

ANTIBIÒTICS AMINOGLICÒSIDS

M. PILAR GOÑI,¹ M. CARMEN AGUDO² I RAFAEL GÓMEZ-LUS¹

¹ *Centro de Referencia Microbiológico de Aragón, Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universitat de Saragossa.*

² *Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Facultad de Medicina, Universitat de Saragossa.*

Adreça per a la correspondència: M. Pilar Goñi. Centro de Referencia Microbiológico de Aragón, Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universitat de Saragossa. Domingo Miral, s/n. 50009 Saragossa. Adreça electrònica: pgoni@unizar.es.

RESUM

Els aminoglicòsids són antibiòtics que varen ésser introduïts en la pràctica clínica a mitjan anys quaranta, en els albors de l'era antibiòtica. Actuen sobre els ribosomes i són actius enfront d'un gran nombre de patògens.

Actualment es coneixen diferents mecanismes de resistència i, sense cap mena de dubte, la modificació i desactivació dels antibiòtics és el més important.

Paraules clau: aminoglicòsid, mecanisme d'acció, resistència.

SUMMARY

Aminoglycosides were introduced in clinical training in the middle of the forties, in the beginning of the antibiotic era. Those agents act in ribosomes, and are active against a great number of pathogens.

Currently different resistance mechanisms are known, being, surely, antibiotics modification and inactivation the most important of all.

Keywords: aminoglycoside antibiotics, mechanism of action, resistance.

INTRODUCCIÓ

El primer antibiòtic aminoglicòsid, l'estreptomina, va ésser descobert el 1944, i és també el primer antibiòtic actiu enfront de *Mycobacterium tuberculosis* (Waskaman, 1943; Schatz *et al.*, 1944). Posteriorment, s'aïllaren i intro-

duïren en la pràctica clínica un gran nombre de compostos com la neomicina (1949), kanamicina (1957), paromomicina i espectinomina (1959), gentamicina (1963) i tobramicina (1967), tots provinents de *Streptomyces*, *Bacillus* o *Micromonospora*. Però la toxicitat d'aquestes molècules, juntament amb l'aparició

de bacteris resistents derivada de llur àmplia utilització, en limitaren l'ús. Des d'aleshores ençà, els esforços adreçats a reduir-ne la toxicitat i evitar els mecanismes de resistència varen donar com a resultat el desenvolupament de noves molècules semisintètiques, que s'obtingueren per modificació química de les molècules preexistents. Podem esmentar com a exemple la dibekacina i l'amikacina (1972), que són derivats de kanamicina B i A, respectivament, o la sisomicina i les netilmicines, derivats de la gentamicina.

ESPECTRE D'ACTIVITAT

Actualment, els antibiòtics aminoglicòsids continuen essent actius davant una gran part dels bacils aerobis gramnegatius. En infeccions greus produïdes per aquests microorganismes són emprades freqüentment en combinació amb β -lactàmics.

L'efecte sinèrgic que presenten amb els antimicrobians que actuen a la paret celular, com penicil·lines, cefalosporines, monobactam, carbapenem o glicopèptids, els fa actius davant *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, estreptococs del grup viridans, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* o *Listeria monocytogenes* (Eliopoulos i Moellering, 1996).

L'estreptomocina té més activitat *in vitro* davant *M. tuberculosis* i l'espectinomicina s'ha emprat com a tractament en la infecció gonocòccica. Davant *Haemophilus* sp. i *Legionella* sp. presenten activitat *in vitro*, però no es fan servir en la pràctica clínica en infeccions causades per aquests agents.

No posseeixen activitat davant *Stenotrophomonas maltophilia*, bacteris anaerobis, rickètsies, fongs ni *Mycoplasma* sp. (Edson i Terrell, 1999; Gilbert, 2000).

ESTRUCTURA I PROPIETATS QUÍMIQUES

Els antibiòtics aminoglicòsids constitueixen un ampli grup d'agents antimicrobians, normalment d'origen natural, produïts per *Streptomyces*, *Micromonospora* sp., *Bacillus* sp. i *Pseudomonas* sp., o derivats semisintètics obtinguts per modificació química d'aquests.

Bàsicament, llur estructura es caracteritza per posseir dos o més aminosucre units glicosídicament a un nucli hexosa o aminociclitol, que es troba generalment en posició central, per la qual cosa seria més correcte anomenar-los *aminoglicòsids-aminociclitols* (Rienhart i Sumi, 1980).

