

# Resistencia a los antimicrobianos y virulencia bacteriana

## Introducción

La infección bacteriana es un proceso complejo en el que tiene un papel importante, no sólo la bacteria infecciosa, sino también el huésped. De hecho, parte importante de los problemas derivados de la infección se deben a la respuesta del huésped a la misma. Además, hay situaciones fisiológicas o clínicas que favorecen la infección (p. ej., inmunodepresión, intubación, cateterización, etc.). Así, es bien conocido que hay patógenos (patógenos oportunistas) que sólo infectan a individuos inmunodeprimidos, con roturas en las barreras epiteliales o con otras enfermedades previas<sup>1</sup>. Estos patógenos oportunistas son la mayor fuente de infección en los hospitales<sup>2</sup>. Por otra parte, en los últimos años se ha comenzado a desvelar la existencia de una base genética que justifica una mayor o menor predisposición de cada individuo a cada tipo de infección<sup>3</sup>. En este panorama de interacción huésped/patógeno hay un nuevo elemento que no es fruto de la evolución natural, sino de la "evolución cultural" humana. Este elemento son los antimicrobianos. Los antimicrobianos han sido excepcionalmente eficaces en el tratamiento de la infección, de modo que incluso cuando fallan las respuestas antiinfecciosas del huésped (p. ej., pacientes inmunodeprimidos) es posible luchar contra la enfermedad. Sin embargo, las bacterias se han hecho resistentes a los mismos. Con muy escasas excepciones, hemos de asumir que una vez un antibiótico se ha introducido en el mercado, la aparición de estirpes resistentes al mismo es sólo un problema de tiempo<sup>4</sup>.

De hecho, desde el punto de vista de la bacteria, hoy en día, para poder producir de modo eficaz una infección, sobre todo en el ambiente hospitalario que está saturado de antimicrobianos, es necesario ser virulenta, pero también resistente a los antibacterianos<sup>5</sup>. Hemos de tener en cuenta sin embargo que la adquisición de un fenotipo de resistencia a los antimicrobianos puede producir cambios en la fisiología microbiana<sup>6</sup>, de modo que los parámetros de infección de las bacterias resistentes no sean exactamente los mismos que los de las bacterias sensibles. Para poder elaborar estrategias más eficaces para el tratamiento de la infección es, por tanto, necesario comprender las bases de la interrelación entre virulencia y resistencia a los antimicrobianos (fig. 1) para intentar predecir su evolución en un futuro<sup>5</sup>. Un aspecto esencial en la virulencia microbiana que a menudo se olvida es el estado del huésped<sup>7</sup>. Además, hemos de tener en cuenta que un porcentaje considerable de las infecciones debidas a patógenos oportunistas están producidas por bacterias medioambientales. Para poder infectar a un número suficiente de individuos, el patógeno oportunista requiere por tanto persistir en el medio ambiente. Los patógenos oportunistas son con frecuencia bacterias medioambientales que infectan tan sólo a individuos debilitados, inmunodeprimidos o con patologías previas y que habitualmente están bajo tratamiento antibiótico. Para que un patógeno oportunista sea eficaz, debe por tanto ser virulento, resistente a los antimicrobianos y capaz de persistir en el medio ambiente no hospitalario.

## Determinantes comunes de virulencia bacteriana y resistencia a los antimicrobianos

Un elemento importante cuando se analiza la interrelación entre la resistencia a los antimicrobianos y la virulencia microbiana es si existen mecanismos comunes implicados en ambos fenómenos. La primera pregunta sería saber si la infección, o al menos ciertos tipos de infección, puede favorecer situaciones de resistencia fenotípica<sup>8</sup> que no son detectables mediante los habituales ensayos *in vitro* de antibiograma.

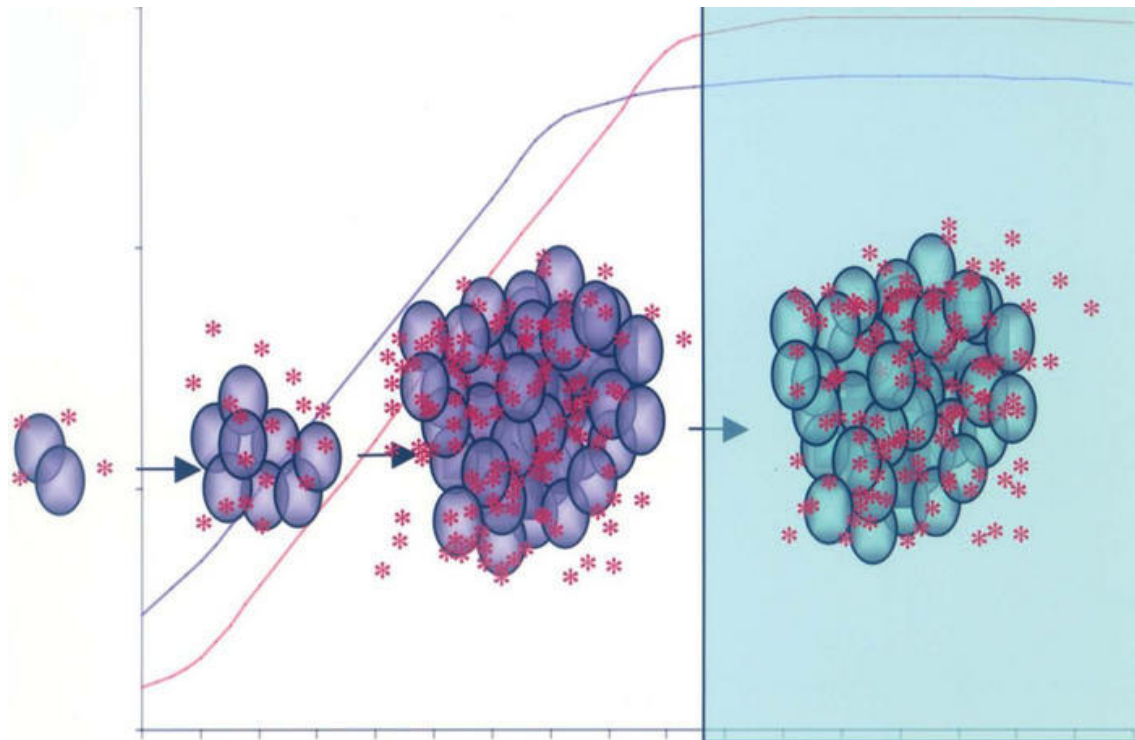
Un ejemplo concreto de esta situación son los patógenos intracelulares. Hay muchas bacterias que son capaces de invadir las células de mamíferos a incluso viajar de célula a célula a través de protusiones de la membrana sin necesidad de entrar en contacto con el medio extracelular<sup>9</sup>. Se sabe, por otra parte, que las células de mamíferos no son totalmente permeables a ciertos antimicrobianos y que un bajo pH, como el que se encuentra en los fagolisosomas, puede asimismo disminuir la bioactividad de ciertos antimicrobianos<sup>10</sup>. Como consecuencia de ello, puede ocurrir que los patógenos intracelulares no respondan adecuadamente a la terapia cuando están dentro de las células. Además de ello, se ha descrito que la localización intracelular puede producir modificaciones<sup>11</sup> en las proteínas fijadoras de penicilina, que son el blanco de acción de los betalactámicos. Aunque no se ha estudiado en detalle, dichas modificaciones podrían alterar la sensibilidad a esta familia de antimicrobianos cuando las bacterias crecen intracelularmente. Un ejemplo de esta falta de sensibilidad lo tenemos en el caso de *Legionella pneumophila*, que puede adquirir de modo transitorio un fenotipo de resistencia a los antimicrobianos cuando crece dentro de las células del huésped<sup>12</sup>.

