterobacteriaceae

Las enterobacterias aisladas con mayor frecuencia en un laboratorio de Microbiología Clínica son *E. coli* y *Klebsiella* spp., seguidas por *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. y diferentes especies del grupo *Proteus-Morganella-Providencia*. Estas especies, comensales del tubo digestivo del hombre y animales, causan toda infección oportunista en el hombre, con la excepción de algunos patogrupos de *E. coli* que son enteropatógenas⁽³⁾ (Tabla 2).

Tabla 2: Especies de *Enterobacteriaceae* con importancia clínica.

<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Proteus penneri</i>
<i>Citrobacter koseri</i>	<i>Providencia stuartii</i>
<i>Edwardsiella tarda</i>	<i>Providencia rettgeri</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Salmonella enterica</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Morganella morganii</i>	<i>Shigella boydii</i>
<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Yersinia pestis</i>
<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>

Por otro lado, existe otro grupo compuesto por salmonelas, shigelas y yersinias que causan enteritis y otros cuadros clínicos como la fiebre tifoidea y paratifoidea (*Salmonella enterica* serotipo Typhi y Paratyphi A, B y C) o la peste (*Yersinia pestis*), siendo las bacterias de este segundo grupo patógenas primarias para el hombre^(1,3).

En cuanto a la relevancia clínica de las especies comensales puede decirse que constituyen los microorganismos que con mayor frecuencia producen infecciones en pacientes sondados, intubados, o con enfermedades que debiliten las defensas inmunitarias, provocando de esta manera infecciones urinarias, colecistitis, neumonía en pacientes intubados, infección de herida quirúrgica y sepsis^(1,3).

Enterobacteriaceae

El tratamiento de estas infecciones está basado fundamentalmente en la terapia con fármacos antimicrobianos⁽³⁾. Existen diversos grupos de antimicrobianos con actividad frente a enterobacterias^(3,10). El más utilizado es el de los betalactámicos, aunque muchas enterobacterias posean, como mecanismo de resistencia, betalactamasas cromosómicas^(1,11) o la posibilidad de adquisición de betalactamasas plasmídicas, hecho descrito por primera vez en el año 1965 para la TEM-1 en Atenas, de un aislado de *E. coli* proveniente de un paciente llamado Temoneira, y de ahí la designación de TEM^(12,13). En los últimos 20 años fueron diseñados muchos antibióticos con la finalidad de ser resistentes a la acción hidrolítica de las betalactamasas, pero con cada nueva clase de betalactámico que se utilizaba para tratar pacientes, surgía una nueva betalactamasa que confería resistencia al mismo⁽¹¹⁾.

Una de estas nuevas clases era la de las oximiino-cefalosporinas, que fueron ampliamente utilizadas para el tratamiento de infecciones graves en la década de los 80. Como cabía esperar, la resistencia a estos betalactámicos de espectro ampliado no tardó en aparecer. La primera de estas enzimas capaces de hidrolizar esta clase de betalactámicos, la SHV-2, fue encontrada en una cepa de *K. ozaenae* aislada en Alemania en 1983^(12,14,15). Debido al espectro incrementado de actividad, fueron llamadas betalactamasas de espectro extendido (BLEE)^(15,16). La aparición de estas enzimas, junto con otras como las AmpC plasmídicas y las carbapenemasas capaces de inactivar además a las cefamicinas y a los carbapenémicos, respectivamente, hacen que los betalactámicos sean cada vez menos útiles a la hora de combatir infecciones, principalmente en el medio hospitalario^(11,12).

Otro grupo de antimicrobianos utilizado frecuentemente para tratar infecciones producidas por enterobacterias es el de las quinolonas. Son un grupo de antimicrobianos semisintéticos, de los que caben destacar el ácido nalidíxico y las quinolonas fluoradas, como norfloxacin, ciprofloxacino y levofloxacino, especialmente activas frente a bacterias gramnegativas. A medida que se sintetizaron nuevas moléculas de fluoroquinolonas, como moxifloxacino, este espectro se amplió a bacterias grampositivas e incluso a micobacterias.

Enterobacteriaceae

El nivel de resistencia a quinolonas fluoradas (ciprofloxacino) en enterobacterias en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau durante el año 2007 alcanzó una media ponderada de 29,6%. La resistencia a estos fármacos es principalmente debida a mutaciones de los genes de la DNA-girasa y topoisomerasa IV⁽¹⁷⁾. La primera proteína de resistencia a quinolonas mediada por plásmidos Qnr (luego denominada QnrA) fue hallada en una muestra urinaria de la que se aisló una *K. pneumoniae*, en Birmingham, Estados Unidos, en 1994. Esto abrió una nueva era en la resistencia a quinolonas, descendiéndose luego el enzima AAC(6')-Ib_{cr} o las proteínas estructurales QepA⁽¹⁸⁻²⁰⁾.

Finalmente también son de utilidad los aminoglucósidos, en general en tratamientos combinados con fármacos que actúan sobre la pared bacteriana^(3,10,18).

Los aminoglucósidos de los grupos de la kanamicina y de la gentamicina son muy activos frente a la mayoría de los bacilos gramnegativos aerobios. Poseen una elevada actividad frente a un gran número de miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, como *E. coli* y otras especies de los géneros *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Proteus*^(10,21). La resistencia a aminoglucósidos en enterobacterias se debe fundamentalmente a la presencia de enzimas modificadoras de aminoglucósidos (EMAG), que son el motivo de este estudio y serán comentadas en profundidad, junto con otras características de los aminoglucósidos en el siguiente capítulo.

3. AMINOGLUCÓSIDOS

Aminoglucósidos

3.1 Definición.

Los aminoglucósidos son antibióticos naturales o semisintéticos, de estructura heterocíclica, primariamente bactericidas (con excepción de la espectinomicina) de amplio espectro, que actúan sobre las bacterias sensibles inhibiendo la correcta síntesis proteica y que precisan, para ejercer su acción, encontrarlas en fase de crecimiento⁽²²⁾.

3.2 Historia y clasificación.

Selman Abraham Waksman (Figura 2) nació en Priluka, cerca de Kiev, el 22 de Julio de 1888. Luego de completar su educación en Odessa, emigró hacia Estados Unidos en 1910, donde se matriculó en la Universidad de Rutgers, de Nueva Jersey, para estudiar Agricultura. Tras realizar los estudios de Bioquímica se doctoró en esta especialidad en la Universidad de California y comenzó a trabajar en la Universidad de Rutgers como profesor. Una vez obtenida la nacionalidad norteamericana, asumió la dirección del Departamento de Microbiología de esa misma universidad. Desde que terminó la carrera de Bioquímica se especializó en los asuntos relacionados con la microbiología del suelo⁽²³⁾.



Figura 2: Selman Abraham Waksman.

Waksman comenzó un extenso programa de estudio cuyo objetivo era determinar la naturaleza de las sustancias con las que unos microorganismos del suelo destruían a otros. Había estado interesado en los actinomicetos durante 25 años y era natural que demostrara mayor interés hacia estos microbios.

Aminoglucósidos

En 1916, Waksman y Curtis aislaron en Estados Unidos una cepa de un actinomiceto del suelo al que llamaron *Actinomyces griseus*. Este actinomiceto había sido aislado con anterioridad (en 1914) por Krainsky, del suelo ruso⁽²²⁾. Su nombre fue cambiado en 1943 al de *Streptomyces griseus* (Figura 3). De una cepa de esta especie se aisló por primera vez la estreptomycinina. Waksman demostró que de los microbios, *Streptomyces* era el que tenía mejor capacidad para sobrevivir cuando las condiciones en el suelo se mostraban desfavorables, y esto fue un motivo adicional para comenzar por el género *Streptomyces*⁽²⁴⁾.

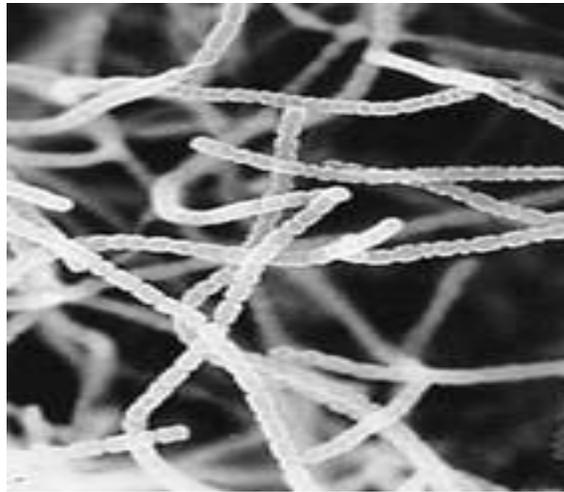


Figura 3: *Streptomyces griseus*.

Era conocido desde hacía mucho tiempo que el bacilo tuberculoso es rápidamente destruido en el suelo. En 1932 la *American National Association against Tuberculosis* le propuso a Waksman investigar sobre este tema. Fue capaz de confirmar las observaciones anteriores y concluyó que la desaparición del bacilo tuberculoso en el suelo se debía probablemente a la influencia de otros microbios antagonistas. En esa época el término “antibiótico” no estaba acuñado. Fue Waksman quien introdujo la nueva palabra, significando una sustancia antibacteriana, producida por un microbio, que inhibe el crecimiento o hasta destruye a otros microorganismos⁽²⁴⁾. En 1940, Waksman y Woodruff consiguieron aislar el primer antibiótico de *Streptomyces antibioticus*, al que llamaron actinomicina, aunque éste resultó muy tóxico. En 1942, otro antibiótico fue descubierto a partir de *Actinomyces lavendulae*, se llamó estreptotricina, aunque también resultó muy tóxico⁽²⁴⁾.

Aminoglucósidos

Animados por el descubrimiento de la estreptotricina y estimulados por el desarrollo triunfal del tratamiento con penicilina, el equipo de Waksman continuó con su búsqueda de microbios productores de antibióticos. Antes del descubrimiento de la estreptomicina, a no menos de 10000 microbios del suelo diferentes se les estudió su actividad antibiótica. Waksman dirigió el trabajo y distribuyó varias líneas de investigación entre sus jóvenes asistentes. Uno de ellos era Albert Schatz (Figura 4), quien previamente había trabajado con Waksman durante dos meses y en Junio de 1943 volvió al laboratorio⁽²⁵⁾.



Figura 4: Albert Schatz.

Waksman le encomendó la tarea de aislar nuevas especies de *Actinomyces*. Después de unos meses Schatz aisló dos cepas de *Actinomyces* que eran idénticas al *Streptomyces griseus*, descubierto por Waksman in 1916. En contraposición al previo el microbio redescubierto mostraba actividad antibiótica. A este antibiótico Waksman lo llamó estreptomicina. Estudió el efecto antibiótico de la estreptomicina junto a Schatz y Elisabeth Bugie (Figura 5) y encontró que era activo frente a numerosas bacterias incluyendo al bacilo tuberculoso. Estos estudios preliminares se completaron en poco tiempo, gracias a los claros principios que habían sido desarrollados con anterioridad por Waksman para el estudio de la estreptotricina.

Aminoglucósidos

En 1944 Waksman, Schatz y Bugie comunicaron públicamente el descubrimiento del nuevo antibiótico, aunque luego habría disputas entre Schatz y Waksman por la autoría del descubrimiento⁽²⁵⁾.



Figura 5: Elisabeth Bugie.

El uso de la estreptomina como agente anti-tuberculoso fue confiado a dos médicos, Feldman y Hinshaw, en la Clínica Mayo en Rochester, quedando constatada la utilidad clínica de la estreptomina en 1949⁽²⁵⁾.

El hecho de haber descubierto el primer antibiótico efectivo contra el bacilo tuberculoso le valió a Waksman el Premio Nobel en Fisiología o Medicina en 1952. También hubo polémica acerca de si Schatz debía estar o no incluido en el Premio Nobel, pero se entendió que no sólo fue galardonado por el descubrimiento de la estreptomina, sino por el desarrollo de métodos y técnicas que llevaron a su descubrimiento, y el descubrimiento de otros antibióticos⁽²⁶⁾.

Debido al éxito obtenido con la estreptomina, se continuó con la búsqueda de agentes antimicrobianos obtenidos a partir de actinomicetos.

De esta forma, Waksman y Hubert Lechevalier descubrieron la neomicina B, producida por *Streptomyces fradiae*, del cual posteriormente, en 1959, se aislaría la paromomicina⁽²²⁾. Hamao Umezawa (Figura 6) y colaboradores, en 1957, aislaron por primera vez la kanamicina del *Streptomyces kanamyceticus*⁽²⁷⁾.

Aminoglucósidos

No sólo del género *Streptomyces* se aislaron especies productoras de agentes antimicrobianos, sino que también del género *Micromonospora* y del género *Bacillus*⁽²²⁾. Así la gentamicina fue un producto de *Micromonospora purpurea* que Weinstein y colaboradores estudiaron originariamente en 1963, y que fue finalmente aislada y purificada y caracterizada por Rosselet y colaboradores en 1964^(28,29). El origen de cada aminoglucósido está indicado por el sufijo del nombre del mismo en inglés: así, los terminados en “mycin” derivan de *Streptomyces*, ya sea de forma directa o indirecta, y los terminados en “micin” de *Micromonospora*^(3,29).



Figura 6: Hamao Umezawa.

Posteriormente aparecieron la tobramicina, la amikacina y la netilmicina. La primera forma parte del complejo de aminoglucósidos producidos por *Streptomyces tenebrarius*, aislados por Higgins y Kasterns en 1967⁽²⁹⁾. La amikacina y la netilmicina, a diferencia de los aminoglucósidos mencionados anteriormente, son semisintéticos. La amikacina deriva de la kanamicina A, y fue desarrollada por Kawaguchi y colaboradores en 1972, mediante la acilación del grupo 1-amino de la fracción 2-desoxiestreptamina con ácido 2-hidroxi-4-amino-butírico⁽³⁰⁾.

La netilmicina (1975) fue desarrollada a partir de la sisomicina (aislada en 1970, es producida por *Micromonospora inyoensis*) mediante el agregado de un grupo etilo al grupo amino en posición 1 del aminociclitol^(20,31).

Aminoglucósidos

La dibekacina (1971) y la isepamicina (1978) también son derivados semisintéticos. La primera es el derivado dideoxi de la kanamicina B, y la segunda el derivado I-N-alfa hidroxil-B-aminopropionil de gentamicina B^(32,33). La butirosina deriva de *Bacillus circulans*. Fue documentada por Howells y colaboradores y por Dion y colaboradores en 1972⁽³⁴⁻³⁶⁾.

3.3 Propiedades químicas de los aminoglucósidos.

Los aminoglucósidos son poliheterósidos aminados, con la excepción de la espectinomicina que es un verdadero aminociclitol. Sus principales aglicones (estructuras químicas que no contienen azúcares) proceden de la estreptamina, que es un derivado dinámico del inositol o ciclohexano (Figura 7)⁽²²⁾.

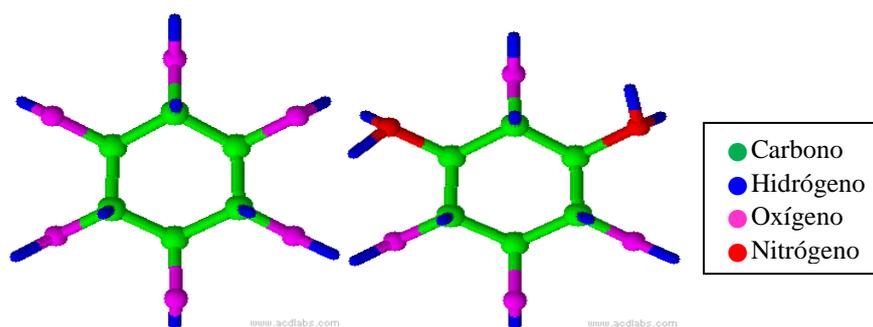


Figura 7: Inositol (izquierda) y Estreptamina (derecha).

Por reducción de la función alcohólica del carbono 2 de la estreptamina se obtiene la desoxiestreptamina, que constituye la base de los antibióticos del grupo de la kanamicina, gentamicina y neomicina (Figura 8)⁽²²⁾.

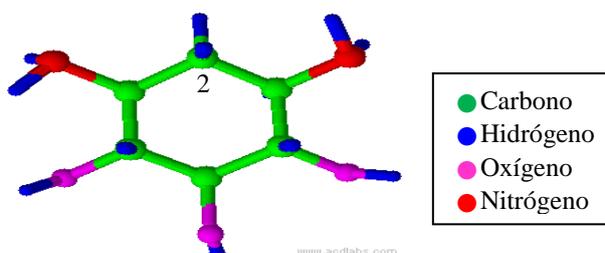


Figura 8: Desoxiestreptamina.

Aminoglucósidos

La sustitución de dos hidrógenos, uno en cada grupo aminado de la estreptamina, por el radical guanido, da lugar a la estreptidina, aglicón fundamental de las estreptomicinas (Figura 9)⁽²²⁾.

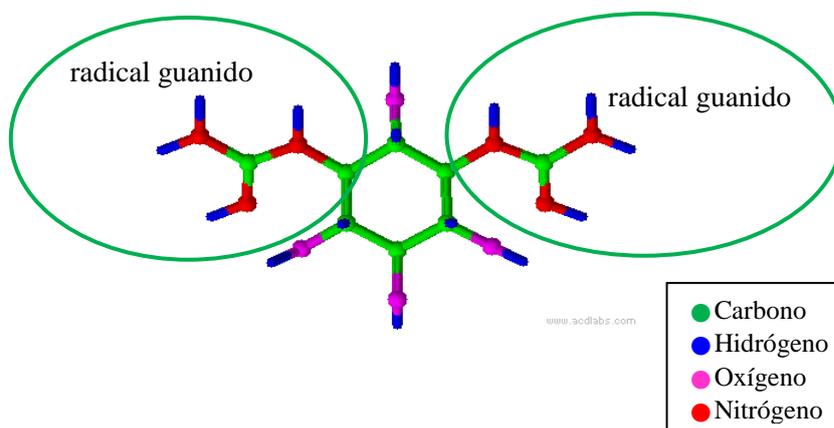


Figura 9: Estreptidina.

La desoxiestreptamina (DOS), de antibióticos del grupo de la kanamicina y gentamicina, se une con azúcares aminados por sus carbonos 4 y 6 (4,6-DOS) mediante enlaces glucosídicos, quedando libre el grupo OH en posición 5; sin embargo, en el grupo de la neomicina estos enlaces se establecen en posición 4 y 5 (4,5-DOS) (Figura 10)⁽²²⁾.

Las estreptomicinas presentan siempre el aglicón unido por un solo enlace glucosídico en posición 4 con una pentosa aminada, que a la vez lleva un puente glucosídico con un hexanol aminado en posición 1 (Figura 11)⁽²²⁾.

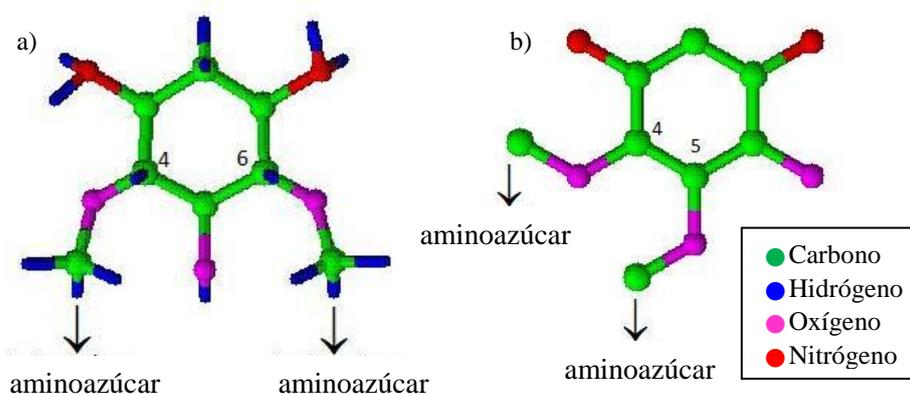


Figura 10: a) 4,6-DOS y b) 4,5-DOS.

Aminoglucósidos

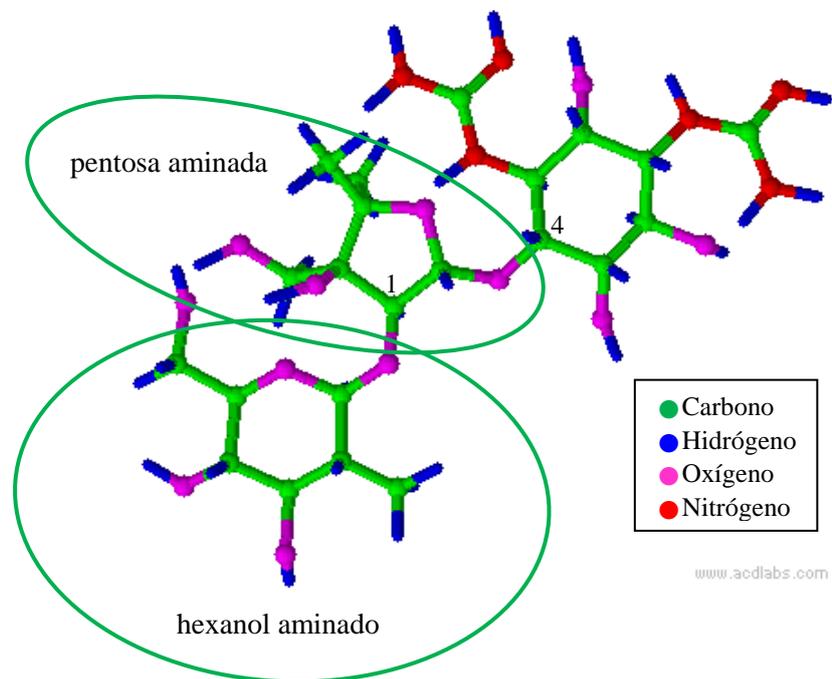


Figura 11: Dihidroestreptomicina.

La apramicina es un aminoglucósido de estructura única que contiene una mitad de azúcar bicíclico y una desoxiestreptamina monosustituida (Figura 12)^(20,37).

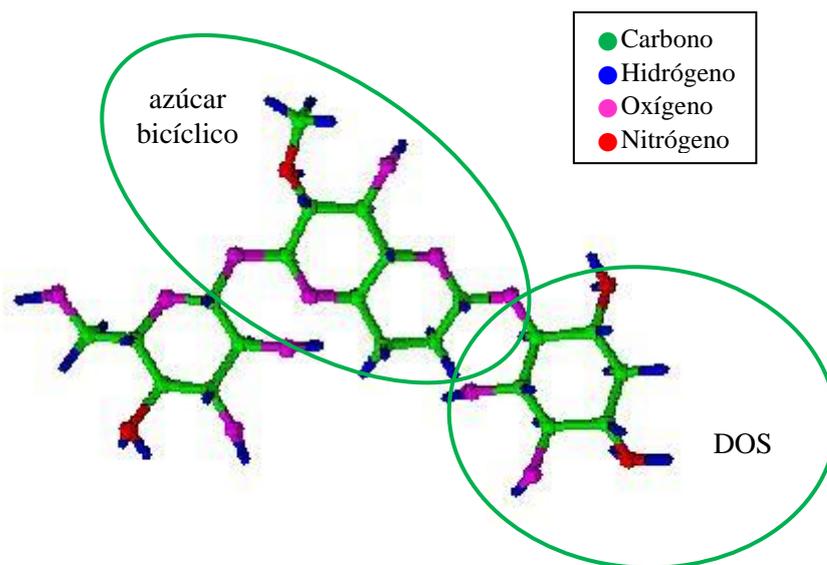


Figura 12: Apramicina.

Aminoglucósidos

La espectinomicina (Figura 13) es un aminociclitol que no contiene aminoazúcares ni enlaces glucosídicos, por lo que químicamente es un aminociclitol y no un aminoglucósido, pero a pesar de ello, al derivar de *Streptomyces spectabilis* y tener un mecanismo de acción similar, se la suele incluir con los aminoglucósidos^(3,22). Los aminoglucósidos se clasifican según su estructura química en distintas familias (Tabla 3).

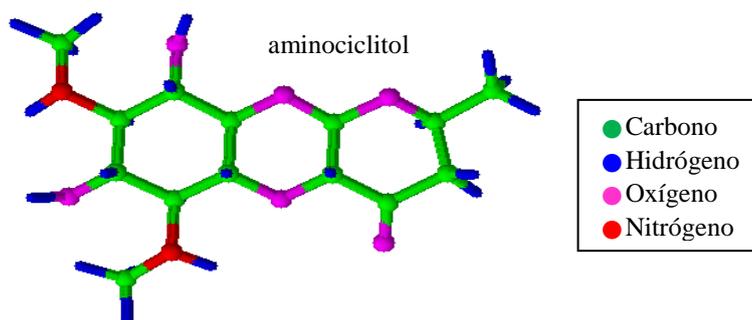


Figura 13: Espectinomicina.

Tabla 3: Clasificación de los aminoglucósidos según su estructura química.

Estructura heterocíclica	Aglicón	Sust.	Familia	Antibiótico		
Aminociclitol	-	-	-	Espectinomicina		
Aminoglucósido con aminociclitol	Estreptidina	-	-	Estreptomina		
		4	-	Apramicina		
		4,5	Neomicinas I	Ribostamicina		
				Butirosina A		
				Butirosina B		
			Neomicinas II	Neomicina B		
				Neomicina C		
				Lividomicina A		
		2-DOS	4,5	Kanamicinas	Lividomicina B	
	Paromomicina					
	4,6				Gentamicinas	Kanamicina A
						Kanamicina B
						Kanamicina C
	Tobramicina					
	Dibekacina					
	Amikacina					
	4,6		Gentamicinas	Gentamicina A		
		Gentamicina B				
Gentamicina C1						
Gentamicina C1a						
Gentamicina C2						
Netilmicina						
Sisomicina						

Sust.: posición de las sustituciones en la desoxiestreptamina.

Aminoglucósidos

Las familias de los aminoglucósidos 2-DOS se diferencian entre sí por los aminoazúcares unidos al aminociclitol (Tablas 4 y 5, Figuras 14 y 15).

Tabla 4: Familia de neomicina.

Aminoglucósidos	Grupo	R1	R2	R3	R4
Ribostamicina	I	H	OH	H	-
Butirosina A	I	OH	H	-CO(CHOH)-CH ₂ -CH ₂ -NH ₂	-
Butirosina B	I	OH	OH	-CO(CHOH)-CH ₂ -CH ₂ -NH ₂	-
Neomicina B	II	NH ₂	CH ₂ NH ₂	H	H
Neomicina C	II	NH ₂	H	CH ₂ NH ₂	H
Paromomicina	II	OH	CH ₂ NH ₂	H	H
Lividomicina A	II	OH	CH ₂ NH ₂	H	Manosa
Lividomicina B	II	OH	CH ₂ NH ₂	H	H

R: radical

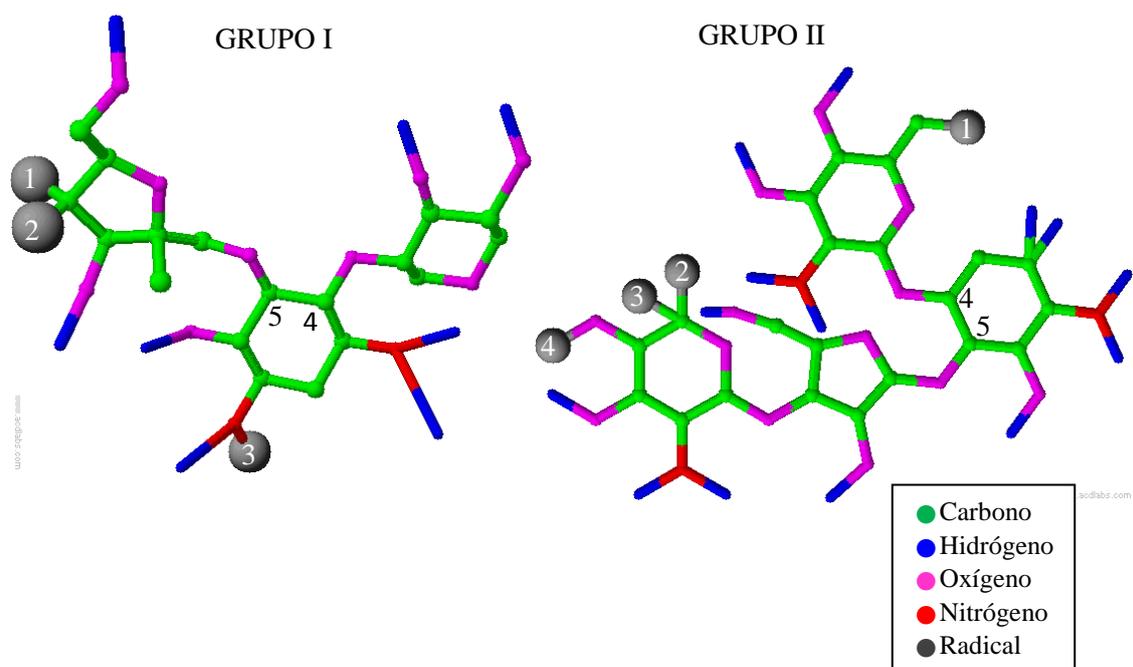


Figura 14: Familia de neomicina.

Aminoglucósidos

Tabla 5: Familias de kanamicina y gentamicina.

Aminoglucósidos	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8
Kanamicina A	NH ₂	OH	NH ₂	CH ₂ OH	OH	OH	H	
Kanamicina B	NH ₂	NH ₂	NH ₂	CH ₂ OH	OH	OH	H	OH
Kanamicina C	OH	NH ₂	NH ₂	CH ₂ OH	OH	OH	H	OH
Dibekacina	NH ₂	H	H	CH ₂ OH	OH	H	H	OH
Amikacina	OH	OH	OH	CH ₂ OH	OH	OH	NH-CO-COH ₂ -CH ₂ -NH ₂	OH
Tobramicina	NH ₂	H	OH	CH ₂ OH	OH	H	H	OH
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 ₁	H	NH ₂	H	H	NH ₂	OH	CH ₃	H
Gentamicina C _{1a}	CH ₃	NH ₂	H	H	NH ₂	OH	CH ₃	H
Gentamicina C ₂	CH ₃	NH-CH ₃	H	H	NH ₂	OH	CH ₃	H
Sisomicina	CH ₃		H	H	NH ₂	OH	CH ₃	HCH ₂ -CH ₃
Netilmicina			H	H	NH ₂	OH	CH ₃	H

R: radical

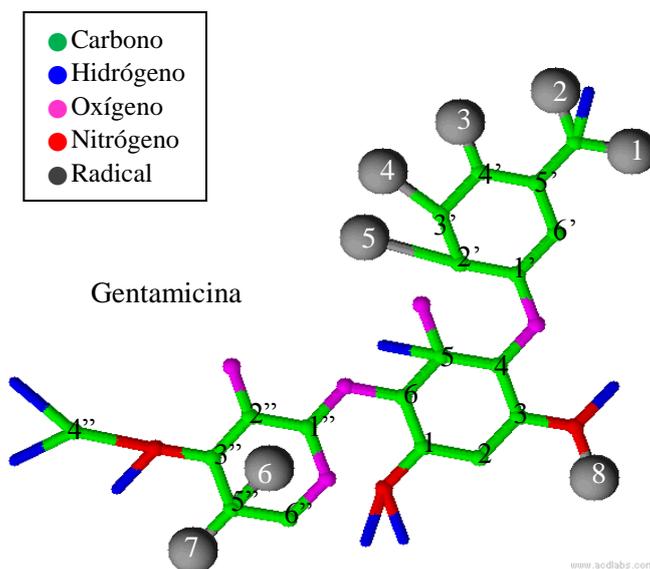
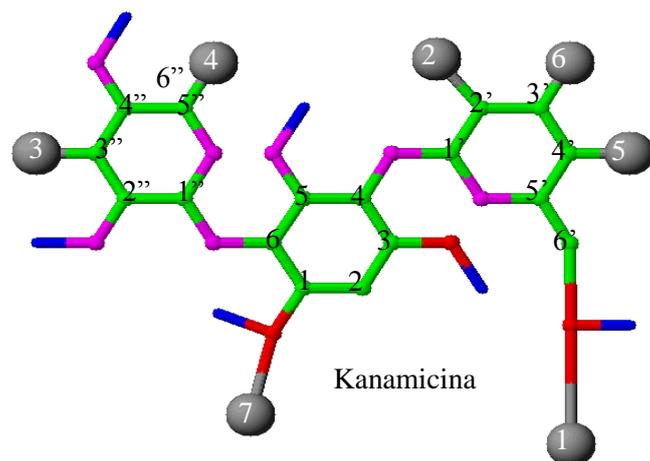


Figura 15: Familias de kanamicina y gentamicina.

Aminoglucósidos

3.4 Propiedades farmacocinéticas de los aminoglucósidos.

Los aminoglucósidos son administrados por vía parenteral, ya que son absorbidos muy pobremente desde el tracto gastrointestinal. Cuando se administran por vía intravenosa es recomendable hacerlo durante un período de 15 a 30 minutos, para evitar un aumento del pico sérico muy veloz que elevaría el riesgo de bloqueo neuromuscular.

Cuando se administran por vía intramuscular, se absorben completamente, llegando a la máxima concentración sérica entre 30 y 90 minutos⁽³⁸⁾. También pueden administrarse tópicamente, con ninguna o mínima absorción sistémica del fármaco, siempre y cuando la barrera cutáneo mucosa esté conservada. Otra forma de administración del fármaco es la instilación del mismo dentro del espacio pleural, de la cavidad peritoneal o intratecalmente, obteniéndose concentraciones séricas rápidas y proporcionales a la cantidad instilada. También es posible la administración por vía inhalatoria de aminoglucósidos tales como gentamicina, tobramicina o amikacina, en casos de fibrosis quística y bronquiectasias de otro origen⁽³⁾.

La farmacocinética es similar para todos los antibióticos del grupo, y puede dividirse en tres fases (α , de distribución; β , de eliminación; y γ , eliminación tardía)^(3,39).