Segons l'aminociclitol central, es poden dividir en els següents grups (vegeu la taula 1 i la figura 1):

a) L'aminociclitol central és una estreptidina. L'estreptomocina pertany a aquest grup, ja que és constituïda per un nucli central d'estreptidina al qual s'uneixen una hexosa i una pentosa (pseudodisacàrid).

b) Quan l'aminociclitol central és la 2-desoxiestreptamina es poden distingir tres subgrups:

1. L'aminociclitol central és una 2-desoxiestreptamina central que està substituïda a les posicions 4 i 5. Exemples d'aquest grup són la butirosina, neomicina, paromomicina i ribosamicina.

2. La 2-desoxiestreptamina central està substituïda a les posicions 4 i 6, com és el cas de la kanamicina, tobramicina o gentamicina.

3. La 2-desoxiestreptamina està substituïda a la posició 4, com en l'apramicina.

c) Els que no corresponen a cap dels grups anteriors i són mancats d'aminosucres es consideren aminociclitols purs, com per exemple l'espectinomicina.

Llur propietat més notable, relacionada amb llur activitat i amb els mecanismes de resistència, és que a pH fisiològic es troben en forma de poliacions, atès que els grups fun-

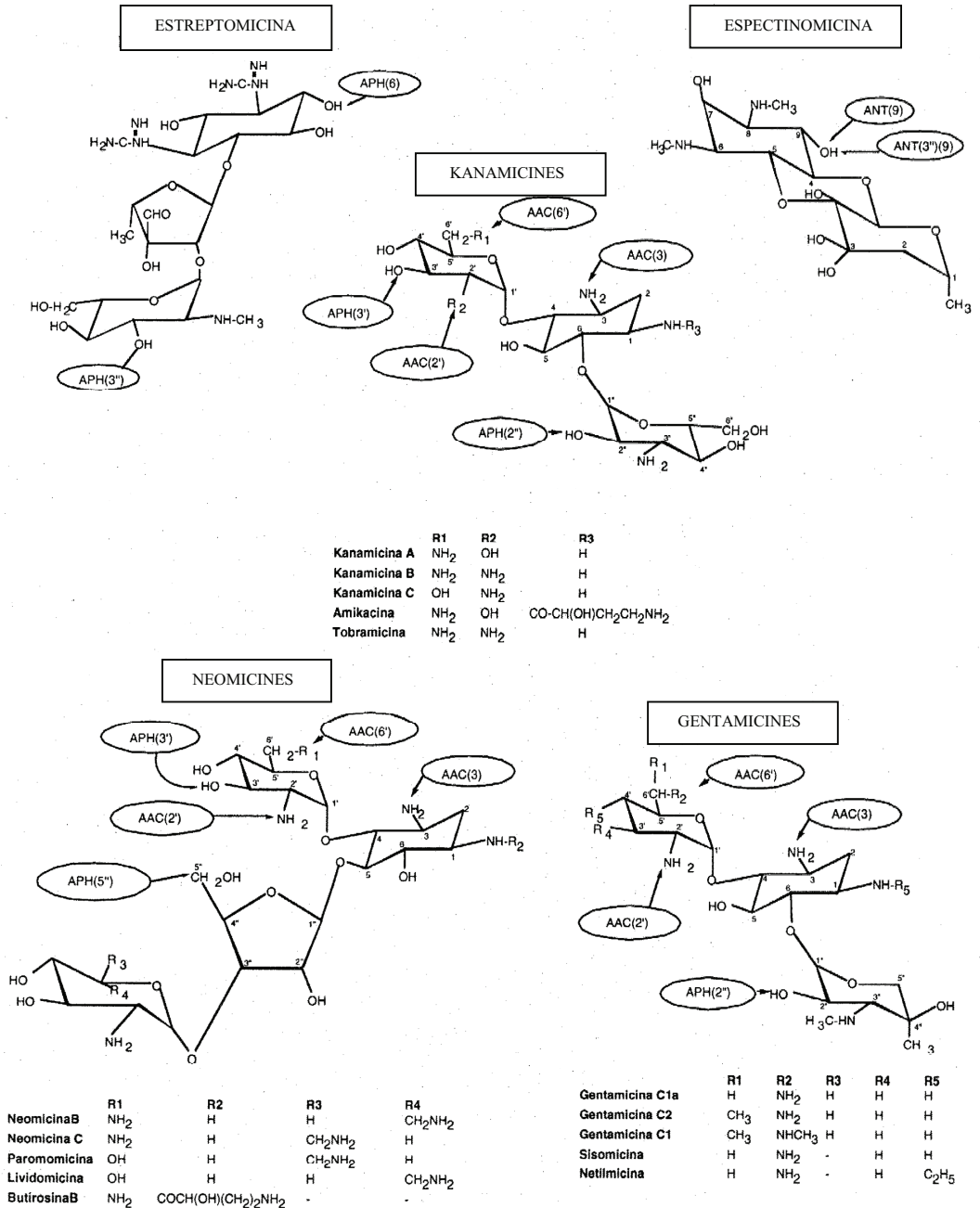


FIGURA 1. Principals famílies d'antibiòtics aminoglicòsids i enzims que els modifiquen.

cionals presents són grups amino i hidroxil (Davies, 1986). Tanmateix, com s'ha demostrat

mitjançant assaigs de modificació, sembla ésser que els responsables de l'activitat i de la

TAULA 1. Classificació dels antibiòtics aminoglicòsids segons llur estructura química

| Estreptidina | 2-desoxiestreptamina | | | Aminociclitols |
|--------------|----------------------|--|---|---|
| | 4-monosubstituïts | 4,5-disubstituïts | 4,6-disubstituïts | |
| Estreptomina | Apramicina | Ribostamicina Paromomicina Lividomicina B (3'-desoxiparomomicina) Neomicina (6'-amino-paromomicina) Butirosina A (1-HABA-xilostatina) butirosina B (1-HABA-ribostamicina) | Kanamícines A, B, C Amikacina (1-HABA-kanamicina A) Tobramicina (9'-desoxikanamicina B) Dibekacina (3'-4'-didesoxikanamicina B) Gentamicines C1, C2, C1a Sisomicina (4,5-deshidrogen-tamicina C1a) Netilmicina (1-N-etilsisomicina) 2'-etil-netilmicina 6'-etil-netilmicina Isepamicina (1-HAPA-gentamicina B) | Espectinomicina Higromicina B Fortimicina Dactimicina Trospectomicina |