Otro ejemplo que ha recibido bastante atención en los últimos años es la formación de biocapas y su papel en la resistencia fenotípica. Las bacterias forman frecuentemente biocapas cuando están produciendo infecciones crónicas y también en el caso de infecciones asociadas a cuerpos extraños, como prótesis o catéteres. Se ha descrito que las biocapas bacterianas son más resistentes a los antimicrobianos que las bacterias planctónicas<sup>13</sup>, aunque hay todavía un importante debate sobre las causas de dicha resistencia (la estructura de la biocapa que impide la entrada de los antimicrobianos o el estado metabólico de las bacterias creciendo en la biocapa<sup>14</sup>), el hecho de que las bacterias sean más resistentes cuando están creciendo de este modo hace que se haya propuesto y desarrollado un sistema específico para analizar la resistencia a los antimicrobianos de bacterias que crecen formando biocapas<sup>15</sup>.

Además de la resistencia fenotípica asociada a la infección, se han descrito algunos ejemplos de genes que tienen un papel, tanto en resistencia a los antimicrobianos como en virulencia bacteriana. En los últimos años, el estudio de los sistemas de bombeo múltiple de drogas (MDR del inglés *multidrug resistance*) ha suscitado un gran interés<sup>16</sup>. Las bombas MDR están distribuidas de modo ubicuo en todos los organismos analizados hasta el momento. Además de ello, cada especie bacteriana posee un repertorio de bombas MDR que está presente en todas sus estirpes. Por último, la expresión de las bombas MDR está reprimida, al menos bajo condiciones de cultivo *in vitro*. Los sistemas MDR son capaces de expulsar desde el interior celular una amplia gama de compuestos, estando implicados en la resistencia intrínseca a los mismos. Además, el tratamiento con antimicrobianos selecciona mutantes resistentes (habitualmente de bajo nivel) en los que la expresión de los sistemas MDR está desreprimida<sup>16</sup>, de modo que los sistemas MDR contribuyen también a la resistencia adquirida.

A pesar de que los sistemas MDR se caracterizaron inicialmente como sistemas de resistencia a los antimicrobianos, es difícil pensar que su función fisiológica esencial sea tan sólo dicha resistencia. En el caso de bacterias patógenas, cabe la posibilidad de que los sistemas MDR pudieran contribuir a su virulencia. Esta posibilidad ha sido explorada en algunos casos: para producir una infección, las bacterias deben ser capaces de resistir la acción de diferentes compuestos antibacterianos producidos por el huésped. Dentro de este tipo de compuestos cabe citar las sales biliares, los ácidos grasos de cadena larga y los péptidos antimicrobianos catiónicos. Las sales biliares se encuentran en el ecosistema intestinal, de modo que las enterobacterias, para poder establecerse en dicho ecosistema, han desarrollado sistemas de resistencia a estos compuestos. El mejor caracterizado es el sistema AcrAB<sup>17</sup>, uno de los primeros sistemas MDR que se caracterizaron en bacterias. Se ha visto que, además de contribuir a la resistencia múltiple a fármacos, AcrAB está implicado en la resistencia a sales biliares en enterobacterias<sup>17</sup>, hasta tal punto que un mutante de *Salmonella enterica* serotipo *Typhimurium* defectivo en AcrAB es avirulento en un modelo de ratón<sup>18</sup>. De modo semejante, el sistema MDR CmeABC confiere resistencia a un amplio grupo de antimicrobianos y es necesario para la colonización del sistema gastrointestinal en un modelo aviar por parte de *Campylobacter jejuni*<sup>19</sup>. Tenemos por tanto una situación en la cual la resistencia a los antimicrobianos y la virulencia bacteriana están ligadas en el mismo gen. De modo semejante, los ácidos grasos de cadena larga y los péptidos antimicrobianos, que están presentes en las superficies mucosas, tienen acción antimicrobiana. Las bacterias que colonizan dichas superficies han desarrollado sistemas para resistir estos antimicrobianos. En muchos casos dichas estrategias están basadas en la expulsión de los antibacterianos. Por ejemplo, se ha descrito que los sistemas MDR MtrCDE y FarAB expulsan ácidos grasos y péptidos antimicrobianos y son necesarios para la colonización de mucosas por parte de *Neisseria gonorrhoeae*. Sin embargo, el efecto de ambos sistemas es diferente. La bomba de expulsión MtrCDE es necesaria para la infección genital en un modelo de hembras de rata<sup>20</sup>, mientras que datos epidemiológicos en humanos han demostrado que el sistema FarAB es necesario para la colonización en infecciones rectales<sup>21</sup>. Esto demuestra que la función de los sistemas MDR no es inespecífica, sino que cada uno de ellos puede servir para colonizar exclusivamente un hábitat concreto entre aquellos en los cuales la bacteria puede producir una infección.