La fase α consiste en el paso del antibiótico desde el espacio vascular al extravascular. Esta fase tiene una vida media de 15 a 30 minutos⁽³⁹⁾. Los aminoglucósidos son fármacos de baja unión a proteínas plasmáticas y muy hidrosolubles, lo que hace que se distribuyan libremente en el compartimiento vascular y en el intersticio de muchos tejidos. Debido a su tamaño, su peso molecular, su carga policatiónica y su insolubilidad en lípidos, atraviesan pobremente las membranas biológicas, con la excepción de las células tubulares renales y las células del oído interno, donde pueden superar los niveles plasmáticos de aminoglucósidos. Existen ciertos sitios donde el nivel de antibiótico alcanzado cuando se administran por vía IV o IM es inadecuado, como las secreciones bronquiales, donde es más efectiva la administración en aerosoles que produzcan microgotas de 1 a 3 μm de diámetro, o la barrera hemato-encefálica, donde es más efectiva la administración lumbar o intratecal. Sin embargo hay otros sitios, como la orina, donde la concentración es excelente,

Aminoglucósidos

también en líquido sinovial o en ojo, por ejemplo, el antibiótico alcanza una concentración satisfactoria^(3,10).

La fase β de eliminación es el resultado de la excreción del fármaco desde el plasma y el espacio extravascular a la orina. Esta fase está determinada por el índice de filtrado glomerular, siendo de fundamental importancia para el ajuste de la dosificación del fármaco. En adultos y niños mayores de 6 meses de edad, la vida media de todos los aminoglucósidos es similar, y oscila entre 1,5 a 3,5 horas^(3,40-42). En neonatos esta vida media se alarga pudiendo llegar hasta 8 a 11 horas. En personas de edad avanzada es el deterioro de la función renal lo que determina la prolongación en el tiempo de eliminación de los aminoglucósidos. En una administración parenteral de aminoglucósidos, el 99% del fármaco es excretado sin cambios por el riñón, y el 1% restante entre heces y saliva. Si se trata de un adulto con función renal normal, el 90% de la dosis administrada se recupera de la orina en las primeras 24 horas^(3,43).

La fase γ consiste en la lenta y progresiva eliminación del fármaco por la orina, pudiendo ser detectado 20 o más días después de la administración del mismo⁽³⁾.

Los aminoglucósidos son antibióticos bactericidas concentración dependientes, es decir que cuanto mayor es la concentración del antibiótico, mayor es el efecto bactericida, y la persistencia de su acción bactericida depende del efecto postantibiótico. Estos dos aspectos fundamentan la dosificación espaciada sin pérdida de eficacia⁽²²⁾.

El efecto postantibiótico se define como la supresión del crecimiento bacteriano que persiste después de cortas exposiciones a antimicrobianos y en ausencia, o presencia de muy escasa cantidad, del mismo. Tal inhibición no es debida por lo tanto a la presencia del antibiótico en el medio.

Este fenómeno fue descrito originariamente por Bigger en 1944, al observar el retraso en el crecimiento de *Staphylococcus* spp. previamente expuestos a penicilina. Pocos años después Parker y colaboradores comprueban el descubrimiento de Bigger, mientras que Eagle y colaboradores fueron capaces de demostrar el fenómeno con penicilina y otros cocos grampositivos tanto *in vitro* como *in vivo*. Sin embargo no es hasta los años 70 cuando la importancia de este efecto comienza a crecer, debido a que

Aminoglucósidos

se descubre en otros grupos de antimicrobianos y en bacterias gramnegativas. El mecanismo por el cual los antimicrobianos inducen el efecto postantibiótico en los microorganismos es en parte desconocido. La explicación más probable es que estaría debido a los daños no letales producidos por los antimicrobianos y/o a la persistente unión de éstos a determinados sitios bacterianos, lo que se traduce en un retraso en el crecimiento normal de la bacteria. En el caso de los antimicrobianos que actúan en los ribosomas inhibiendo la síntesis proteica, como los aminoglucósidos, el efecto postantibiótico se podría explicar por un período de resíntesis de proteínas necesarias para el metabolismo o el crecimiento bacteriano, y si la unión del antimicrobiano es irreversible, la actividad de éste persiste aunque haya sido retirado^(44,45).

Numerosos estudios experimentales y clínicos han demostrado la utilidad de los parámetros farmacocinéticos, no sólo para predecir el éxito terapéutico, sino el riesgo de selección de mutantes resistentes a un determinado antimicrobiano. El primer parámetro que se debe considerar es el cociente inhibitorio, por lo general referido al suero, obtenido al dividir la concentración sérica máxima ($C_{m\acute{a}x}$) por la concentración inhibitoria mínima (CIM) frente al patógeno, el segundo de los parámetros a considerar es la tasa área bajo la curva (ABC)/CIM, y el tercero es el tiempo durante el cual las concentraciones séricas superan la CIM frente al patógeno (Figura 16)^(45,46). En el caso de los aminoglucósidos, los dos primeros parámetros son los que determinan su utilidad. Se ha constatado que un cociente $C_{m\acute{a}x}/CIM \geq 10$ consigue el máximo efecto bactericida y disminuye la selección de subpoblaciones resistentes⁽³⁸⁾.

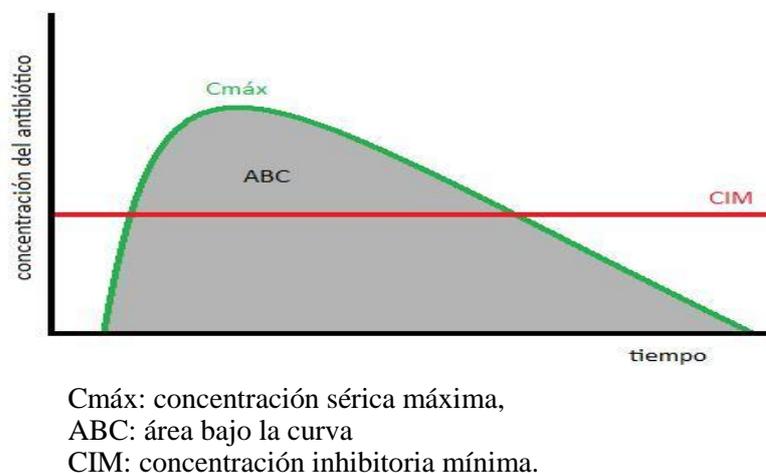


Figura 16: Parámetros farmacocinéticos que determinan la utilidad de un antibiótico.

Aminoglucósidos

3.5 Mecanismo de acción de los aminoglucósidos.

Es sabido que los aminoglucósidos actúan uniéndose a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano impidiendo la correcta síntesis de proteínas, aunque el mecanismo preciso que subyace su actividad antimicrobiana aún se desconoce con detalle^(21,47).

La síntesis de proteínas ocurre en los ribosomas, que constan de dos subunidades, una grande (50S) y una pequeña (30S). La subunidad 50S está formada por dos moléculas de RNA (5S y 23S) y 33 proteínas específicas, mientras que la subunidad 30S está formada por una única molécula de RNA (16S) y de 20 a 21 proteínas^(48,49). Para la síntesis de proteínas, también se requiere de moléculas de tRNA, que están plegadas en una estructura secundaria con forma de hoja de trébol. La molécula de tRNA es el adaptador que aparea el aminoácido correcto con cada codón de mRNA durante la síntesis de proteínas. Existe al menos un tipo de molécula de tRNA para cada tipo de aminoácido presente en las células. Las enzimas conocidas como aminoacil-tRNA sintetasas catalizan la unión de cada aminoácido a su molécula de tRNA específica. En el lugar donde la cadena de mRNA está en contacto con un ribosoma, se unen tRNAs temporalmente a la cadena de mRNA.

Esta unión ocurre por apareamiento de bases complementarias entre el codón de mRNA y el anticodón de tRNA. Cada molécula de tRNA lleva el aminoácido específico requerido por el codón de mRNA, al cual se une el tRNA. Así, siguiendo la secuencia dictada originalmente por el DNA, las unidades de aminoácidos son alineadas una tras otra y, a medida que se forman los enlaces peptídicos entre ellas, se unen en una cadena polipeptídica⁽⁴⁸⁾.

La síntesis de proteínas ocurre en varias etapas:

a) **Iniciación:** La subunidad ribosómica 30S se une al extremo 5' de una molécula de mRNA. La primera molécula de tRNA, que lleva el aminoácido modificado fMet, se acopla con el codón iniciador AUG de la molécula de mRNA. La subunidad ribosómica 50S se ubica en su lugar, el complejo tRNA-fMet ocupa el sitio P (peptídico). El sitio A (aminoacil) está vacante. El complejo de iniciación está completo ahora⁽⁴⁸⁾.

Aminoglucósidos

b) Elongación: Un segundo tRNA, con su aminoácido unido, se coloca en el sitio A y su anticodón se acopla con el mRNA. Se forma un enlace peptídico entre los dos aminoácidos reunidos en el ribosoma. Al mismo tiempo, se rompe el enlace entre el primer aminoácido y su tRNA. El ribosoma se mueve a lo largo de la cadena de mRNA en una dirección 5' a 3', y el segundo tRNA, con el dipéptido unido, se mueve desde el sitio A al sitio P, a medida que el primer tRNA se desprende del ribosoma. Un tercer aminoacil-tRNA se coloca en el sitio A y se forma otro enlace peptídico. La cadena peptídica naciente siempre está unida al tRNA que se está moviendo del sitio A al sitio P y el tRNA entrante que lleva el siguiente aminoácido siempre ocupa el sitio A. Este paso se repite una y otra vez hasta que se completa el polipéptido⁽⁴⁸⁾.

c) Terminación: Cuando el ribosoma alcanza un codón de terminación (en este ejemplo UGA), el polipéptido se escinde del último tRNA y el tRNA se desprende del sitio P. El sitio A es ocupado por un factor de liberación que produce la disociación de las dos subunidades del ribosoma⁽⁴⁸⁾.

Los aminoglucósidos, para ejercer su acción a nivel ribosomal, precisan atravesar la pared bacteriana, y ello se realiza en tres fases diferenciadas. La primera, independiente de energía, consiste en la unión de los aminoglucósidos (de carga eléctrica positiva) a moléculas como fosfolípidos y lipopolisacáridos de la membrana externa de bacterias gramnegativas, y fosfolípidos y ácidos teicóicos en bacterias grampositivas (todas estas moléculas de carga eléctrica negativa). Esta unión de los aminoglucósidos a moléculas cargadas negativamente da como resultado un desplazamiento de los iones de Ca^{2+} y Mg^{2+} que mantienen unidos a los polipéptidos adyacentes, provocando un daño en la membrana externa que conlleva un aumento en la permeabilidad celular^(50,51). Esta etapa inicial de unión electrostática se continúa con una “fase I dependiente de energía” (EDP_1 , del inglés energy-dependent phase I)⁽⁵²⁾.

El mecanismo de transporte de aminoglucósidos a través de la membrana citoplasmática durante la EDP_1 puede involucrar energía ligada a reacciones redox de la quinona o de componentes adicionales de la cadena de transporte de electrones, o ambos, aunque existe evidencia reciente de unión del antibiótico a sistemas de transporte de oligopéptidos que actuarían como transportadores de aminoglucósidos en esta fase. La

Aminoglucósidos

EDP₁ precede a la inhibición de la síntesis proteica y la entrada de antibiótico en esta fase puede ser bloqueada por inhibidores del transporte de electrones, como la cianida, la anaerobiosis o el pH bajo⁽⁵³⁾. Durante la EDP₁ la concentración de moléculas de antibiótico alcanzada en el interior de la célula no es elevada, pero suficiente para provocar, mediante su unión a los ribosomas, lecturas alteradas o terminación prematura del mRNA, y por lo tanto, proteínas anómalas. Algunas de estas proteínas se insertaran en la membrana citoplasmática, dañándola aún más y haciéndola más permeable⁽⁵⁴⁾. Esta pérdida de la integridad desencadena una cascada de eventos conocidos como “fase II dependiente de energía” (EDP₂)⁽⁵²⁾. Es en esta fase cuando se acumula la mayor cantidad de antibiótico dentro de la célula de manera rápida y virtualmente irreversible, saturando los ribosomas y causando la muerte de la célula.

En general, la EDP₂ representa una tasa acelerada de transporte de aminoglucósido a través de la membrana citoplasmática, mediante un proceso que utiliza energía de la cadena de transporte de electrones, y posiblemente de la hidrólisis de ATP. La EDP₂ precisa de la unión del antibiótico al ribosoma para iniciarse, y no ocurre si el aminoglucósido ha sido modificado enzimáticamente. A mayor concentración de aminoglucósido, más rápidamente alcanzará la EDP₂ y con ella la muerte bacteriana, es por ello que se trata de un grupo de antimicrobianos bactericidas concentración dependiente⁽⁵²⁾.

La interacción entre los aminoglucósidos y los ribosomas no se conoce en su totalidad, pero estructuras de cristal de alta resolución definieron que el sitio de unión de los aminoglucósidos 2-DOS (que son los que mayoritariamente se utilizan en la práctica clínica) está dentro de la región decodificadora del 16S rRNA (Figura 17)⁽⁴⁷⁾. Cierta número de contactos entre nucleótidos y antibiótico han sido propuestos para esclarecer la afinidad del aminoglucósido por el sitio A del 16S rRNA. Los nucleótidos del sitio A que serían esenciales para la unión de los aminoglucósidos son A1408 (la numeración de *E. coli* es la utilizada a lo largo de este trabajo), la interacción C1409-G1491 y el par de bases U1406·U1495 (Figura 18). La A1408 forma un pseudo par de bases con el anillo I de los aminoglucósidos 2-DOS, la G1491 interactúa con el anillo I estabilizando la unión al nucleótido A1408 (Figura 19). El U1495 otorga unión

Aminoglucósidos

hidrógeno con el anillo II. Además, el par de bases U1406·U1495 acomoda el anillo III de los 4,6-2-DOS, permitiendo de esta forma contactos adicionales con la G1405⁽⁵⁵⁾.

El resultado final de la unión del fármaco al sitio A es la interferencia de la incorporación de alta fidelidad de aminoácidos, inhibiendo la translocación del complejo tRNA-rRNA e induciendo una lectura errónea del mRNA que provoca una selección incorrecta del aminoacil-tRNA⁽⁵⁶⁾. Esta interferencia ocurre por la inducción y estabilización de un cambio conformacional del sitio A del rRNA ocasionado por la presencia de aminoglucósidos.

Cuando un 2-DOS se une al sitio A del rRNA, las purinas A1492 y A1493 se mueven hacia el exterior y se posicionan para interactuar con el surco menor de la hélice codón-anticodón. Este cambio conformacional normalmente ocurre solamente durante la acomodación de un complejo tRNA-rRNA correcto⁽⁵⁷⁾. Al quedar estabilizada esta conformación, el ribosoma pierde su habilidad para discriminar tRNA correcto de tRNA incorrecto, incorporando cualquier aminoácido durante la síntesis proteica, llevando a la síntesis de proteínas anómalas y, finalmente, a la muerte celular⁽⁵⁸⁻⁶¹⁾.

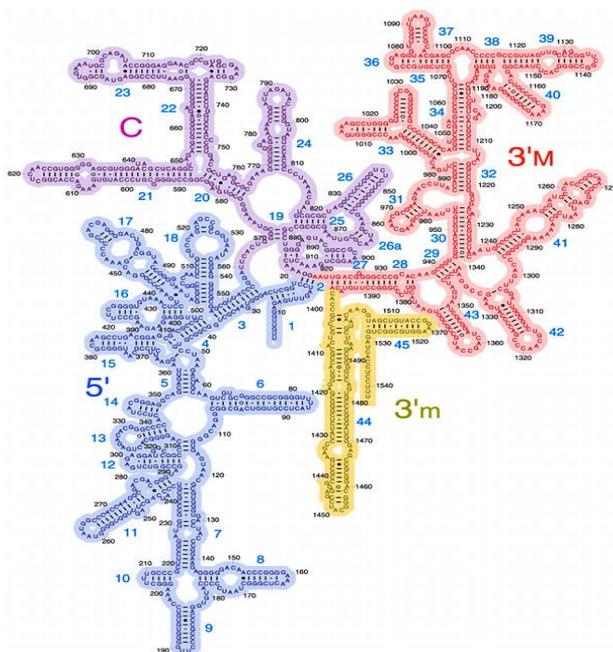


Figura 17: Estructura secundaria del 16S rRNA de *Escherichia coli*. (http://rna.ucsc.edu/rnacenter/ribosome_images.html)

Aminoglucósidos

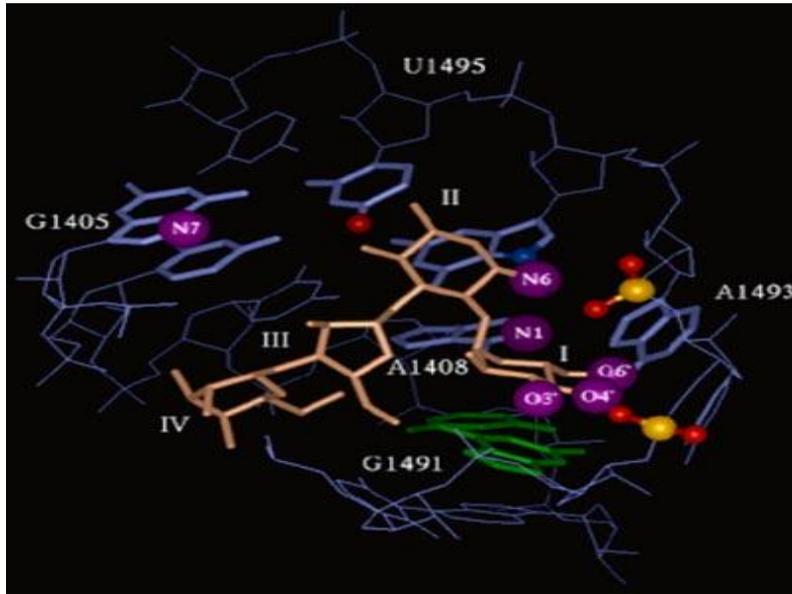


Figura 18: Estructura en 3D de la paromomicina unida al sitio A del rRNA bacteriano. (<http://puglisi.stanford.edu/research.html>)

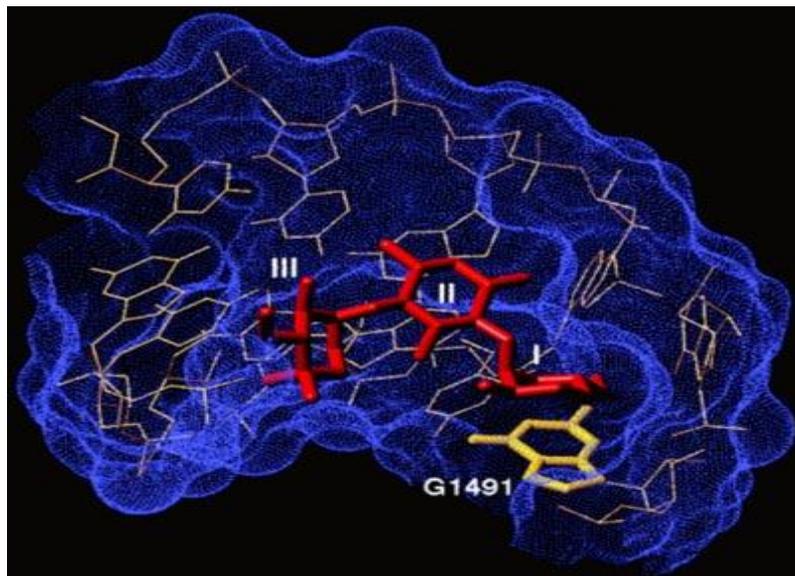


Figura 19: Estructura en 3D de la gentamicina C_{1A} que muestra la interacción G1491-anillo I (<http://puglisi.stanford.edu/research.html>)

La mayor parte de los residuos de rRNA están universalmente conservados, tanto en procariotas como en eucariotas, con la salvedad de la A1408, que en eucariotas es G. A esta sola diferencia se debe probablemente la selectividad de los aminoglucósidos para unirse a los ribosomas bacterianos⁽⁴⁷⁾.

Aminoglucósidos

La estreptomicina se une a los nucleótidos 13, 256, 915 y 1490 del rRNA y a la proteína 12S, la espectinomicina se une al surco menor de la hélice H34 del 16S rRNA. La unión de la espectinomicina en esta posición estabilizaría la hélice H34, inhibiendo la unión del factor de elongación G, bloqueando de esta manera la translocación del peptidil-tRNA del sitio A al sitio P⁽⁶²⁾.

Más adelante, al analizar las enzimas modificadoras de aminoglucósidos, se comentará la influencia de las interacciones químicas citadas anteriormente en la resistencia a los aminoglucósidos.

3.6 Resistencia a los aminoglucósidos.

La resistencia a los aminoglucósidos puede ser natural o adquirida. Una forma de resistencia natural es la que se presenta en bacterias anaerobias estrictas, ya que como se comentó previamente la entrada de los aminoglucósidos a la célula es un proceso activo que precisa oxígeno. También se observa que las bacterias facultativas son mucho más resistentes cuando proliferan en medios anaerobios.

La resistencia adquirida de una bacteria a los aminoglucósidos puede ser debida a tres mecanismos distintos: la disminución de la acumulación intracelular del antibiótico, las alteraciones de la diana y, la más importante, la inactivación enzimática del antibiótico por parte de enzimas modificadoras de aminoglucósidos (EMAG).

La disminución de la acumulación intracelular del antibiótico puede deberse a alteraciones en la permeabilidad de la membrana a la hora de la penetración del antibiótico a la célula o a la presencia de bombas de expulsión activa⁽⁶³⁾.

La disminución de la permeabilidad refleja, en algunos casos, la pérdida de componentes de la cadena respiratoria, pero este mecanismo reduce a su vez la tasa de crecimiento bacteriano y confiere sólo una resistencia de bajo nivel⁽⁶⁴⁾.

Otro cambio en la envoltura celular puede permitir niveles considerables de resistencia a aminoglucósidos en aislados de *E. coli*, existe evidencia de que la proteína

Aminoglucósidos

fijadora de oligopéptidos OppA, que es el componente periplasmático de un sistema de permeabilidad de oligopéptidos, puede actuar como trasportador de aminoglucósidos, y que una disminución en su expresión confiere resistencia a aminoglucósidos como la kanamicina, la neomicina, la sisomicina, la gentamicina o la tobramicina⁽⁶³⁻⁶⁶⁾. Otro mecanismo que se ha descrito que conlleva a una disminución de la acumulación intracelular del antibiótico son las bombas de eflujo tipo RND (del inglés Resistance Nodulation Division), como la AcrD de *E. coli*. A diferencia de otras bombas de eflujo, como AcrB, que tienen por sustratos exclusivos a compuestos lipofílicos y anfifílicos, las AcrD tienen por sustratos a compuestos hidrofílicos, como los aminoglucósidos, aunque también unos pocos compuestos anfifílicos, como el dodecil sulfato sódico, el desoxicolato y la novobiocina^(67,68). Estas bombas exportan el antibiótico una vez que éste se encuentra dentro de la bacteria. Estos mecanismos confieren un tipo de resistencia cruzada a todos los aminoglucósidos. Esta resistencia es de bajo nivel de forma natural, salvo que una mutación provoque su sobreexpresión y esto conlleve a un aumento considerable del nivel de resistencia^(67,68).

Un segundo mecanismo de resistencia agrupa a las alteraciones en la diana del antibiótico, que pueden ser debidas a mutaciones puntuales o a metilación del RNA. Las mutaciones puntuales ribosomales no afectan a todas las bacterias por igual. La diferencia depende básicamente de las copias del operón RNA ribosomal que exista en cada especie, así *E. coli* tiene siete copias de este operón, y la resistencia recién se manifiesta cuando más del 50% de los ribosomas están afectados. La probabilidad que sobrevengan tantas mutaciones es baja⁽⁴⁷⁾. En otras bacterias, como por ejemplo *Mycobacterium tuberculosis*, que posee una sola copia del operón de rRNA este mecanismo es muy importante en la resistencia a la estreptomina⁽²¹⁾.

El otro mecanismo documentado de alteración de la diana es la metilación ribosomal, que ha sido recientemente reportado en bacterias patógenas para el hombre⁽⁴⁷⁾. La metilación del RNA 16S en posición G1405 se debe a la presencia de algunos de los siguientes genes: *armA*, *rmtA* o *rmtB*^(69,70). El primero fue descrito originariamente en Francia en *K. pneumoniae* BM4536 en el plásmido pIP1204 del grupo de incompatibilidad IncL/M en el transposón compuesto Tn1548, capaz de replicar en enterobacterias y que además confiere resistencia a cefalosporinas de 3^a

Aminoglucósidos

generación por la presencia del gen que codifica la betalactamasa CTX-M-3⁽⁷¹⁾. Los genes *rmtA* y *rmtB* fueron detectados, en *Pseudomonas aeruginosa* y *Serratia marcescens* respectivamente, en Japón^(69,72). La metilación G1405 confiere resistencia de alto nivel a los aminoglucósidos 4,6-2-DOS (kanamicina, amikacina, tobramicina, gentamicina, netilmicina), pero no afecta a los 4,5-2-DOS (neomicina)⁽²¹⁾.

El tercer mecanismo de resistencia, y el más importante en la clínica es la modificación enzimática de los aminoglucósidos por parte de las EMAG^(3,47,73). Por este motivo y por ser el objeto de estudio de este trabajo se comentarán en el siguiente apartado con mayor detalle, teniendo en cuenta principalmente aquellos mecanismos que afecten a la familia *Enterobacteriaceae*.

3.7 Enzimas modificadoras de aminoglucósidos.

Las modificaciones enzimáticas debidas a EMAG son el mecanismo más frecuente de resistencia a los aminoglucósidos^(21,47,73). La modificación de un aminoglucósido por parte de estas enzimas provoca que su fijación al RNA 16S se vea afectada y de esta forma pierda su actividad^(49,74), aunque puede darse el caso de que un antibiótico modificado conserve su actividad, como sucede con la 6'-N-acetil-neomicina⁽⁷⁵⁾.

Se cree que las EMAG derivan de los organismos que producen aminoglucósidos, o de mutación de genes que codifican enzimas relacionadas con la respiración celular^(21,73,76,77). Los genes que las codifican suelen encontrarse en plásmidos y transposones⁽⁷³⁾.

Las EMAG son producidas de manera constitutiva, su peso molecular ronda los 23.000 a 63.000 Da, y precisan la presencia de cationes divalentes para actuar⁽²¹⁾. Suelen conferir resistencia de alto nivel, aunque ello depende de múltiples factores como el microorganismo en cuestión, la cepa individual, el nivel de enzima producido, y su actividad catalítica^(47,49).

Aminoglucósidos

A la fecha existen más de 50 tipos diferentes de EMAG, que se pueden agrupar en tres tipos según la reacción que catalizan^(49,56):

- **N-acetiltransferasas (AAC):** catalizan una acetilación, transfiriendo un grupo acetato desde la acetilcoenzimaA a un grupo amino del aminoglucósido.
- **O-fosfotransferasas (APH):** catalizan una fosforilación, transfiriendo un grupo fosfato desde un ATP a un grupo hidroxilo del aminoglucósido.
- **O-nucleotidiltransferasas (ANT):** catalizan una nucleotidilación, esto es, la transferencia de un nucleótido monofosfato desde un nucleótido trifosfato a un grupo hidroxilo del aminoglucósido.

Cada uno de estos grupos (AAC, APH y ANT) tiene a su vez diferentes clases, según el sitio de modificación del aminoglucósido, representado por un número arábigo entre paréntesis; diferentes tipos, según el perfil de resistencia que genera, representado a continuación por un número romano, y finalmente, si el perfil de resistencia es el mismo, pero tienen alguna diferencia genética, se agrega una letra minúscula a continuación del número romano^(49,73). Como ejemplo, la AAC(6')-Ib catalizará acetilación en la posición 6' del aminoglucósido, y dará el perfil I, esto es resistencia a kanamicina, tobramicina, amikacina y netilmicina.

En cuanto a los genes que codifican las EMAG existen dos nomenclaturas válidas, lo que ha llevado a confusiones. En el sistema clásico las acetiltransferasas, las fosfotransferasas y las nucleotidiltransferasas son designadas *aac*, *aad* y *aph*, respectivamente. Una letra mayúscula a continuación indica la posición del aminoglucósido que se ve afectada por la enzima codificada (para las *aac*, por ejemplo, la A indica la posición 6' y la C la 3) y un número arábigo el orden en el cual fueron descubiertos los distintos genes que codifican para una enzima de acción semejante⁽⁷³⁾. Así *aacA1* es el gen que codifica para la AAC(6')-Ia. Otro sistema propone que la nomenclatura de los genes sea la misma que la de la enzima, escrita en cursiva y minúsculas, para el ejemplo anterior sería *aac(6')-Ia*. Ha habido algunos malos

Aminoglucósidos

entendidos debido a la utilización simultánea de las dos nomenclaturas⁽⁷⁸⁾. En este trabajo se utilizará el segundo sistema, por ser el más aceptado actualmente.

La distribución de las EMAG varía tanto geográfica como temporalmente, ya que la política antibiótica propia de cada lugar parece jugar un papel decisivo en la adquisición y diseminación de resistencia⁽⁴⁹⁾, como en lo que respecta a los géneros bacterianos a los que afectan (Tabla 6).

Tabla 6: EMAG más frecuentes en diferentes grupos bacterianos

Enzima	CGP	BGN	PSE	ACI	PROD
APH(3')-I		×			
APH(3')-II			×		
APH(3')-III	×				
APH(3')-IV					×
APH(3')-V					×
APH(3')-VI				×	
APH(3')-VII		×			
APH(2'')-I	×				
APH(3'')-Ia,-Ib		×			
APH(7'')-Ia					
APH(4)-Ia,-Ib					
APH(6)-Ia,-Ib,-Ic,-Id					×
APH(9)-Ia,-Ib					
AAC(6')-I	×	×			
AAC(6')-II			×		
AAC(3)-Ia,-Ib		×	×		
AAC(3)-IIa,-IIb,-IIc		×	×		
AAC(3)-IIIa,-IIIb,-IIIc			×		
AAC(3)-IV			×		
AAC(3)-VI					×
AAC(1)		×			
AAC(2')-Ia		×			
ANT(2'')-I		×			
ANT(3'')-Ia	×	×	×		

CGP: cocos grampositivos, BGN: bacilos gramnegativos, PSE: *Pseudomonas* spp., ACI: *Acinetobacter* spp., PROD: bacterias productoras de aminoglucósidos.

Aminoglucósidos

Debido a que los grupos funcionales que reconocen estas enzimas son grupos amino e hidroxilo, una misma enzima puede afectar a más de un aminoglucósido, siempre que éste posea el grupo a modificar en la posición adecuada. De la misma manera, un aminoglucósido puede ser modificado por más de una enzima, siempre que éstas afecten a sus grupos amino o hidroxilo (Figura 20) ⁽⁵⁰⁾. De esta forma surgen los patrones de resistencia de las EMAG en los diferentes grupos bacterianos (Tablas 7, 8 y 9) ⁽⁴⁷⁾.

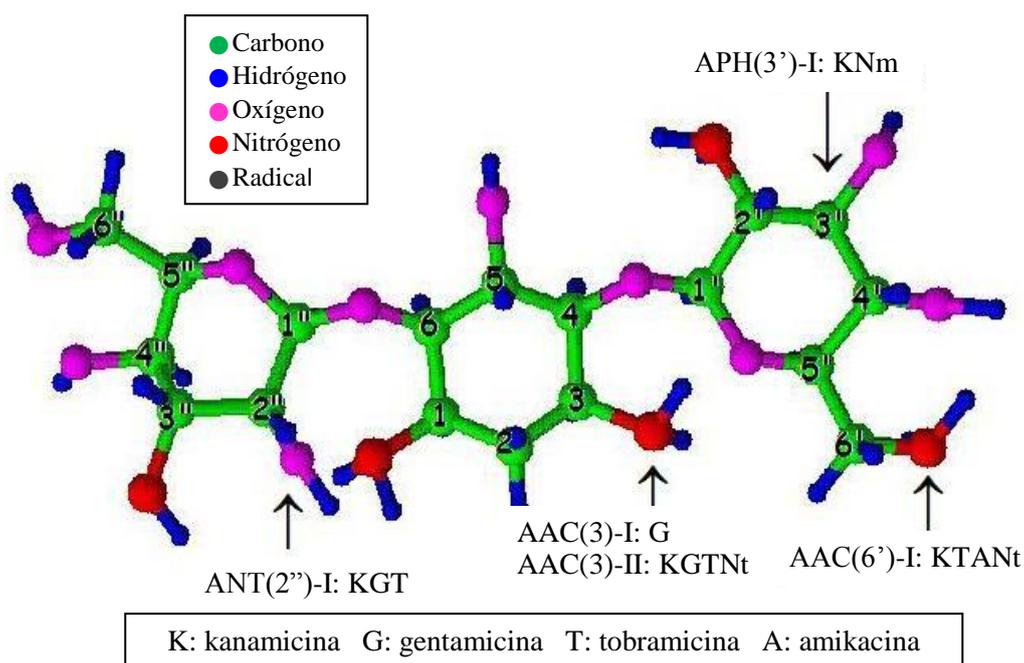


Figura 20: Sitios de acción de EMAG en 4,6-2-DOS.

Tabla 7: Perfil de sustratos de las ANT.

Enzima	G	T	A	K	Nm	Nt	Str	Spt	L	P	R	S	D
ANT(2'')-I	×	×		×								×	×
ANT(3'')-Ia							×	×					
ANT(4')-Ia		×	×	×									×
ANT(4')-IIa		×	×	×									
ANT(6')-I							×						
ANT(9)-I								×					

G: gentamicina, T: tobramicina, A: amikacina, K: kanamicina, Nm: neomicina, Nt: netilmicina, Str: estreptomycin, Spt: espectinomycin, L: lividomicina, P: paromomicina, R: ribostamicina, S: sisomicina, D: dibekamicina.

Aminoglucósidos

Tabla 8: Perfil de sustratos de las AAC.

Enzima	G	T	A	K	Nm	Nt	Str	Spt	L	P	R	S	D
AAC(6')-I		×	×	×		×						×	×
AAC(6')-II	×	×		×		×						×	×
AAC(3)-Ia,-Ib	×											×	
AAC(3)-IIa,-IIb,-IIc	×	×		×		×						×	×
AAC(3)-IIIa,-IIIb,-IIIc	×	×		×	×				×	×		×	×
AAC(3)-IV	×	×				×						×	×
AAC(3)-VI	×												
AAC(1)									×	×	×		
AAC(2')-Ia	×	×		×	×								×

G: gentamicina, T: tobramicina, A: amikacina, K: kanamicina, Nm: neomicina, Nt: netilmicina, Str: estreptomicina, Spt: espectinomicina, L: lividomicina, P: paromomicina, R: ribostamicina, S: sisomicina, D: dibekamicina.

Tabla 9: Perfil de sustratos de las APH.