toxicitat de la molècula són els grups amino (Fillastre *et al.*, 1982; Umezawa, 1987).

MECANISME D'ACCIÓ

Malgrat que se sap que el mecanisme d'acció dels aminoglicòsids implica la unió al ribosoma bacterià i la inhibició de la síntesi de proteïnes, el mecanisme precís pel qual això té lloc encara roman sense estudiar.

L'òrgan diana d'aquest grup d'antibiòtics és, per tant, el ribosoma bacterià, al qual s'uneixen mitjançant enllaç covalent i, així, irreversible. Més concretament, els aminoglicòsids com les kanamicines (4,6-disubstituïdes) i la neomicina (4,5-disubstituïdes) interaccionen amb el lloc aminoacil-tRNA al 16S rRNA.

Pel fet d'ésser polications a pH neutre, penetren molt pobrament a través de la membrana, de tal manera que l'entrada a la cèl·lula ha de produir-se per un mecanisme de transport actiu. Bryan ho ha descrit com un procés en tres fases (Bryan, 1984): en la primera fase, la molècula de l'antibiòtic s'uneix als llocs aniónics de la superfície cel·lular (lipopolisacàrids, fosfolípids i proteïnes en gramnegatius i àcids teicoics en grampositius). Les altres

dues fases són dependents d'energia, i es denominen *EDP-I* i *EDP-II*. En la fase *EDP-I*, l'antibiòtic travessa la membrana per efecte de la diferència de potencial elèctric, o amb la participació d'un transportador específic. En la *EDP-II* es produeix una acceleració de l'entrada de l'antibiòtic a través de la membrana citoplasmàtica, utilitzant l'energia de la cadena transportadora d'electrons i la hidròlisi d'ATP.

Un cop a l'interior de la cèl·lula, l'aminoglicòsid s'uneix a la subunitat ribosòmica 30S, que té un paper essencial en la traducció del material genètic, i inhibeix la síntesi de proteïnes.

A concentracions subinhibitòries, es produeix una lectura errònia de l'mRNA, amb obtenció de proteïnes defectuoses, la qual cosa recolza un mecanisme d'acció en què l'entrada inicial d'unes poques molècules donarà lloc a la síntesi de proteïnes defectuoses (Davis, 1987). Algunes d'aquestes proteïnes van destinades a la membrana, i formen canals que permeten l'entrada de més antibiòtic; això augmenta la síntesi de proteïnes defectuoses, cosa que, per la seva banda, accelera la penetració de l'antibiòtic. Aquest s'uneix als ribosomes implicats en el principi de la ca-

dena de síntesi de proteïnes, bloquejant-los i aturant la síntesi de les mateixes.