Un último aspecto en el que los sistemas MDR tienen un papel importante es en la señalización intercelular. Ciertas especies bacterianas son capaces de determinar la densidad de población en un lugar determinado. Cuando el número de individuos sobrepasa un cierto límite, se dispara una respuesta denominada *quorum sensing* (QS) que provoca cambios en la transcripción de un considerable número de genes bacterianos (fig. 2). Una de las bacterias en las que la respuesta QS está mejor estudiada es *Pseudomonas aeruginosa*<sup>22</sup>. En esta especie microbiana, la respuesta QS dispara la transcripción de un número elevado de factores de virulencia. *P. aeruginosa* contiene en su genoma al menos diez sistemas MDR (<http://www.pseudomonas.com>). Se ha determinado que alguno de ellos es capaz de expulsar señales QS<sup>23-25</sup>. Esto quiere decir que la expresión de genes de resistencia a los antimicrobianos (MDR) y de virulencia (QS) está integrada en una red compleja de señalización intercelular que responde a señales medioambientales, como podría ser la respuesta a infección. Algo semejante (aunque en este caso no debido a la respuesta QS) ocurre también en el caso de *Escherichia coli*. En esta especie existe un regulón (Mar, de *Multiple antibiotic resistance*) que comprende genes implicados en virulencia, respuesta a estrés oxidativo (como el producido por los macrófagos) y determinantes de resistencia a los antimicrobianos, como el anteriormente citado AcrAB<sup>26</sup>. El regulón Mar está presente en otras enterobacterias y tiene una implicación clara en la respuesta simultánea a situaciones de infección y de presencia de antimicrobianos.



**Figura 2.** Respuesta *quórum sensing* (QS). Los sistemas de respuesta QS se basan en la presencia de una molécula señal y un receptor intracelular que a su vez es un factor de transcripción. Cuando una población bacteriana se multiplica (línea azul), produce constantemente la señal QS (línea roja). Cuando dicha señal alcanza una concentración umbral, se une al receptor (zona verde) y la actividad del mismo modifica la transcripción de un cierto número de genes (regulón QS).

### **Selección cruzada de virulencia bacteriana y resistencia a los antimicrobianos**

Las bacterias pueden hacerse resistentes a los antimicrobianos, bien por mutación, bien como consecuencia de la adquisición de genes de resistencia. En este último caso, los genes de resistencia pueden residir en plásmidos que contengan otros genes que permitan su selección en ambientes en los cuales no haya presión selectiva por antimicrobianos<sup>27</sup>. Un ejemplo de esta situación es el de los plásmidos de resistencia a sulfamidas. A pesar de que estos antimicrobianos se han dejado de usar, estudios realizados en Inglaterra han demostrado que la resistencia a las sulfamidas no ha disminuido<sup>28</sup>. El análisis de los plásmidos que contienen los genes de resistencia a sulfamidas demostró que en muchos casos estamos en presencia de plásmidos de multiresistencia, con genes que confieren resistencia a otros antimicrobianos que aún se están utilizando en clínica<sup>28</sup>.

Una situación semejante podría producirse en el caso de genes de resistencia contenidos en plásmidos que a su vez contengan genes de virulencia<sup>29</sup>. En este caso, una situación infectiva puede coseleccionar los genes de resistencia a los antimicrobianos. Los plásmidos *vir* (de virulencia) son relativamente frecuentes en las bacterias patógenas. Alguno de dichos plásmidos se han secuenciado y se ha visto que en ocasiones contienen genes de resistencia a los antimicrobianos<sup>3</sup>. La presencia de genes de resistencia y virulencia en el mismo elemento génico permiten la coselección de ambos determinantes: en situaciones no infectivas pero en presencia

de antimicrobianos, el determinante de resistencia permite la selección del factor de virulencia, mientras que en situación de infección, la presencia del factor de virulencia garantiza el mantenimiento del plásmido, y por tanto de los genes de resistencia a los antimicrobianos, incluso en ausencia de presión selectiva. Estos elementos son por tanto claves en la evolución conjunta de la resistencia a los antimicrobianos y la virulencia bacteriana.