Enzima	G	T	A	K	Nm	Nt	Str	Spt	L	P	R	S	D
APH(3')-I				×	×				×	×	×		
APH(3')-II				×	×				×	×	×		
APH(3')-III			×	×	×				×	×	×		
APH(3')-IV				×	×					×	×		
APH(3')-V					×					×	×		
APH(3')-VI			×	×	×					×	×		
APH(3')-VII				×	×								
APH(2'')-Ia	×	×		×								×	×
APH(2'')-Ib,-Id	×	×		×		×							×
APH(2'')-Ic	×	×		×									
APH(3'')-Ia,Ib							×						
APH(7'')-Ia													
APH(4)-Ia,Ib													
APH(6)-Ia,-Ib,-Ic,-Id							×						
APH(9)-Ia,-Ib								×					

G: gentamicina, T: tobramicina, A: amikacina, K: kanamicina, Nm: neomicina, Nt: netilmicina, Str: estreptomicina, Spt: espectinomicina, L: lividomicina, P: paromomicina, R: ribostamicina, S: sisomicina, D: dibekamicina.

Aminoglucósidos

3.8 Interacciones aminoglucósido-EMAG.

En el caso de los aminoglucósidos 4,6-2-DOS, las N-acetiltransferasas acetilcoenzimaA dependientes acetilan tanto los grupos 2'-NH₃⁺ y 6'-NH₃⁺ del anillo I como el 3-NH₃⁺ del anillo II^(56,79). La introducción de un grupo acetilo en la posición 6'-NH₃⁺ interfiere en el contacto de puente de hidrógeno de la molécula 6'-NH₃⁺ del aminoglucósido y la A1408 del 16S rRNA del ribosoma, resultando en una resistencia de alto nivel^(56,80,81). La modificación del grupo 2'-NH₃⁺ cambia la conformación estructural de los 4,6-2-DOS introduciendo una cadena lateral que interfiere con el posicionamiento adecuado de los anillos II y III^(56,80). La acetilación del 3-NH₃⁺ previene la formación de los enlaces que el grupo amino de la posición 3 del anillo II hace con el N-7 de la G1494, y con los grupos fosfato de A1493 o G1494^(56,80,81).

En el caso de la fosforilación o adenilación del grupo OH en la posición 2'', los enlaces del hidrógeno al O-6 de G1405 y el vecino entre N-3'' y N-7 de G1405 no se pueden formar^(56,80,81). Estas interacciones pueden observarse en el ejemplo de la figura 21⁽⁵⁶⁾.

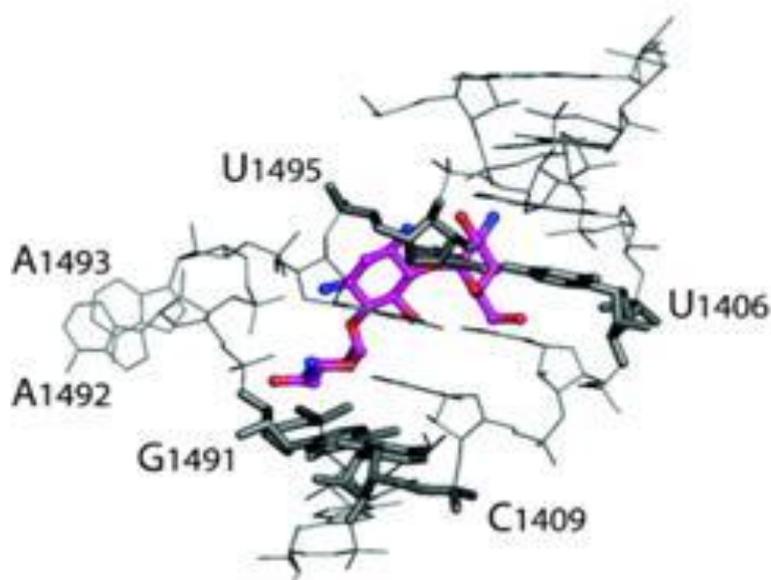


Figura 21: Estructura cristalina del complejo entre la tobramicina (color) y un oligonucleótido (gris) contenido en el sitio A⁽⁵⁶⁾.

Aminoglucósidos

3.9 Usos clínicos de los aminoglucósidos.

La utilización clínica de los aminoglucósidos en el tratamiento de infecciones provocadas por *Enterobacteriaceae* es muy limitada.

Al analizar los protocolos de la Sociedad Española de Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) que recomiendan tratamientos para los diversos síndromes de patología infecciosa, se comprueba que los aminoglucósidos no tienen un papel protagonista en el tratamiento de infecciones por *Enterobacteriaceae*⁽⁸²⁾.

De los 11 protocolos, sólo cinco contienen alguna indicación de aminoglucósidos para el tratamiento de infecciones por enterobacterias, si bien es cierto que dos de estos protocolos no contienen patología provocada por *Enterobacteriaceae* (tuberculosis y ETS), de todas formas las indicaciones de aminoglucósidos son escasas y muchas de ellas como alternativa a otros tratamientos de elección (Tablas 10 a 14).

Tabla 10: Protocolo I: Infecciones de Aparato Respiratorio Inferior

Patología	Aminoglucósido	Indicación
Neumonía nosocomial grave	Aminoglucósido (sin especificar)	Asociado a betalactámicos 1ª y 2ª elección
Neumonía precoz en pacientes ventilados ^a	Amikacina	Asociada a betalactámicos
Neumonía tardía en pacientes ventilados	Amikacina	Asociada a betalactámicos

^a con factores de riesgo o tratamiento antibiótico previo

Tabla 11: Protocolo IV: Infección urinaria.

Patología	Aminoglucósido	Indicación
Pielonefritis aguda	Gentamicina o amikacina	Asociada a betalactámicos
Pielonefritis aguda y shock séptico	Amikacina	Asociada a betalactámicos 1ª elección
Recambio de sonda permanente	Gentamicina o amikacina	Profilaxis

Aminoglucósidos

Tabla 12: Protocolo VI: Infecciones ósea y de partes blandas.

Patología	Aminoglucósido	Indicación
¿?	¿?	Rosario o Cemento

Tabla 13: Protocolo IX: Peritonitis e infecciones intrabdominales.

Patología	Aminoglucósido	Indicación
Peritonitis secundaria extrahospitalaria	Gentamicina	Alternativa
Colecistitis complicada	Gentamicina o amikacina	Asociada a betalactámicos

Tabla 14: Protocolo XI: Neutropénicos.

Patología	Aminoglucósido	Indicación
Fiebre	Gentamicina o amikacina	Tratamiento inicial empírico

En guías terapéuticas de bolsillo⁽⁸³⁾, las indicaciones de aminoglucósidos en infecciones por *Enterobacteriaceae*, también son escasas. Las indicaciones son similares a las de los protocolos de la SEIMC, ya que si se analiza cada indicación individualmente, se observa que cuando está indicado el uso de aminoglucósidos, suelen ser infecciones nosocomiales o infecciones localizadas que se acompañan de sepsis. En caso de sepsis por *Enterobacteriaceae*, la indicación de amikacina es clara. En otras patologías se usa empíricamente, por la posibilidad de aislamiento de *Pseudomonas* spp., en estos casos también se indica amikacina, por su efecto antipseudomonas. La única indicación clara de gentamicina es la peritonitis bacteriana secundaria^(82,83).

4. OBJETIVOS

Objetivos

Los objetivos del presente estudio son los siguientes:

- Estudiar la sensibilidad a los antimicrobianos de las *Enterobacteriaceae* con interés clínico aisladas en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau durante el primer trimestre de 2006, mediante la técnica de disco difusión.
- Determinar la prevalencia de los diferentes patrones de resistencia a aminoglucósidos de estos aislados.
- Determinar la prevalencia de los genes que codifican las enzimas modificadoras de aminoglucósidos en estos aislados.
- Establecer correlación entre los valores de sensibilidad obtenidos mediante la técnica de disco difusión, las características fenotípicas del halo de inhibición y la presencia de genes de enzimas modificadoras de aminoglucósidos.
- Optimizar el estudio de la sensibilidad a aminoglucósidos en *Enterobacteriaceae* mediante la técnica de disco difusión en el laboratorio de microbiología clínica.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales y Métodos

5.1 Características y ámbito del estudio.

Se ha realizado un estudio transversal descriptivo y observacional en el que se han analizado 788 aislados de enterobacterias aisladas entre el 1 de Enero de 2006 y el 31 de Marzo de 2006 en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona, España. Este centro hospitalario de tercer nivel dispone de 645 camas y cubre una población de 300.000 habitantes.

Los aislados incluidos en el estudio representan una parte del total de enterobacterias con significado clínico aisladas en el laboratorio de Microbiología durante el mismo período, que fue de 1053. Los aislados no incluidos corresponden a aislados duplicados.

Los datos demográficos de los pacientes se obtuvieron de la información provista por el sistema informático del hospital.

En el estudio se incluyó un solo aislado por paciente a menos que correspondiesen a especies diferentes o a la misma especie, pero con antibiograma diferente. En los aislados que presentaron resistencia a alguno de los aminoglucósidos estudiados se estudio genéticamente la presencia de enzimas modificadoras de aminoglucósidos, al igual que en 34 aislados, sensibles a todos los aminoglucósidos estudiados, seleccionados al azar, así como en la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 (ver más adelante).

5.2 Estudio de la sensibilidad a los antibióticos.

El estudio de la sensibilidad a los antibióticos se realizó mediante la técnica de disco difusión en agar Mueller-Hinton (Oxoid, Unipath Limited, Basingstokes, Reino Unido) con discos de papel impregnados de concentraciones estandarizadas de antibióticos. Los discos de antibióticos utilizados fueron de Bio-Rad Laboratories, Inc., excepto la espectinomicina que fue una tableta de ROSCO NEO-SENSITABS™.

La técnica realizada fue la propuesta por el CLSI⁽⁸⁴⁾. Las placas crecidas fueron posteriormente leídas con el sistema SirScan y clasificadas según los criterios del CLSI⁽⁸⁴⁾, excepto en el caso de la espectinomicina, para la que se usaron los criterios

Materiales y Métodos

establecidos por ROSCO NEO-SENSITABS^{TM(85)}. Para la neomicina, al no existir puntos de corte del CLSI ni del fabricante, se utilizó uno propio del presente trabajo, fijado en 1 mm menos del valor inferior de los aislados control. Los puntos de corte de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) son los propuestos por el CLSI⁽⁸⁴⁾, excepto en el caso de la estreptomina y la espectinomicina, que al no existir estos puntos de corte para enterobacterias, se utilizaron los recomendados por la casa comercial^(84,85).

Los antimicrobianos evaluados en el antibiograma inicial de rutina del laboratorio de microbiología fueron: betalactámicos (ampicilina, piperacilina, cefazolina, cefoxitina, cefuroxima, cefotaxima, ceftazidina, cefepima, aztreonam, imipenem, amoxicilina-ácido clavulánico, y piperacilina-tazobactam), aminoglucósidos (gentamicina, tobramicina y amikacina), ácido nalidíxico, ciprofloxacino, fosfomicina, nitrofurantoína, tetraciclina y cotrimoxazol.

Posteriormente, a cada aislado se le realizó un estudio de sensibilidad a siete aminoglucósidos (kanamicina, gentamicina, tobramicina, amikacina, netilmicina, neomicina y estreptomina) y un aminociclitol (espectinomicina), con el fin de obtener patrones de resistencia a aminoglucósidos mediante la técnica de disco difusión (Tabla 15).

Aquellos aislados que presentaron resistencia a alguno de estos antibióticos se seleccionaron para el presente estudio y se les determinó posteriormente la CIM de kanamicina, gentamicina, tobramicina, amikacina, netilmicina, estreptomina y espectinomicina.

Además de estos aislados, se seleccionaron al azar 34 aislados sensibles a todos los aminoglucósidos evaluados y la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922, con la finalidad de obtener una población de controles sensibles. Mediante los resultados obtenidos se propone un punto de corte para cada aminoglucósido evaluado en los aislados control que está dado por el valor mínimo del diámetro del halo de inhibición de los 35 aislados seleccionados. De esta forma, si un aislado de este estudio posee un halo de inhibición inferior al punto de corte de los aislados control para un determinado aminoglucósido, pero superior al crítico de sensibilidad según el CLSI⁽⁸⁴⁾, será considerado como de “sensibilidad disminuida” al aminoglucósido en cuestión.

Materiales y Métodos

El estudio de la CIM se realizó mediante la técnica de Etest® (AB BIODISK, Solna, Suecia) que consiste en unas tiras de plástico de 5 x 57 mm calibradas con una escala de concentraciones en µg/mL y un código para identificar al antimicrobiano en una cara de la tira, mientras que en la otra cara se encuentra un gradiente predefinido del antimicrobiano en cuestión con 15 diluciones dobles seriadas. Cuando se aplica una tira de Etest® sobre la superficie del agar inoculado, el gradiente exponencial preformado del antimicrobiano se transfiere inmediatamente al agar. Tras 24 horas de incubación se forma una elipse de inhibición simétrica centrada a lo largo de la tira. La CIM se lee directamente en la escala, en el punto de intersección de la elipse de inhibición con la tira de plástico. En este estudio se utilizaron Etest® de kanamicina, amikacina, tobramicina, gentamicina, netilmicina, estreptomicina y espectinomicina. No se determinó la CIM de la neomicina por no estar disponible en tiras de Etest®. El Etest® se consideró la técnica de referencia para comparar los resultados de disco difusión. Según los resultados obtenidos en ambas técnicas, se dividieron los mismos en “acuerdo”, “error menor”, “error mayor” y “error máximo” (Tabla 16).

Tabla 15: Puntos de corte según CLSI.

Antibiótico	Contenido del disco (µg)	Halo de inhibición (mm).			CIM (µg/mL)		
		S	I	R	S	I	R
Kanamicina	30	≥18	14-17	≤13	≤16	32	≥64
Gentamicina	10	≥15	13-14	≤12	≤4	8	≥16
Tobramicina	10	≥15	13-14	≤12	≤4	8	≥16
Amikacina	30	≥17	15-16	≤14	≤16	32	≥64
Netilmicina	30	≥15	13-14	≤12	≤8	16	≥32
Neomicina	30 UI	-	-	≤16	-	-	-
Estreptomicina	10	≥15	12-14	≤11	≤32	-	≥64
Espectinomicina	200	≥20	17-19	≤16	≤4	-	≥8

S: sensible, I: sensibilidad intermedia y R: resistente.

Tabla 16: Concordancia entre resultados de disco difusión y Etest®.

		Etest®		
		S	I	R
Disco difusión	S	Acuerdo	Error menor	Error máximo
	I	Error menor	Acuerdo	Error menor
	R	Error mayor	Error menor	Acuerdo

S: sensible, I: sensibilidad intermedia y R: resistente.

Materiales y Métodos

A pesar de estar bien establecidos los puntos de cortes para la mayoría de los aminoglucósidos utilizados en clínica y de establecerse un rango bastante estrecho de diámetros considerados intermedios, se ha descrito presencia de EMAG con diámetros de los halos de inhibición inferiores a los de la población salvaje (sin presencia de EMAG), aún manteniéndose dentro del rango de sensibles⁽⁴⁷⁾. Es por ello que en este trabajo se han considerado varias categorías:

- **Resistente:** un aislado se considera resistente a un aminoglucósido cuando el diámetro del halo de inhibición del mismo es menor (o la CIM mayor) al punto de corte establecido por el CLSI como sensibilidad intermedia⁽⁸⁴⁾, o para el caso de la espectinomicina los propuestos por ROSCO NEO-SENSITABSTM. Para la neomicina, para la cual tampoco existen puntos de corte del CLSI, se utilizaron los valores de la población control de este trabajo, como se comentó previamente. Si no se aclara lo contrario, a lo largo del texto, esta categoría incluye también los aislados con sensibilidad intermedia, según los criterios del CLSI, o de ROSCO NEO-SENSITABSTM para la espectinomicina.
- **Sensibilidad disminuida:** un aislado se considera con sensibilidad disminuida a un aminoglucósido cuando el diámetro del halo de inhibición del mismo está por debajo de los valores obtenidos para los 35 aislados control sensibles a todos los aminoglucósidos evaluados, pero superior al punto crítico (de sensible), según el CLSI⁽⁸⁴⁾. En este estudio esta categoría puede aplicarse a la gentamicina, a la tobramicina, a la amikacina y la netilmicina (cuando el halo de inhibición mide entre 15 y 19mm, 15 y 18mm, 17 y 20mm y 15 y 22mm, respectivamente)
- **Sensibles:** un aislado se considera sensible a un aminoglucósido cuando el diámetro del halo de inhibición del mismo es mayor (o la CIM menor) al punto de corte establecido por el CLSI como sensibilidad intermedia⁽⁸⁴⁾, o para el caso de la espectinomicina los propuestos por ROSCO NEO-SENSITABSTM. Para la neomicina, para la cual tampoco existen puntos de

Materiales y Métodos

corte del CLSI, se utilizaron los valores de la población control de este trabajo y el mínimo de éstos fue considerado como el punto de corte.

Por más que un aislado cumpla la definición de sensibilidad disminuida, se considerará como sensible, a no ser que se aclare lo contrario.

Además de los diámetros de halo de inhibición, se consideraron características fenotípicas de la zona de inhibición, como el borde del halo (en bisel o cortante) y los saltos de colonias de aspecto normal en los bordes de los halos, considerando los halos de inhibición cortantes y la aparición de las colonias en los bordes de los halos de inhibición como sugestivos de inactivación enzimática del antibiótico (Figura 22)^(47,86).



Izquierda: fenotipo de salto de colonias en el borde del halo.
Centro: fenotipo de borde del halo de inhibición cortante.
Derecha: fenotipo de borde del halo de inhibición en bisel.

Figura 22: Características fenotípicas del borde del halo de inhibición.

5.3 Detección y amplificación de los genes de EMAG

La detección de los genes *aph(3'')-Ia*, *aph(3'')-Ib*, *ant(3'')-Ia*, *aph(3')-Ia*, *ant(2'')-Ia*, *aac(3)-IIa*, *aac(6')-Ia*, *aac(6')-Ib*, *aac(6')-Ic*, *aac(3)-Ia*, *aac(3)-Ib*, *aac(2')-Ia* se efectuó mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando iniciadores descritos en la Tabla 17.

Materiales y Métodos

Tabla 17: Iniciadores utilizados para detección de genes de EMAG.

gen	Iniciadores	Secuencia	Tamaño	GenBank	Ref.
<i>aph(3'')-Ia</i>	Forward	5'-CGGCGTGGGCGGCGACTG-3'	557pb	X53527	87
	Reverse	5'-CCGGATGGAGGACGATGTTGG-3'			
<i>aph(3'')-Ib</i>	Forward	5'-GTGGCTTGCCCCGAGGTCATCA-3'	592pb	M28829	88
	Reverse	5'-CCAAGTCAGAGGGTCCAATC-3'			
<i>ant(3'')-Ia</i>	Forward	5'-TCGACTCAACTATCAGAGG-3'	244pb	X02340	89
	Reverse	5'-ACAATCGTGACTTCTACAGCG-3'			
<i>aph(3')-Ia</i>	Forward	5'-CGAGCATCAAATGAAACTGC-3'	624pb	V00359	90
	Reverse	5'-GCGTTGCCAATGATGTTACAG-3'			
<i>ant(2'')-Ia</i>	Forward	5'-ACGCCGTGGGTCGATGTTTGATGT-3'	572pb	X04555	91
	Reverse	5'-CTTTTCCGCCCCGAGTGAGGTG-3'			
<i>aac(3)-IIa</i>	Forward	5'-GGCAATAACGGAGGCGCTTCAAAA-3'	563pb	X13543	92
	Reverse	5'-TTCCAGGCATCGGCATCTCATAACG-3'			
<i>aac(6')-Ia</i>	Forward	5'-ATGAATTATCAAATTGTG-3'	558pb	M18967	93
	Reverse	5'-TTACTCTTTGATTAAACT-3'			
<i>aac(6')-Ib</i>	Forward	5'-CGCGCGGATCCAAAGTTAGGCATCACA-3'	540pb	M21682	94
	Reverse	5'-ACCTGTACAGGATGGAC-3'			
<i>aac(6')-Ic</i>	Forward	5'-CTACGATTACGTCAACGGCTGC-3'	130pb	M94066	95
	Reverse	5'-TTGCTTCGCCCACTCCTGCACC-3'			
<i>aac(3)-Ia</i>	Forward	5'-GGCAATAACGGAGGCGCTTCAAAA-3'	563pb	X15852	96
	Reverse	5'-TTCCAGGCATCGGCATCTCATAACG-3'			
<i>aac(3)-Ib</i>	Forward	5'-GCAGTCGCCCTAAAACAAA-3'	563pb	L06157	97
	Reverse	5'-CACTTCTTCCCGTATGCCCAACTT-3'			
<i>aac(2')-Ia</i>	Forward	5'-AGAAGCGCTTACGATTTATTA-3'	563pb	L06156	98
	Reverse	5'-GACTCCGCCTTCTTCTCAA-3'			

Materiales y Métodos

Esta técnica permite *in vitro* la generación (amplificación) de grandes cantidades de un fragmento de DNA. Clásicamente esta técnica se divide en tres etapas: la iniciación, la hibridación y la extensión. La etapa de iniciación comprende una desnaturalización térmica del DNA bicatenario para conseguir cadenas monocatenarias a las que se les puedan aparejar los iniciadores o *primers*. Los iniciadores son una cadena sintética de oligodesoxiribonucleótidos, complementaria a los extremos 5' o 3' de cada cadena monocatenaria del fragmento a amplificar. La hibridación entre los iniciadores y el DNA monocatenario es necesaria porque la polimerasa requiere de una región de DNA de doble hebra para la iniciación de la síntesis de la cadena complementaria a partir de una única cadena. Finalmente, la extensión es la etapa donde la polimerasa sintetizará las dos cadenas monocatenarias. Estas tres etapas forman un ciclo que se repite un número determinado de veces.

La elevada estabilidad de la *Taq*DNA polimerasa de *Thermus aquaticus* a temperaturas elevadas que permite una desnaturalización, una hibridación y una extensión de la cadena sin necesidad de añadir nuevos reactivos, así como el desarrollo de los termocicladores actuales que permiten que los cambios de temperatura se produzcan de una manera rápida y precisa, han permitido que esta técnica haya tenido una gran expansión.

El proceso consta de tres etapas que se detallan a continuación.

1) Extracción del DNA

Para la extracción del DNA se partió de un cultivo puro en agar sangre incubado durante 24 horas a 37°C y se siguió el siguiente procedimiento:

- I. Resuspender una o dos colonias en 100 µL de agua ultra pura estéril.
- II. Congelar y descongelar dos veces a -80°C durante 10 minutos.
- III. Incubar a 95°C durante 20 minutos en un termociclador.

2) Reacción de amplificación

Para la reacción de amplificación se preparó la mezcla de amplificación para un volumen de 50 µL (Tabla 18). Posteriormente se amplificó la mezcla en un termociclador BioRad Cyclyer siguiendo las condiciones de la tabla 19.

Materiales y Métodos

Tabla 18: Mezcla de amplificación (para 50 μ L).

Reactivo	Volumen
Agua	30,6 μ L
Tampón 10X (15mM MgCl ₂)	5 μ L
dNTPs [Roche] (2mM cada uno)	5 μ L
Taq Expand [Roche] (3,5 U/ μ L)	0,4 μ L
Sobrenadante del extracto de DNA	5 μ L
Iniciador forward [Isogen-Life Science] (10pmol/ μ L)	2 μ L
Iniciador reverse [Isogen-Life Science] (10pmol/ μ L)	2 μ L

Tabla 19: Condiciones de amplificación.

Gen	Tm primers	Tm PCR	Ciclos	Desnat.	Hibridación	Extensión	Extensión final
<i>aph(3'')-Ia</i>	F 67,4°C	55°C	30	95°C 1'	55°C 1'	72°C 1'	72°C 7'
	R 63,7°C						
<i>aph(3'')-Ib</i>	F 65,8°C	55°C	30	95°C 1'	55°C 1'	72°C 1'	72°C 7'
	R 59,4°C						
<i>ant(3'')-Ia</i>	F 54,5°C	50°C	30	95°C 1'	55°C 1'	72°C 1'	72°C 7'
	R 57,9°C						
<i>aph(3')-Ia</i>	F 55,3°C	50°C	30	95°C 1'	55°C 1'	72°C 1'	72°C 7'
	R 57,9°C						
<i>ant(2'')-Ia</i>	F 64,4°C	55°C	30	95°C 1'	55°C 1'	72°C 1'	72°C 7'
	R 65,8°C						
<i>aac(3)-IIa</i>	F 62,7°C	55°C	30	95°C 1'	55°C 1'	72°C 1'	72°C 7'
	R 64,4°C						
<i>aac(6')-Ia</i>	F 42,3°C	40°C	30	95°C 1'	60°C 1'	72°C 1'	72°C 7'
	R 42,3°C						
<i>aac(6')-Ib</i>	F 68°C	55°C	30	95°C 1'	60°C 1'	72°C 1'	72°C 7'
	R 55,2°C						
<i>aac(6')-Ic</i>	F 62,1°C	55°C	30	95°C 1'	60°C 1'	72°C 1'	72°C 7'
	R 65,8°C						
<i>aac(3)-Ia</i>	F 67,4°C	55°C	30	95°C 1'	55°C 1'	72°C 1'	72°C 7'
	R 66,1°C						
<i>aac(3)-Ib</i>	F 62,7°C	55°C	30	95°C 1'	55°C 1'	72°C 1'	72°C 7'
	R 64,4°C						
<i>aac(2')-Ia</i>	F 54,5°C	55°C	30	95°C 1'	52°C 1'	72°C 1'	72°C 7'
	R 62,7°C						

Tm: temperatura de *melting*. Desnat.: desnaturalización.
F: iniciador forward. R: iniciador reverse

Materiales y Métodos

3) Electroforesis en gel de agarosa y visualización del producto amplificado

La técnica de electroforesis se utiliza para separar e identificar fragmentos de DNA y también permite el aislamiento de un determinado fragmento a partir de una mezcla heterogénea. Esta técnica se basa en la migración del DNA (con carga negativa a pH neutro) hacia el polo positivo a través de una matriz porosa (la agarosa) al ser sometido a un campo eléctrico. La movilidad electroforética depende de diversos parámetros entre los que se encuentran la longitud del DNA, su conformación estructural, la porosidad del gel de agarosa (porcentaje de agarosa) y la corriente eléctrica aplicada.

Procedimiento:

I. Preparar una solución de agarosa (BioRad) al 0,8% en tampón TBE 0,5X (50 mM Tris, 50 mM ácido bórico y 0,2 mM EDTA). Disolver la agarosa en el microondas evitando que queden partículas en suspensión.

II. Dejar enfriar hasta unos 50-55°C y adicionar bromuro de etidio de una solución stock de 10 mg/mL hasta una concentración final de 0,5 µg/mL.

III. Verter la solución sobre un soporte, en el que los frontales se habrán sellado transitoriamente con cinta adhesiva. Colocar una pieza dentada para la formación de los pocillos a 0,5-1 cm del extremo, verificando que quede separada de la base del soporte de 0,5 a 1 mm para mantener la integridad de los pocillos. Dejar a temperatura ambiente hasta que esté solidificado.

IV. Retirar la pieza dentada y la cinta adhesiva, y colocar el gel en una cubeta de electroforesis llena de tampón TBE 0,5X, que debe cubrir el gel.

V. Mezclar 2 µL de tampón de carga 10X (0,25% azul de bromofenol, 0,25% xileno cianol y 60% glicerol) con 10 µL de cada muestra. Cargar los pocillos con esta mezcla. Generalmente en uno o más pocillos se agrega un marcador de peso molecular que contiene fragmentos lineales de tamaño conocido (Marcador VIII, Roche) y permite, una vez acabada la electroforesis, establecer relaciones con las bandas de la muestra del DNA y deducir su tamaño aproximado.

VI. Aplicar un voltaje constante de entre 70 y 80 voltios, para obtener una intensidad de entre 25 y 30 mA (Power Pac 300, BioRad).

VII. Para la visualización del DNA se sitúa el gel en un transiluminador de radiación ultravioleta (UVP).

Materiales y Métodos

5.4 ERIC PCR.

Se utilizó ERIC PCR (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR*) para descartar clonalidad de cepas en los aislados de *E. coli* que presentaban resistencia a aminoglucósidos. Las secuencias ERIC son de 126 pares de bases de largo y parecen estar restringidas a regiones transcritas del genoma bacteriano, en regiones intergénicas de operones policistrónicos. Las diferencias en los fragmentos amplificados representan polimorfismo en las distancias entre los elementos repetitivos de diferentes genomas bacterianos, por lo que el ERIC-PCR permite la identificación de diversidad genotípica entre cepas de una misma especie bacteriana. Para la realización de esta técnica, se siguió el siguiente protocolo:

1) Extracción del DNA

- I. Resuspender una o dos colonias en 100 µL de agua ultra pura estéril.
- II. Hervir la muestra durante 15 minutos y situar rápidamente en hielo.

2) Reacción de amplificación

Para la reacción de amplificación se preparó la mezcla de amplificación para un volumen de 25 µL (Tabla 20). Posteriormente se amplificó la mezcla en un termociclador BioRad Cycler siguiendo las condiciones de la tabla 21.

Tabla 20: Mezcla de amplificación para ERIC PCR.

Reactivo	Volumen
Cebador E2 ^a 10 µM	2 µL
dNTPs 2 mM	2,5 µL
Tampón 10 X	2,5 µL
MgCl ₂ 25 mM	3 µL
H ₂ O	10,8 µL
Taq ^b 5 U/µL	0,2 µL
DNA	4 µL

^a ERIC 2: 5'- AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3'

^b AmpliTaq DNA Polymerase, Applied Biosystems

Materiales y Métodos

Tabla 21: Condiciones de amplificación.

Ciclos	Desnaturalización	Hibridación	Extensión	Extensión final
35	94°C 1'	40°C 1'	74°C 2'	4°C ∞

3) Electroforesis en gel de agarosa y visualización del producto amplificado

Procedimiento:

I. Preparar una solución de agarosa (BioRad) al 2% en tampón TBE 0,5X (50 mM Tris, 50 mM ácido bórico y 0,2 mM EDTA). Disolver la agarosa en el microondas evitando que queden partículas en suspensión.

II. Dejar enfriar hasta unos 50-55°C y adicionar bromuro de etidio de una solución stock de 10 mg/mL hasta una concentración final de 0,5 µg/mL.

III. Verter la solución sobre un soporte, en el que los frontales se habrán sellado transitoriamente con cinta adhesiva. Colocar una pieza dentada para la formación de los pocillos a 0,5-1 cm del extremo, verificando que quede separada de la base del soporte de 0,5 a 1 mm para mantener la integridad de los pocillos. Dejar a temperatura ambiente hasta que esté solidificado.

IV. Retirar la pieza dentada y la cinta adhesiva, y colocar el gel en una cubeta de electroforesis llena de tampón TBE 0,5X, que debe cubrir el gel.

V. Mezclar 2 µL de tampón de carga 10X (0,25% azul de bromofenol, 0,25% xileno cianol y 60% glicerol) con 10 µL de cada muestra. Cargar los pocillos con esta mezcla. Generalmente en uno o más pocillos se agrega un marcador de peso molecular que contiene fragmentos lineales de tamaño conocido (Marcador VIII, Roche) y permite, una vez acabada la electroforesis, establecer relaciones con las bandas de la muestra del DNA y deducir su tamaño aproximado.

VI. Aplicar un voltaje constante de entre 70 y 80 voltios, para obtener una intensidad de entre 25 y 30 mA (Power Pac 300, BioRad).

VII. Para la visualización del DNA se sitúa el gel en un transiluminador de radiación ultravioleta (UVP).

Materiales y Métodos

5.5 Electroforesis en campo pulsante

La electroforesis en campo pulsante es una técnica que permite establecer la relación epidemiológica entre aislados y, por lo tanto derivados recientes de un microorganismo común. Permite, de la misma manera, diferenciar aislamientos no relacionados dentro de una misma especie o taxón. Está basada en la macrorrestricción del DNA cromosómico y electroforesis en campo pulsante (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*; PFGE), esto es, digestión del DNA cromosómico en fragmentos de gran medida y separación mediante una técnica especial de electroforesis en la que se aplican campos eléctricos que regularmente cambian de dirección. El estudio de macrorrestricción genómica y PFGE se realizó a todas las enterobacterias que presentaban resistencia a aminoglucósidos excepto en *E. coli*.

Este procedimiento consta de las siguientes fases:

1) preparación de los insertos y lisis celular .

I. Sembrar las cepas en placas de agar sangre, incubar a la estufa 37 ± 2 °C, durante 18 horas.

II. Resuspender aproximadamente una tercera parte de la placa en un tubo con 5 mL de tampón PET IV (Tris 1 M pH 7.6; NaCl 1 M.

III. Centrifugar a temperatura ambiente durante 10 minutos a 3.000 rpm.

VI. Eliminar el líquido con cuidado de que no caiga el sedimento.

V. Resuspender el sedimento con 5 mL de tampón PET IV.

VI. Centrifugar durante 10 minutos a 3.000 rpm.

VII. Resuspender el sedimento bacteriano con PET IV hasta aproximadamente 1 mL de volumen final.

VIII. Limpiar los moldes para la formación de los insertos (Pharmacia Biotech Europe, Uppsala, Suecia) con agua destilada y etanol. Dejar secar y sellar la parte inferior con cinta adhesiva transparente.

IX. Preparar la cantidad necesaria de agarosa de bajo punto fusión (Incert agarosa, FMC Bioproducts) para obtener una concentración final de 0,8%. Para conseguirlo, la agarosa se tiene que preparar al 1,6% puesto que después la relación agarosa-muestra es de 1:1 (v/v) y, por lo tanto, queda diluida a la

Materiales y Métodos

mitad. Normalmente, se preparan 5-6 insertos por muestra y cada inserto tiene un volumen total de 100 μL . Por lo tanto, se necesitan 600-700 μL de volumen por muestra a realizar, de los cuales 350 μL serán de agarosa al 1,6%.

X. Disolver el agarosa con agua destilada estéril por calor y mantenerla a una temperatura entre 45 y 50 $^{\circ}\text{C}$ al baño bloque metálico.

XI. Transferir 350 μL de la suspensión bacteriana a un tubo eppendorf de 1,5 mL y añadir 350 μL de agarosa de bajo punto de fusión.

XII. Homogeneizar la mezcla y sin dejar que se enfríe, dispensar 100 μL en cada bloque del molde, con cuidado de no hacer burbujas.

