

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
ESCUELA DE GRADUADOS



Bombas de eflujo de antibacterianos en
cepas de bacilos Gram negativos
aislados de hospitales y su relación con
la resistencia a quinolonas

Por

Daniel Mauricio Ibáñez Cabrera

TESIS DE MAGISTER PRESENTADA A LA ESCUELA DE GRADUADOS DE LA
UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER
EN CIENCIAS, MENCIÓN MICROBIOLOGÍA

Concepción, Chile

2006

Resumen

Las quinolonas son un grupo de agentes antibacterianos que ha sido utilizado en el tratamiento de infecciones, tanto hospitalarias como de la comunidad. Este grupo de agentes antibacterianos posee como blanco de acción dos enzimas involucradas en la replicación del ADN: ADN girasa y topoisomerasa IV. La interacción de las quinolonas con el complejo formado por el ADN y una de estas enzimas causa la inhibición de la síntesis del ADN bacteriano y, por tanto, la muerte bacteriana. El uso extensivo de estos agentes antibacterianos ha conducido a la selección de cepas bacterianas resistentes. El principal mecanismo de resistencia está dado por la mutación de los genes que codifican para ADN girasa y topoisomerasa IV, ocurriendo estas mutaciones en una zona llamada “*quinolone resistance determining region*” (QRDR). Otro mecanismo de resistencia es la disminución de la concentración intracelular del antibiótico debido a sistemas de bombas de eflujo los que expulsan el antibiótico al exterior de la célula. En bacilos Gram negativos se ha descrito distintas familias de bombas de eflujo, siendo la superfamilia RND la principal familia involucrada en la expulsión activa de los antibióticos. En esta familia dos sistemas han sido bien caracterizados: Mex en *Pseudomonas aeruginosa* y Acr en *Escherichia coli* y otras enterobacterias, los cuales no sólo proporcionan resistencia a quinolonas sino también a otros agentes antibacterianos, otorgando multiresistencia a la bacteria.

En esta tesis se estudiaron 100 cepas de bacilos Gram negativos resistentes a quinolonas de primera, segunda o tercera generación y 50 cepas de bacilos Gram negativos susceptibles a quinolonas. Las cepas fueron aisladas, entre los años 1998-2004, de muestras clínicas en diversos hospitales de Chile. Se determinaron los patrones y niveles de

resistencia mediante los métodos de difusión en agar y dilución seriada en agar, respectivamente. La participación de bombas de eflujo se detectó mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) en presencia y ausencia del inhibidor de bombas de eflujo MC 207,110. Los genes estructurales de algunas bombas de eflujo se detectaron empleando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Los resultados mostraron que la gran mayoría de las cepas (89%) presentó resistencia a todas las quinolonas ensayadas, además un alto porcentaje presentaba resistencia a antibióticos aminoglicósidos y β -lactámicos. Los mayores niveles de resistencia se manifestaron frente a ácido nalidíxico, aunque frente a ciprofloxacina los niveles de resistencia de las cepas de bacilos Gram negativos fermentadores y no fermentadores también fueron elevados, con CMI₉₀ de 128 μ g/ml y 256 μ g/ml, respectivamente. Para levofloxacina y moxifloxacina se manifestaron niveles de resistencia inferiores con CMI₉₀ de 64 y >64 μ g/ml, respectivamente. En todos los casos, las CMI sobre los bacilos Gram negativos no fermentadores, fueron levemente mayores que las observadas sobre bacilos Gram negativos fermentadores.

Al determinar la participación de las bombas de eflujo en la resistencia a quinolonas, se observó que en 83% y 95% de las cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, respectivamente, las bombas expulsan quinolonas, siendo levofloxacina y moxifloxacina las principales fluoroquinolonas expulsadas. En las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* se encontró que en 75% de las cepas las bombas expulsaron las fluoroquinolonas ensayadas, en cambio, en un bajo porcentaje (23%) de las cepas de *Acinetobacter baumannii* se evidenció expulsión de quinolonas. En cepas susceptibles, se observó la expulsión de todas las quinolonas ensayadas, sin embargo, la frecuencia de

cepas que expulsan quinolonas fue menor que el observado en las cepas resistentes. En un bajo porcentaje de las cepas de las distintas especies ensayadas se evidenció la participación de bombas de eflujo en la resistencia a los antibióticos aminoglicósidos y β -lactámicos.

Al investigar los genes que codifican proteínas estructurales de las bombas de eflujo se detectó la presencia del gen *acrA* en 89% de las cepas de *K. pneumoniae* resistentes a quinolonas y en 57% de las cepas susceptibles. En *E. coli* se detectó la presencia del gen *acrB* en 83% de las cepas resistentes y en 100% de las cepas susceptibles a quinolonas. En *P. aeruginosa* se detectó el gen *mexA* en 84% de las cepas resistentes y en 93% de las cepas susceptibles y, además, se encontró el gen *mexX* en 74% y 86% de las cepas resistentes y susceptibles, respectivamente. Por otra parte, en *A. baumannii* el gen *adeB* se detectó en todas las cepas ensayadas.

Estos resultados nos indican que los sistemas de eflujo activo en bacilos Gram negativos tienen una importante participación en la resistencia a quinolonas. Además, también actuarían, aunque en menor frecuencia, en cepas susceptibles, ya que al ser inhibidos aumenta la susceptibilidad hacia estos agentes antibacterianos. Sin embargo, los sistemas de eflujo investigados no tienen una participación relevante en la resistencia a otros grupos de agentes antibacterianos, específicamente antibióticos β -lactámicos y aminoglicósidos, donde la modificación enzimática sería el principal mecanismo de resistencia para estos antibióticos. Sin embargo, la presencia, en forma conjunta, de distintos mecanismos de resistencia ayudaría a otorgar niveles de resistencia más elevados, contribuyendo al fenotipo de multiresistencia de las cepas bacterianas.