## Coste y compensación de la resistencia a los antimicrobianos

Los antimicrobianos ejercen su acción sobre elementos básicos para el funcionamiento de las bacterias. Si una bacteria adquiere resistencia por mutación, esto producirá cambios estructurales en dichos elementos básicos. Se puede prever, por tanto, que la eficiencia metabólica del mutante resistente a los antimicrobianos será menor<sup>6</sup> que en el caso de la bacteria sensible (menor *fitness*). Si es cierta esta asunción, eso significa que si se retira un cierto tipo de antimicrobianos por un período de tiempo, las poblaciones bacterianas sensibles pueden desplazar a las resistentes aliviando de este modo el problema de la resistencia a los antimicrobianos. Esto ha llevado a proponer y en ocasiones ejecutar estrategias cíclicas de tratamiento con antimicrobianos<sup>30</sup>: durante un cierto período de tiempo se utilizarían una serie de familias de antimicrobianos y, pasado este período, se retirarían del tratamiento y se utilizarían otras familias estructuralmente distintas y con otros blancos de acción. Esta estrategia eventualmente debería permitir que la resistencia a ciertas familias de antimicrobianos disminuyera en el espacio de tiempo durante el cual no son utilizados.

A pesar de su consistencia teórica, la utilización de esta estrategia no ha dado resultados concluyentes. Por ello, resulta necesario analizar más en detalle la interrelación entre un fenotipo de resistencia y la virulencia microbiana. En primer lugar es necesario evitar generalizaciones. La resistencia a los antimicrobianos puede producir efectos distintos dependiendo de la especie bacteriana y el tipo de resistencia implicados. En segundo lugar, el coste de la resistencia puede ser diferente en función del ambiente (infectivo o no) en el que estén creciendo las bacterias. Esto es especialmente relevante, porque el coste de la resistencia a los antimicrobianos no tiene forzosamente que ser igual *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, es fácil seleccionar *in vitro* mutantes de *Salmonella* con resistencia de alto nivel a quinolonas. Sin embargo, dichos mutantes no son frecuentes *in vivo*, lo que ha llevado a elaborar la hipótesis de que el coste asociado a dicha resistencia sería excesivo para que este tipo de mutantes se seleccionara y diseminara en la naturaleza<sup>31</sup>. Por último, los mutantes resistentes a los antimicrobianos, con un *fitness* menor que las bacterias susceptibles, pueden acumular mutaciones que compensen el efecto de la resistencia sobre el metabolismo microbiano<sup>32</sup>. De este modo, las bacterias continuarían siendo resistentes, pero el efecto de la resistencia sobre el metabolismo quedaría eliminado. Este tipo de situación se ha analizado *in vitro* y se ha llegado a la conclusión de que, efectivamente, al menos en los casos estudiados, las bacterias resistentes con un *fitness* reducido acumulan mutaciones que eliminan dicho defecto haciéndolas incluso más competitivas que las bacterias sensibles originales. Si esta fuera la situación en todos los casos, una estrategia cíclica de uso de los antimicrobianos como la descrita anteriormente no tendría ningún valor.

Es difícil, sin embargo, hacer generalizaciones. Como ya se ha dicho, la eliminación del uso de sulfamidas en Inglaterra no ha producido un descenso en paralelo de la prevalencia de aislados resistentes a las mismas<sup>28</sup>. Como vimos anteriormente, esto es debido posiblemente a que dicha resistencia es esencialmente plasmídica y el

mantenimiento de los plásmidos implicados está favorecido por la presencia en los mismos de otros genes de resistencia a los antimicrobianos. Recientemente se ha demostrado que la presencia de estos plásmidos puede mejorar el *fitness* bacteriano incluso en ausencia de presión selectiva<sup>33</sup>.

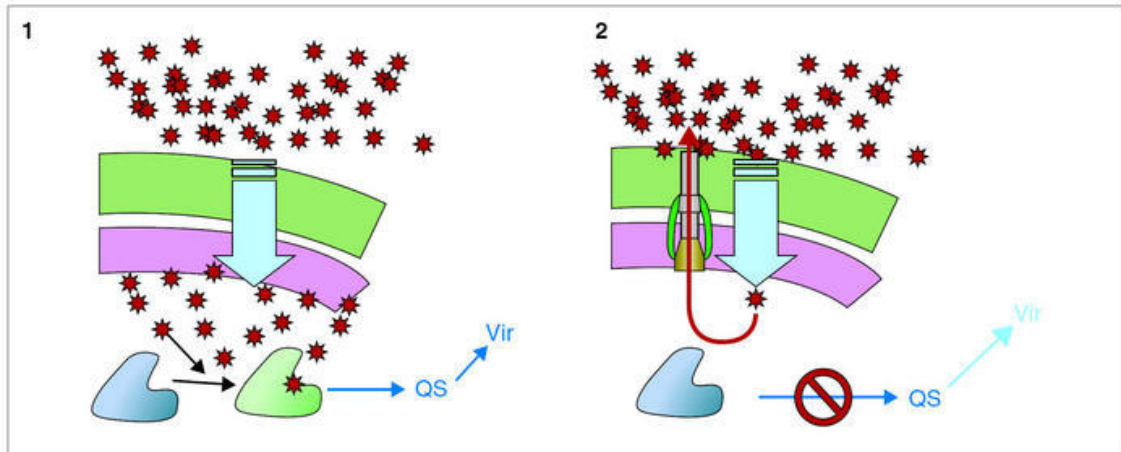
Sin embargo, la reducción en el uso de avoparcina en la alimentación animal ha producido una disminución de la resistencia a glucopéptidos en bacterias que infectan animales y también pueden infectar seres humanos<sup>34</sup>. Esta experiencia nos indica que puede haber situaciones en las que no sea posible paliar el coste debido a la resistencia a los antimicrobianos, a pesar de los resultados que se observen en experimentos realizados *in vitro*. De hecho, se ha demostrado que el tipo de mutaciones compensatorias que se seleccionan *in vitro* e *in vivo* son diferentes<sup>32</sup>. Si pensamos que las bacterias pueden tener distinto tipo de actividad metabólica en función del nicho ecológico en el que vivan, está claro que los tipos de compensación han de ser necesariamente distintos. En el caso de bacterias que ocupen diferentes hábitats, las mutaciones que compensen los defectos en alguno de dichos hábitats pueden ser perjudiciales para sobrevivir en otros (fig. 3). Por ejemplo *P. aeruginosa*, además de infectar humanos, puede infectar otros animales, plantas y colonizar ecosistemas acuáticos y terrestres. Cuando una cepa ambiental de *P. aeruginosa* produce una infección (bacterias verdes en la figura), puede hacerse resistente a los antimicrobianos (bacterias rojas). Dado que la adquisición de un fenotipo de resistencia conlleva con frecuencia una disminución del *fitness* bacteriano, las bacterias resistentes a los antimicrobianos acumulan con frecuencia mutaciones "compensatorias" (bacterias azules). Sin embargo, cuando estas bacterias vuelven al medio ambiente no infectivo, tienen que competir con las poblaciones previamente presentes en el mismo. Se ha descrito que las mutaciones que compensan los defectos de *fitness* son diferentes en los distintos ecosistemas<sup>32</sup>. Esto justificaría el hecho de que, a pesar de que se pueden seleccionar durante la infección mutaciones que compensen los defectos asociados a la resistencia, las bacterias resistentes sean incapaces de competir y desaparezcan en medioambientes no infectivos y sin presión selectiva de antimicrobianos.