XIII. Dejar solidificar los insertos a la nevera durante aproximadamente una hora.

XIV. Una vez solidificados se sacan los insertos del molde, por eso retirar la cinta adhesiva y con la ayuda de una tetina de goma hacer presión a la parte superior para que el inserto salga por la presión del aire. Transferirlo directamente a un tubo con 2 mL de Tampón de lisis (Tris 6 mM pH 7.6; NaCl 1 M; EDTA 0.5 M pH 9.5; Brij58 0.5%; Deoxicolato 0.2%; Sarkosyl 0.5%).

XV. Añadir 40 μL de lisozima (50 mg/mL) y 4 μL RNAsa (10 mg/mL) al tubo donde tenemos los insertos con el tampón de lisis.

XVI. Mezclar suavemente dando la vuelta al tubo e incubar durante unas 24 horas a 37 ± 2 $^{\circ}\text{C}$ en un baño maría sin agitación.

XVII. Retirar el tampón de lisis de los insertos con la ayuda de una pipeta y añadir a cada tubo 2 mL de tampón ESP (EDTA 0.5 M pH 9.5; SLS 1%) y 40 μL de Proteinasa K (50 mg/mL).

XVIII. Mezclar suavemente dando la vuelta al tubo e incubar durante 48 horas a 50 ± 2 $^{\circ}\text{C}$ en un baño maría sin agitación.

XIX. Guardar los tubos con los insertos en la nevera. Los insertos se pueden guardar en esta solución durante unos años.

2) lavado de los insertos

Antes de realizar la digestión enzimática del DNA es necesario eliminar los restos de detergentes utilizados para la lisis celular, así como los restos que pueden quedar de la lisis.

Materiales y Métodos

I. Transferir un inserto a un eppendorf 1,5 mL con 1 mL de TE (Tris 10 mM pH 7.4; EDTA 1 mM). Incubar a temperatura ambiente durante un día cambiando el TE como mínimo 3 o 4 veces.

II. Repetir el proceso de lavado con TE un segundo día, con una duración aproximada de 1 hora cada lavado.

III. Una vez ha finalizado el proceso de lavado, cambiar el TE y guardar en la nevera o bien digerir. Los insertos se pueden guardar en esta solución durante unos meses.

3) digestión enzimática del DNA cromosómico

La digestión enzimática del ADN, igual que la lisis celular, tiene lugar en el mismo inserto gracias a la difusión de la enzima a través de la matriz de agarosa. Las enzimas que se utilizan por el análisis de restricción del ADN cromosómico en PFGE son endonucleasas de baja frecuencia de corte, obteniendo de esta forma un número limitado de fragmentos de alto peso molecular. La elección de la enzima dependerá, del contenido en G C del genoma de la especie bacteriana a estudiar, de la secuencia diana de restricción, y de la medida y número de fragmentos obtenidos.

Para la digestión de un fragmento del inserto de aproximadamente 1mm de grueso, se utilizan 30 unidades de la enzima en un volumen total de 200 μ L, siguiendo las indicaciones de la casa comercial.

Por cada cepa a digerir preparar un tubo eppendorf y añadir:

I. 144 μ L de agua destilada estéril

II. 20 μ L de tampón de restricción 10X (tampón suministrado con la enzima)

III. 2 μ L de albumina sérica vacuna (BSA 10 mg/mL)

IV. 1/3 parte del inserto (cortado de forma longitudinal)

V. 30 U de la enzima de restricción XbaI o NotI (para *P. mirabilis*).

Incubar al baño maría sin agitar durante 18 horas a 37°C y guardar en la nevera durante unos 30 minutos antes de proceder a la electroforesis.

Materiales y Métodos

4) electroforesis de los fragmentos de restricción

- I. Preparar un gel de agarosa al 1%.
- II. Montar la base para hacer el gel, colocar el peine y verter la agarosa (reservar un poco para sellar después los pocillos).
- III. Dejar enfriar el hielo unos 30 minutos hasta que se solidifique bien.
- VI. Colocar a cada pocillo cada uno de los bloques de agarosa guardando uno o dos pocillos a cada extremo para colocar uno o dos marcadores de peso molecular (Lambda ladder PFGE marker y Low Range PFGE marker), según el espacio disponible.
- V. Sellar los pocillos con la misma agarosa usada para hacer el gel. Volver a calentar la agarosa si se ha solidificado, en este caso dejar enfriar.
- VI. Añadir a la cubeta de electroforesis del CHEF unos 2,3 litros de TBE 0,5X (Tris 1 M; Acido bórico 1 M; EDTA 2.5 Mm), y poner en marcha la bomba del CHEF si no lo está y dejarla a la posición entre 80-90.
- VII. Poner en marcha la unidad de refrigeración del CHEF a 14°C.
- VIII. Desmontar la base y dejar el gel sólo con la base negra, limpiar esta base por debajo para eliminar la agarosa que haya.
- IX. Cuando la T^a de la cubeta llegue a 14°C, colocar la pieza que sirve de apoyo al gel, y poner el gel.
- X. Programar las condiciones de electroforesis y determinados parámetros al CHEF DRIII Power Modulo. El ángulo de electroforesis será de 120°, el voltaje (quieres/cm) a 6,00.

Las condiciones de electroforesis variarán según la especie:

K. pneumoniae y *K. oxytoca*
Bloque 1: 4-25 seg, 4 horas
Bloque 2: 25-45 seg, 20 horas

E. cloacae
Bloque 1: 5-20 seg, 6 horas
Bloque 2: 25-40 seg, 18 horas

P. mirabilis
Bloque 1: 5-25 seg, 4 horas
Bloque 2: 26-50 seg, 20 horas

Materiales y Métodos

5) tinción y visualización del DNA

Una vez acabada la electroforesis:

- I. Apagar el refrigerador y bajar la velocidad de circulación de la bomba.
- II. Vaciar el tampón de la cubeta poniendo el conector designado por esta función.
- III. Sacar el gel y ponerlo en una cubeta de plástico con unos 500 mL del tampón que hemos sacado de la cubeta.
- IV. Acabar de vaciar la cubeta y añadir un litro de agua.
- V. Poner la cubeta con el gel sobre un agitador con agitación suave y añadir unos 36 μL de bromuro de etidio, repartir homogéneamente el bromuro con cuidado de no tocar el gel para que no queden zonas con manchas que dificultaría la interpretación de las bandas.
- VI. Visualizar el gel al transiluminador de luz ultravioleta y fotografiarlo.

5.6 Análisis estadístico

La explotación de los datos obtenidos en este estudio se realizó utilizando el programa estadístico SPSS[®], versión 17.

La prueba de χ^2 de Pearson, que permite determinar si existe una relación entre dos variables categóricas, fue utilizada para establecer relación entre fenotipo BLEE y sensibilidad a los aminoglucósidos, y fenotipo del borde del halo de inhibición y presencia de genes de EMAG. La χ^2 mide la diferencia global entre los recuentos de casilla observados y los recuentos esperados. Mientras mayor sea el valor de la χ^2 , mayor será la diferencia entre los recuentos observados y esperados, lo que nos indica que mayor es la relación entre las variables.

Se utilizaron curvas ROC para comparar la sensibilidad y la especificidad de los puntos de corte del CLSI y de sensibilidad disminuida de este estudio para la detección de genes de EMAG. Una curva ROC (acrónimo de *Receiver Operating Characteristic*, o Característica Operativa del Receptor) es una representación gráfica de la sensibilidad

Materiales y Métodos

frente a 1-especificidad. Esto significa que el área que queda por debajo de la curva representa los diagnósticos correctos (verdaderos positivos y verdaderos negativos), mientras que el área que queda por encima de ella son los diagnósticos incorrectos (falsos positivos y falsos negativos).

5.7 Gráficos de estructuras químicas

Los gráficos de las estructuras químicas de los amiglicósidos de las figuras 7 a 15 y 19 se realizaron con el programa ACD/ChemSketch Freeware, versión 12.0, Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, On, Canada, www.acdlabs.com, 2009.

6.RESULTADOS

Resultados

6.1 Resultados demográficos.

Del total de 13754 muestras para cultivo microbiológico recibidas en el Laboratorio de Microbiología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau durante el período abarcado entre el 01/01/2006 y el 31/03/2006, se aislaron 1053 enterobacterias con significado clínico. El número de aislados incluidos en el estudio fue de 788, tras eliminar los aislados duplicados.

Los 788 aislados proceden de 708 pacientes, 436 (61,6%) de sexo femenino y 272 (38,4%) de sexo masculino. La edad media de las pacientes de sexo femenino fue de 63,45 años, mientras que la de los de sexo masculino fue de 61,59 años. La pirámide poblacional siguió un patrón de población envejecida, congruente con el área de influencia del hospital (Figura 23).

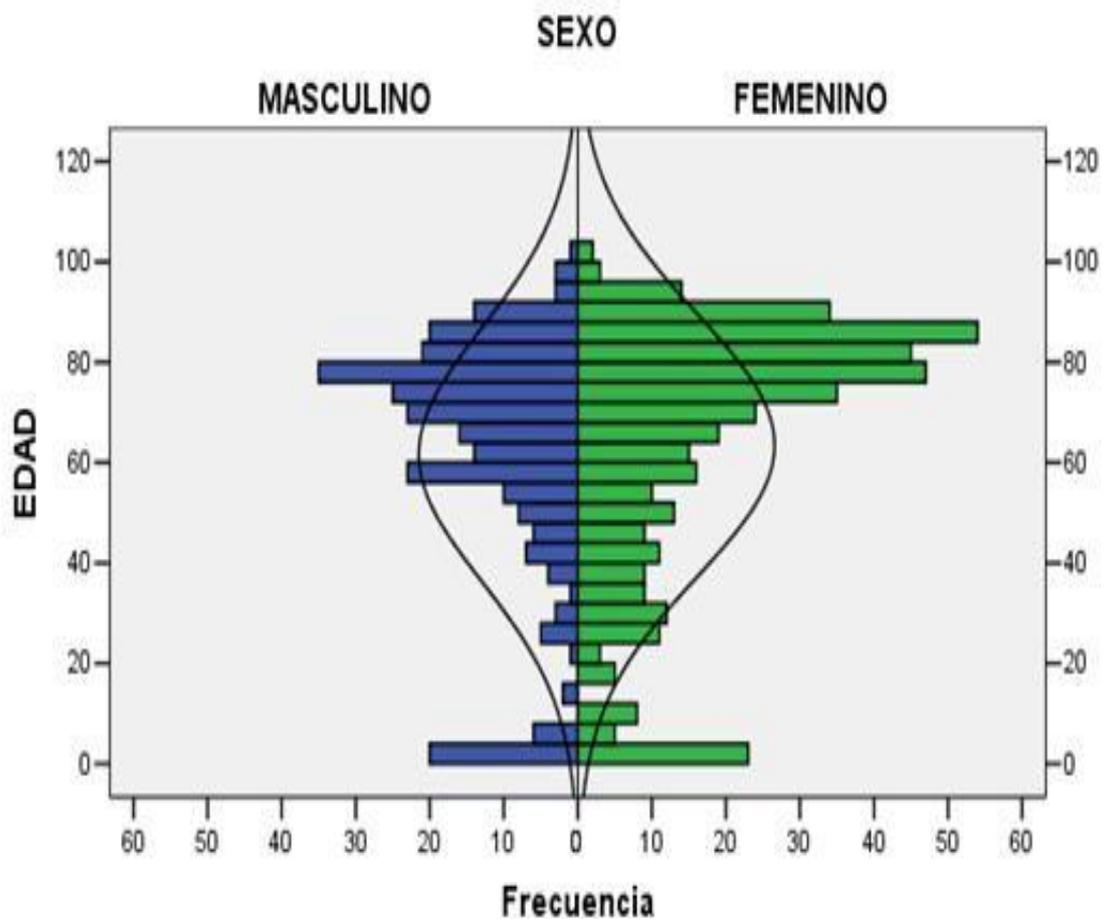


Figura 23: Pirámide poblacional de los pacientes incluidos en el estudio.

Resultados

6.2 Procedencia, tipo y resultado de las muestras.

En lo que respecta a la procedencia de los 788 aislados, el servicio que más aportó fue Urgencias Generales, con 273 (34,6%), seguido por los diferentes servicios quirúrgicos con 110 (14%) y Medicina con 97 (12,3%). El resto de los servicios aportaron menos del 10% de aislados cada uno.

Las muestras estudiadas fueron predominantemente orinas (559; 70,9%), seguidas de sangre (74; 9,4%), muestras cutáneas (61; 7,7%), heces (22; 2,8%), muestras respiratorias (18; 2,3%), muestras genitales (17; 2,2%), catéteres (10; 1,3%), líquidos estériles (6; 0,8%) y otras muestras (21; 2,5%) (Figura 24)

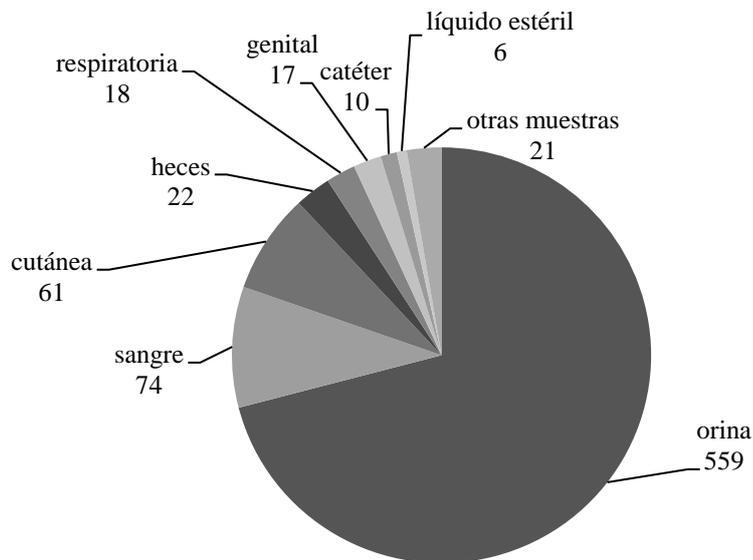


Figura 24: Distribución de las muestras por tipo.

Los 788 aislados fueron identificados como *Escherichia coli* (539; 68,4%), *Proteus mirabilis* (63; 8%), *Klebsiella pneumoniae* (58; 7,4%), *Enterobacter cloacae* (26; 3,3%), *Klebsiella oxytoca* (21; 2,7%), *Salmonella enterica* (18; 2,3%), *Morganella morganii* (15; 1,9%), *Serratia marcescens* (10; 1,3%), *Citrobacter koseri* (10; 1,3%), *Enterobacter aerogenes* (8; 1%), *Citrobacter freundii* (6; 0,8%), *Proteus vulgaris* (4; 0,5%), *Serratia spp.* (4; 0,5%), *Providencia stuartii* (3; 0,4%), *Citrobacter sp.* (1; 0,1%), *Shigella flexneri* (1; 0,1%) y *Shigella sonnei* (1; 0,1%) (Figura 25).

Resultados

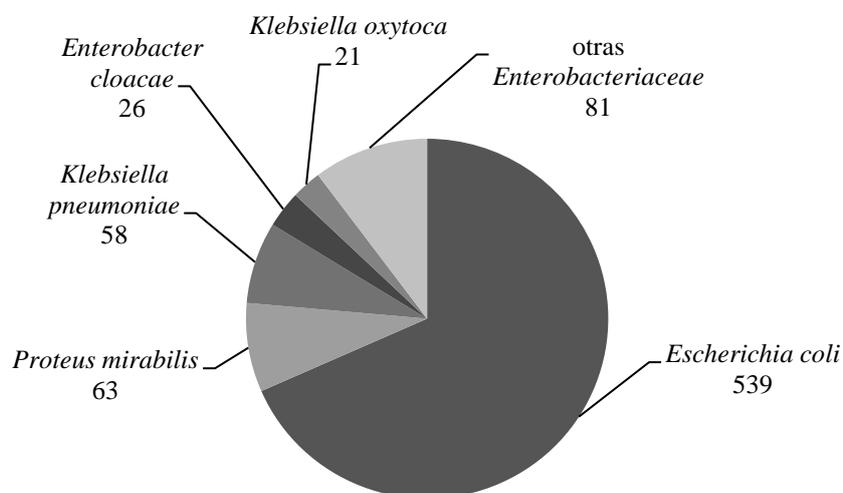


Figura 25: Distribución de los aislados por especie.

6.3 Resultados del estudio de sensibilidad.

En el laboratorio de microbiología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau el estudio de la sensibilidad antimicrobiana de rutina incluye diversos grupos de antimicrobianos.

En enterobacterias se estudia la sensibilidad a antibióticos betalactámicos: ampicilina (AMP), piperacilina (PIP), cefazolina (CEF), cefoxitina (FOX), cefuroxima (CXM), cefotaxima (CTX), ceftazidina (CZA), cefepima (FEP), aztreonam (AZT), amoxicilina / ácido clavulánico (AMX/CLA), piperacilina / tazobactam (PIP/TAZ) e imipenem (IMI), antibióticos aminoglucósidos: gentamicina (GEN), tobramicina (TOB) y amikacina (AMK), y otros como ácido nalidíxico (NAL), ciprofloxacino (CIP), fosfomicina (FOS), nitrofurantoína (NIT), tetraciclina (TET) y cotrimoxazol (COT). Los resultados de sensibilidad a todos estos antimicrobianos en los 788 aislados estudiados se muestran a continuación (Tabla 22).

Los resultados de sensibilidad a estos antimicrobianos de las cinco especies más frecuentemente aisladas (*E. coli*, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae* y *K. oxytoca*), se muestran a continuación (Tablas 23 a 27).

Resultados

Tabla 22: Sensibilidad a los antimicrobianos de los aislados estudiados.

Antibiótico	Sensibles (%)	Sensibilidad Intermedia (%)	Resistentes (%)
Ampicilina	215 (27,3)	24 (3)	549 (69,7)
Piperacilina	386 (49)	93 (11,8)	309 (39,2)
Cefazolina	460 (58,4)	69 (8,8)	259 (32,8)
Cefoxitina	699 (88,7)	19 (2,4)	70 (8,9)
Cefuroxima	665 (84,4)	21 (2,7)	102 (12,9)
Cefotaxima	717 (91)	30 (3,8)	41 (5,2)
Ceftazidima	744 (94,4)	15 (1,9)	29 (3,7)
Cefepima	772 (98)	6 (0,8)	10 (1,2)
Aztreonam	742 (94,2)	19 (2,4)	27 (3,4)
Imipenem	788 (100)	-	-
Amoxicilina/ ácido clavulánico	654 (83)	37 (4,7)	97 (12,3)
Piperacilina/ tazobactam	749 (15,1)	26 (3,3)	13 (1,6)
Gentamicina	722 (91,6)	9 (1,1)	57 (7,3)
Tobramicina	725 (92)	24 (3)	39 (5)
Amikacina	782 (99,2)	-	6 (0,8)
Ácido nalidíxico	448 (56,9)	9 (1,1)	331 (42)
Ciprofloxacino	564 (71,5)	2 (0,3)	222 (28,2)
Fosfomicina	739 (93,7)	2 (0,3)	47 (6)
Nitrofurantoína	609 (77,3)	8 (1)	171 (21,7)
Tetraciclina	372 (47,2)	29 (3,7)	387 (49,1)
Cotrimoxazol	504 (64)	17 (2,2)	267 (33,8)

Resultados

Tabla 23: Sensibilidad a los antimicrobianos de las *Escherichia coli* aisladas.

<i>Escherichia coli</i>	Sensibles (%)	Sensibilidad Intermedia (%)	Resistentes (%)
Ampicilina	162 (30,1)	21 (3,9)	356 (66)
Piperacilina	212 (39,3)	76 (14,1)	251 (46,6)
Cefazolina	315(58,4)	67 (12,4)	157 (29,1)
Cefoxitina	515 (95,5)	8 (1,5)	16 (3)
Cefuroxima	490 (90,9)	14 (2,6)	35 (6,5)
Cefotaxima	508 (94,2)	15 (2,8)	16 (3)
Ceftazidima	529 (98,1)	2 (0,4)	8 (1,5)
Cefepima	536 (99,4)	2 (0,4)	1 (0,2)
Aztreonam	525(97,4)	10 (1,9)	4 (0,7)
Imipenem	539 (100)	-	-
Amoxicilina/ ácido clavulánico	499 (92,5)	24 (4,5)	16 (3)
Piperacilina/ tazobactam	526 (97,6)	8 (1,5)	5 (0,9)
Gentamicina	489 (90,7)	3 (0,6)	47 (8,7)
Tobramicina	494 (91,7)	18 (3,3)	27 (5)
Amikacina	537 (99,6)	-	2 (0,4)
Ácido nalidíxico	282 (52,3)	3 (0,6)	254 (47,1)
Ciprofloxacino	354 (65,7)	-	185 (34,3)
Fosfomicina	532 (98,7)	-	7 (1,3)
Nitrofurantoína	514 (95,4)	3 (0,6)	22 (4,1)
Tetraciclina	263 (48,8)	15 (2,8)	261 (48,4)
Cotrimoxazol	319 (59,2)	10 (1,8)	210 (39)

Resultados

Tabla 24: Sensibilidad a los antimicrobianos de los *Proteus mirabilis* aislados.

<i>Proteus mirabilis</i>	Sensibles (%)	Sensibilidad Intermedia (%)	Resistentes (%)
Ampicilina	39 (61,9)	-	24 (38,1)
Piperacilina	52 (82,5)	4 (6,3)	7 (11,1)
Cefazolina	58 (92,1)	-	5 (7,9)
Cefoxitina	61 (96,8)	1 (1,6)	1 (1,6)
Cefuroxima	61 (96,8)	1 (1,6)	1 (1,6)
Cefotaxima	60 (95,2)	3 (4,8)	-
Ceftazidima	60 (95,2)	2 (3,2)	1 (1,6)
Cefepima	62 (98,4)	1 (1,6)	-
Aztreonam	63 (100)	-	-
Imipenem	63 (100)	-	-
Amoxicilina/ ácido clavulánico	58 (92)	-	5 (8)
Piperacilina/ tazobactam	63 (100)	-	-
Gentamicina	54 (85,7)	2 (3,2)	7 (11,1)
Tobramicina	57 (90,4)	5 (8)	1 (1,6)
Amikacina	62 (98,4)	-	1 (1,6)
Ácido nalidíxico	42 (66,7)	-	21 (33,3)
Ciprofloxacino	54 (85,7)	2 (3,2)	7 (11,1)
Fosfomicina	53 (84,1)	2 (3,2)	8 (12,7)
Nitrofurantoína	2 (3,2)	1 (1,6)	60 (95,2)
Tetraciclina	3 (4,8)	-	60 (95,2)
Cotrimoxazol	37 (58,7)	3 (4,8)	23 (36,5)

Resultados

Tabla 25: Sensibilidad a los antimicrobianos de las *Klebsiella pneumoniae* aisladas.

<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Sensibles (%)	Sensibilidad Intermedia (%)	Resistentes (%)
Ampicilina	-	-	58 (100)
Piperacilina	30 (51,7)	7 (12,1)	21 (36,2)
Cefazolina	43 (74,1)	1 (1,7)	14 (24,1)
Cefoxitina	55 (94,8)	3 (5,2)	-
Cefuroxima	45 (77,6)	2 (3,4)	11 (19)
Cefotaxima	46 (79,3)	3 (5,2)	9 (15,5)
Ceftazidima	47 (81)	1 (1,7)	10 (17,3)
Cefepima	52 (89,7)	4 (6,9)	2 (3,4)
Aztreonam	47 (81)	1 (1,7)	10 (17,3)
Imipenem	58 (100)	-	-
Amoxicilina/ ácido clavulánico	48 (82,8)	9 (15,5)	1 (1,7)
Piperacilina/ tazobactam	51 (87,9)	7 (12,1)	-
Gentamicina	56 (96,6)	1 (1,7)	1 (1,7)
Tobramicina	53 (91,4)	-	5 (8,6)
Amikacina	58 (100)	-	-
Ácido nalidíxico	35 (60,3)	3 (5,2)	20 (34,5)
Ciprofloxacino	45 (77,6)	-	13 (22,4)
Fosfomicina	47 (81)	-	11 (19)
Nitrofurantoína	37 (63,8)	3 (5,2)	18 (31)
Tetraciclina	38 (65,5)	6 (10,4)	14 (24,1)
Cotrimoxazol	43 (74,2)	1 (1,7)	14 (24,1)

Resultados

Tabla 26: Sensibilidad a los antimicrobianos de las *Enterobacter cloacae* aisladas.

<i>Enterobacter cloacae</i>	Sensibles (%)	Sensibilidad Intermedia (%)	Resistentes (%)
Ampicilina	-	1 (3,8)	25 (96,2)
Piperacilina	18 (69,2)	-	8 (30,8)
Cefazolina	-	-	26 (100)
Cefoxitina	-	-	26 (100)
Cefuroxima	13 (50)	3 (11,5)	10 (38,5)
Cefotaxima	18 (69,2)	1 (3,8)	7 (27)
Ceftazidima	18 (69,2)	-	8 (30,8)
Cefepima	26 (100)	-	-
Aztreonam	18 (69,2)	5 (19,3)	3 (11,5)
Imipenem	26 (100)	-	-
Amoxicilina/ ácido clavulánico	-	1 (3,8)	25 (96,2)
Piperacilina/ tazobactam	20 (76,9)	1 (3,8)	5 (19,3)
Gentamicina	24 (92,3)	2 (7,7)	-
Tobramicina	24 (92,3)	2 (7,7)	-
Amikacina	26 (100)	-	-
Ácido nalidíxico	20 (76,9)	2 (7,7)	4 (15,4)
Ciprofloxacino	23 (88,5)	-	3 (11,5)
Fosfomicina	22 (84,6)	-	4 (15,4)
Nitrofurantoína	15 (57,7)	-	11 (42,3)
Tetraciclina	13 (50)	5 (19,2)	8 (30,8)
Cotrimoxazol	22 (84,6)	-	4 (15,4)

Resultados

Tabla 27: Sensibilidad a los antimicrobianos de las *Klebsiella oxytoca* aisladas.

<i>Klebsiella oxytoca</i>	Sensibles (%)	Sensibilidad Intermedia (%)	Resistentes (%)
Ampicilina	-	1 (4,8)	20 (95,2)
Piperacilina	12 (57,1)	3 (14,3)	6 (28,6)
Cefazolina	14 (66,6)	1 (4,8)	6 (28,6)
Cefoxitina	18 (85,7)	1 (4,8)	2 (9,5)
Cefuroxima	15 (71,4)	-	6 (28,6)
Cefotaxima	15 (71,4)	1 (4,8)	5 (23,8)
Ceftazidima	17 (81)	2 (9,5)	2 (9,5)
Cefepima	16 (76,2)	-	5 (23,8)
Aztreonam	16 (76,2)	-	5 (23,8)
Imipenem	21 (100)	-	-
Amoxicilina/ ácido clavulánico	15 (71,4)	-	6 (28,6)
Piperacilina/ tazobactam	15 (71,4)	6 (28,6)	-
Gentamicina	21 (100)	-	-
Tobramicina	17 (81)	-	4 (19)
Amikacina	18 (85,7)	-	3 (14,3)
Ácido nalidíxico	13 (61,9)	-	8 (38,1)
Ciprofloxacino	13 (61,9)	-	8 (38,1)
Fosfomicina	17 (81)	-	4 (19)
Nitrofurantoína	18 (85,7)	-	3 (14,3)
Tetraciclina	13 (61,9)	-	8 (38,1)
Cotrimoxazol	13 (61,9)	1 (4,8)	7 (33,3)

Resultados

Se detectó fenotípicamente la presencia de aislados productores de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en 45 aislamientos. La prevalencia de aislados productores de BLEE fue de 45/788 (5,7%).

Esta prevalencia fue muy similar a la de *E. coli* 31/539 (5,8%), representando el 68,9% del total de BLEE; pero muy inferior a la de *K. pneumoniae* 11/58 (19%), que representó el 24,4% del total de BLEE. La de *Enterobacter* spp. sin embargo fue muy baja 1/26 (3,8%), representando sólo el 2,2% del total de BLEE. Al comparar los porcentajes de sensibilidad a los aminoglucósidos de aislados portadores y no portadores de BLEE, se observó que en algunas especies y para algunos aminoglucósidos, existía una diferencia estadísticamente significativa entre los mencionados porcentajes de sensibilidad al aplicar el test de la χ^2 (Tabla 28).

Tabla 28: Sensibilidad (%) en aislados con y sin fenotipo de BLEE.

Especie	n	K	G	T	A	Nt	Nm	Str	Spt
<i>E.coli</i>	539	86,6	90,7	91,7	99,6	98,7	92,2	50,5	98,5
BLEE(-)	508	88,2	90,9	92,3	100	99	92,5	51,2	99,2
BLEE(+)	31	64,5	87,1	80,6	93,5	93,5	87,1	38,7	87,1
Diferencia		23,7	3,8	11,7	6,5	5,5	5,4	12,5	12,1
p		0,001	NS	0,036	0,003	NS	NS	NS	0,001
<i>K. pneumoniae</i>	58	91,4	96,6	91,4	100	98,3	96,6	86,2	93,1
BLEE(-)	47	97,9	97,9	97,9	100	100	95,7	93,6	97,9
BLEE(+)	11	63,6	90,9	63,6	100	90,9	100	54,5	72,7
Diferencia		34,3	7	34,3	0	9,1	-4,3	39,1	25,2
p		<0,001	NS	<0,001	-	0,037	NS	0,001	0,003
Total	788	87,2	91,6	92	99,2	98	92,3	57,6	95,7
BLEE(-)	743	88,7	92,1	93,1	99,6	98,5	92,5	58,5	96,5
BLEE(+)	45	62,2	84,4	73,3	93,3	88,9	88,9	42,2	82,2
Diferencia		26,5	7,7	19,8	6,3	9,6	3,6	16,3	14,3
p		<0,001	NS	<0,001	0,003	0,001	NS	0,042	<0,001

NS: no significativo

Resultados

6.4 Sensibilidad a los aminoglucósidos.

De los 8 aminoglucósidos evaluados en los 788 aislados, considerados individualmente, el más afectado fue la estreptomicina, seguido de la kanamicina, la gentamicina, la tobramicina, la neomicina, la espectinomicina, la netilmicina y la amikacina (Tabla 29). Como se comentó en Materiales y Métodos (página 56), los aislados resistentes y de sensibilidad intermedia se han considerado de manera conjunta como resistentes.

Tabla 29: Sensibilidad a aminoglucósidos.

Aminoglucósido	Resistentes (%)	Sensibles (%)
Estreptomicina	334 (42,4)	454 (57,6)
Kanamicina	101 (12,8)	687 (87,2)
Gentamicina	66 (8,4)	722 (91,6)
Tobramicina	63 (8)	725 (92)
Neomicina	61 (7,7)	727 (92,3)
Espectinomicina	34 (4,3)	754 (95,7)
Netilmicina	16 (2)	772 (98)
Amikacina	6 (0,8)	782 (99,2)

Al analizar la sensibilidad a los aminoglucósidos evaluados en las diferentes especies aisladas encontramos que los porcentajes de resistencia de *E. coli*, la especie más frecuentemente aislada ($n=539$; 64,8%), se asemejan a los porcentajes totales. En cambio en otras especies, como *K. pneumoniae* ($n=58$; 7,4%) o *M. morgani* ($n=15$; 1,9%), llama la atención el bajo porcentaje de resistencia a estreptomicina (13,8% y 13,3%, respectivamente), en comparación al porcentaje total de resistencia a este fármaco (42,4%). Es también grande la diferencia entre el porcentaje total de resistencia a amikacina (0,8%) comparado al de *K. oxytoca* (3/21; 14,3%) (Tabla 30).

Resultados

Tabla 30: Resistencia a aminoglucósidos en las diferentes enterobacterias aisladas.

Bacteria	n (%)	K (%)	G (%)	T (%)	A (%)	Nt (%)	Nm (%)	Str (%)	Spt (%)
<i>C. freundii</i>	6 (0,8)	-	-	-	-	-	-	1 (16,7)	-
<i>C. koserii</i>	10 (1,3)	-	1 (10)	1 (10)	-	-	-	1 (10)	-
<i>Citrobacter</i> spp.	1 (0,1)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. aerogenes</i>	8 (1)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. cloacae</i>	26 (3,3)	2 (7,7)	2 (7,7)	2 (7,7)	-	2 (7,7)	-	5 (19,2)	2 (7,7)
<i>E. coli</i>	539 (68,4)	71 (13,2)	50 (9,3)	45 (8,3)	2 (0,4)	7 (1,3)	42 (7,8)	267 (49,5)	8 (1,5)
<i>K. oxytoca</i>	21 (2,6)	5 (23,8)	-	4 (19)	3 (14,3)	3 (14,3)	-	7 (33,3)	4 (19)
<i>K. pneumoniae</i>	58 (7,4)	5 (8,6)	2 (3,4)	5 (8,6)	-	1 (1,7)	2 (3,4)	8 (13,8)	4 (6,9)
<i>M. morgani</i>	15 (1,9)	4 (26,7)	1 (6,7)	-	-	3 (4,8)	4 (26,7)	2 (13,3)	2 (13,3)
<i>P. mirabilis</i>	63 (8)	14 (22,2)	9 (14,3)	6 (9,5)	1 (1,6)	-	13 (20,6)	35 (55,6)	10 (15,9)
<i>P. vulgaris</i>	4 (0,5)	-	-	-	-	-	-	1 (25)	-
<i>P. stuartii</i>	3 (0,4)	-	1 (33,3)	-	-	-	-	3 (100)	2 (66,7)
<i>S. enterica</i>	18 (2,3)	-	-	-	-	-	-	2 (11,1)	2 (11,1)
<i>S. marcescens</i>	10 (1,3)	-	-	-	-	-	-	1 (10)	-
<i>Serratia</i> spp.	4 (0,5)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. flexneri</i>	1 (0,1)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. sonnei</i>	1 (0,1)	-	-	-	-	-	-	1 (100)	-
Total	788	101 (12,8)	66 (8,4)	63 (8)	6 (0,8)	16 (2)	61 (7,7)	334 (42,4)	34 (4,3)

Los resultados del estudio de sensibilidad a aminoglucósidos muestran que la mayor parte de los aislados de *Enterobacteriaceae* (90,1%) son sensibles a todos los aminoglucósidos evaluados, o sólo resistentes a aminoglucósidos que no están indicados para el tratamiento de infecciones por enterobacterias, como la estreptomycin, espectinomycin, netilmicin, neomicin y kanamicin. Sólo el 9,9% de los aislados fueron resistentes a gentamicin, tobramicin y/o amikacin (Tabla 31).