La unió al ribosoma no és igual per a tots els aminoglicòsids, i hi ha detalls diferents. Així, els aminoglicòsids que contenen una 2-desoxiestreptamina s'uneixen a l'RNA 16S al solc major de l'hèlix H44; l'estreptomina, que posseeix una estreptidina com a anell central, interacciona amb els nucleòtids 13, 256, 915 i 1490 de l'rRNA 16S i la proteïna S12 (Carter *et al.*, 2000). L'espectinomina, un aminociclitol pur, s'uneix al solc menor de l'hèlix H34, prop d'on ho fa la paromomicina (2-desoxiestreptamina).

MECANISMES DE RESISTÈNCIA

Com ja s'ha fet esment, la utilitat d'aquest grup d'antibiòtics s'ha vist minvada per l'aparició de mecanismes de resistència i per llur ràpida disseminació. El desenvolupament de mecanismes de resistència pot ésser conseqüència de la utilització massiva dels antibiòtics del grup, per la qual cosa presentarà un fort component geogràfic i llur disseminació es veurà influïda per l'ús i pel tipus de mecanisme de resistència de què es tracti.

Existeixen quatre mecanismes descrits pels quals un bacteri pot expressar la resistència als antibiòtics aminoglicòsids (Phillips i Shannon, 1984; Davies, 1986), i que esmentarem seguidament.

Alteracions en la permeabilitat de la membrana

Suposa la disminució en l'acumulació de l'antibiòtic per l'alteració de la permeabilitat de la membrana, disminució del transport a través de la membrana interna o *efflux* actiu (Magnet *et al.*, 2001). Aquest mecanisme sol conferir resistència creuada a tots els aminoglicòsids. És un mecanisme sense importància clínica, tret dels organismes anaerobis. Els

bacteris anaerobis estrictes, que no fan servir una cadena de transport electrònic, són resistents, ja que els manca un transportador carregat negativament o un potencial adient que pugui permetre l'entrada de l'antibiòtic.

En algunes espècies, com ara *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus* i *Salmonella* sp. s'han trobat soques amb mutacions que afecten el transport electrònic, i donen com a resultat el creixement de «petites colònies» que reverteixen en absència d'antibiòtic.

Mutacions a l'òrgan diana

Aquest mecanisme, de caire cromosòmic, és sovint el responsable de la resistència a l'estreptomina (Buckel *et al.*, 1977). Suposa l'adquisició de mutacions a les proteïnes de la subunitat ribosòmica 30S, a les quals s'uneixen els antibiòtics, que fan minvar l'afinitat de l'antibiòtic pel ribosoma. És un mecanisme poc freqüent en aïllaments clínics, malgrat que ha estat descrit en bacteris productors d'antibiòtics aminoglicòsids. Atès que l'estreptomina es fa servir en el tractament de la tuberculosi, la resistència a estreptomina en soques clíniques de *M. tuberculosis* té gran rellevància clínica.

Desactivació de l'antibiòtic per modificació enzimàtica

El bacteri produeix enzims modificadors d'aminoglicòsids (EMAG), que són capaços de modificar la molècula de l'antibiòtic, i donen lloc a un producte inactiu. La molècula modificada no és capaç d'unir-se correctament al ribosoma, cosa que permet al bacteri sobreviure en presència de l'antibiòtic. Per la gran importància clínica que té aquest mecanisme, el desenvoluparem en detall.

Enzims modificadors d'aminoglicòsids

Les EMAG poden ésser de tres tipus (vegeu la taula 2 i la figura 2):

a) N-acetiltransferases (AAC). Catalitzen una reacció d'acetilació, en la qual un grup acetat es transfereix des de l'acetilcoenzim A fins a un grup amino de l'antibiòtic.

b) O-fosfotransferases (APH). Catalitzen una reacció de fosforilació, és a dir, la transferència d'un grup fosfat des d'ATP fins a un grup hidroxil de l'antibiòtic.

c) O-nucleotidiltransferases (ANT). Catalitzen una reacció de nucleotidilació, és a dir, la transferència d'un nucleòtid monofosfat des d'un nucleòtid trifosfat cap a un grup hidroxil de l'antibiòtic, sovint utilitzant ATP com a cofactor.