**Figura 3.** Coste y compensación de la resistencia a los antimicrobianos en distintos ecosistemas. Los patógenos oportunistas de vida libre pueden colonizar distintos ecosistemas, de modo que la adaptación a todos ellos es un requisito necesario para su eficacia colonizadora.

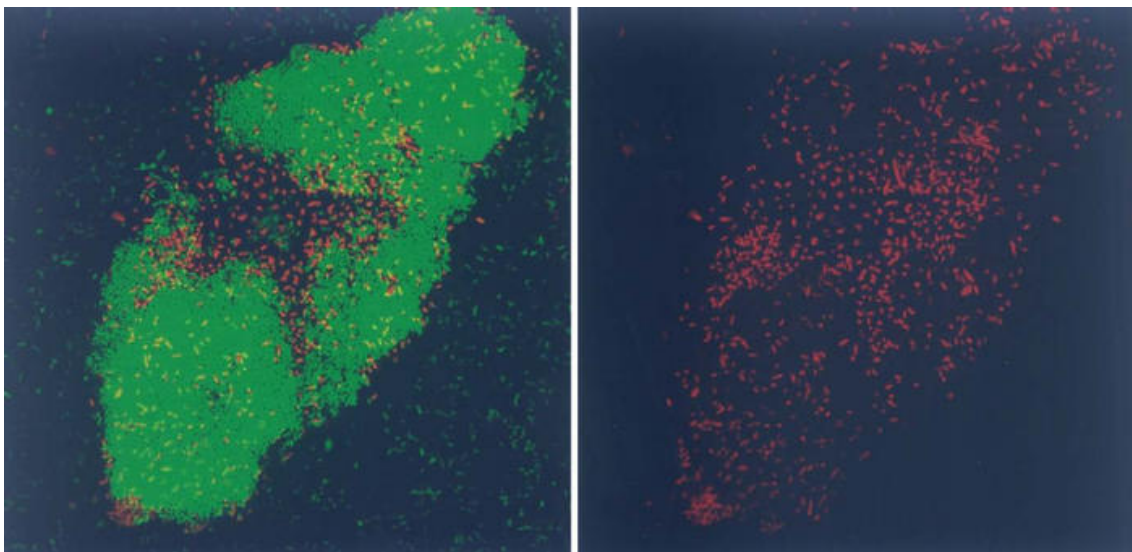
Además de analizar el efecto de la resistencia a los antimicrobianos sobre el metabolismo general bacteriano, es necesario conocer, de un modo específico, dicho efecto sobre la virulencia bacteriana. Diversos trabajos han mostrado que con frecuencia las bacterias resistentes son menos virulentas, al menos utilizando modelos en el laboratorio<sup>35</sup>. Aunque en muchos casos se desconocen las causas de esta menor virulencia, en ocasiones se han podido determinar los mecanismos moleculares subyacentes. Por ejemplo, cuando se obtienen mutantes que expresan constitutivamente los sistemas MDR de *P. aeruginosa* implicados en QS, el nivel de acumulación intracelular de dicha señal es bajo y la respuesta QS no se dispara. Como consecuencia de esta situación, las bacterias producen bajos niveles de factores de virulencia y son menos virulentas<sup>36,37</sup> que las bacterias sensibles (fig. 4). Otro ejemplo interesante es la resistencia a isoniazida de *Mycobacterium tuberculosis*. La isoniácida es un proantibiótico que necesita activarse en el interior celular. La activación la hace la proteína KatG. Mutaciones en *katG* producen por tanto resistencia a isoniazida<sup>38</sup>. Además de esta actividad, KatG es una superoxidodismutasa, posiblemente implicada en la respuesta al ataque por macrófagos y con un papel esencial en la virulencia de *M. tuberculosis*<sup>39</sup>. Se ha visto que ciertos mutantes *katG* resistentes a isoniazida son menos virulentos en modelos animales. Sin embargo, hay otras mutaciones en dicho gen que no conllevan una reducción en dicha virulencia<sup>40</sup>. Incluso en el caso de los mutantes avirulentos, pueden aparecer mutantes que compensan esta mayor sensibilidad a estrés oxidativo mediante la sobreexpresión de la alkilhidroperoxidasa AhpC<sup>41</sup>.





**Figura 4.** Efecto de la sobreproducción de sistemas MDR (*multidrug resistance*) en la virulencia bacteriana. Se ha descrito que hay sistemas MDR que expulsan al exterior celular las señales QS (véase texto). En situación normal, las bacterias disparan la producción de factores de virulencia (panel 1) cuando se sobrepasa una concentración umbral de señal QS. Si una bomba MDR expulsa dicha molécula, no se alcanza la concentración intracelular necesaria para disparar la correspondiente respuesta. En estas condiciones, no se producen los factores de virulencia regulados por QS y la bacteria es menos patógena (panel 2).