Resultados

Tabla 31: Sensibilidad a los aminoglucósidos de uso clínico para el tratamiento de infecciones causadas por *Enterobacteriaceae*.

Patrón de resistencia	Aislados	Prevalencia
S	710	90,1%
G	15	1,9%
T	7	0,9%
GT	50	6,4%
TA	5	0,6%
GTA	1	0,1%

S: sensibles a gentamicina, tobramicina y amikacina, G: resistentes a gentamicina, T: resistentes a tobramicina, GT: resistentes a gentamicina y tobramicina, TA: resistentes a tobramicina y amikacina, GTA: resistentes a gentamicina, tobramicina y amikacina.

6.5 Resultados de ERIC PCR y PFGE

Estos estudios se realizaron a 384 aislados: *E. coli* (320 cepas), *P. mirabilis* (35 cepas), *K. pneumoniae* (12 cepas), *K. oxytoca* (8 cepas), *E. cloacae* (5 cepas) y *M. morgani* (4 cepas). A las 10 cepas restantes pertenecientes a diferentes especies no se les realizó el estudio de epidemiología molecular.

Mediante la técnica de ERIC-PCR se estudió la clonalidad de las 320 cepas de *E. coli*. Se encontraron 23 patrones mayoritarios: 19 cepas en el patrón A, 10 en el V, 9 en el J, 5 en el B y 4 cepas en los patrones M, R y S. El resto de patrones (16, entre ellos el patrón K), están formados por un solo par de cepas. Finalmente, las 210 cepas restantes presentaron un patrón único.

La epidemiología clínica muestra sólo una posible relación en tres cepas del patrón A, que se aislaron en pacientes del Servicio de Pediatría, y en dos cepas del patrón K y dos cepas del patrón R que se se aislaron en una sala de enfermos crónicos.

En *K. oxytoca* se encontraron dos patrones con dos cepas cada uno (el resto eran patrones únicos). Las dos cepas de un clon se aislaron de pacientes provenientes de la Fundació Puigvert. Las otras dos cepas del otro clon se aislaron de pacientes provenientes de las salas de oncología y medicina interna.

En *K. pneumoniae* sólo se obtuvieron dos patrones predominantes, el A con 4 cepas y el B con dos. Solo se pudo establecer relación clínico-epidemiológica en dos

Resultados

cepas del clon A. Los pacientes con estas dos cepas procedían de cardiología. Las cuatro cepas del clon A fueron productoras de CTX-M-1 mientras que las dos cepas del clon B fueron productoras de CTX-M-15.

En el caso de *E. cloacae* y *M. morgani* sólo se encontró un par de cepas de cada especie compartiendo patrón de PFGE. En el caso de *P. mirabilis*, se detectaron dos pares de cepas compartiendo patrón.

Tras los estudios moleculares, se compararon los patrones de resistencia de las cepas pertenecientes al mismo patrón y solo se excluyeron de posteriores estudios aquellas con idéntico antibiograma.

Así pues, tras el estudio de clonalidad, de los 394 aislados con resistencia a alguno de los 8 aminoglucósidos evaluados, se eliminaron 31 cepas que compartieron patrones de ERIC o PFGE y antibiograma. Se prosiguió el estudio con 363 cepas.

6.6 Correlación entre CIM y disco difusión.

Se estudió la correlación entre los valores de CIM obtenidos por Etest® y los valores en mm del diámetro de los halos de inhibición obtenidos por técnica de disco difusión para evaluar la concordancia entre las técnicas. Esto no fue posible en el caso de la neomicina, por no disponer de Etest® de dicho antibiótico. Los resultados obtenidos permitieron conocer los porcentajes de Error máximo, Error mayor, Error menor y Acuerdo, que se detallan en la tabla 32. Este estudio se realizó con las 363 cepas resistentes a aminoglucósidos y no relacionadas epidemiológicamente y con las 34 cepas sensibles.

Tabla 32: Concordancia entre resultados de disco difusión y CIM

Resultado	K <i>n</i> (%)	G <i>n</i> (%)	T <i>n</i> (%)	A <i>n</i> (%)	Nt <i>n</i> (%)	Str <i>n</i> (%)	Spt <i>n</i> (%)
A	372(93,7)	385(96,5)	373(94)	396(99,7)	371(93,4)	279(70,3)	34(8,6)
Em	21(5,3)	11(3)	21(5,3)	-	22(5,6)	78(19,6)	36(9,1)
EM	1(0,3)	-	-	1(0,3)	-	38(9,6)	-
EMáx	3(0,7)	1(0,5)	3(0,7)	-	4(1)	2(0,5)	327(82,3)

A: Acuerdo, Em: Error menor, EM: Error mayor, EMáx: Error máximo.

Resultados

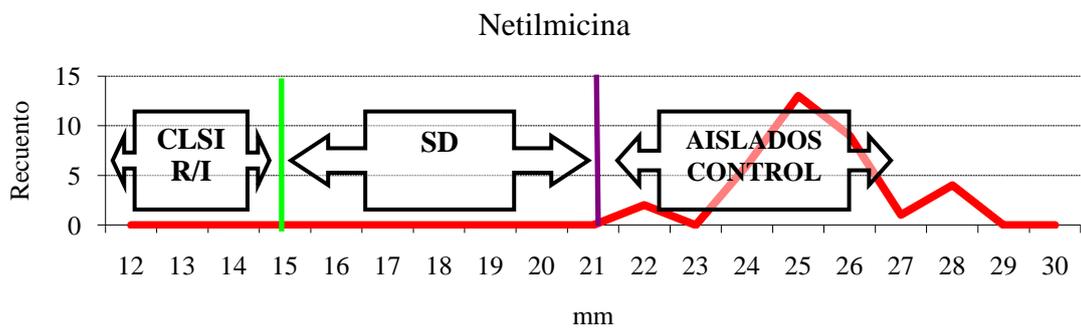
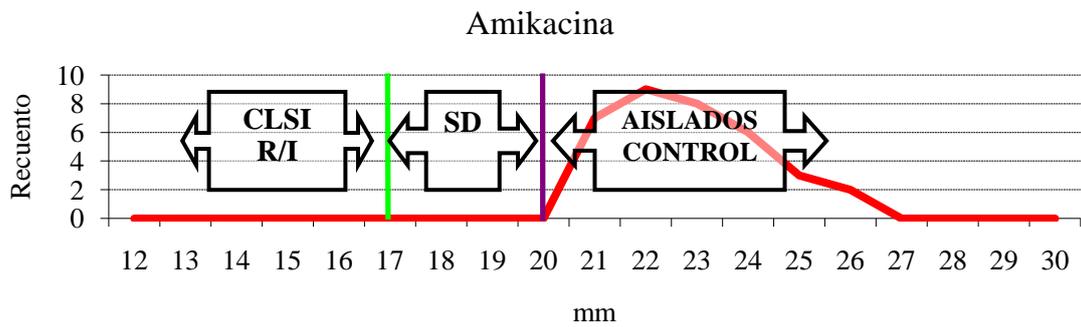
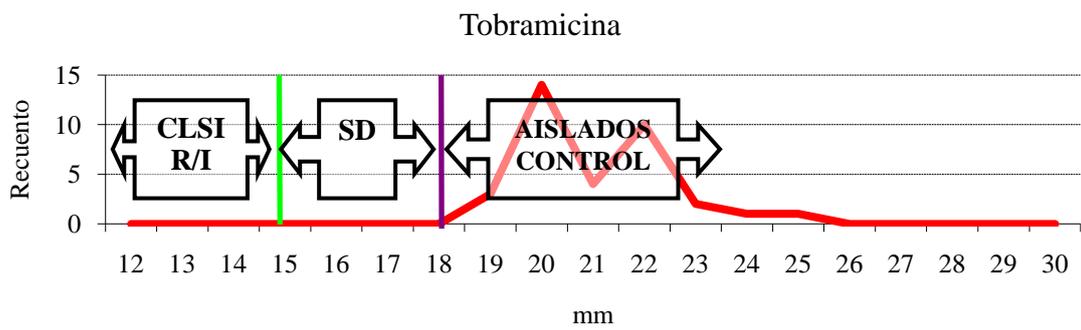
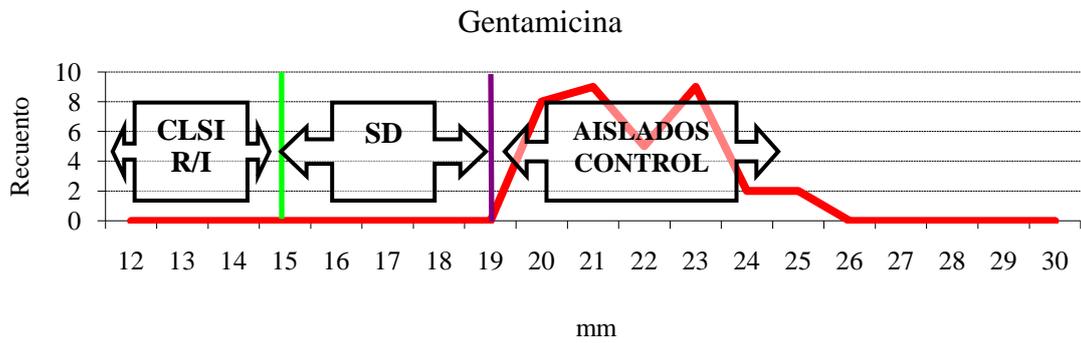
Se estudiaron 35 aislados sensibles a todos los aminoglucósidos evaluados por técnica de disco difusión y se estudió su CIM mediante Etest®, éstas incluían 34 aislados de la rutina del laboratorio y la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922, con el objetivo de obtener una población control sensible a los aminoglucósidos estudiados, tal como se detalló en Materiales y Métodos. En la tabla 33 se detallan los resultados obtenidos.

Tabla 33: Diámetros del halo de inhibición (mm) y CIM ($\mu\text{g/mL}$) de los 35 aislados control.

Aminoglucósido	Diámetro media (mínimo-máximo)	CIM media (mínimo-máximo)
Kanamicina	21 (18-24)	3 (1,5-6)
Gentamicina	22 (20-25)	0,75 (0,38-1,5)
Tobramicina	21 (19-25)	1 (0,38-1,5)
Amikacina	23 (21-26)	2 (1-3)
Netilmicina	25 (22-28)	0,50 (0,125-2)
Neomicina	20 (17-23)	-
Estreptomina	16 (15-23)	4 (1,5-24)
Espectinomicina	30 (20-39)	183,7 (2-2048)

En la figura 26 se representa en rojo la distribución de los halos de inhibición (mm) de los 35 aislados control. Las líneas verticales representan los puntos de corte. Cuando éstas son verdes representan un milímetro más que los puntos de corte del CLSI, en cambio, cuando son violetas, un milímetro menos del mínimo de los aislados control. Si un aislado posee un diámetro de halo de inhibición que se encuentra entre estos dos valores, se toma para el presente trabajo como sensibilidad disminuida (SD) al aminoglucósido en cuestión. Esto es válido, por lo tanto, sólo para la gentamicina, la tobramicina, la amikacina y la netilmicina, ya que para la kanamicina, la neomicina, la estreptomina y la espectinomicina el mínimo de los aislados control fue 1mm superior a los puntos de corte del CLSI, no existiendo por lo tanto aislados que cumplieran la definición de sensibilidad disminuida.

Resultados



Rojo: aislados control.
 Verde: punto de corte del CLSI.
 Violeta: punto de corte de sensibilidad disminuida.

Figura 26 Puntos de corte según CLSI y sensibilidad disminuida para gentamicina, tobramicina, amikacina y netilmicina (mm).

Resultados

Es por ello que, como se comentó previamente en el apartado de Materiales y Métodos (página 56), en este estudio se considera que un aislado posee sensibilidad disminuida (SD) cuando el diámetro del halo de inhibición se encuentra entre 15 y 19mm en el caso de la gentamicina, entre 15 y 18mm para la tobramicina, entre 17 y 20mm para la amikacina, y entre 15 y 21mm para la netilmicina.

En las 363 cepas mencionadas previamente, se analizó si dentro de estos valores se incluían aislados con Error menor (sensible por disco difusión y sensibilidad intermedia por CIM) o Error máximo (sensible por disco difusión y resistente por CIM) para gentamicina, tobramicina, amikacina y netilmicina (Figura 27).

Para la gentamicina, 2 (18,2%) de los 11 aislados con Error menor tenían valores de disco difusión de sensibilidad disminuida.

Para la tobramicina, 9 (42,8%) de los 21 aislados con Error menor y 2 (66,7%) de los 3 aislados con Error máximo tenían valores de disco difusión de sensibilidad disminuida.

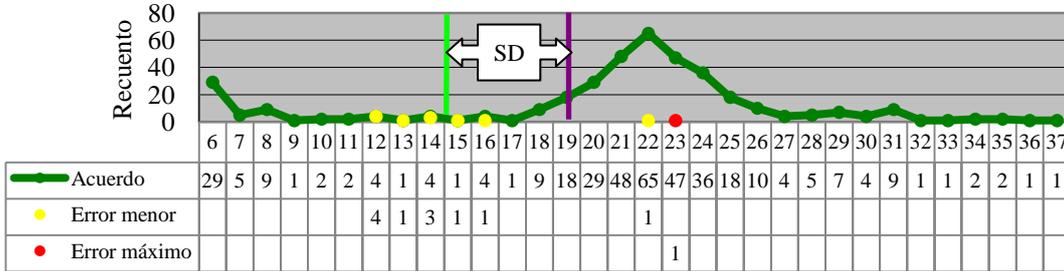
Para la amikacina, todos los aislados con valores de disco difusión de sensibilidad disminuida mostraron Acuerdo entre disco difusión y CIM.

En netilmicina, 15 (68,2%) de los 22 aislados con Error menor y los 4 (100%) aislados con Error máximo tenían valores de disco difusión de sensibilidad disminuida.

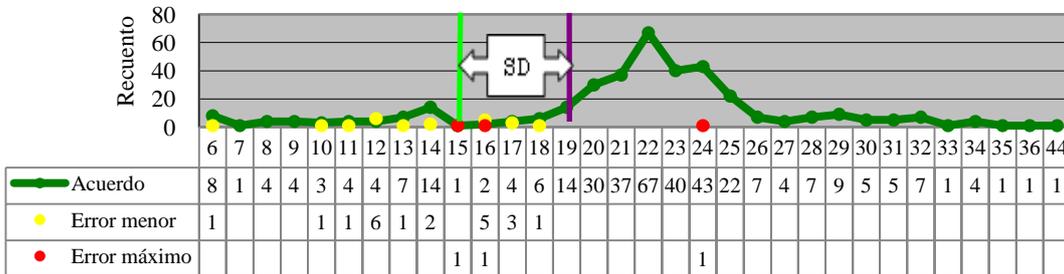
De esta manera, en 26 de los 64 aislados con Error menor (48,1%) y en 6 de los 8 aislados con Error máximo (75%) los valores del diámetro de disco difusión se encontraron dentro de los valores de sensibilidad disminuida.

Resultados

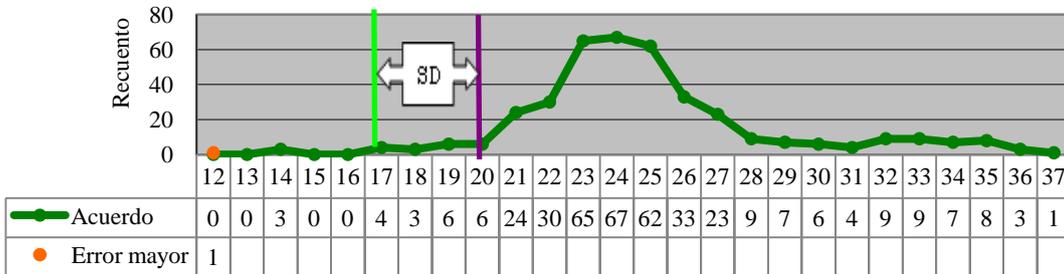
Gentamicina



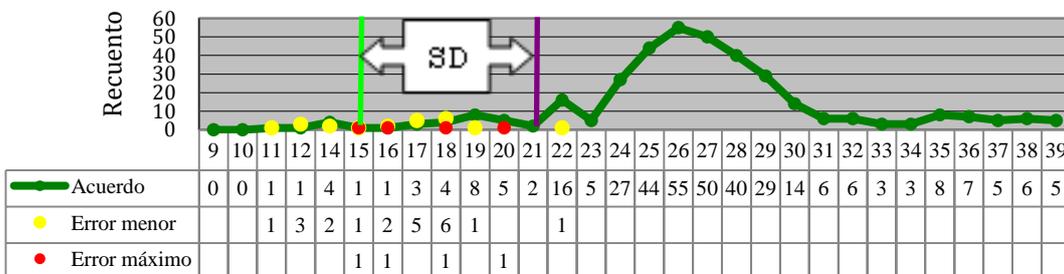
Tobramicina



Amikacina



Netilmicina



Verde: punto de corte del CLSI. Violeta: punto de corte de sensibilidad disminuida.

Figura 27: Concordancia entre disco difusión y CIM de gentamicina, tobramicina, amikacina y netilmicina.

Resultados

6.7 Resultados de la detección de genes de EMAG.

Los genes de EMAG que fueron detectados mediante PCR están listados en la tabla 34, conjuntamente con la prevalencia en la que fueron encontrados cada uno de ellos por separado.

Tabla 34: Prevalencia genes codificadores de EMAG.

Gen	Patrón de resistencia	Prevalencia
<i>aph(3'')-Ia</i>	Str	0%
<i>aph(3'')-Ib</i>	Str	(225/363) 62%
<i>ant(3'')-Ia</i>	StrSpt	(127/363) 35%
<i>aph(3')-Ia</i>	KNm	(51/363) 14%
<i>ant(2'')-Ia</i>	KGT	(14/363) 3,9%
<i>aac(3)-IIa</i>	KTGNt	(37/363) 10,2%
<i>aac(6')-Ia</i>	KTANt	0%
<i>aac(6')-Ib</i>	KTANt	(17/363) 4,7%
<i>aac(6')-Ic</i>	KTANt	(2/363) 0,6%
<i>aac(3)-Ia</i>	G	0%
<i>aac(3)-Ib</i>	G	0%
<i>aac(2')-Ia</i>	GTNtNm	0%

Str: estreptomicina, Spt: espectinomicina, Nm: neomicina, Nt: netilmicina, K: kanamicina, T: tobramicina, G: gentamicina y A: amikacina.

De los 363 aislados con resistencia a aminoglucósidos analizados, 326 (89,8%) fueron positivos para al menos un gen de EMAG. De éstos, 217 (66,6%) presentaron sólo un gen, mientras que 109 (33,4%) presentaron combinación de dos o más genes.

En los que presentaron sólo un gen, el más prevalente fue *aph(3'')-Ib*, seguido de *ant(3'')-Ia*, representando entre los dos el 88,5% de los aislados de este grupo.

En los que presentaron múltiples genes, la combinación más frecuente fue *aph(3'')-Ib* + *ant(3'')-Ia*, seguida de *aph(3'')-Ib* + *aph(3')-Ia*, representando entre las dos combinaciones el 47,7% de los aislados de este grupo (Tabla 35).

Resultados

Tabla 35: Prevalencia de combinaciones de genes de EMAG.

Gen	Patrón	Prevalencia
<i>aph(3'')-Ib</i>	Str	(134/363) 36,9%
<i>ant(3'')-Ia</i>	StrSpt	(58/363) 16%
<i>aac(3)-IIa</i>	KTGNt	(11/363) 3%
<i>aph(3')-Ia</i>	KNm	(8/363) 2,2%
<i>aac(6')-Ib</i>	KTANt	(6/363) 1,7%
<i>aph(3'')-Ib + ant(3'')-Ia</i>	StrSpt	(36/363) 9,9%
<i>aph(3'')-Ib + aph(3')-Ia</i>	StrKNm	(16/363) 4,4%
<i>aph(3'')-Ib + aac(3)-IIa</i>	StrKTGNt	(12/363) 3,3%
<i>aph(3'')-Ib + ant(3'')-Ia + aph(3')-Ia</i>	StrSptKNm	(7/363) 1,9%
<i>ant(3'')-Ia + aph(3')-Ia</i>	StrSptKNm	(6/363) 1,7%
<i>aph(3'')-Ib + aph(3')-Ia + aac(3)-IIa</i>	StrSptKNmGTNt	(5/363) 1,4%
<i>ant(3'')-Ia + aac(6')-Ib</i>	StrSptKTANt	(4/363) 1,1%
<i>aph(3'')-Ib + ant(3'')-Ia + aph(3')-Ia + ant(2'')-Ia</i>	StrSptKNmGT	(3/363) 0,8%
<i>ant(3'')-Ia + ant(2'')-Ia</i>	StrSptKGT	(2/363) 0,6%
<i>aph(3'')-Ib + ant(3'')-Ia + ant(2'')-Ia</i>	StrSptKGT	(2/363) 0,6%
<i>aph(3'')-Ib + ant(3'')-Ia + aac(3)-IIa</i>	StrSptKGTNt	(2/363) 0,6%
<i>ant(3'')-Ia + ant(2'')-Ia + aac(6')-Ib</i>	StrSptKGTANt	(2/363) 0,6%
<i>aph(3'')-Ib + aph(3')-Ia + ant(2'')-Ia</i>	StrSptKNmGT	(1/363) 0,3%
<i>ant(3'')-Ia + aph(3')-Ia + ant(2'')-Ia</i>	StrSptKNmGT	(1/363) 0,3%
<i>ant(3'')-Ia + aac(3)-IIa</i>	StrSptKGTNt	(1/363) 0,3%
<i>aph(3')-Ia + aac(3)-IIa</i>	KNmGTNt	(1/363) 0,3%
<i>aph(3'')-Ib + ant(3'')-Ia + aph(3')-Ia + aac(3)-IIa</i>	StrSptKNmGTNt	(1/363) 0,3%
<i>aph(3'')-Ib + ant(2'')-Ia + aac(3)-IIa</i>	StrKGTNt	(1/363) 0,3%
<i>aph(3'')-Ib + aac(6')-Ib</i>	StrKTANt	(1/363) 0,3%
<i>aph(3'')-Ib + aph(3')-Ia + ant(2'')-Ia + aac(6')-Ib</i>	StrKNmGTANt	(1/363) 0,3%
<i>aac(3)-IIa + aac(6')-Ib</i>	KGTNtA	(1/363) 0,3%
<i>aph(3'')-Ib + ant(3'')-Ia + aph(3')-Ia + aac(3)-IIa + aac(6')-Ib</i>	StrSptKNmTANt	(1/363) 0,3%
<i>aph(3'')-Ib + ant(3'')-Ia + ant(2'')-Ia + aac(6')-Ic</i>	StrSptKGTANt	(1/363) 0,3%
<i>aph(3'')-Ib + aac(3)-IIa + aac(6')-Ib + aac(6')-Ic</i>	StrKGTNtA	(1/363) 0,3%

Str: estreptomina, Spt: espectinomicina, Nm: neomicina, Nt: netilmicina, K: kanamicina, T: tobramicina, G: gentamicina y A: amikacina.

Resultados

Los resultados de la detección de genes que codifican EMAG muestran que la prevalencia de genes de resistencia es mayor para aquellos que no afectan los aminoglucósidos de uso clínico. De los 363 aislados con resistencia a aminoglucósidos analizados, 326 (89,8%) fueron positivos para algún gen que codifique EMAG, pero sólo 61 fueron positivos para genes de EMAG que modifican la gentamicina, la tobramicina y/o la amikacina (*aac(3)-IIa*, *aac(6')-Ib* y *ant(2'')-Ia*). De éstos, 53 presentaron 1 solo gen, 7 presentaron 2 genes, y sólo 1 fue positivo para 3 genes. La prevalencia de genes que codifican EMAG que afectan a gentamicina, tobramicina y/o amikacina fue 16,8% (Tabla 36).

Tabla 36: Prevalencia de aislados con genes de EMAG que modifican a la gentamicina, a la tobramicina y/o a la amikacina, agrupados según el número de genes detectados.

Nº de genes de EMAG que modifican G, T y/o A	Aislados	Prevalencia
0	302	83,2 %
1	53	14,6 %
2	7	1,9 %
3	1	0,3 %

EMAG: enzimas modificadoras de aminoglucósidos.
G: gentamicina. T: tobramicina. A: amikacina.

De estos tres genes el más frecuente fue *aac(3)-IIa*, seguido de *aac(6')-Ib* y *ant(2'')-Ia*. La tobramicina se ve afectada por la totalidad de los genes detectados de este grupo, mientras que la gentamicina en el 82% y la amikacina en el 29,5% (Tabla 37).

Tabla 37: Patrón, frecuencia y prevalencia de genes de EMAG que modifican a la gentamicina, a la tobramicina y/o a la amikacina.

Gen	Patrón	Aislados	Prevalencia
<i>aac(3)-IIa</i>	KGTNt	33	54,1
<i>aac(6')-Ib</i>	KTANt	11	18
<i>ant(2'')-Ia</i>	KGT	9	14,9
<i>ant(2'')-Ia</i> + <i>aac(6')-Ib</i>	KGTANt	3	4,9
<i>aac(3)-IIa</i> + <i>aac(6')-Ib</i>	KGTANt	2	3,3
<i>ant(2'')-Ia</i> + <i>aac(3)-IIa</i>	KGTNt	1	1,6
<i>ant(2'')-Ia</i> + <i>aac(6')-Ic</i>	KGTANt	1	1,6
<i>aac(3)-IIa</i> + <i>aac(6')-Ib</i> + <i>aac(6')-Ic</i>	KGTANt	1	1,6

Resultados

De los 363 aislados con resistencia por disco difusión a alguno se los aminoglucósidos evaluados, 37 fueron negativos para todos los genes de EMAG evaluados (Tabla 38). La gran mayoría de ellos presentaron resistencia aislada a estreptomicina (23/37; 62,2%), mientras que sólo 4 (10,8%) presentaron resistencia a gentamicina y/o tobramicina. Ninguno de estos aislados presentó resistencia a amikacina.

Tabla 38: Patrones de resistencia en aislados sin genes de EMAG detectados.

Patrón de resistencia disco difusión (<i>n</i>)	Patrón de resistencia CIM (<i>n</i>)
Str (23)	Str (9) y SENSIBLE (14)
K (3)	K (2) y SENSIBLE (1)
StrSpt (2)	StrSpt (1) y Str (1)
KNmStr (2)	KStr (2)
G (1)	G (1)
GT (1)	GT (1)
KGT (1)	KGT (1)
Nm (1)	SENSIBLE (1)
KNm (1)	K (1)
KStr (1)	K (1)
GTStr (1)	GTNt (1)

De los 29 aislados con resistencia a estreptomicina por disco difusión, 16 (55,2%) fueron sensibles por técnica de dilución, lo que explicaría la ausencia de genes de EMAG en estos aislados.

En los aislados con resistencia a aminoglucósidos tanto por disco difusión, como por técnica de dilución, es probable que otras EMAG que no han sido incluidas en este estudio sean responsables de la resistencia. También es posible que otros mecanismos de resistencia, como permeabilidad o bombas de expulsión, sean responsables de la resistencia a estos aminoglucósidos.

Finalmente cabe comentar que la posibilidad de que sean portadoras de las recientemente descritas metilasas (RmtA, RmtB, RmtC, ArmA) fue descartada por el patrón de resistencia observado, dado que dichas enzimas suelen conferir resistencia de alto nivel a las 4,6-2-DOS (gentamicina, amikacina, tobramicina y netilmicina), manteniendo la sensibilidad a la 4,5-2-DOS (neomicina y estreptomicina)⁽⁶⁹⁻⁷¹⁾.

Resultados

6.8 Sensibilidad, Especificidad y Valores Predictivos de los puntos de corte de disco difusión para el cribado de genes de EMAG.

Los resultados de sensibilidad, especificidad y valores predictivos para el cribado de la presencia de genes que codifican EMAG que presentaron los puntos de corte para disco difusión propuestos por el CLSI utilizados en el presente estudio se muestran en la tabla 39.

Tabla 39: Sensibilidad, especificidad y valores predictivos para el cribado de genes que codifican EMAG de los diferentes aminoglucósidos que conforman el patrón de resistencia de cada gen. Puntos de corte del CLSI.

Gen	Aminoglucósido	S (%)	E (%)	VPP (%)	VPN (%)
<i>aph(3'')-Ib</i>	Str	100	36,6	67,4	100
<i>ant(3'')-Ia</i>	Str	100	23,3	38	100
	Spt	25,2	99,3	94,1	73,8
<i>aph(3')-Ia</i>	K	100	85,5	50,5	100
	Nm	100	97,1	83,6	100
<i>ant(2'')-Ia</i>	K	85,7	76,8	11,4	99,3
	G	71,4	85,4	15,2	98,8
	T	71,4	86,2	15,9	98,8
<i>aac(3)-IIa</i>	K	70,3	79,2	25,7	96,3
	T	78,4	90,6	46	97,6
	G	100	91,9	56,1	100
	Nt	18,9	97,5	43,8	92,1
<i>aac(6')-Ib</i>	K	100	77,9	16,8	100
	T	100	87,9	27	100
	A	35,3	100	100	97,2
	Nt	52,9	98,2	56,3	97,9

Str: estreptomicina, Spt: espectinomicina, Nm: neomicina, Nt: netilmicina, K: kanamicina, T: tobramicina, G: gentamicina y A: amikacina.

Los resultados de sensibilidad, especificidad y valores predictivos para el cribado de la presencia de genes que codifican EMAG que presentaron los puntos de corte para la técnica de disco difusión propuestos por el presente estudio (sensibilidad disminuida) se muestran en la tabla 40.

Resultados

Tabla 40: Sensibilidad, especificidad y valores predictivos para el cribado de genes que codifican EMAG de los diferentes aminoglucósidos que conforman el patrón de resistencia de cada gen. Puntos de corte del presente estudio.

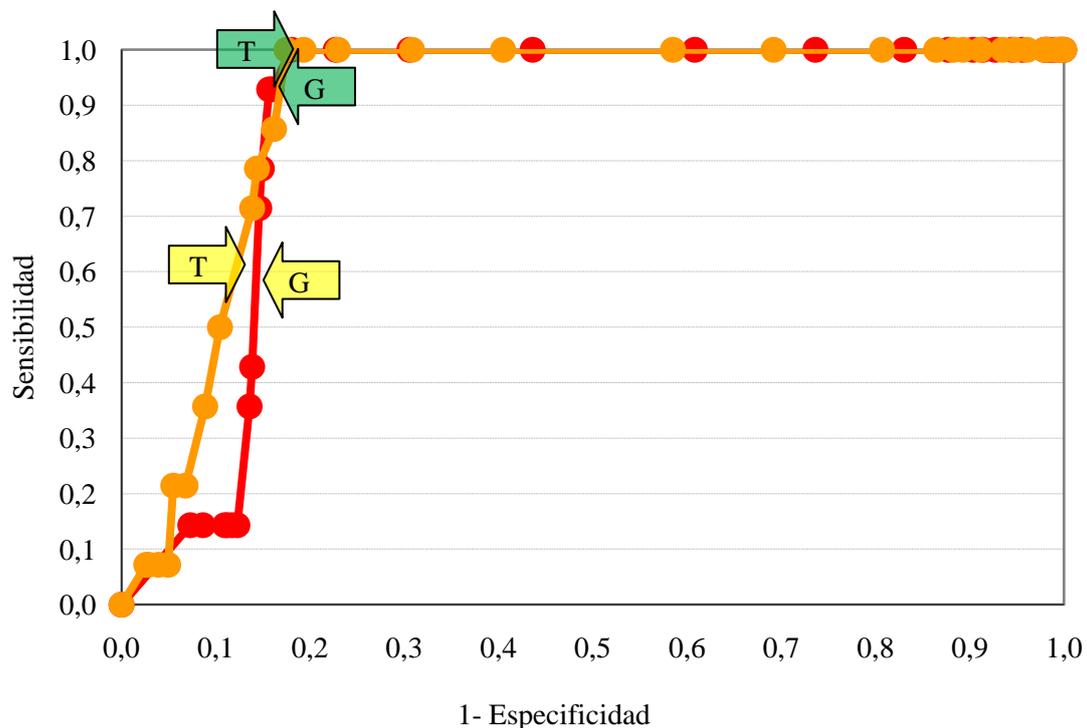
Gen	Aminoglucósido	S (%)	E (%)	VPP (%)	VPN (%)
<i>aph(3'')-Ib</i>	Str	100	36,6	67,4	100
<i>ant(3'')-Ia</i>	Str	100	23,3	38	100
	Spt	25,2	99,3	94,1	73,8
<i>aph(3')-Ia</i>	K	100	85,5	50,5	100
	Nm	100	97,1	83,6	100
<i>ant(2'')-Ia</i>	K	85,7	76,8	11,4	99,3
	G	100	90,8	16,5	100
	T	100	89,3	14,4	100
<i>aac(3)-IIa</i>	K	70,3	79,2	25,7	96,3
	T	100	92	38,1	100
	G	100	93,6	43,5	100
	Nt	78,4	95,9	48,3	98,9
<i>aac(6')-Ib</i>	K	100	77,9	16,8	100
	T	100	89,6	17,5	100
	A	82,4	98,3	51,9	99,6
	Nt	94,1	94,3	26,7	99,9

Str: estreptomycin, Spt: espectinomycin, Nm: neomicin, Nt: netilmicin, K: kanamicin, T: tobramicin, G: gentamicin y A: amikacin.