La producció d'EMAG generalment produeix resistència d'alt nivell, malgrat que existeixin diferències entre microorganismes i entre soques individuals, ja que depèn de diversos factors, com la quantitat d'enzim produït, la seva eficiència catalítica o el tipus d'aminoglicòsid de què es tracti.

Les EMAG són proteïnes amb pesos moleculars que oscil·len entre 23.000 i 63.000 Da i necessiten la presència de cations divalents per a llur activitat.

Pel que respecta a llur localització, es pensa que pot ésser citoplasmàtica. Malgrat això, en alguns gramnegatius s'han trobat a l'espai periplasmàtic (Hollingshead i Vapnek, 1985), fet que dotaria d'eficiència el mecanisme de resistència, que barra el pas de molècules d'antibiòtic sense modificar, de manera que la localització de la proteïna té un paper important a l'hora de definir el nivell de resistència. Un altre factor que té un paper primordial és la relació entre les constants cinètiques de l'enzim que defineixen la seva activitat (K_m i $V_{màx}$) i la velocitat d'entrada de l'antibiòtic.

Atès que els grups funcionals que reconeixen aquests enzims són grups amino i hidroxil, un mateix enzim pot modificar diversos antibiòtics aminoglicòsids, i un mateix antibi-

òtic pot ésser modificat per diversos enzims (Benveniste i Davies, 1971, 1973a). Per una altra banda, pot donar-se el cas que un antibiòtic modificat encara conservi activitat antibiòtica, com succeeix amb la 6'-N-acetil-neomicina (Phillips i Shannon, 1984).

Per anomenar-los, s'indica en primer lloc el tipus de reacció que catalitzen, és a dir, AAC per a acetiltransferasa, APH per a fosfotransferasa o ANT si es tracta d'una nucleotidiltransferasa. Seguidament, un nombre entre parèntesis ens indica la posició de la molècula d'antibiòtic que es modifica. Diversos enzims que modifiquin una mateixa posició però que tinguin diferents perfils de substrat es diferencien per nombres romans. Si presenten el mateix perfil però existeix alguna variació genètica o bioquímica s'hi afegeix a més una lletra minúscula (p. ex.: AAC(3)IIIa o AAC(3)IIIb).

Els EMAG es poden identificar per diversos mètodes, malgrat que clàssicament el més emprat ha estat l'assaig radioenzimàtic, per la seva rapidesa, sensibilitat i per la manca de necessitat de purificar l'enzim. Malgrat això, aquest assaig és costós i requereix una complexa infraestructura, raó per la qual s'està imposant la detecció i identificació dels gens que codifiquen els enzims per tècniques de biologia molecular (Benveniste i Davies, 1973a; Haas i Dowding, 1975). Tanmateix, la identificació de l'enzim mitjançant assaig radioenzimàtic suposa determinar el seu perfil de substrat amb el desenvolupament de la reacció amb una selecció d'antibiòtics que ens indiqui el grup modificat. Si una soca determinada produeix diversos enzims, és possible que el seu perfil de substrat se superposi i la identificació sigui difícil de realitzar. En aquests casos la detecció genètica es fa totalment necessària.

La distribució d'enzims modificadors d'aminoglicòsids és variable, tant geogràficament, ja que la política antibiòtica que s'aplica a cada localitat influeix decisivament en l'ad-