Si las bacterias resistentes a los antimicrobianos tienen una disminución en *fitness* y son menos virulentas ¿por qué se seleccionan? En primer lugar podríamos hablar de las mutaciones compensatorias discutidas anteriormente, pero además hemos de tener en cuenta que la resistencia a los antimicrobianos cubre la misma función ecológica que un factor de colonización en el paciente tratado<sup>5</sup>. Los factores de colonización son elementos que ayudan a que una bacteria se establezca y eventualmente desplace al resto de poblaciones microbianas en un determinado ecosistema<sup>42</sup>. En el caso de un paciente tratado el antimicrobiano matará a las poblaciones sensibles, de modo que el hábitat quedará vacío para ser ocupado por la población resistente (fig. 5). Esta situación hace que el tratamiento antibiótico sea un factor de riesgo frente a la infección por patógenos resistentes a los mismos.



**Figura 5.** La resistencia a los antimicrobianos es un factor de colonización en el paciente tratado. En un individuo normal, una de las barreras para evitar la



colonización por bacterias patógenas (en rojo) es la flora comensal (en verde). Como se muestra a la izquierda, en la mayor parte de los casos, la flora comensal compete eficazmente con las bacterias exógenas. Sin embargo en presencia de un antimicrobiano (panel de la derecha), las bacterias comensales (sensibles) desaparecen y el ecosistema puede ser ocupado por bacterias foráneas resistentes.

## **Evolución futura de la asociación virulencia/resistencia a los antimicrobianos**

A lo largo del artículo hemos comentado distintos aspectos de la interrelación entre la resistencia a los antimicrobianos y la virulencia bacteriana. Un punto importante es evaluar la evolución de esta asociación en el futuro. Para ello hemos de considerar:

1. *La probabilidad de aparición de la resistencia.* Esta probabilidad dependerá de la frecuencia de mutación<sup>43</sup> del blanco en particular o de la posibilidad de adquirir genes de resistencia a partir de otras bacterias<sup>44</sup>. La probabilidad de mutación de un gen determinado depende de distintos factores, entre los que se encuentran la estructura del gen, el número de copias, el número de posiciones permisivas para la mutación y la frecuencia intrínseca de mutación del aislado en particular<sup>43</sup>. En los últimos años se ha desvelado que un cierto porcentaje de los aislados de las poblaciones microbianas son estirpes hipermutadoras, con frecuencias de mutación que pueden ser hasta mil veces superiores a las de las estirpes silvestres. Se ha determinado que en el caso de infecciones crónicas, como la fibrosis quística, el porcentaje de bacterias hipermutadoras se incrementa enormemente y que este incremento se correlaciona, como se podría prever, con un aumento en la resistencia a los antimicrobianos<sup>45</sup>. En este caso vemos, pues, que la infección crónica puede favorecer la aparición de mutantes resistentes a los antimicrobianos. En el caso de adquisición de determinantes de resistencia, la situación es más compleja. Para poder adquirir dicho determinante, la bacteria patógena debe coexistir con otra que ya lo posea. Debe por tanto poder adquirirlo, bien de bacterias medioambientales, bien de bacterias comensales. En esta situación la selección medioambiental de resistencia a los antimicrobianos<sup>27</sup>, tanto por contaminación, como por el uso de antimicrobianos en ganadería puede incrementar la posterior difusión de genes de resistencia en poblaciones patógenas (fig. 6). Por ejemplo, hay un cierto número de plásmidos que contienen genes de resistencia a metales pesados y a antimicrobianos. La contaminación, bien natural, bien por acción del hombre, por metales pesados es la más abundante a día de hoy. En zonas contaminadas por metales pesados, se producirá una coselección de resistencia a los antimicrobianos como consecuencia de la presencia de ambos tipos de determinantes en el mismo plásmido. Se sabe también que hay sistemas MDR que, además de antimicrobianos, pueden expulsar detergentes, solventes y biocidas. La contaminación debida a estos compuestos producirá también la selección de bacterias resistentes a los antimicrobianos. De igual modo, el aumento de la resistencia en poblaciones de bacterias comensales puede contribuir a que también se incremente la resistencia en las poblaciones de bacterias patógenas<sup>46</sup>.



**Figura 6.** Selección de resistencia a los antimicrobianos en el medio ambiente. Los ecosistemas naturales pueden tener lugares con concentraciones locales altas de antimicrobianos, biocidas o metales pesados, bien de modo natural, bien como consecuencia de la contaminación. La presencia de estos compuestos puede producir la selección de bacterias resistentes a los antimicrobianos.

2. *El efecto de la resistencia sobre el fitness bacteriano y por tanto la posibilidad de que dicha resistencia sea estable.* Hemos visto que la resistencia puede producir un efecto sobre la virulencia bacteriana y que estos defectos pueden compensarse mediante mutaciones subsiguientes. Sin embargo, los efectos pueden ser distintos en función del medio ambiente en que se encuentran las bacterias. En el caso de patógenos muy especializados, que ocupan siempre el mismo nicho ecológico, es de esperar que el coste debido a la resistencia quede paliado en el futuro, de modo que virulencia y resistencia queden unidas. Por el contrario, en el caso de bacterias infectivas de vida libre (p. ej., *P. aeruginosa*), la necesidad de compensar distintos defectos en los diferentes ecosistemas ocupados por esta especie bacteriana<sup>47</sup> puede provocar que la fijación del fenotipo de resistencia en la población sea más improbable (fig. 3). Incluso en este caso, así como cuando las mutaciones disminuyen mucho el *fitness* bacteriano, hemos de tener también en cuenta que el mismo tipo de mutación puede aparecer y desaparecer recurrentemente en la población bacteriana. Por ejemplo, la sobreproducción estable de sistemas MDR por parte de las bacterias patógenas es mucho más frecuente en aislados obtenidos tras el tratamiento antimicrobiano que en los que se obtienen antes del mismo. Esto indica que, al menos hasta el momento, estos mutantes no son seleccionados fuera del paciente tratado. A pesar de ello, aparecen fácilmente y pueden constituir un problema terapéutico.

