

**ROL DE INTEGRONES Y CASSETTES GENETICOS EN LA
RESISTENCIA DE *Acinetobacter baumannii* A ANTIBIOTICOS
AMINOGLICOSIDOS**



**POR
GERARDO ENRIQUE GONZALEZ ROCHA**



**TESIS PRESENTADA A
ESCUELA DE GRADUADOS DE LA UNIVERSIDAD DE CONCEPCION**

**PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
MENCION BIOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR**

**CONCEPCION-CHILE
2002**

RESUMEN

Acinetobacter baumannii es un microorganismo que constituye un serio problema hospitalario, por ser agente causal de variadas infecciones nosocomiales, principalmente en pacientes inmunodeprimidos en las unidades de cuidados intensivos. El principal problema de esta bacteria es su elevada y amplia resistencia a los antibióticos comúnmente usados en terapia antiinfecciosa, incluyendo antibióticos β -lactámicos, aminoglicósidos y quinolonas.

Los antibióticos aminoglicósidos constituyen un grupo importante de compuestos bactericidas que, asociados a los antibióticos β -lactámicos, logran efectos sinérgicos, especialmente sobre bacilos Gram negativos. Esta propiedad determina su amplio uso a nivel hospitalario, ejerciendo una fuerte presión selectiva que ha llevado a una rápida y creciente selección de bacterias resistentes. El principal mecanismo de resistencia a estos antibacterianos se basa en la síntesis de enzimas modificantes de aminoglicósidos (EMAs) que acetilan grupos amidógenos o fosforilan o adenilan ciertos grupos hidroxilos. Los genes de EMAs son variados y pueden localizarse en plásmidos, transposones o *cassettes* genéticos de resistencia insertos en integrones. Estos últimos, constituyen una familia de elementos genéticos potencialmente móviles capaces de integrar y expresar genes de resistencia a antibióticos.

La multiresistencia que presentan las cepas de *A. baumannii* no ha podido ser totalmente fundamentada en la presencia de plásmidos de resistencia, ya que aquellos detectados en esta bacteria no siempre se relacionan con la resistencia a antibióticos.

En esta Tesis se evaluó la actividad de amikacina, gentamicina, kanamicina, neomicina, netilmicina, tobramicina, estreptomina, trimetoprim, cloranfenicol, sulfametoxazol y tetraciclina sobre 486 cepas de *A. baumannii* aisladas en diversos hospitales de Chile entre 1990 y 1998. El perfil de EMAs de las cepas se dedujo a partir de su patrón de resistencia a antibióticos aminoglicósidos, pero también se intentó la identificación de los genes que codifican estas enzimas en algunas cepas. Se determinó la prevalencia de integrones de las clases 1, 2 y 3 en 254 cepas y se caracterizó la zona variable de integrones clase 1 y clase 2 en un grupo seleccionado de ellas.

Los resultados indicaron que las cepas de *A. baumannii* aisladas en hospitales chilenos presentan elevada resistencia a los antibióticos aminoglicósidos, especialmente a gentamicina (> 85 %), estreptomina (> 87 %) y neomicina (> 80 %), con amikacina como el antibiótico más activo, pero con frecuencia de resistencia elevada (> 50 %). La mayor frecuencia de cepas resistentes se encontró entre las cepas de 1994 (> 90 %). Frente a todos los aminoglicósidos el nivel de resistencia fue elevado, con valores de CMI₅₀ que sobrepasan el límite de resistencia establecidos. Todas las cepas fueron resistentes a cloranfenicol y la resistencia a trimetoprim y sulfametoxazol fue elevada (> 85 %). Tetraciclina exhibió niveles de resistencia moderados, con valores de CMI₅₀ que variaron entre 4 µg/ml y 16 µg/ml; sin embargo, la frecuencia de cepas resistentes fue elevada. La mayor frecuencia de resistencia a todos los antibióticos se encontró en las cepas del biotipo 9 (≥ 75 %).

Experimentos de curación permitieron relacionar un plásmido de más de 30 kb con la resistencia a amikacina, neomicina y kanamicina, específicamente por la pérdida del gen *aph(3')VIa* en las cepas curadas.

La mayoría de las cepas posee integrones (68,1 %), siendo más prevalente la clase 2 (64,2 %), principalmente en las cepas del biotipo 9. La mayoría de los integrones caracterizados presentó una estructura similar a la encontrada en el transposón Tn7, ya que en ellos se detectaron los *cassettes* genéticos *dfrA1* y *ant(3'')Ia*. En una cepa se comprobó, además, la integración del gen *cat*, que codifica resistencia a cloranfenicol, entre los genes *intI2* y *dfrA1*. En otra cepa, no fue posible determinar los genes insertos en esta región.

Sólo once cepas (4,3 %) del biotipo 6 presentaron un integrón clase 1. En todas ellas se encontró el *cassette* genético *aac(6')Ib* inserto en la zona variable, justificando la resistencia a amikacina, tobramicina y netilmicina. No se detectaron integrones clase 3 en las cepas de *A. baumannii* estudiadas.

La resistencia a amikacina, netilmicina y tobramicina, fue mayor en cepas con integrón que en aquellas que no los poseen, pero frente al resto de los antibióticos no hubo grandes diferencias entre ambos grupos de cepas. Los patrones de resistencia fueron más amplios en las cepas con integrón, incluyendo a siete o más antibióticos.

En las cepas con integrón clase 2 los patrones de resistencia a los antibióticos aminoglicósidos permitió deducir una gran variedad de EMAs, siendo ANT(3'')-Ia y AAC(3) las prevalentes, con frecuencias de 98,8 % y 87,5 %, respectivamente. En menor frecuencia (68,8 %) se dedujo las enzimas APH(3') y AAC(6')Ib. En las cepas sin integrón las enzimas más frecuentes fueron

ANT(3'')-I ó APH(3'')-I, AAC(3) y APH(3') (96,3 %, 57,5 % y 43,8 %, respectivamente). La EMA APH(3')-V, no descrita con anterioridad en *Acinetobacter* spp., fue inferida en once cepas *intI2*⁺ y en dos cepas sin integrón. Además, la EMA ANT(4')-II, igualmente no informada anteriormente en esta bacteria, se dedujo en dos cepas *intI2*⁺.

Los resultados de este estudio demuestran que la elevada resistencia de cepas de *A. baumannii*, aisladas en hospitales de Chile, se fundamenta en la síntesis de una variada gama de EMAs, cuyos genes no siempre están codificados en *cassettes* genéticos de resistencia insertos en un integrón.