Los puntos de corte del CLSI y de sensibilidad disminuida para kanamicina, neomicin, estreptomycin y espectinomycin coinciden, por lo que el cribado de presencia de EMAG es equivalente utilizando cualquiera de los dos puntos de cortes. Para gentamicin, tobramicin, amikacin y neomicin difieren (ver página 87), haciendo que la sensibilidad, especificidad y valores predictivos difieran según los puntos de cortes que se utilicen. Evidentemente, a puntos de corte más elevados, aumenta la sensibilidad de la técnica de disco difusión para la detección de genes que codifican EMAG. Para conocer cómo afecta este aumento de sensibilidad en la pérdida

Resultados

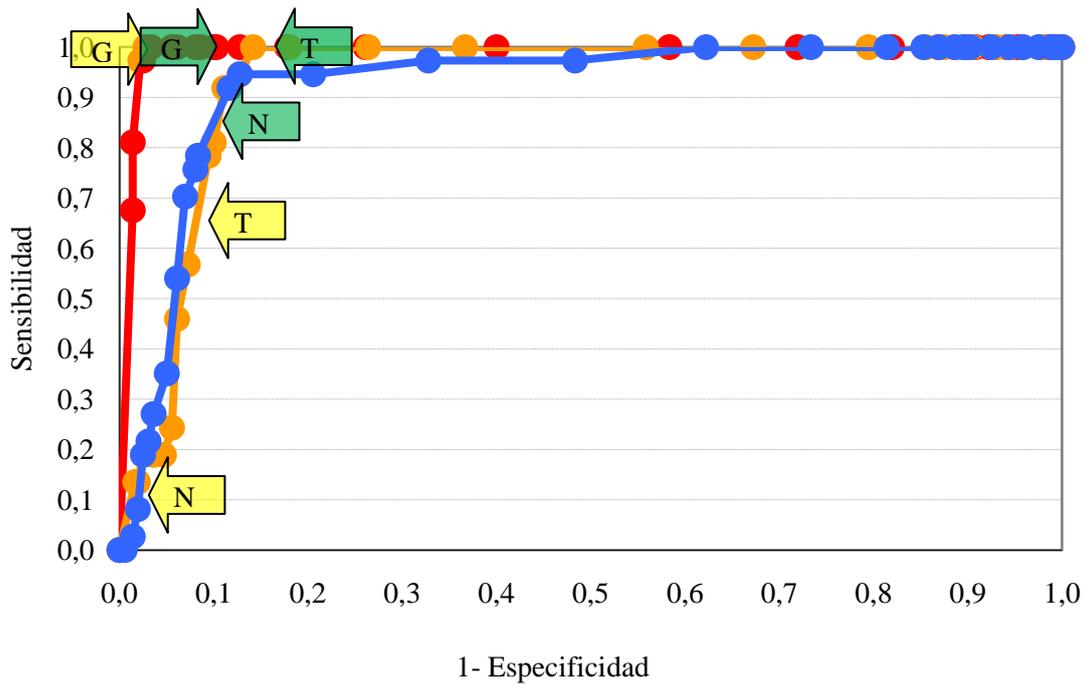
de especificidad (a puntos de corte más elevados aumenta la probabilidad de falsos positivos), se construye una curva de características operativas para el receptor (ROC), graficando la tasa de verdaderos positivos (sensibilidad) frente a la de falsos positivos (1 – especificidad). Las curvas ROC ponen de manifiesto el equilibrio entre sensibilidad y especificidad de una prueba, siendo de especial utilidad para contribuir a decidir dónde se encuentra el mejor punto de corte. Considerando como aceptable una sensibilidad $\geq 80\%$ y una especificidad $\geq 80\%$, los puntos de cortes propuestos por el presente estudio superan a los del CLSI como marcadores de presencia de genes de EMAG. Las siguientes curvas ROC muestran la relación entre sensibilidad y especificidad de la gentamicina, tobramicina, amikacina y netilmicina para la detección de *ant(2'')-I*, *aac(3)-IIa* y *aac(6')-Ib* (Figuras 28 a 30). A continuación de cada curva se muestra una tabla con las equivalencias de los milímetros de diámetro del halo de inhibición con las coordenadas (sensibilidad y 1- especificidad) de la curva ROC (Tablas 41 a 48).



En amarillo: punto de corte CLSI. En verde: punto de corte de sensibilidad disminuida.

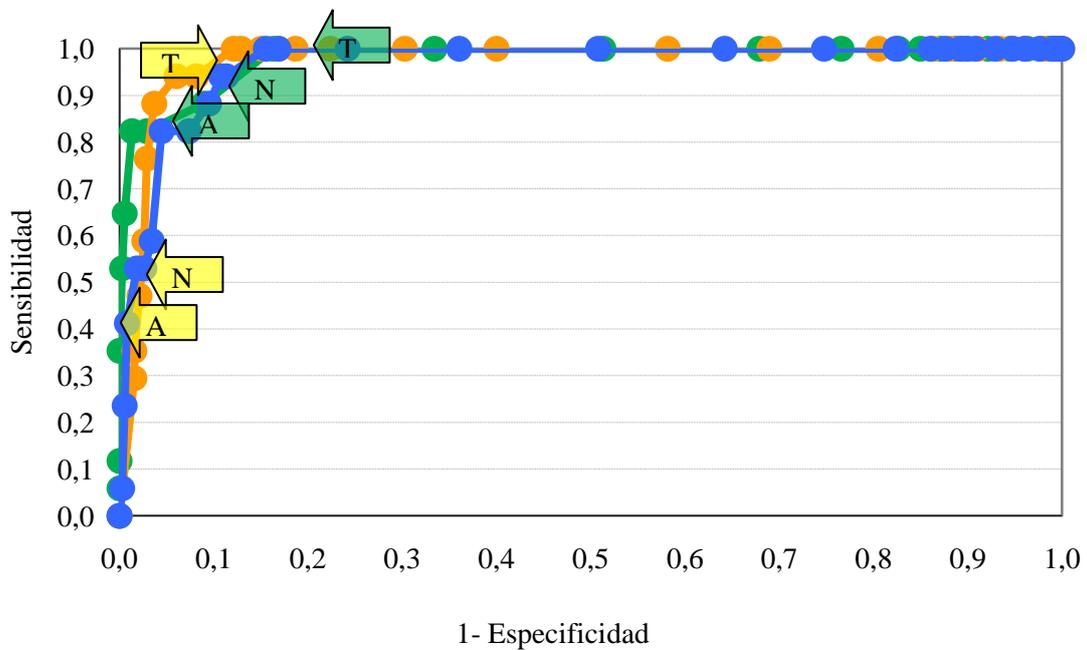
Figura 28 : Curva ROC de gentamicina (rojo) y tobramicina (naranja) para la detección de *ant(2'')-Ia*.

Resultados



Amarillo: punto de corte CLSI. Verde: punto de corte de sensibilidad disminuida.

Figura 29: Curva ROC de gentamicina (rojo), tobramicina (naranja) y netilmicina (azul) para la detección de *aac(3)-IIa*.



Amarillo: punto de corte CLSI. Verde: punto de corte de sensibilidad disminuida.

Figura 30: Curva ROC de amikacina (verde), tobramicina (naranja) y netilmicina (azul) para la detección de *aac(6)-Ib*.

Resultados

Tabla 41: Coordenadas de la curva ROC de gentamicina para *ant(2'')*-Ia.

Disco difusión de Gentamicina (mm)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
6,50	14,3	92,7
7,50	14,3	91,4
8,50	14,3	89
9,50	14,3	88,8
10,50	14,3	88,3
11,50	14,3	87,7
12,50	35,7	86,4
13,50	42,9	86,2
15,00	71,4	85,4
16,50	78,6	85,1
17,50	92,9	84,3
18,50	92,9	84,1
19,50	100	82
20,50	100	77,3
21,50	100	69,5
22,50	100	56,4
23,50	100	39,2
24,50	100	26,4
25,50	100	17

Amarillo: punto de corte CLSI. Verde: punto de corte de sensibilidad disminuida.

Tabla 42: Coordenadas de la curva ROC de tobramicina para *ant(2'')*-Ia.

Disco difusión de Tobramicina (mm)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
6,50	7,1	97,4
7,50	7,1	97,1
8,50	7,1	96,1
9,50	7,1	95
10,50	21,4	94,5
11,50	21,4	93,2
12,50	35,7	91,1
13,50	50	89,6
14,50	71,4	86,2
15,50	78,6	85,6
16,50	85,7	83,8
17,50	100	82,5
18,50	100	80,7
19,50	100	77
20,50	100	69,2
21,50	100	59,5
22,50	100	41,5
23,50	100	30,8
24,50	100	19,3
25,50	100	97,4

Amarillo: punto de corte CLSI. Verde: punto de corte de sensibilidad disminuida.

Resultados

Tabla 43: Coordenadas de la curva ROC de gentamicina para *aac(3)-IIa*.

Disco difusión de Gentamicina (mm)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
6,50	67,6	98,6
7,50	81,1	100
8,50	97,3	100
9,50	97,3	97,5
10,50	100	97,2
11,50	100	96,7
12,50	100	94,5
13,50	100	93,9
15,00	100	91,9
16,50	100	91,4
17,50	100	90
18,50	100	89,7
19,50	100	87,2
20,50	100	82,2
21,50	100	73,9
22,50	100	60
23,50	100	41,7

Amarillo: punto de corte CLSI. Verde: punto de corte de sensibilidad disminuida.

Tabla 44: Coordenadas de la curva ROC de tobramicina para *aac(3)-IIa*.

Disco difusión de Tobramicina (mm)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
6,50	14	98,3
7,50	14	98,3
8,50	14	97,5
9,50	19	96,4
10,50	19	95,3
11,50	24	94,4
12,50	46	93,9
13,50	57	92,8
14,50	78	90,6
15,50	81,1	90
16,50	91,9	88,9
17,50	94,6	87,2
18,50	100	85,8
19,50	100	81,9
20,50	100	73,6
21,50	100	63,3

Amarillo: punto de corte CLSI. Verde: punto de corte de sensibilidad disminuida.

Resultados

Tabla 45: Coordenadas de la curva ROC de netilmicina para *aac(3)-IIa*.

Disco difusión de Netilmicina (mm)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
8,50	0	99,4
11,50	0	98,6
13,00	8,1	98,1
14,50	18,9	97,5
15,50	21,6	96,9
16,50	27	96,4
17,50	35,1	95
18,50	54,1	93,9
19,50	70,3	93,1
20,50	75,7	91,9
21,50	78,4	91,7
22,50	91,9	88,3
23,50	94,6	87,2
24,50	94,6	79,4
25,50	97,3	67,2

Amarillo: punto de corte CLSI. Verde: punto de corte de sensibilidad disminuida

Tabla 46: Coordenadas de la curva ROC de amikacina para *aac(6')-Ib*.

Disco difusión de Amikacina (mm)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
11,00	0	100
12,50	5,9	100
13,50	11,8	100
15,50	35,3	100
17,50	52,9	99,9
18,50	64,7	99,7
19,50	82,4	99,2
20,50	82,4	98,3
21,50	88,2	94,3
22,50	100	85,8
23,50	100	69,4
24,50	100	50,5
25,50	100	33,8
26,50	100	24,9
27,50	100	19,4
28,50	100	16,7
29,50	100	14,6

Amarillo: punto de corte CLSI. Verde: punto de corte de sensibilidad disminuida

Resultados

Tabla 47: Coordenadas de la curva ROC de tobramicina para *aac(6')-Ib*.

Disco difusión de Tobramicina (mm)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
6,50	29,4	99,2
7,50	35,3	99,2
8,50	47,1	99
9,50	58,8	98,7
10,50	76,5	98,6
11,50	88,2	98,2
12,50	94,1	97
13,50	94,1	96
14,50	100	94
15,50	100	93,7
16,50	100	92,4
17,50	100	91,2
18,50	100	89,6
19,50	100	87,3
20,50	100	80,4
21,50	100	69
22,50	100	50,1

Amarillo: punto de corte CLSI. Verde: punto de corte de sensibilidad disminuida

Tabla 48: Coordenadas de la curva ROC de netilmicina para *aac(6')-Ib*.

Disco difusión de Netilmicina (mm)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
8,50	5,9	99,9
11,50	23,5	99,7
13,00	41,2	99,6
14,50	52,9	99,1
15,50	52,9	98,7
16,50	58,8	98,3
17,50	82,4	97,8
18,50	82,4	96,4
19,50	88,2	95,2
20,50	94,1	94,6
21,50	94,1	94,3
22,50	100	91,8
23,50	100	89,6
24,50	100	81
25,50	100	69,2

Amarillo: punto de corte CLSI. Verde: punto de corte de sensibilidad disminuida

Resultados

6.9 Correlación entre características fenotípicas del borde del halo de inhibición y genes de EMAG.

Al realizar la técnica de disco difusión para aminoglucósidos, se analizaron las características fenotípicas de los bordes de los halos de inhibición, tal como se detalla con anterioridad en Materiales y Métodos (página 57). A continuación se muestra la correlación de la presencia de borde de halo cortante, salto colonias en el interior del halo de inhibición, o ambas características [fenotipo (+)] con la detección de genes que codifican EMAG mediante PCR [PCR (+)]. La ausencia de ambas características se señala como fenotipo (-) y la ausencia de detección de EMAG como PCR (-). La ausencia de halo de inhibición se contabilizó como fenotipo (+). Los resultados se analizaron mediante la prueba de χ^2 de Pearson. Las tablas 2x2 se muestran a continuación (Tablas 49 a 56).

Tabla 49: Correlación de kanamicina para fenotipo y PCR.

Kanamicina	PCR (+)	PCR (-)	Total
Fenotipo (+)	94	48	142
Fenotipo (-)	4	251	255
Total	98	299	397

χ^2 Pearson= 204,9 ($p \leq 0,01$)

Tabla 50: Correlación de gentamicina para fenotipo y PCR

Gentamicina	PCR (+)	PCR (-)	Total
Fenotipo (+)	50	31	81
Fenotipo (-)	0	316	316
Total	50	347	397

χ^2 Pearson= 223,2 ($p \leq 0,01$)

Resultados

Tabla 51: Correlación de tobramicina para fenotipo y PCR.

Tobramicina	PCR (+)	PCR (-)	Total
Fenotipo (+)	58	43	101
Fenotipo (-)	3	293	296
Total	61	336	397

χ^2 Pearson= 184,3 ($p \leq 0,01$)

Tabla 52: Correlación de amikacina para fenotipo y PCR.

Amikacina	PCR (+)	PCR (-)	Total
Fenotipo (+)	14	25	39
Fenotipo (-)	3	355	358
Total	17	380	397

χ^2 Pearson= 105,5 ($p \leq 0,01$)

Tabla 53: Correlación de netilmicina para fenotipo y PCR.

Netilmicina	PCR (+)	PCR (-)	Total
Fenotipo (+)	45	27	72
Fenotipo (-)	6	319	325
Total	51	346	397

χ^2 Pearson= 193,7 ($p \leq 0,01$)

Tabla 54: Correlación de neomicina para fenotipo y PCR.

Neomicina	PCR (+)	PCR (-)	Total
Fenotipo (+)	48	24	72
Fenotipo (-)	3	322	325
Total	51	346	397

χ^2 Pearson= 227,5 ($p \leq 0,01$)

Resultados

Tabla 55: Correlación de estreptomomicina para fenotipo y PCR.

Estreptomomicina	PCR (+)	PCR (-)	Total
Fenotipo (+)	278	39	317
Fenotipo (-)	21	58	80
Total	299	98	397

χ^2 Pearson= 129,7 ($p \leq 0,01$)

Tabla 56: Correlación de espectinomicina para fenotipo y PCR.

Espectinomicina	PCR (+)	PCR (-)	Total
Fenotipo (+)	30	7	37
Fenotipo (-)	97	263	360
Total	127	270	397

χ^2 Pearson= 45,2 ($p \leq 0,01$)

7.DISCUSIÓN

Discusión

7.1 Discusión de las especies aisladas.

Las especies aisladas en este estudio mostraron una distribución similar a las aisladas en los años 2004 y 2005 en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Figura 31)⁽⁹⁹⁾. Puede observarse que los aislados del primer trimestre del año 2006, incluidos en este estudio, presentan una distribución porcentual semejante a la de los dos años anteriores, para las especies aisladas con más frecuencia. La frecuencia absoluta inferior en este último período, 715 en el 1^{er} trimestre de 2006 ($\times 4 = 2860$), contra 3098 y 3220, en los años 2004 y 2005 respectivamente, probablemente sea debida a pequeños cambios estacionales en las muestras y aislados, que al considerar sólo un trimestre, naturalmente se pierden.

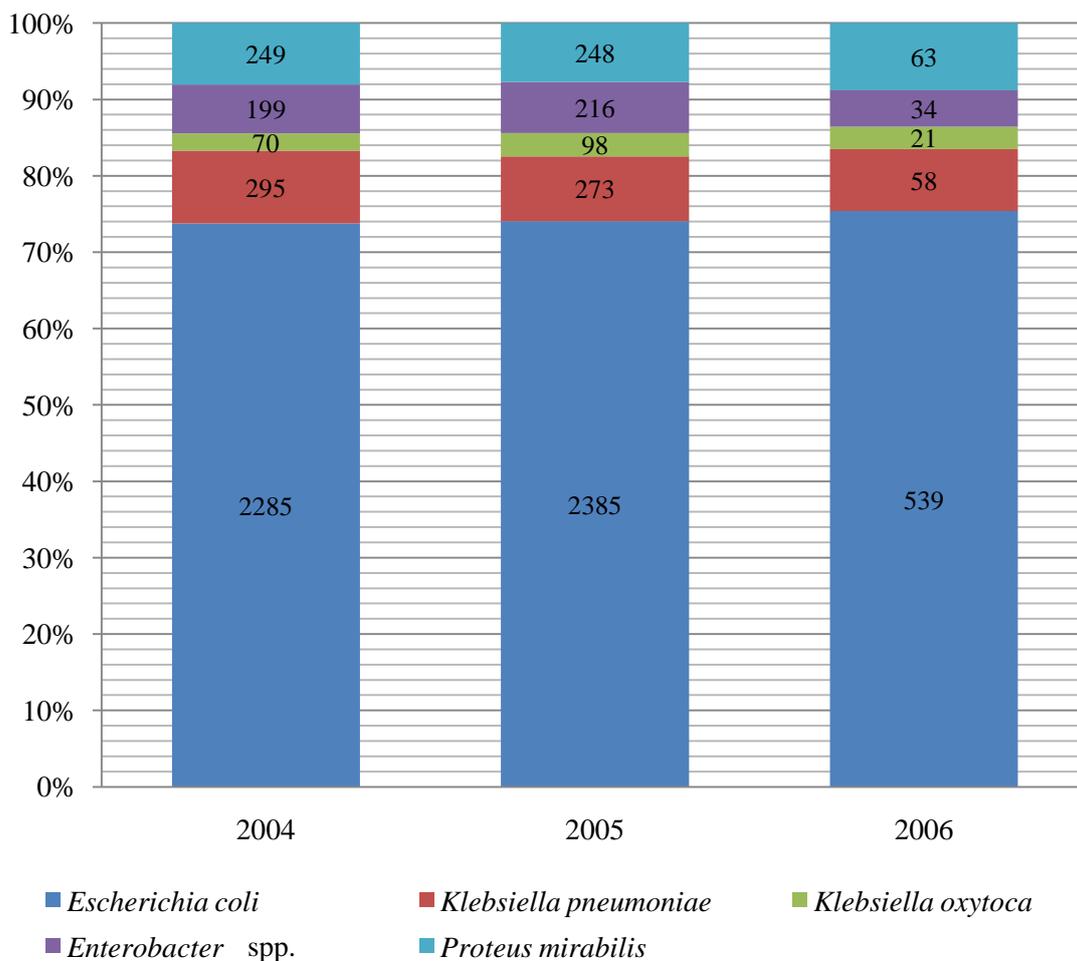


Figura 31: Frecuencias absolutas y relativas de *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Enterobacter* spp. y *P. mirabilis* aislados en 2004, 2005 y 1er trimestre de 2006.

Discusión

7.2 Discusión del estudio de sensibilidad.

El principal interés, al estudiar la resistencia a aminoglucósidos en *Enterobacteriaceae* y de conocer la sensibilidad de los aislados estudiados a otros grupos de antimicrobianos está fundado en el hecho de que los aminoglucósidos sólo se indican en combinación con otros antimicrobianos, principalmente del grupo de los betalactámicos y quinolonas.

Al comparar los resultados de sensibilidad a los antimicrobianos no aminoglucósidos analizados en este estudio con los resultados obtenidos en *Enterobacteriaceae* durante los años 2004 y 2005 en el laboratorio de Microbiología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau⁽⁹⁹⁾, se comprueba que el grupo de los betalactámicos no han sufrido grandes variaciones en este período de tiempo, mientras que las quinolonas han aumentado más de 6 puntos porcentuales en este período (Tabla 57).

Tabla 57: Porcentajes de resistencia a betalactámicos y quinolonas en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau en 2004, 2005 y 1er trimestre de 2006.

		Resistencia (%) HSCSP 2004 (n=3335)	Resistencia (%) HSCSP 2005 (n=3430)	Resistencia (%) ESTE ESTUDIO 2006 (n=788)
Betalactámicos	Ampicilina	72	71,8	72,7
	Amox/ác clav.	18	22	17
	Cefazolina	ND	ND	41,6
	Cefoxitina	ND	ND	11,3
	Ceftazidima	6,4	8,4	5,6
	Cefotaxima	7,3	8,4	9
	Cefepima	4,5	5,2	2
	Imipenem	1,5	0	0
Quinolonas	Ácido nalidíxico	ND	ND	43,1
	Ciprofloxacino	22,1	25,5	28,4

ND: no se dispone de datos.

Discusión

Al comparar los resultados de sensibilidad a aminoglucósidos de este estudio con los resultados obtenidos en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau en *Enterobacteriaceae* aisladas en 2004 y 2005⁽⁹⁹⁾, se observa que la prevalencia de resistencia a aminoglucósidos en *Enterobacteriaceae* ha variado los últimos años.

Mientras que la prevalencia de la resistencia a gentamicina no ha sufrido grandes variaciones desde 2004, la prevalencia de resistencia a tobramicina se ha casi duplicado en sólo dos años, y la resistencia a amikacina ha aumentado considerablemente (Tabla 58).

Tabla 58: Resistencia a gentamicina, tobramicina y amikacina en las *Enterobacteriaceae* aisladas en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (2004 y 2005) y en este estudio (2006).

	Resistencia (%)		
	HSCSP 2004 (n=3335)	HSCSP 2005 (n=3430)	ESTE ESTUDIO (n=788)
Gentamicina	8,3	9,6	8,7
Tobramicina	5,1	9,7	8,3
Amikacina	0,1	0,5	0,8

La prevalencia de resistencia a aminoglucósidos ha variado de manera diferente en las distintas especies aisladas. En la tabla 59 se detalla la evolución de las resistencias a gentamicina, tobramicina y amikacina de las especies de *Enterobacteriaceae* aisladas con mayor frecuencia en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau en 2004, 2005 y 1er trimestre de 2006⁽⁹⁹⁾.

En *E. coli*, la especie aislada con más frecuencia en estos tres períodos, no se observa un gran aumento porcentual de la resistencia a gentamicina, aunque sí de la resistencia a amikacina y en menor medida a tobramicina.

Discusión

El gran aumento del porcentaje de resistencia a tobramicina y amikacina en *Enterobacteriaceae* en estos tres períodos, se debe fundamentalmente al aumento de la resistencia a estos aminoglucósidos en *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* y *K. oxytoca*.

Tabla 59: Resistencia a gentamicina, tobramicina y amikacina en las *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *P. mirabilis* y *Enterobacter* spp. Aisladas en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (2004 y 2005) y en este estudio (2006).

	Resistencia % (n)								
	Gentamicina			Tobramicina			Amikacina		
	HSCSP 2004	HSCSP 2005	ESTE ESTUDIO	HSCSP 2004	HSCSP 2005	ESTE ESTUDIO	HSCSP 2004	HSCSP 2005	ESTE ESTUDIO
<i>E. coli</i>	9 (2285)	10,6 (2385)	9,3 (539)	6 (2285)	10,9 (2385)	8,3 (539)	0,2 (2285)	0,5 (2385)	0,4 (539)
<i>K. pneumoniae</i>	3,4 (295)	2,9 (273)	3,4 (58)	2,4 (295)	4,4 (273)	8,6 (58)	0 (295)	1,1 (273)	0 (58)
<i>P. mirabilis</i>	12,5 (249)	12,5 (248)	9 (63)	3 (249)	12 (248)	9,5 (63)	0 (249)	0 (248)	1,6 (63)
<i>Enterobacter</i> spp.	1 (199)	1,8 (211)	5,9 (34)	1 (199)	1,4 (211)	5,9 (34)	0 (199)	0 (211)	0 (34)
<i>K. oxytoca</i>	1,5 (70)	3 (98)	0 (21)	0 (70)	8,1 (98)	19 (21)	0 (70)	2 (98)	14,3 (21)

Al comparar los resultados de sensibilidad a los antimicrobianos analizados en este estudio con los resultados obtenidos en *Enterobacteriaceae* en el estudio SMART (*Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends*) de 2003, en el que se evaluó la sensibilidad a antimicrobianos, utilizando el método de microdilución en caldo recomendado por el CLSI, en 981 enterobacterias de 13 hospitales de diferentes regiones de España⁽¹⁰⁰⁾, se observa que los porcentajes de aislados sensibles es similar, para la gran mayoría de especies y antibióticos, a pesar de haber utilizado dos métodos diferentes para evaluar la sensibilidad de los aislados (Tabla 60). La excepción es el bajo porcentaje de sensibilidad a ciprofloxacino (71,6%) en los aislados de este estudio, muy por debajo de la media española, sólo comparable con el País Vasco (71,4%).

Discusión

Tabla 60: Porcentajes de sensibilidad a los antimicrobianos de este estudio comparados con el estudio SMART 2003.

	IMP	CTX/ CRX	CAZ	FOX	FEP	PTZ	AMK	TOB	CIP
Este estudio (n=788)	100	91	94,4	88,7	98	85,1	99,2	92	71,6
España (n=981)	99,7	90,5	89,5	81,9	93,8	92,9	99,6	94,1	83,5
Andalucía (n=193)	99,5	81,3	81,9	79,8	85,5	92,7	99	95,9	86
Aragón (n=100)	100	96	93	86	99	93	100	94	91
Castilla-León (n=59)	100	98,3	98,3	86,4	98,3	98,3	100	91,5	91,5
Cataluña (n=159)	100	91,2	89,9	86,8	95,6	91,2	100	91,2	82,4
Comunidad Valenciana (n=60)	100	93,3	91,7	85	95	98,3	100	100	86,7
Islas Baleares (n=73)	100	91,8	90,4	79,5	95,9	93,2	100	93,2	84,9
Madrid (n=267)	99,6	94,4	93,6	81,6	95,9	95,1	100	94	79,8
País Vasco (n=70)	98,6	81,4	78,6	67,1	90	78,6	97,1	94,3	71,4

IMP: imipenem, CTX/CRX: cefotaxima en este estudio y ceftriaxona en SMART 2003, CAZ: ceftazidima, FOX: ceftoxitina, FEP: cefepima, PTZ: piperacilina-tazobactam, AMK: amikacina, TOB: tobramicina, CIP: ciprofloxacino.

Discusión

Con el objetivo de determinar los patrones de resistencia a los antimicrobianos en las especies multiresistentes más frecuentes, en el estudio VIRA 2006 (*Vigilancia de resistencia a los antimicrobianos*)⁽¹⁰¹⁾ se evaluó la sensibilidad por técnica de microdilución de 365 *E. coli* resistentes a ciprofloxacino de 40 hospitales españoles.

Al comparar los resultados de sensibilidad a los aminoglucósidos de uso clínico en *E. coli* resistentes a ciprofloxacino analizados en este estudio mediante tiras Etest® con los resultados obtenidos en el estudio VIRA 2006, se observa que los porcentajes de sensibilidad son muy parecidos en los tres aminoglucósidos en ambos estudios, en cambio, la determinación de sensibilidad intermedia y resistencia mostró diferencias, más notables para la tobramicina (Figura 32). Probablemente estas diferencias se deban a la técnica empleada para la determinación de la CIM.

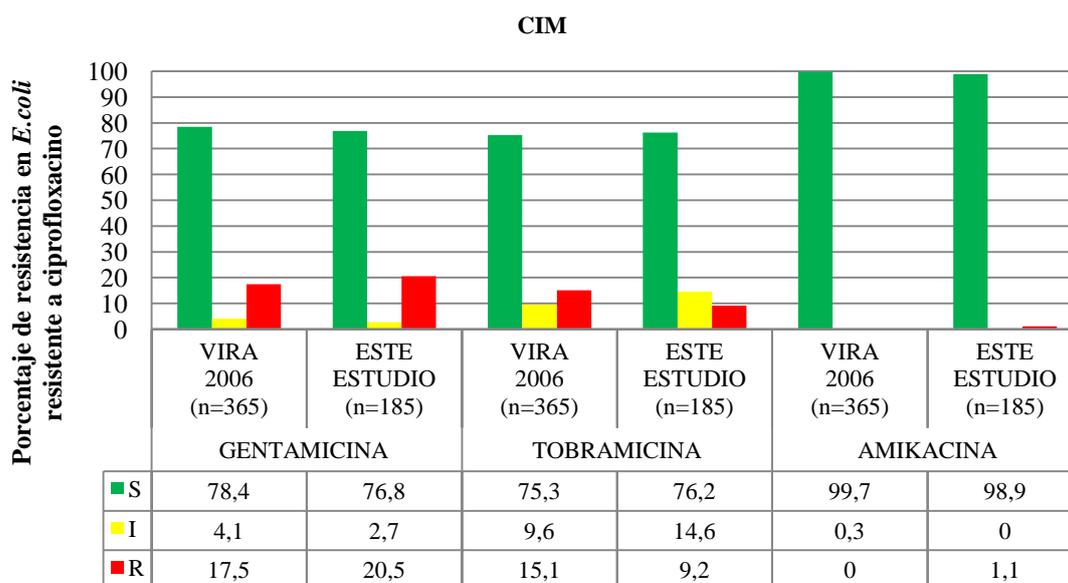


Figura 32: Sensibilidad a gentamicina, tobramicina y amikacina en *E. coli* resistente a ciprofloxacino en este estudio y en el estudio VIRA 2006

EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*), presenta en su página web la distribución de los halos de inhibición de diferentes microorganismos para diferentes antimicrobianos en tablas e histogramas. Estas distribuciones están basadas en datos de estudios realizados en bacterias aisladas de humanos y animales, de cualquier origen geográfico, durante un amplio período de tiempo⁽¹⁰²⁾.

Discusión

Al comparar la distribución de los halos de inhibición de los aminoglucósidos evaluados en este estudio con los evaluados por EUCAST, se observa que los histogramas de frecuencia difieren (Figura 33). En todos los aminoglucósidos comparados la media, mediana y desviación típica es superior en los aislados de este estudio (Tabla 61).

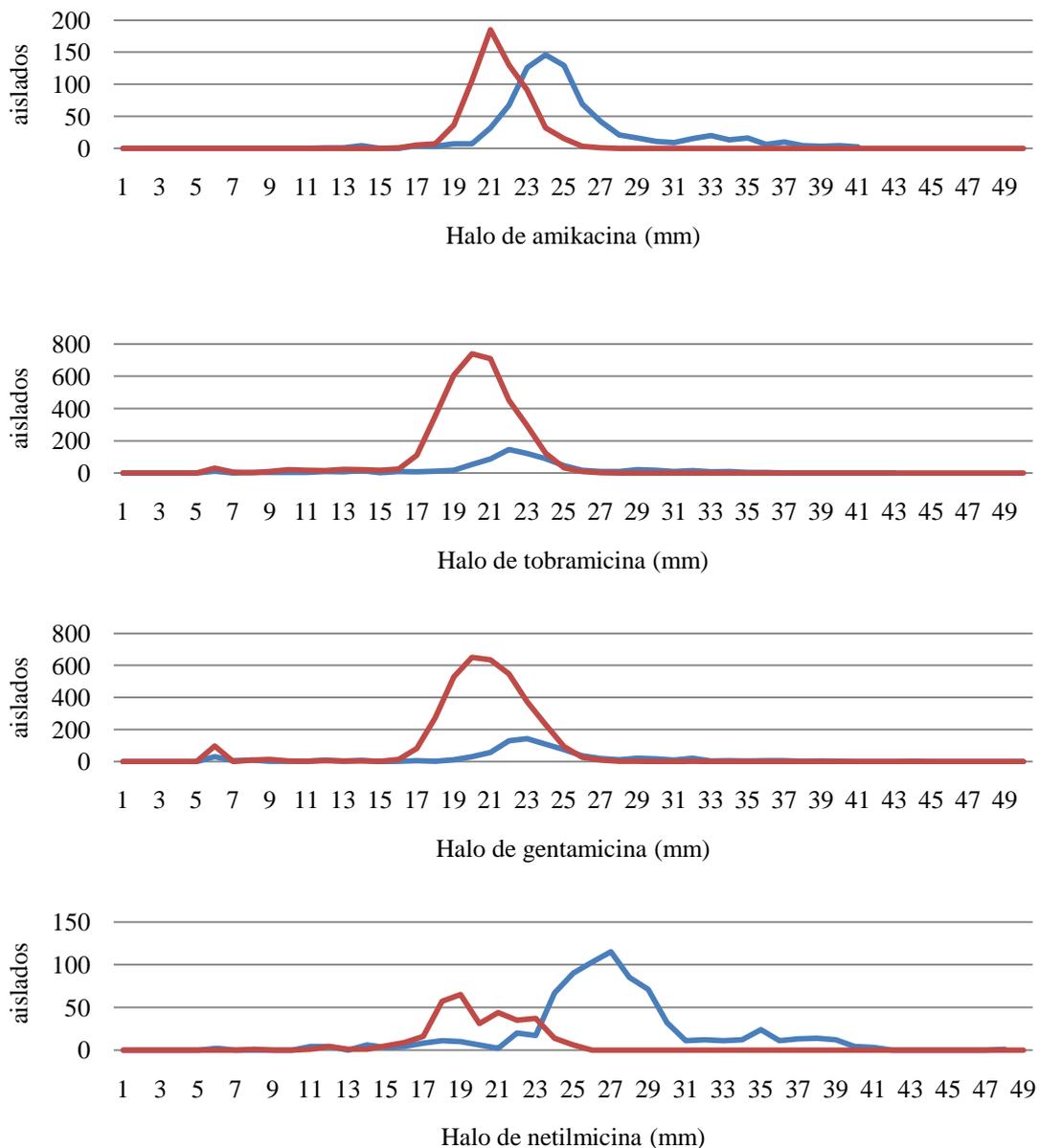


Figura 33: Distribución de los diámetros de los halos de inhibición de amikacina, tobramicina, gentamicina y netilmicina en *Enterobacteriaceae* en este estudio (azul) y en EUCAST (rojo).

Discusión

Sin embargo, al comparar el porcentaje de aislados sensibles, de sensibilidad intermedia y resistentes de este estudio, utilizando puntos de corte CLSI⁽⁸⁴⁾, con los porcentajes de EUCAST utilizando sus puntos de corte, se observa que el porcentaje de cada categoría es muy semejante (Tabla 62). Es decir que las diferencias en media, mediana y desviación típica parecen no repercutir en los porcentajes de sensibilidad, sensibilidad intermedia y resistencia.

Tabla 61: Estadísticos de las frecuencias de halos de inhibición de amikacina, tobramicina, gentamicina y netilmicina de este estudio y de EUCAST.