3. *La asociación de la resistencia con otras resistencias u otros fenotipos seleccionables de modo que, incluso cuando el fitness disminuye, la resistencia se mantiene como consecuencia de un fenómeno de selección de segundo orden.* En el caso que comentamos anteriormente de la avoparcina<sup>34</sup>, la resistencia en bacterias aisladas de pollos disminuyó drásticamente con la retirada del antibiótico, mientras que

la resistencia se mantuvo estable en bacterias aisladas a partir de cerdos. Se observó que, en los cerdos, los genes de resistencia a macrólidos y glucopéptidos estaban asociados de modo que cuando disminuyó el uso de la tilosina, también disminuyó la prevalencia de aislados resistentes a los glucopéptidos.

4. *La asociación de la resistencia a grupos clonales prevalentes.* En ocasiones, se ha demostrado la existencia de variedades clonales de una especie microbiana que son resistentes a los antimicrobianos.

En el epígrafe anterior hemos visto que los clones bacterianos prevalentes en pollos y cerdos llevan asociados distintos genes de resistencia a los antimicrobianos. Nos podemos preguntar si la diseminación de dichos clones corresponde a que los genes de resistencia han sido adquiridos por un clon previamente muy extendido o si es la adquisición de la resistencia y la posterior selección de dicha variedad clonal en un ambiente (habitualmente hospitalario) rico en antimicrobianos, lo que ha producido su expansión. Los datos que tenemos sobre el particular no son totalmente concluyentes, pero indican que lo más posible es que hayan concurrido ambas situaciones. Por ejemplo, se ha sugerido que la adquisición del gen *mecA* que confiere resistencia a meticilina a *Staphylococcus aureus* ha sido adquirido por esta especie bacteriana en un número limitado de ocasiones. Sin embargo, se ha extendido posteriormente a toda la especie por transmisión horizontal. También parece que hay una serie de clones muy epidémicos, incluyendo el clon ibérico de MRSA, que se han diseminado de modo eficaz<sup>48</sup>. Estos clones ya eran epidémicos antes de incorporar *mecA*. Pero la incorporación de este elemento de resistencia ha contribuido al éxito de su difusión en un ambiente rico en antimicrobianos.

#### Referencias Bibliográficas:

1. Quinn JP. Clinical problems posed by multiresistant nonfermenting gram-negative pathogens. *Clin Infect Dis* 1998;27:S117-24.
2. Swartz MN. Hospital-acquired infections: diseases with increasingly limited therapies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:2420-7.
3. Segal S, Hill AV. Genetic susceptibility to infectious disease. *Trends Microbiol* 2003;11:445-8.
4. Palumbi SR. Humans as the world's greatest evolutionary force. *Science* 2001;293:1786-90.
5. Martínez JL, Baquero F. Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:647-79.
6. Andersson DI, Levin BR. The biological cost of antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol* 1999;2:489-93.
7. Beck MA, Handy J, Levander OA. Host nutritional status: the neglected virulence factor. *Trends Microbiol* 2004;12:417-23.
8. Martínez JL, Blázquez J, Baquero F. Non-canonical mechanisms of antibiotic resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994;13:1015-22.
9. Monack DM, Theriot JA. Actin-based motility is sufficient for bacterial membrane protrusion formation and host cell uptake. *Cell Microbiol* 2001; 3:633-47.
10. Seral C, Van Bambeke F, Tulkens PM. Quantitative analysis of gentamicin, azithromycin, telithromycin, ciprofloxacin, moxifloxacin, and oritavancin (LY333328) activities against intracellular *Staphylococcus aureus* in mouse J774 macrophages. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:2283-92.
11. Dargis M, Gourde P, Beauchamp D, Foiry B, Jacques M, Malouin F. Modification in penicillin-binding proteins during in vivo development of genetic competence of *Haemophilus influenzae* is associated with a rapid change in the physiological state of cells. *Infect Immun* 1992;60:4024-31.
12. Barker J, Scaife H, Brown MR. Intraphagocytic growth induces an antibiotic-resistant phenotype of *Legionella pneumophila*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:2684-8.
13. Mah TF, Pitts B, Pellock B, Walker GC, Stewart PS, O'Toole GA. A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature* 2003;426:306-10.
14. Borriello G, Werner E, Roe F, Kim AM, Ehrlich GD, Stewart PS. Oxygen limitation contributes to antibiotic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:2659-64.
15. Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol* 1999;37:1771-6.

16. Li XZ, Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs* 2004;64:159-204.
17. Ma D, Cook DN, Alberti M, Pon NG, Nikaido H, Hearst JE. Genes *acrA* and *acrB* encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 1995;16:45-55.
18. Lacroix FJ, Cloeckaert A, Grepinet O, Pinault C, Popoff MY, Waxin H, et al. *Salmonella typhimurium* *acrB*-like gene: identification and role in resistance to biliary salts and detergents and in murine infection. *FEMS Microbiol Lett* 1996;135:161-7.
19. Lin J, Sahin O, Michel LO, Zhang Q. Critical role of multidrug efflux pump CmeABC in bile resistance and in vivo colonization of *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun* 2003;71:4250-9.
20. Jerse AE, Sharma ND, Simms AN, Crow ET, Snyder LA, Shafer WM. A gonococcal efflux pump system enhances bacterial survival in a female mouse model of genital tract infection. *Infect Immun* 2003;71:5576-82.
21. Lee EH, Shafer WM. The *farAB*-encoded efflux pump mediates resistance of gonococci to long-chained antibacterial fatty acids. *Mol Microbiol* 1999;33: 839-45.
22. Smith RS, Iglewski BH. *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Curr Opin Microbiol* 2003;6:56-60.
23. Kohler T, Van Delden C, Curty LK, Hamzeshpour MM, Pechere JC. Overexpression of the MexEF-OprN multidrug efflux system affects cell-to-cell signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 2001;183:5213-22.
24. Evans K, Passador L, Srikumar R, Tsang E, Nezezon J, Poole K. Influence of the MexAB-OprM multidrug efflux system on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 1998;180:5443-7.
25. Aendekerck S, Ghysels B, Cornelis P, Baysse C. Characterization of a new efflux pump, MexGHI-OpmD, from *Pseudomonas aeruginosa* that confers resistance to vanadium. *Microbiology* 2002;148:2371-81.
26. Barbosa TM, Levy SB. Differential expression of over 60 chromosomal genes in *Escherichia coli* by constitutive expression of MarA. *J Bacteriol* 2000;182: 3467-74.
27. Alonso A, Sánchez P, Martínez JL. Environmental selection of antibiotic resistance genes. *Environ Microbiol* 2001;3:1-9.
28. Enne VI, Livermore DM, Stephens P, Hall LM. Persistence of sulphonamide resistance in *Escherichia coli* in the UK despite national prescribing restriction. *Lancet* 2001;357:1325-8.
29. Martínez JL, Baquero F. Genetic linkage of antibiotic resistance and bacterial virulence. *APUA Newsletters* 1988;6:1-3.
30. Kollef MH. Is there a role for antibiotic cycling in the intensive care unit? *Crit Care Med* 2001;29:N135-42.
31. Giraud E, Brisabois A, Martel JL, Chaslus-Dancla E. Comparative studies of mutations in animal isolates and experimental in vitro- and in vivo-selected mutants of *Salmonella* spp. suggest a counterselection of highly fluoroquinolone-resistant strains in the field. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:2131-7.
32. Bjorkman J, Nagaev I, Berg OG, Hughes D, Andersson DI. Effects of environment on compensatory mutations to ameliorate costs of antibiotic resistance. *Science* 2000;287:1479-82.
33. Enne VI, Bennett PM, Livermore DM, Hall LM. Enhancement of host fitness by the *sul2*-coding plasmid p9123 in the absence of selective pressure. *J Antimicrob Chemother* 2004;53:958-63.
34. Aarestrup FM, Seyfarth AM, Emborg HD, Pedersen K, Hendriksen RS, Bager F. Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal enterococci from food animals in Denmark. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:2054-9.
35. Alonso A, Morales G, Escalante R, Campanario E, Sastre L, Martínez JL. Overexpression of the multidrug efflux pump SmeDEF impairs *Stenotrophomonas maltophilia* physiology. *J Antimicrob Chemother* 2004;53:432-4.
36. Cosson P, Zuilanello L, Join-Lambert O, Faurisson F, Gebbie L, Benghezal M, et al. *Pseudomonas aeruginosa* virulence analyzed in a *Dictyostelium discoideum* host system. *J Bacteriol* 2002;184:3027-33.
37. Sánchez P, Linares JF, Ruiz-Díez B, Campanario E, Navas A, Baquero F, et al. Fitness of in vitro selected *Pseudomonas aeruginosa* *nalB* and *nfxB* multidrug resistant mutants. *J Antimicrob Chemother* 2002;50:657-64.
38. Zhang Y, Heym B, Allen B, Young D, Cole S. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature* 1992;358:591-3.
39. Li Z, Kelley C, Collins F, Rouse D, Morris S. Expression of *katG* in *Mycobacterium tuberculosis* is associated with its growth and persistence in mice and guinea pigs. *J Infect Dis* 1998;177:1030-5.
40. Pym AS, Saint-Joanis B, Cole ST. Effect of *katG* mutations on the virulence of *Mycobacterium tuberculosis* and the implication for transmission in humans. *Infect Immun* 2002;70:4955-60.
41. Sherman DR, Mduliri K, Hickey MJ, Arain TM, Morris SL, Barry CE, et al. Compensatory *ahpC* gene expression in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 1996;272:1641-3.
42. Evans DJ Jr, Evans DG. Colonization factor antigens of human pathogens. *Curr Top Microbiol Immunol* 1990;151:129-45.
43. Martínez JL, Baquero F. Mutation frequencies and antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:1771-7.
44. Davies JE. Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants. *Ciba Found Symp* 1997;207:15-27.
45. Oliver A, Cantón R, Campo P, Baquero F, Blázquez J. High frequency of hypermutable *Pseudomonas*

aeruginosa in cystic fibrosis lung infection. *Science* 2000;288:1251-4.

46. Salyers AA, Gupta A, Wang Y. Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. *Trends Microbiol* 2004;12:412-6.

47. Alonso A, Rojo F, Martínez JL. Environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* show pathogenic and biodegradative properties irrespective of their origin. *Environ Microbiol* 1999;1:421-30

48. Crisostomo MI, Westh H, Tomasz A, Cheng M, Oliveira DC, De Lencastre H. The evolution of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: similarity of genetic backgrounds in historically early methicillin-susceptible and -resistant isolates and contemporary epidemic clones. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:9865-70.

*Enferm Infecc Microbiol Clin* 2005; 23: 86 - 93