	AMIKACINA		TOBRAMICINA		GENTAMICINA		NETILMICINA	
	ESTE ESTUDIO (n=788)	EUCAST (n=612)	ESTE ESTUDIO (n=788)	EUCAST (n=3625)	ESTE ESTUDIO (n=788)	EUCAST (n=3602)	ESTE ESTUDIO (n=788)	EUCAST (n=327)
MEDIA	25,5	21,4	22,5	20	23	20,4	27,2	19,9
MEDIANA	24	21	22	20	23	21	27	20
DESV. TÍP.	4,22	1,53	5,15	2,75	5,74	3,28	5,07	2,57
P5	21	19	12,5	16	8	17	18	16
P25	23	20	21	19	22	19	25	18
P50	24	21	22	20	23	21	27	20
P75	26	22	24	22	25	22	29	22
P95	35	24	32	23	32	24	37	24

Tabla 62: Número y porcentaje de aislados sensibles (S), sensibilidad intermedia (I) y resistentes (R) de este estudio y de EUCAST.

	AMIKACINA		TOBRAMICINA		GENTAMICINA		NETILMICINA	
	ESTE ESTUDIO (n=788)	EUCAST (n=612)	ESTE ESTUDIO (n=788)	EUCAST (n=3625)	ESTE ESTUDIO (n=788)	EUCAST (n=3602)	ESTE ESTUDIO (n=788)	EUCAST (n=327)
S	782 (99,2%)	611 (99,8%)	725 (92%)	3475 (95,9%)	722 (91,6%)	3466 (96,2%)	772 (98%)	319 (97,6%)
I	0	1 (0,2%)	24 (3%)	45 (1,2%)	9 (1,1%)	7 (0,2%)	6 (0,7%)	2 (0,6%)
R	6 (0,8%)	0	39 (5%)	105 (2,9%)	57 (7,3%)	129 (3,6%)	10 (1,3%)	6 (1,8%)

Discusión

7.3 Discusión de la detección de genes de EMAG.

Un estudio realizado por *The Aminoglycoside Resistance Study Group* recogió durante los primeros cuatro meses de 1996 aislados de *E. coli*, *Klebsiella* spp. y *Enterobacter* spp. con significado clínico, resistentes a gentamicina, tobramicina, amikacina y/o netilmicina, provenientes de 15 hospitales de Turquía⁽¹⁰³⁾. En este estudio se descartaron aquellos aislados en que la resistencia fenotípica no coincidía con la genotípica, realizándose el estudio sobre un total de 419 aislados en los que se detectaron diversos mecanismos de resistencia.

Con el fin de comparar la prevalencia de los diferentes mecanismos de resistencia detectados en Turquía con los detectados en el presente estudio, se seleccionaron los 49 aislados del presente estudio que cumplían con los criterios de inclusión del estudio realizado en Turquía (Tabla 63).

Tabla 63: Prevalencia de mecanismos de resistencia a aminoglucósidos en este estudio y en el estudio de *The Aminoglycoside Resistance Study Group* de Turquía⁽¹⁰³⁾.

MECANISMO DE RESISTENCIA	TURQUÍA (1996) n (%)	ESTE ESTUDIO (2006) n (%)
<i>aac(3)-IIa</i>	101 (24,1)	31 (63,3)
<i>ant(2'')-Ia</i>	48 (11,4)	2 (4,1)
<i>aac(6')-Ib</i>	29 (6,9)	11 (22,5)
<i>aac(3)-IIa + ant(2'')-Ia</i>	15 (3,6)	1 (2)
<i>aac(3)-IIa + aac(6')-Ib</i>	41 (9,8)	1 (2)
<i>ant(2'')-Ia + aac(6')-Ib</i>	39 (9,4)	2 (4,1)
<i>aac(3)-IIa + ant(2'')-Ia + aac(6')-Ib</i>	11 (2,6)	0
<i>aac(3)-IIa + aac(6')-Ib + aac(6')-Ic</i>	0	1 (2)
AAC(6')-III	14 (3,4)	
AAC(6')-IV	116 (27,7)	
AAC(6')-III + AAC(6')-IV	1 (0,2)	
PERMEABILIDAD	4 (0,9)	
Total	419	49

Discusión

Los porcentajes de aislados resistentes a amikacina, tobramicina, gentamicina y/o netilmicina portadores de *aac(6')-Ib* son similares en ambos estudios (Turquía 28,6%, este estudio 30,6%). Sin embargo, los porcentajes de portadores de *aac(3)-IIa* y de *ant(2'')-Ia* difieren considerablemente (*aac(3)-IIa*: Turquía 40,1%, este estudio 69,4 y *ant(2'')-Ia*: Turquía 27%, este estudio 10,2%) (Tabla 64).

La resistencia a amikacina está mediada por *aac(6')-Ib* en ambos estudios, con una prevalencia similar, la resistencia a gentamicina y tobramicina, se debe a la presencia de *aac(3)-IIa* y *ant(2'')-Ia* en ambos estudios, pero con una prevalencia diferente.

Tabla 64: Prevalencia de mecanismos de resistencia a aminoglucósidos en este estudio y en el estudio de The Aminoglycoside Resistance Study Group de Turquía⁽¹⁰³⁾.

MECANISMO DE RESISTENCIA	TURQUÍA (1996) <i>n</i> (%)	ESTE ESTUDIO (2006) <i>n</i> (%)
<i>aac(3)-IIa</i>	168 (40,1)	34 (69,4)
<i>ant(2'')-Ia</i>	113 (27)	5 (10,2)
<i>aac(6')-Ib</i>	120 (28,2)	15 (30,6)

7.4 Discusión de la sensibilidad y especificidad de los puntos de corte del CLSI, los puntos de corte de sensibilidad disminuida, y las características fenotípicas de los halos de inhibición.

La sensibilidad para detectar la presencia de genes que codifican EMAG de los puntos de corte de sensibilidad disminuida (SD) definidos en el presente estudio, fue superior que la de los puntos de corte del CLSI para todos los aminoglucósidos que se compararon (gentamicina, tobramicina, amikacina y netilmicina), con la excepción de la gentamicina para la detección de *aac(3)-IIa*, que obtuvo una sensibilidad del 100% con ambos puntos de corte.

La especificidad, en cambio, fue siempre levemente superior para los puntos de corte del CLSI⁽⁸⁴⁾, oscilando entre 85,4% y 100%, según el aminoglucósido y el gen estudiado, mientras que para los puntos de corte SD el rango fue de 80,7% a 98,8%.

Discusión

La diferencia de puntos porcentuales de sensibilidad y especificidad entre los puntos de corte SD y los del CLSI de gentamicina, tobramicina, amikacina y netilmicina para la detección de *ant(2'')-Ia*, *aac(3)-IIa* y *aac(6')-Ib*, que representan el 97,1% del total de enzimas detectadas con actividad frente a estos antibióticos, se muestran en la tabla 65.

Tabla 65: Diferencia de puntos porcentuales entre sensibilidad y especificidad de los puntos de corte SD y CLSI de gentamicina, tobramicina, amikacina y netilmicina para la detección de *ant(2'')-Ia*, *aac(3)-IIa* y *aac(6')-Ib*.

Gen	Aminoglucósido	Sensibilidad (%SD - %CLSI)	Especificidad (%SD - %CLSI)
<i>ant(2'')-Ia</i>	gentamicina	39	-2,7
	tobramicina	39,3	-6,3
<i>aac(3)-IIa</i>	gentamicina	0	-4,4
	tobramicina	29,8	-5,2
	netilmicina	84,3	-7,8
<i>aac(6')-Ib</i>	amikacina	38,3	-1,2
	tobramicina	2,9	-4,6
	netilmicina	50	-6,3
Media		35,5	-4,8

SD: sensibilidad disminuida. CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*.

La menor especificidad de los puntos de corte SD se debe al aumento de falsos positivos. Combinando los puntos de corte SD con las características fenotípicas de los bordes del halo de inhibición que están asociados a presencia de genes de EMAG, se alcanzan valores predictivos negativos cercanos al 100% para gentamicina, tobramicina, amikacina y netilmicina. Es decir que al evaluar la gentamicina, tobramicina, amikacina y netilmicina, si un aislado no presenta ninguna característica fenotípica asociada a presencia de genes de EMAG (borde del halo de inhibición cortante o salto de colonias en el interior del halo de inhibición) y su halo de inhibición es mayor al punto de corte SD, la probabilidad de que ese aislado no presente un gen de EMAG (que afecte a estos aminoglucósidos) es del 100% en el caso de la tobramicina y la gentamicina, del 99,4% para la amikacina y 98,8% para la netilmicina (Tabla 66).

Discusión

Tabla 66: Sensibilidad, especificidad y valores predictivos de características fenotípicas del borde del halo de inhibición y puntos de corte SD de tobramicina, gentamicina, amikacina y netilmicina para la detección de genes de EMAG.

Aminoglucósido	S (%)	E (%)	VPP (%)	VPN (%)
Tobramicina (H y/o SD)	100	85,4	55,5	100
Gentamicina (H y/o SD)	100	88,5	55,5	100
Amikacina (H y/o SD)	88,9	90,8	31,4	99,4
Netilmicina (H y/o SD)	92,2	91,6	59,5	98,8

S: Sensibilidad, E: Especificidad, VPP: Valor Predictivo Positivo, VPN: Valor Predictivo Negativo, H y/o SD: presencia de características fenotípicas del halo de inhibición (borde cortante y/o salto de colonias) y/o sensibilidad disminuida.

Tabla 67: Diámetro (mm) del halo de inhibición de disco difusión en aislados portadores de diferentes genes de EMAG.

Gen		K	G	T	A	Nt	Nm	Str	Spt
<i>aph(3'')-Ib</i> (n=225)	Media	20	21	22	26	27	20	7	30
	Mínimo-Máximo	6-35	6-40	6-44	12-41	6-48	6-35	6-14	6-50
	Desviación Típica	7,5	7,2	5,9	3,9	5,8	5,1	2,2	6,8
<i>ant(3'')-Ia</i> (n=127)	Media	19	21	21	24	26	19	10	22
	Mínimo-Máximo	6-35	6-37	6-36	13-39	11-38	8-32	6-14	6-29
	Desviación Típica	7,3	5,4	5,4	3,3	5,2	4,3	3	5,2
<i>aph(3')-Ia</i> (n=51)	Media	6	20	20	25	26	11	9	27
	Mínimo-Máximo	6-10	6-35	6-34	12-34	6-38	6-16	6-22	6-50
	Desviación Típica	0,6	8,2	6,1	3,8	6,7	2,5	4,4	9,9
<i>ant(2'')-Ia</i> (n=14)	Media	11	13	13	23	22	16	9	20
	Mínimo-Máximo	6-19	6-19	6-17	12-27	6-31	6-23	6-14	6-48
	Desviación Típica	5,6	3,7	3	4,2	7,7	5,5	3,2	11,6
<i>aac(3)-IIa</i> (n=37)	Media	15	7	12	24	18	16	10	31
	Mínimo-Máximo	6-23	6-10	6-18	18-34	11-27	6-28	6-21	19-50
	Desviación Típica	5,5	1	3,4	4,2	3,6	4,9	5,4	6,6
<i>aac(6')-Ib</i> (n=17)	Media	8	17	9	17	15	19	11	26
	Mínimo-Máximo	6-12	6-24	6-14	12-22	6-22	6-24	6-20	14-48
	Desviación Típica	2,5	6,6	2,4	3,1	4,1	4,7	5,1	8,1
<i>aac(6')-Ic</i> (n=2)	Media	14	12	11	23	22	20	6	27
	Mínimo-Máximo	10-17	6-17	6-16	18-27	16-27	19-21	6-6	24-29
	Desviación Típica	5	7,8	7,1	6,4	7,8	1,4	0	3,5

verde: media \leq punto de corte CLSI, amarillo: media en rango de sensibilidad disminuida, rojo: media $>$ punto de corte de sensibilidad disminuida

Discusión

Analizando la media de las medidas de los halos de inhibición de los aminoglucósidos evaluados, se comprueba que de los aminoglucósidos de uso clínico, sólo la amikacina presenta una media superior al punto de corte del CLSI en presencia de genes de EMAG que la afectan (Tabla 67).

Al analizar los diámetros de cada uno de los aislados que presentan genes de EMAG que afectan la amikacina individualmente, 16 de ellos con *aac(6')-Ib*, uno con *aac(6')-Ic* y uno con ambos, se puede observar que 6 (33,3%) de ellos se encuentran por debajo del punto de corte del CLSI, 8 (44,5%) presentan sensibilidad disminuida y 4 (22%) son sensibles.

Las características fenotípicas de los bordes de los halos de inhibición muestran que 14 (77,8%) aislados presentaron borde cortante y/o salto de colonias, mientras que 4 (22,2%) presentaron borde en bisel, sin salto de colonias. Dos de los 4 aislados que no presentan características fenotípicas asociadas a resistencia, presentaron diámetros de halo de inhibición por debajo del punto de corte del CLSI, mientras que los otros dos son sensibles.

La asociación existente entre las características de los bordes de los halos de inhibición (borde cortante y/ o salto de colonias) y presencia de genes que codifican EMAG (ver página 100), sirve de ayuda para la interpretación de la sensibilidad a la amikacina en aquellos aislados en que el diámetro del halo de inhibición tiene valores de sensibilidad disminuida, ya que la totalidad de los casos que estuvieron entre 17 y 20 mm presentaron borde del halo cortante o salto de colonias, o ambas características (Figura 34).

Lo mismo puede decirse para la tobramicina y la gentamicina. En el caso de la tobramicina, de los 12 aislados que presentaron sensibilidad disminuida, 10 de ellos (83,3%) presentaron borde del halo de inhibición cortante y/o salto de colonias. En el caso de la gentamicina, todos aquellos aislados que fueron positivos para algún gen que codifique una EMAG que afecte la gentamicina, presentaron borde del halo de inhibición cortante y/o salto de colonias (Figuras 35 y 36).

Discusión

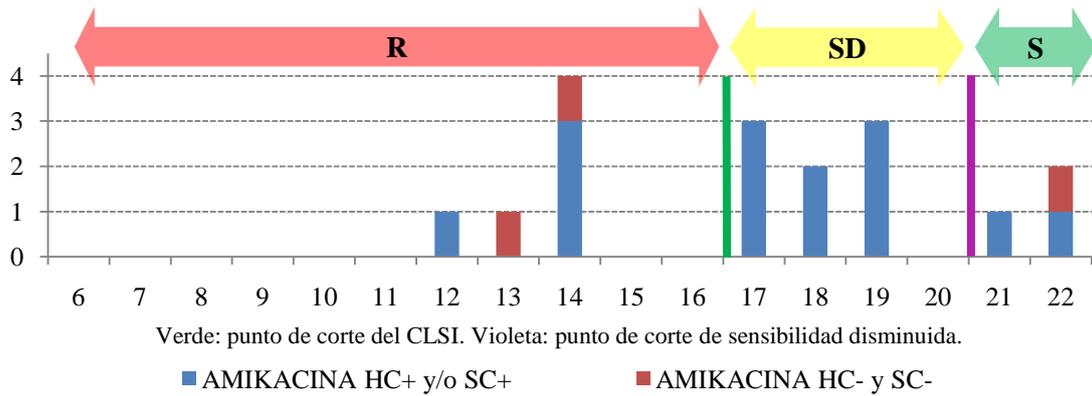


Figura 34: Diámetro del halo de inhibición de amikacina y características fenotípicas de los aislados portadores de genes de EMAG que afectan a la amikacina.

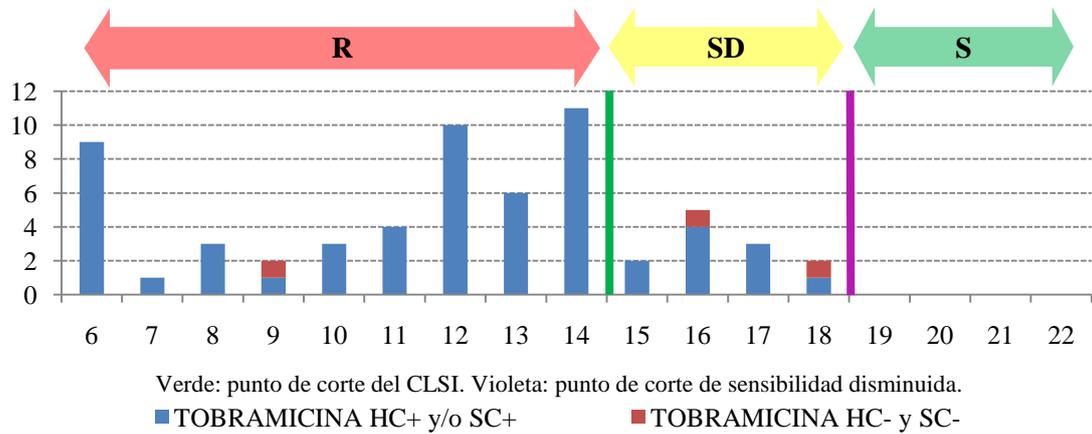


Figura 35: Diámetro del halo de inhibición de tobramicina y características fenotípicas de los aislados portadores de genes de EMAG que afectan a la tobramicina.

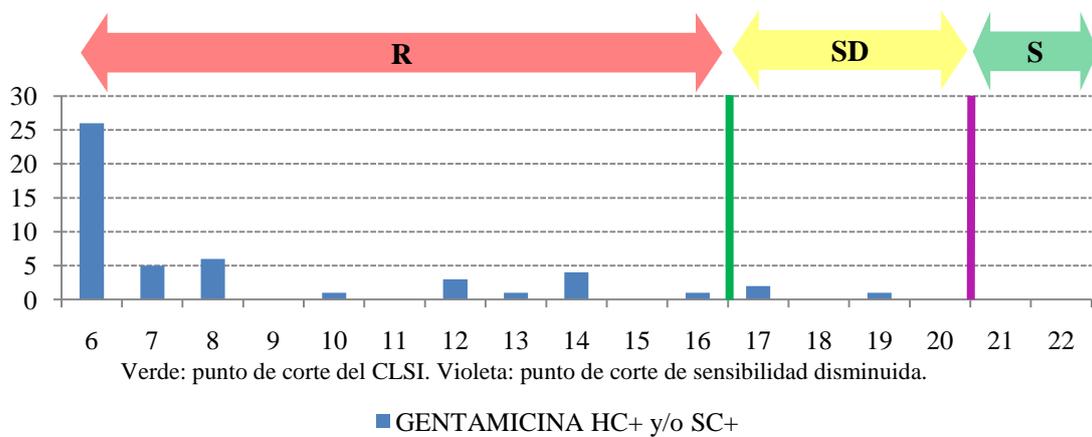


Figura 36: Diámetro del halo de inhibición de gentamicina y características fenotípicas de los aislados portadores de genes de EMAG que afectan a la gentamicina.

Discusión

7.5 Interpretación del antibiograma de disco difusión de aminoglucósidos en *Enterobacteriaceae*.

Los aminoglucósidos de uso clínico en nuestro medio para el tratamiento de infecciones provocadas por enterobacterias son la gentamicina, la tobramicina y la amikacina, es por ello que se incluyen en el antibiograma rutinario de enterobacterias en la mayor parte de laboratorios de microbiología clínica. La recomendación de incluir también netilmicina, afectada por las EMAG AAC(2')-Ia, AAC(3)-IIa y AAC(6')-Ib, no resulta útil para la interpretación del antibiograma de aminoglucósidos en *Enterobacteriaceae* en nuestro medio, ya que no se detectaron aislados portadores de *aac(2')-Ia*, y en los aislados que se detectó *acc(3)-IIa* o *aac(6')-Ib* la gentamicina y la tobramicina presentaron 100% de resistencia, respectivamente. La netilmicina sólo alcanzó el 19% de resistencia en aislados portadores de *aac(3)-IIa* y el 53% en *aac(6')-Ib* (Tabla 68).

Tabla 68: Resistencia a netilmicina en aislados portadores de EMAG que la afectan.

Gen	Resistencia a netilmicina	Resistencia a G o T
<i>aac(3)-IIa</i>	19 %	100% G Resistente
<i>aac(6')-Ib</i>	53 %	100% T Resistente
<i>aac(2')-Ia</i>	No se detectó la presencia de <i>aac(2')-Ia</i>	

G: gentamicina. T: tobramicina

Así pues, la netilmicina no aporta información nueva a la que ya aportaban la gentamicina y la tobramicina. Por este motivo no estaría recomendada su adición al antibiograma de *Enterobacteriaceae*.

Como hemos visto, la principal causa de resistencia a aminoglucósidos en enterobacterias es la producción de EMAG^(3,47,73), generando diferentes patrones de resistencia cada una. También es posible que estén presentes más de una de estas EMAG, generando patrones de resistencia a aminoglucósidos más complejos que dificultan la interpretación del antibiograma. En este estudio la prevalencia de aislados con más de un gen de EMAG fue de 45,3%. Si se analizan exclusivamente los aislados portadores de genes de EMAG que afectan los aminoglucósidos de uso clínico se

Discusión

observa que la prevalencia de aislados que presentan más de un gen de EMAG desciende drásticamente a 1,8% (7/397). La suma de patrones de resistencia a aminoglucósidos de uso clínico no representa una complicación añadida en la gran mayoría de los casos. También se observa que la totalidad de estos aislados portadores de más de un gen de EMAG que afectan aminoglucósidos de uso clínico son portadores de *aac(6')-I*, acompañados por un gen de EMAG que afecta a la gentamicina (*ant(2'')-Ia* o *aac(3)-IIa*) (Tabla 69).

Tabla 69: Prevalencia de aislados portadores de genes de EMAG que afectan gentamicina, tobramicina y/o amikacina.

Genes	Patrón	Prevalencia
<i>aph(3'')-Ib + aac(3)-IIa</i>	GT	(12/397) 3%
<i>aac(3)-IIa</i>	GT	(11/397) 2,8%
<i>aac(6')-Ib</i>	TA	(6/397) 1,5%
<i>aph(3'')-Ib + aph(3')-Ia + aac(3)-IIa</i>	GT	(5/397) 1,3%
<i>ant(3'')-Ia + aac(6')-Ib</i>	TA	(4/397) 1%
<i>aph(3'')-Ib + ant(3'')-Ia + aph(3')-Ia + ant(2'')-Ia</i>	GT	(3/397) 0,8%
<i>ant(3'')-Ia + ant(2'')-Ia</i>	GT	(2/397) 0,5%
<i>aph(3'')-Ib + ant(3'')-Ia + ant(2'')-Ia</i>	GT	(2/397) 0,5%
<i>aph(3'')-Ib + ant(3'')-Ia + aac(3)-IIa</i>	GT	(2/397) 0,5%
<i>ant(3'')-Ia + ant(2'')-Ia + aac(6')-Ib</i>	GTA	(2/397) 0,5%
<i>aph(3'')-Ib + aph(3')-Ia + ant(2'')-Ia</i>	GT	(1/397) 0,3%
<i>ant(3'')-Ia + aph(3')-Ia + ant(2'')-Ia</i>	GT	(1/397) 0,3%
<i>ant(3'')-Ia + aac(3)-IIa</i>	GT	(1/397) 0,3%
<i>aph(3')-Ia + aac(3)-IIa</i>	GT	(1/397) 0,3%
<i>aph(3'')-Ib + ant(3'')-Ia + aph(3')-Ia + aac(3)-IIa</i>	GT	(1/397) 0,3%
<i>aph(3'')-Ib + ant(2'')-Ia + aac(3)-IIa</i>	GT	(1/397) 0,3%
<i>aph(3'')-Ib + aac(6')-Ib</i>	TA	(1/397) 0,3%
<i>aph(3'')-Ib + aph(3')-Ia + ant(2'')-Ia + aac(6')-Ib</i>	GTA	(1/397) 0,3%
<i>aac(3)-IIa + aac(6')-Ib</i>	GTA	(1/397) 0,3%
<i>aph(3'')-Ib + ant(3'')-Ia + aph(3')-Ia + aac(3)-IIa + aac(6')-Ib</i>	GTA	(1/397) 0,3%
<i>aph(3'')-Ib + ant(3'')-Ia + ant(2'')-Ia + aac(6')-Ic</i>	GTA	(1/397) 0,3%
<i>aph(3'')-Ib + aac(3)-IIa + aac(6')-Ib + aac(6')-Ic</i>	GTA	(1/397) 0,3%

verde: patrón provocado por un solo gen, amarillo: patrón provocado por dos genes, rojo: patrón provocado por tres genes.

Discusión

Otra dificultad para la interpretación del antibiograma de aminoglucósidos en *Enterobacteriaceae* es que la presencia de un gen de EMAG no garantiza la expresión completa del patrón de resistencia de la misma. Al analizar cada EMAG por separado se observa que el porcentaje de aislados con expresión completa del fenotipo de resistencia es diferente para cada EMAG. Si se analizan por separado estas EMAG según afecten o no a aminoglucósidos de uso clínico en *Enterobacteriaceae* (gentamicina, tobramicina y amikacina), se obtienen dos grupos de diferente complejidad de interpretación.

Grupo de EMAG que no afectan aminoglucósidos de uso clínico en *Enterobacteriaceae*:

- ***aph(3'')-Ib (Str)***

La presencia de este gen se tradujo en resistencia a la estreptomicina en el 100% (225/225) de los casos.

- ***ant(3'')-Ia (StrSpt)***

La presencia de este gen se tradujo en resistencia a estreptomicina y a la espectinomomicina en el 25,2% (32/127) de los casos y la resistencia a la estreptomicina sola en el 74,8% (95/127) de los casos restantes.

- ***aph(3')-Ia (KNm)***

La presencia de este gen se tradujo en resistencia a kanamicina y neomicina en el 100% (51/51) de los casos.

La interpretación de este grupo de EMAG no representa un verdadero problema, ya que provocan resistencia a los aminoglucósidos que afectan en el 100% de los casos en que están presentes, con la excepción de la espectinomomicina, resistente en el 25,2% de los casos en que la detección del gen *ant(3'')-Ia* fue positiva. Hay que tener en cuenta que la espectinomomicina sólo se utiliza como alternativa a los betalactámicos en embarazadas alérgicas a los mismos para el tratamiento de infecciones urogenitales por *Neisseria gonorrhoeae*, y que el punto de corte de disco difusión utilizado en este estudio es el propuesto por ROSCO NEO-SENSITABS™, al no existir recomendaciones del CLSI (ver Materiales y Métodos), y probablemente esa sea la

Discusión

razón por la cual el porcentaje de resistencia a la espectinomicina en los aislados portadores de *ant(3'')-Ia* fue pequeño. La diferenciación entre portadores de *aph(3'')-Ia* y portadores de *ant(3'')-Ia* no es posible, al menos utilizando los puntos de corte para espectinomicina sugeridos para *Neisseria gonorrhoeae*.

Grupo de EMAG que afectan aminoglucósidos de uso clínico en *Enterobacteriaceae*:

- ***aac(3)-IIa* (KGTNt)**

Como se puede observar en la figura 37 la presencia de *aac(3)-IIa* se tradujo en varios fenotipos de resistencia distintos. La gentamicina fue resistente en el 100% (37/37) de los casos, mientras que la tobramicina sólo en el 78% (29/37).

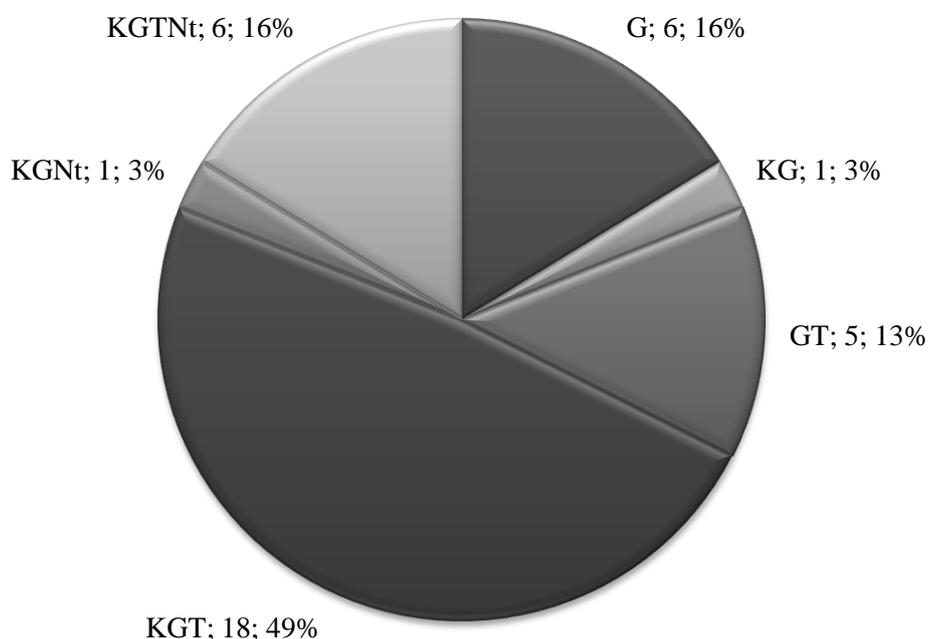


Figura 37: Patrones de resistencia de aminoglucósidos en aislados portadores de *aac(3)-IIa*.

Discusión

- ***ant(2'')-Ia (KGT)***

La presencia de este gen determinó varios fenotipos de resistencia (Figura 38). En el 65% (9/14) de los casos en fenotipo de resistencia incluyó kanamicina, tobramicina y gentamicina. Del 35% restante, el 60% mostró resistencia a algún aminoglucósido (20% a kanamicina, 20% a kanamicina y gentamicina y 20% a kanamicina y tobramicina), pero en el 40% todos los aminoglucósidos evaluados se mostraron sensibles.

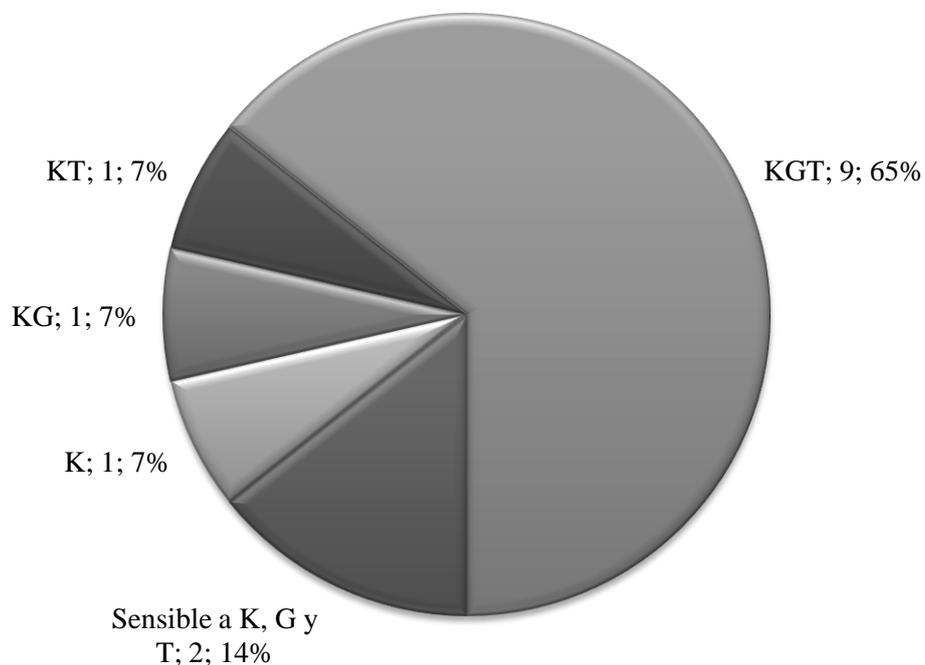


Figura 38: Patrones de resistencia de aminoglucósidos en aislados portadores de *ant(2'')-Ia*.

- ***aac(6')-Ib (KTANt)***

La presencia de este gen determinó varios fenotipos de resistencia (Figura 39). La tobramicina y la kanamicina fueron resistentes en el 100% (17/17) de los casos, la netilmicina en el 53% (9/17) mientras que la amikacina sólo en el 35% (6/17).

Discusión

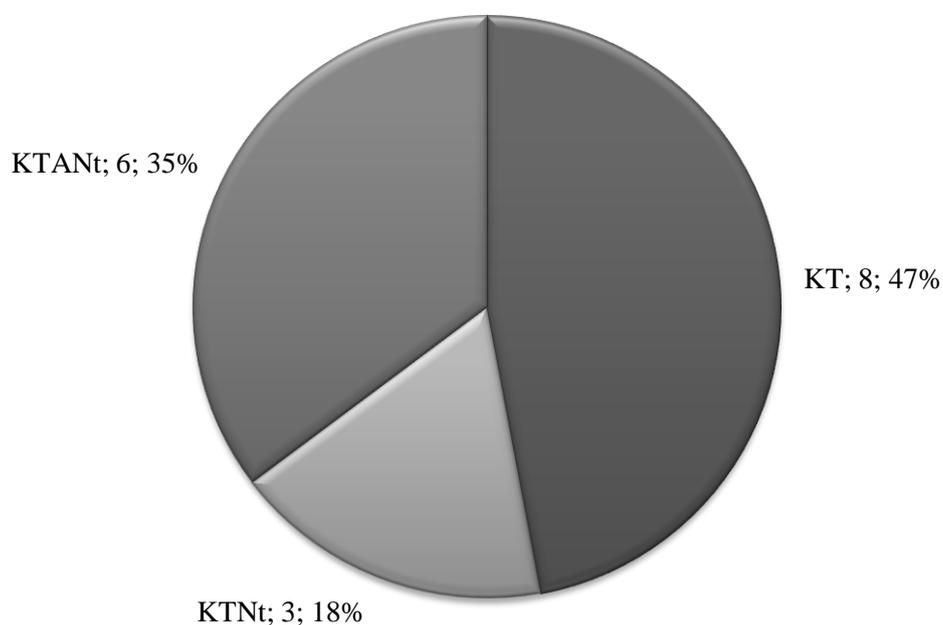


Figura 39: Patrones de resistencia de aminoglucósidos en aislados portadores de *aac(6')-Ib*.

- ***aac(6')-Ic* (KTANT)**

Sólo hubo dos aislados positivos para este gen, uno era resistente a kanamicina y tobramicina, y el otro sólo a kanamicina. En ningún caso hubo resistencia a amikacina o netilmicina.

La interpretación de este grupo de EMAG es más complejo. Los datos obtenidos y analizados en este estudio permiten desarrollar el siguiente método para la interpretación del antibiograma de aminoglucósidos en *Enterobacteriaceae*, válido para un medio con una epidemiología similar a la estudiada.

En la interpretación de los patrones de resistencia de la gentamicina, tobramicina y amikacina en el antibiograma rutinario de enterobacterias hay que considerar ocho posibilidades, que se traducen en los siguientes fenotipos de resistencia (Tabla 70).

Discusión

Tabla 70: Fenotipos de resistencia a aminoglucósidos en *Enterobacteriaceae*.

Fenotipo	Gentamicina	Tobramicina	Amikacina
1	SENSIBLE	SENSIBLE	SENSIBLE
2	SENSIBLE	SENSIBLE	RESISTENTE
3	SENSIBLE	RESISTENTE	SENSIBLE
4	SENSIBLE	RESISTENTE	RESISTENTE
5	RESISTENTE	SENSIBLE	SENSIBLE
6	RESISTENTE	SENSIBLE	RESISTENTE
7	RESISTENTE	RESISTENTE	SENSIBLE
8	RESISTENTE	RESISTENTE	RESISTENTE

Cada uno de estos fenotipos puede estar provocado por diferentes EMAG o combinaciones de ellas. Los aislados estudiados fueron positivos para cuatro genes de EMAG que afectan estos aminoglucósidos: *ant(2'')-Ia*, *aac(3)-IIa*, *aac(6')-Ib* y *aac(6')-Ic*. En este estudio la probabilidad de que un antibiograma presente uno de los ocho fenotipos que se detallan a continuación:

1. Fenotipo G^{STAS} : 78,5% (285/363)

De los 285 aislados G^{STAS} , 282 (99%) fueron negativos para *ant(2'')-Ia*, *aac(3)-IIa*, *aac(6')-Ib* y *aac(6')-Ic*. Los tres aislados restantes fueron positivos para *ant(2'')-Ia*, uno de ellos en combinación con *aac(6')-Ic* (Tabla 71)

Tabla 71: Aislados con fenotipo G^{STAS}

Fenotipo	Gen	n (%)
G^{STAS}	Genes que no afectan GTA	316 (99,1)
	<i>ant(2'')-Ia</i>	2 (0,6)
	<i>ant(2'')-Ia</i> + <i>aac(6')-Ic</i>	1 (0,3)

Discusión

Es el fenotipo que nos encontraremos con más frecuencia y se puede interpretar como no portador de genes de EMAG que afecten a aminoglucósidos de uso clínico con una probabilidad de error aceptable (1%).

Se puede recurrir al análisis de las características fenotípicas del borde del halo de inhibición, recordando que para gentamicina, tobramicina y amikacina la asociación entre presencia de genes de EMAG y borde del halo de inhibición cortante y/o salto de colonias dentro del halo de inhibición, fue estadísticamente significativa ($\leq 0,01$).

Para el cribado de presencia de genes de EMAG es aconsejable utilizar los puntos de corte de sensibilidad disminuida (SD) utilizados en este trabajo, recordando que superan ampliamente los puntos de corte del CLSI en lo que respecta a sensibilidad.

2. Fenotipo $G^{ST}A^R$: 0%

Este fenotipo no se encontró, ya que la resistencia a amikacina se acompañó de resistencia a tobramicina, con *aac(6')-Ib* positiva en todos los casos.

3. Fenotipo $G^{ST}A^S$: 1,9% (7/363)

De los 7 aislados $G^{ST}A^S$, 6 fueron positivos para *aac(6')-Ib* y uno para *ant(2'')-Ia* (Tabla 72).

Tabla 72: Aislados con fenotipo $G^{ST}A^S$

Fenotipo	Gen	n (%)
$G^{ST}A^S$	<i>ant(2'')-Ia</i>	1(14,3)
	<i>aac(6')-Ib</i>	6(85,7)

La resistencia aislada a tobramicina no es un fenotipo posible por ningún mecanismo de resistencia conocido en aminoglucósidos. El fenotipo $G^{ST}A^S$ está provocado por EMAG que afectan también a gentamicina o amikacina, si bien no siempre resultan resistentes en el antibiograma.

Discusión

La diferencia entre el diámetro del halo de inhibición de la tobramicina y la gentamicina (δTG) es útil para diferenciar las EMAG que causan resistencia a tobramicina.

$$\delta TG = \text{Halo inhibición (mm) T} - \text{Halo inhibición (mm) G}$$

T: tobramicina. G: gentamicina.

Al graficar en función del fenotipo de resistencia que acompaña a la resistencia de la tobramicina en las diferentes combinaciones de EMAG (Figura 40), se observa que las que combinan resistencia a tobramicina y amikacina (A), presentan valores de δTG por debajo de -6, mientras que las que combinan tobramicina y gentamicina (G), o gentamicina, tobramicina y amikacina (GA) por encima de -4.

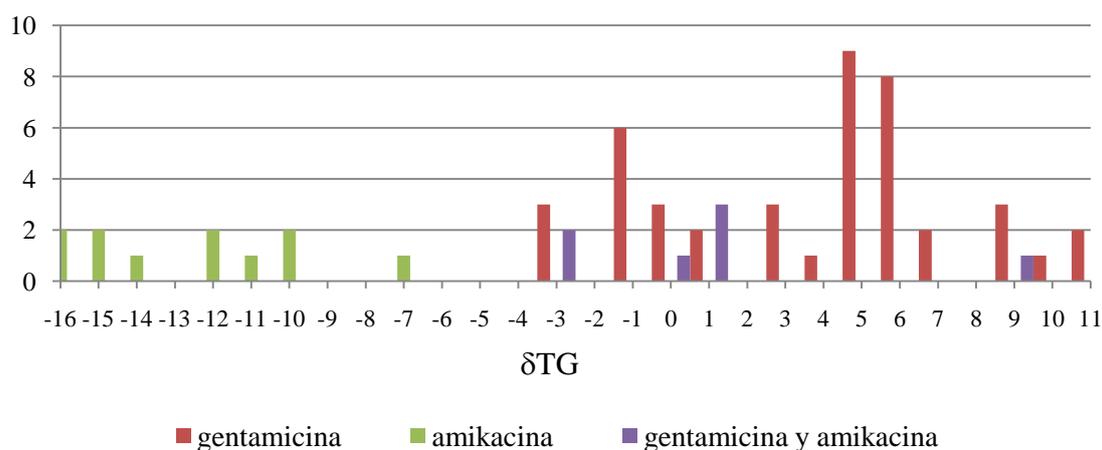


Figura 40: δTG según resistencia asociada a tobramicina.

La relación entre el diámetro de gentamicina y tobramicina nos sirve para discriminar si la resistencia de la tobramicina es debida a una EMAG que afecte a la gentamicina, a la amikacina o a la combinación de ambas. Es decir que si la tobramicina es resistente y el halo de la gentamicina es más de 4mm más grande que el de la tobramicina ($\delta TG \leq -4$), se puede interpretar que la resistencia a tobramicina está provocada por la presencia de *aac(6')Ib*. Si el δTG es cercano a 0 o claramente positivo, la resistencia a tobramicina estará acompañada de resistencia a gentamicina, y en ocasiones también a amikacina.

Discusión

La resistencia a gentamicina puede deberse a la presencia de *ant(2'')-Ia* y de *aac(3)-IIa*. Para el fenotipo $G^{S}T^{R}A^{S}$ *aac(3)-IIa* queda descartada porque en los aislados portadores de esta EMAG, la δTG es claramente positiva, ya que la gentamicina es resistente con diámetros del halo de inhibición inferiores a los de tobramicina (Tabla 73).

Tabla 73: δTG en aislados portadores de *ant(2'')* y *aac(3)IIa*.

	Estadístico	<i>ant(2'')-Ia</i>	<i>aac(3)-IIa</i>
δTG	Media	-1	6
	Mediana	0	6
	Moda	-2	6
	σ	2	3

σ : Desviación típica.

Resumiendo, una diferencia mínima del δTG nos indicaría que la causa de la resistencia a tobramicina es la *ant(2'')-Ia*. Una diferencia claramente negativa indicaría la resistencia a tobramicina debida a la presencia de *aac(6')-Ib*. Y una δTG claramente positiva, resistencia a gentamicina, este caso se analizará en el fenotipo $G^{R}T^{R}A^{S}$.

4. Fenotipo $G^{S}T^{R}A^{R}$: 1,4% (5/363)

Los 5 aislados $G^{S}T^{R}A^{R}$ fueron positivos para *aac(6')-Ib* (Tabla 74).

Tabla 74: Aislados con fenotipo $G^{S}T^{R}A^{R}$

Fenotipo	Gen	<i>n</i> (%)
$G^{S}T^{R}A^{R}$	<i>aac(6')-Ib</i>	5 (100)

Para este fenotipo, la resistencia a amikacina nos indica la presencia de *aac(6')-Ib* que siempre se acompaña de resistencia a tobramicina, pero la presencia o no de *ant(2'')-Ia* o *aac(3)-IIa*, que afectan también a gentamicina se interpreta por el δTG , y por las características fenotípicas del halo de inhibición de la gentamicina.

Discusión

5. Fenotipo $G^R T^S A^S$: 4,1% (15/363)

De los 15 aislados $G^R T^S A^S$, 6 (40%) fueron negativos para *ant(2'')-Ia* y *aac(3)-IIa*, 8 fueron positivos para *aac(3)-IIa* y sólo uno fue positivo para *ant(2'')-Ia* (Tabla 75).

Tabla 75: Aislados con fenotipo $G^R T^S A^S$

Fenotipo	Gen	n (%)
$G^R T^S A^S$	Genes que no afectan GTA	6(40)
	<i>ant(2'')-Ia</i>	1(6,7)
	<i>aac(3)-IIa</i>	8(53,3)

Este fenotipo de resistencia puede estar provocado por *ant(2'')-Ia* o por *aac(3)-IIa*, y se interpreta mediante los valores de δTG , de la misma forma que los aislados resistentes a tobramicina.

6. Fenotipo $G^R T^S A^R$: 0%

Este fenotipo no se encontró, ya que la resistencia a amikacina se acompañó de resistencia a tobramicina, con *aac(6')-Ib* positiva en todos los casos.

7. Fenotipo $G^R T^R A^S$: 13,8% (50/363)

De los 50 aislados $G^R T^R A^S$, 14 (28%) fueron negativos para *ant(2'')-Ia*, *aac(3)-IIa*, *aac(6')-Ib* y *aac(6')-Ic*. Los 36 restantes fueron positivos para diferentes combinaciones de dichos genes (Tabla 76).

Este fenotipo puede deberse a *ant(2'')-Ia*, a *aac(3)-IIa*, a ambas, o a cualquiera de las dos y *aac(6')-Ib*, cuya presencia se ha traducido siempre en resistencia a tobramicina, pero sólo en el 35% de los casos se ha acompañado de resistencia a amikacina. Las características fenotípicas del halo de inhibición de la amikacina y los valores de amikacina de sensibilidad disminuida son la clave para distinguir los aislados portadores de *aac(6')-Ib*.

Discusión

Tabla 76: Aislados con fenotipo $G^R T^R A^S$

Fenotipo	Gen	n (%)
$G^R T^R A^S$	Genes que no afectan GTA	14 (28)
	<i>ant(2'')-Ia</i>	5 (10)
	<i>aac(3)-IIa</i>	25 (50)
	<i>ant(2'')-Ia + aac(3)-IIa</i>	1 (2)
	<i>ant(2'')-Ia + aac(6')-Ib</i>	2 (4)
	<i>aac(3)-IIa + aac(6')-Ib</i>	2 (4)
	<i>aac(3)-IIa + aac(6')-Ib + aac(6')-Ic</i>	1 (2)

Para determinar si la resistencia a gentamicina se debe a la presencia de *ant(2'')*-*Ia* o *aac(3)-IIa* debe considerarse el δTG (página 131). Si la diferencia es mínima, nos inclinaremos por *ant(2'')*-*Ia*, mientras que si la diferencia es claramente positiva consideraremos *aac(3)-IIa* como la causa más probable de resistencia a gentamicina y tobramicina. Cabe destacar que en aquellos con sospecha de *aac(6')-Ib*, la tobramicina estará doblemente afectada y esto afecta su relación con la gentamicina. De esta forma, los aislados positivos para *ant(2'')*-*Ia* que presentaban δTG cercano a 0, presentan valores negativos, mientras que los aislados positivos para *aac(3)-IIa* que presentaban valores claramente positivos de δTG , presentan valores cercanos a 0.

8. Fenotipo $G^R T^R A^R$: 0,3% (1/363)

Un solo aislado presentó este fenotipo (Tabla 77).

Tabla 77: Aislados con fenotipo $G^R T^R A^R$

Fenotipo	Gen	n (%)
$G^R T^R A^R$	<i>ant(2'')-Ia + aac(6')-Ib</i>	1(100)

Este fenotipo se interpreta de la misma manera que el anterior, con la salvedad que en este caso la amikacina es resistente, y por consiguiente no es necesario reparar en las características fenotípicas del halo de inhibición de la amikacina.

Discusión

En la tabla 78 se resume la interpretación del antibiograma de aminoglucósidos en *Enterobacteriaceae*. La tabla 79 muestra la interpretación de los diferentes fenotipos de resistencia.

Tabla 78: Interpretación del antibiograma de aminoglucósidos en *Enterobacteriaceae*.

		AMIKACINA				
		S ≥ 21 mm	SD/F(+) 17-20 mm	R ≤ 16 mm		
TOBRAMICINA	S ≥ 19 mm	GENTAMICINA	S ≥ 19 mm	Fenotipo 1 G ^S T ^S A ^S	Fenotipo 1 G ^S T ^S A ^S	Fenotipo 2 G ^S T ^S A ^R
			SD/F(+) 15-19 mm	Fenotipo 5 G ^R T ^S A ^S	Fenotipo 5 G ^R T ^S A ^S	Fenotipo 6 G ^R T ^S A ^R
			R ≤ 14 mm	Fenotipo 5 G ^R T ^S A ^S	Fenotipo 5 G ^R T ^S A ^S	Fenotipo 6 G ^R T ^S A ^R
	SD/F(+) 15-18 mm	GENTAMICINA	S ≥ 19 mm	Fenotipo 3 G ^S T ^R A ^S	Fenotipo 4 G ^S T ^R A ^R	Fenotipo 4 G ^S T ^R A ^R
			SD/F(+) 15-19 mm	Fenotipo 7 G ^R T ^R A ^S	Fenotipo 8 G ^R T ^R A ^R	Fenotipo 8 G ^R T ^R A ^R
			R ≤ 14 mm	Fenotipo 7 G ^R T ^R A ^S	Fenotipo 8 G ^R T ^R A ^R	Fenotipo 8 G ^R T ^R A ^R
	R ≤ 14 mm	GENTAMICINA	S ≥ 19 mm	Fenotipo 3 G ^S T ^R A ^S	Fenotipo 4 G ^S T ^R A ^R	Fenotipo 4 G ^S T ^R A ^R
			SD/F(+) 15-19 mm	Fenotipo 7 G ^R T ^R A ^S	Fenotipo 8 G ^R T ^R A ^R	Fenotipo 8 G ^R T ^R A ^R
			R ≤ 14 mm	Fenotipo 7 G ^R T ^R A ^S	Fenotipo 8 G ^R T ^R A ^R	Fenotipo 8 G ^R T ^R A ^R

S: sensible, SD: sensibilidad disminuida, (F+): fenotipo de salto de colonias y/o halo cortante, R: resistente, G: gentamicina, T: tobramicina, A: amikacina.

Discusión

Tabla 79: Interpretación de los fenotipos de resistencia

Fenotipo	δ TG	EMAG	comentarios
1.G ^S T ^S A ^S	-	-	-
2.G ^S T ^S A ^R	-	-	Confirmar resistencia a amikacina
3.G ^S T ^R A ^S	< -6	<i>aac(6')-Ib</i>	Sospechar si F(+) en amikacina
	> -4	<i>ant(2'')-Ia</i>	Sospechar si F(+) en gentamicina
4.G ^S T ^R A ^R	< -6	<i>aac(6')-Ib</i>	-
	> -4	<i>ant(2'')-Ia + aac(6')-Ib</i>	Sospechar si F(+) en gentamicina
5.G ^R T ^S A ^S	$\cong 0$	<i>ant(2'')-Ia</i>	-
	> 3	<i>aac(3)-IIa</i>	-
6.G ^R T ^S A ^R	-	-	Confirmar resistencia a amikacina
7.G ^R T ^R A ^S	$\cong 0$	<i>ant(2'')-Ia</i>	-
	> 3	<i>aac(3)-IIa</i>	-
	< 0	<i>ant(2'')-Ia + aac(6')-Ib</i>	Sospechar si F(+) en amikacina
	$\cong 0$	<i>aac(3)-IIa + aac(6')-Ib</i>	Sospechar si F(+) en amikacina
8.G ^R T ^R A ^R	< 0	<i>ant(2'')-Ia + aac(6')-Ib</i>	-
	$\cong 0$	<i>aac(3)-IIa + aac(6')-Ib</i>	-

S: sensible, SD: sensibilidad disminuida, (F+): fenotipo de salto de colonias y/o halo cortante, R: resistente, G: gentamicina, T: tobramicina, A: amikacina, δ TG: diferencia entre el halo de inhibición de tobramicina y gentamicina.

De esta forma se consigue una categorización microbiológica que permite identificar y diferenciar fenotípicamente mecanismos de resistencia a los aminoglucósidos en *Enterobacteriaceae*.

A la hora de realizar el informe de sensibilidad a aminoglucósidos de una enterobacteria, el microbiólogo clínico posee una herramienta más para predecir la probabilidad de éxito terapéutico que el aminoglucósido en cuestión tiene, para la infección que el aislado está causando, al combinar los resultados de la categorización clínico-farmacológica habitual y microbiológica, obtenida con la interpretación propuesta en este estudio.

8. CONCLUSIONES.

Conclusiones

La sensibilidad a los antimicrobianos en *Enterobacteriaceae* entre 2004 y 2006 en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau se ha mantenido estable en el grupo de los betalactámicos, mientras que ha aumentado un 30% la resistencia a las quinolonas y ha aparecido resistencia a amikacina, manteniéndose la resistencia a gentamicina y tobramicina menor al 10%.

Entre los aislados con alguna resistencia a aminoglucósidos, la prevalencia de genes que codifican EMAG que no afectan aminoglucósidos de uso clínico fue superior a la de genes de EMAG que sí afectan estos aminoglucósidos, 84,6% y 15,4%, respectivamente.

El patrón de resistencia a aminoglucósidos más prevalente fue el provocado por *aph(3'')-Ib* que confiere resistencia a estreptomina, presente en un tercio de los aislados resistentes a alguno de los aminoglucósidos estudiados. De los patrones que afectan aminoglucósidos de uso clínico, el más prevalente fue el provocado por *aac(3)-IIa*: resistencia a gentamicina y tobramicina, presente en el 60% de los aislados con resistencias a aminoglucósidos de uso clínico.

La presencia de características fenotípicas en los halos de inhibición (halo cortante y salto de colonias) se asoció de manera significativa con la presencia de genes de EMAG en los 8 aminoglucósidos evaluados.

El estudio de la epidemiología de la resistencia a aminoglucósidos en *Enterobacteriaceae*, los mecanismos involucrados y las características fenotípicas de los halos de inhibición han permitido la creación de reglas para la interpretación del antibiograma de disco difusión de aminoglucósidos en *Enterobacteriaceae*.

9. BIBLIOGRAFÍA.

Bibliografía

1. Prats G, Microbiología clínica: Madrid, Editorial Médica Panamericana, 2005.
2. Euséby JP: <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/ee/enterobacteriaceae.html>. [En línea] 25/10/2005.
3. Gilbert DN. Aminoglycosides. En: Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 6^{ed}. Elsevier Churchill Livingstone, Philadelphia: 2005: 328-56
4. Euzéby JP, List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. Int J Syst Bacteriol 1997; 47:590-2
5. Lapage SP, Proposal of *Enterobactereaceae* nom. nov. as a substitute for the illegitimate but conserved name *Enterobacteriaceae* Ranh 1937. Request for an opinion. Int J Syst Bacteriol. 1979; 29:265-6
6. Buchanan RS *et al*, International Code of Nomenclature. J Bacteriol 1948;55: 287-306
7. Bacteriology, Judicial Commission of the International Committee on Systematic. Present Standing of the name *Enterobacteriaceae* Ranh 1937. Int J Syst Bacteriol 1981; 31: 104
8. Breed, Murray EGD, Smith NR. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 17^{ed}. Baltimore, The Williams & Wilkins Co. 1957.
9. Hacker J, *et al*: <http://www.nature.com/nrmicro/journal/v5/n12/full/nrmicro1810.html>. [En línea] 12/2007.
10. Limbird LE, Hardman JG and Goodman Gilman A. En Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. New York, The McGraw-Hill Companies, 1996.
11. Navarro F *et al*, Interpretative reading of the antibiogram of enterobacteria. Enferm Infecc Microbiol Clin 2002; 20: 225-34
12. Paterson DL *et al*, Extended-spectrum betalactamases: a clinical update. Clin Microbiol Rev 2005;18: 657-86
13. Datta N *et al*, Penicillinase sythesis controlled by infectious R factors in *Enterobacteriaceae*. Nature 1965; 208:239-41
14. Knothe H *et al*, Transferable resistance to cefotaxime, cexofitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. Infection 1983, 11: 315-7
15. Kliebe C *et al*, Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. Antimicrob Agents Chemother 1985; 28: 302-7
16. Livermore DM *et al*, Antibiotic resistance and production of extended-spectrum beta-lactamases among *Klebsiella* spp. from intensive care units in Europe. J Antimicrob Chemother 1996; 38: 409-24
17. Drlica K, *et al*. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. Microbiol Mol Biol Rev. 1997;61: 377-92.

Bibliografía

18. Nordmann P *et al*, Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56:463-9
19. Poirel L *et al*, Is plasmid-mediated quinolone resistance a clinically significant problem? *Clin Microbiol Infect* 2008;14: 295-7
20. Kim HB *et al*, Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants over a 9-year period. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 639-45
21. Goñi MP *et al*, Antibiótics Aminoglucòsids. En: Ruiz J, ed. *Treballs de la Societat Catalana de Microbiologia*. 2004; 55: 107-19.
22. Dámaso D, Moreno-López M, Daza RM *Antibióticos y quimioterápicos antibacterianos*. Uso clínico. Madrid: Grutesa, 1984.
23. Abastado P, 20th century at a glance: the streptomycin story. *Med Sci* 2006; 22: 544-47
24. Daniel TM, Selman Abraham Waksman and the discovery of streptomycin. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005; 9:120-2
25. Skold O, Who owns the discovery, the doctoral candidate or the professor? The streptomycin story. *Lakartidningen* 2005; 102: 3048-9
26. Sulek K, Nobel prize for Selman Abraham Waksman in 1952 for the discovery of streptomycin, the first antitubercular antibiotic. *Wiad Lek* 1968; 21: 2083-4
27. Okami Y, *et al*. Studies on *Streptomyces kanamyceticus*, producer of kanamycin. *Tokio: J Antibiot* 1959; 12: 252-6
28. Weinstein MJ, *et al*. Gentamicin, a New Antibiotic Complex from *Micromonospora*. *J Med Chem* 1963; 6:463-4
29. Rosselet JP, Isolation, Purification and Characterization of Gentamicin. *Antimicrobial Agents Chemother* 1963;161:14-6
30. Higgins CE, *et al*. Nebramycin, a new broad-spectrum antibiotic complex.II. Description of *Streptomyces tenebrarius*. *Antimicrob Agents Chemother* 1967; 7: 324-31
31. Kawaguchi H. BB-K 8, a new semisynthetic aminoglycoside antibiotic. *Tokio: J Antibiot* 1972; 25: 695-708
32. Kondo S, *et al*. Semisynthetic aminoglycoside antibiotics: Development and enzymatic modifications. *J Infect Chemother* 1999; 5:1-9
33. Noone P. Sisomicin, netilmicin and dibekacina: A review of their antibacterial activity and therapeutic use. *Drugs* 1984; 27: 548-78
34. Heifetz CL. Butirosin, a new aminoglycosidic antibiotic complex: antibacterial activity in vitro and in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 1972; 2: 89-94
35. Dion HW. Butirosin, a new aminoglycosidic antibiotic complex: isolation and characterization. *Antimicrob Agents Chemother* 1972; 2:84-8

Bibliografía

36. Howells JD. Butirosin, a new aminoglycosidic antibiotic complex: bacterial origin and some microbiological studies. *Antimicrob Agents Chemother* 1972; 2:79-83
37. Odland B, *et al.* Quality control guidelines for disk diffusion and broth microdilution antimicrobial susceptibility tests with seven drugs for veterinary applications. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 453-5
38. Palomino J, *et al.* Aminoglucósidos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003; 21: 105-14
39. Laskin OL, *et al.* Netilmicin and gentamicin multidose kinetics in normal subjects. *Clin Pharmacol Ther*, 1983; 34: 644-50.
40. Gyselynck AM, *et al.* Pharmacokinetics of gentamicin: distribution and plasma and renal clearance. *J Infect Dis* 1971; 134 (Suppl): S70-6.
41. Plantier J, *et al.* Pharmacokinetics of amikacin in patients with normal or impaired renal function: radioenzymatic acetylation assay. *J Infect Dis* 1976; 134 (Suppl): S323-30
42. Barza M, *et al.* Predictability of blood levels of gentamicin in man. *J Infect Dis* 1975; 132:165-74
43. Wilson TW, *et al.* Elimination of tritiated gentamicin in normal human subjects and in patients with severely impaired renal function. *Clin Pharmacol Ther* 1973; 14: 815-22
44. Vogelman B, *et al.* Postantibiotics effects. *J Antimicrob Chemother* 1985;15 (Suppl A):37-46
45. Lorian V Ed. *Antibiotics in laboratory medicine*. 3^{ed}. Philadelphia, Williams and Wilkins 1991.
46. Soriano F. Pharmacokinetic and pharmacodynamic concepts for an interpretative reading of the antibiogram. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2002; 20: 407-12
47. Courvalin P, Leclercq R, Bingen E, *Antibiogramme*. 2^{ed}. Paris. Editions ESKA, 2006
48. Bray D, Lewis J, Alberts B, Raff M, Roberts K, Watson JD, *Molecular Biology of the Cell*. New York, Garland Publisher, Inc., 1994.
49. Vakulenko SB, *et al.* Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16: 430-50
50. Mingeot-Leclercq MP, *et al.* Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:727-37
51. Hancock RE, *et al.* Interaction of aminoglycosides with the outer membranes and purified lipopolysaccharide and OmpF porin of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35:1309-14
52. Bryan LE, *et al.* Roles of ribosomal binding, membrane potential, and electron transport in bacterial uptake of streptomycin and gentamicin. *Antimicrob Agents Chemother* 1983; 174:835-45.
53. Xiong YQ, *et al.* Influence of pH on adaptive resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides and their postantibiotic effects. *Antimicrob Agents Chemother*, 1996; 40: 35-9.

Bibliografía

54. Melancon P, *et al.* Single-base mutations at position 2661 of *Escherichia coli* 23S rRNA increase efficiency of translational proofreading. *J Bacteriol* 1992; 174: 7896-901
55. Hobbie SN, *et al.* Binding of neomycin-class aminoglycoside antibiotics to mutant ribosomes with alterations in the A site of 16S rRNA. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:1489-96
56. Hobbie SN, *et al.* Analysis of the contribution of individual substituents in 4,6-aminoglycoside-ribosome interaction. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49: 5112-8
57. Carter AP, *et al.* Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature* 2000; 407: 340-8
58. Davies J, *et al.* Misreading of RNA codewords induced by aminoglycoside antibiotics. *Mol Pharmacol* 1965;1: 93-106
59. Davies J, *et al.* Misreading of ribonucleic acid code words induced by aminoglycoside antibiotics. The effect of drug concentration. *J Biol Chem* 1968; 243:3312-6
60. Davis BD, Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides. *Microbiol Rev* 1987; 51: 341-50
61. Davis BD, *et al.* Misread protein creates membrane channels: an essential step in the bactericidal action of aminoglycosides. *Proc Natl Acad Sci* 1986; 83:6164-8
62. Zimmerman JM, *et al.* In vivo selection of spectomycin-binding RNAs. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: 5425-35
63. Acosta MB, *et al.* Altered expression of oligopeptide-binding protein (OppA) and aminoglycoside resistance in laboratory and clinical *Escherichia coli* strains. *J Med Microbiol* 2000; 49: 409-13
64. Taber HW, *et al.* Bacterial uptake of aminoglycoside antibiotics. *Microbiol Rev* 1897; 51: 439-57
65. Kashiwagi K, *et al.* Increased of sensitivity to aminoglycoside antibiotics by polyamine-induced protein (oligopeptide-binding protein) in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1992; 174:4331-7
66. Kashiwagi K, *et al.* Relationship between spontaneous aminoglycoside resistance in *Escherichia coli* and a decrease in oligopeptide binding protein. *J Bacteriol* 1998; 180: 5484-8
67. Aires JR, *et al.* Aminoglycosides are captured from both periplasm and cytoplasm by the AcrD multidrug efflux transporter of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2005; 187: 1923-9
68. Rosenberg EY, *et al.* AcrD of *Escherichia coli* is an aminoglycoside efflux pump. *J Bacteriol* 2000; 183: 1754-6
69. Doi Y, *et al.* Plasmid-mediated 16S rRNA methylase in *Serratia marcescens* conferring high-level resistance to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 491-6

Bibliografía

70. Galimand M, *et al.* Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* due to 16S rRNA methylation. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:2565-71
71. Galimand M, *et al.* Worldwide disseminated armA aminoglycoside resistance methylase gene is borne by composite transposon Tn1548. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 49: 2949-53
72. Yokoyama K, *et al.* Acquisition of 16S rRNA methylase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet* 2003; 362:1888-93
73. Shaw KJ, *et al.* Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familiar relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev* 1993;57:138-63
74. Llano-Sotelo B, *et al.* Aminoglycosides modified by resistance enzymes display diminished binding to bacterial ribosomal aminoacyl-tRNA site. *Chem Biol* 2002; 9:455-63
75. Phillips I, *et al.* Aminoglycoside resistance. *Br Med Bull* 1984; 40: 28-35
76. Benveniste R, *et al.* Mechanisms of antibiotic resistance in bacteria. *Annu Rev Biochem* 1973. 42, p. 471-506.
77. Cundliffe E. How antibiotic-producing organisms avoid suicide. *Annu Rev Microbiol* 1989; 43: 207-33
78. Vanhoof R, *et al.* Nomenclature of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42:484
79. Davies J, *et al.* Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. *Trends Microbiol* 1997; 5: 234-40
80. Vicens Q, *et al.* Crystal structure of a complex between the aminoglycoside tobramycin and an oligonucleotide containing the ribosomal decoding A site. *Chem Biol* 2002; 9:747-55
81. Vicens Q, *et al.* Crystal structure geneticin bound to a bacterial 16S ribosomal RNA A site oligonucleotide. *J Mol Biol* 2003; 326:1175-88
82. Aguado JM, *et al.* <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/clinicos/> [En línea] 07/2010.
83. Mensa J, Gatell JM, Aranza JR, Domínguez-Gil A, García JE, Jiménez de Anta MT, Prats G. *Guía de Terapéutica Antimicrobiana*. 16^{ed}. Masson, Barcelona.2006.
84. Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, fifteenth informational supplement, CLSI document M100-S15. 2005
85. EUCAST and CLSI potency NEO-SENSITABS 2009 <https://rosco.docontrol.com>. [En línea] 07/2010.

Bibliografía

86. Mirelis B, *et al.* A simple phenotypic method for differentiation between acquired and chromosomal Amp^C beta-lactamases in *Escherichia coli*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006; 24: 370-2
87. Trower MK, *et al.* PCR cloning of a streptomycin phosphotransferase (*aphE*) gene from *Streptomyces griseus* ATCC 12475. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 4615.
88. Scholz P, *et al.* Complete nucleotide sequence and gene organization of the broad-host-range plasmid RSF1010. *Gene* 1989;75: 271-88
89. Hollingshead S, *et al.* Nucleotide sequence analysis of a gene encoding a streptomycin/spectinomycin adenylyltransferase. *Plasmid* 1985; 13:17-30
90. Oka A, *et al.* Nucleotide sequence of the kanamycin resistance transposon Tn903. *J Mol Biol* 1981;147: 217-26.
91. Cameron FH, *et al.* Nucleotide sequence of the AAD(2'') aminoglycoside adenylyl transferase determinant *aadB*. Evolutionary relationship of this region with those surrounding *aadA* in R538-1 and *dhfrII* in R388 *Nucleic Acids Res* 1986; 14: 8625-35
92. Allmansberger R, *et al.* Genes for gentamicin-(3)-N-acetyl-transferases III and IV. II. Nucleotide sequences of three AAC(3)-III genes and evolutionary aspects. *Mol Gen Genet* 1985; 198: 514-20
93. Tenover FC, *et al.* Cloning and sequencing of a gene encoding an aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase from an R factor of *Citrobacter diversus*. *J Bacteriol* 1988; 170: 471-3
94. Nobuta K, *et al.* Sequencing and expression of the 6'-N-acetyltransferase gene of transposon Tn1331 from *Klebsiella pneumoniae*. *J Bacteriol* 1988; 170:3769-73
95. Shaw KJ, *et al.* Characterization of the chromosomal *aac(6')-Ic* gene from *Serratia marcescens*. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36:1447-55
96. Wohlleben W, *et al.* On the evolution of Tn21-like multiresistance transposons: sequence analysis of the gene (*aacCI*) for gentamicin acetyltransferase-3-I, another member of the Tn21-based expression cassette. *Mol Gen Genet* 1989; 217(2-3):202-8.
97. Schwocho LR, *et al.* Cloning and characterization of a 3-N-aminoglycoside acetyltransferase gene, *aac(3)-Ib*, from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:1790-6
98. Rather PN, *et al.* Characterization and transcriptional regulation of the 2'-N-acetyltransferase gene from *Providencia stuartii*. *J Bacteriol* 1993; 175: 6492-8
99. web Laboratorio de Microbiología Hospital de la Santa Creu i Sant Pau <http://www.santpau.es/santpau/activitats/inicioMicrobiologia.htm> [En línea] 07/2010
100. Baquero F. Patrones de sensibilidad a antimicrobianos de *Enterobacteriaceae* causantes de infecciones intrabdominales en España: resultados del estudio SMART 2003. *Rev Esp Quimioter* 2006; 19: 52-59
101. Picazo JJ, *et al.* Vigilancia de resistencias a los antimicrobianos: estudio VIRA 2006. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006; 24: 617-28

Bibliografía

102. EUCAST http://www.eucast.org/eucast_disk_diffusion_test/breakpoints/ [En línea] 07/2010.
103. Över U, *et al.* The changing nature of aminoglycoside resistance mechanisms and prevalence of newly recognized resistance mechanisms in Turkey. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7:470-8