TAULA 2. Perfil de substrat dels enzims modificants d'aminoglicòsids

| Enzim | Perfil de substrat |
|----------------------|--|
| AAC(1) | Apra, Lv, Pm, Rb |
| AAC(3)I | Gm, Sis, Dact |
| AAC(3)II | Gm, Sis, Tm, Dkb, Net |
| AAC(3)III | Km, Gm, Sis, Tm, Dkb, Net, Nm, Lv, Pm |
| AAC(3)IV | Gm, Sis, Tm, Dkb, Net, Apra |
| AAC(3)V | Gm, Sis, Tm, Dkb, Net |
| AAC(3)VI | Gm |
| AAC(3)VII | Descoberta en actinomicets productors d'aminoglicòsids |
| AAC(3)VIII | Descoberta en actinomicets productors d'aminoglicòsids |
| AAC(3)IX | Descoberta en actinomicets productors d'aminoglicòsids |
| AAC(3)X | Descoberta en actinomicets productors d'aminoglicòsids |
| AAC(6')I | Km, Sis, Tm, Dkb, Net, Ak |
| AAC(6')II | Km, Gm, Sis, Tm, Dkb, Net |
| AAC(2') | Gm, Tm, Dkb, Net, Nm |
| APH(3')I | Km, Nm, Lv, Pm, Rb, GmB |
| APH(3')II | Km, Nm, Bt, Pm, Rb, GmB |
| APH(3')III | Km, Nm, Lv, Bt, Pm, Rb, GmB, Ak |
| APH(3')IV | Km, Nm, Bt, Pm, Rb |
| APH(3')V | Nm, Pm, Rb |
| APH(3')VI | Km, Nm, Bt, Pm, Rb, GmB, Ak |
| APH(3')VII | Km, Nm |
| AAC(6')/APH(2'')Ia | Km, Gm, Sis, Tm, Dkb, Net, Ak, Dact |
| APH(2'')Ib, Id | Km, Gm, Sis, Tm, Dkb, Net |
| APH(2'')Ic | Km, Gm, Tm |
| APH(3'')Ia, Ib | Sm |
| APH(7'')Ia | Hyg |
| APH(4)Ia, Ib | Hyg |
| APH(6)Ia, Ib, Ic, Id | Sm |
| APH(9)Ia, Ib | Spc |
| ANT(2'') | Km, Gm, Sis, Tm, Dkb |
| ANT(3')(9) | Sm, Spc |
| ANT(4')(4'')Ia | Km, Tm, Dkb, Ak |
| ANT(4')(4'')IIa | Km, Tm, Ak |
| ANT(6) | Sm |
| ANT(9) | Spc |

Ak: amikacina; Apra: apramicina; Bt: butirosina; Dact: dactimicina; Dkb: dibekacina; Gm: gentamicina; GmB: gentamicina B; Hyg: higromicina; Km: kanamicina; Lv: lividomicina; Nm: neomicina; Net: netilmicina; Pm: paromomicina; Rb: ribostamicina; Sis: sisomicina; Sm: estreptomicina; Spc: espectinomicina; Tm: tobramicina.

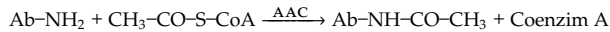
quisició de resistències i llur disseminació, com pel que fa a gèneres bacterians, ja que hi ha, per exemple, enzims propis de grampositius i d'altres de gramnegatius.

Atès el gran nombre d'EMAG descrits fins al moment (vegeu la taula 2), farem esment de

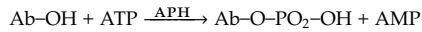
les característiques generals dins de cada tipus.

AAC: Modifiquen només els aminoglicòsids que contenen la 2-desoxiestreptamina, utilitzant acetilcoenzim A com a donador de grups acetil. L'acetilació pot produir-se en

N-Acetiltransferases (AAC):



O-Fosfotransferases (APH):



O-Nucleotidiltransferases (ANT):

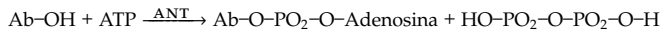


FIGURA 2. Reaccions generals dels enzims modificants d'aminoglicòsids.

quatre grups diferents (1, 3, 2' i 6'), la qual cosa determina l'existència de quatre tipus d'acetiltransferases: AAC(1), AAC(3), AAC(2') i AAC(6'). Totes disposen d'un perfil de substrat molt ampli, i les acetiltransferases del tipus AAC(3) són les que posseeixen un nombre més gran de subclasses.

La immensa majoria de les acetiltransferases descrites tenen llurs gens clonats i s'ha cristallitzat i determinat l'estructura de l'AAC(3)Ia de *S. marcescens* i de l'AAC(6')II d'*Enterococcus* sp.

L'enzim AAC(I) es caracteritza per conferir resistència a apramicina, lividomicina, paromomicina, ribostamicina, neomicina i butirosina (Hedges i Shannon, 1984). Va ésser trobat en soques d'origen animal i, potser, per la seva baixa repercussió clínica els seus gens no es troben clonats.

Els més de catorze isoenzims del tipus AAC(3) descrits actualment presenten patrons de resistència diferents i característics, però en general tots modifiquen gentamicina i sisomicina.

Alguns dels enzims del tipus AAC(6') són capaços de modificar aminoglicòsids importants en clínica, com la tobramicina, netilmicina, amikacina, fortimicina, sisomicina i gentamicines C1a i C2, però són menys capaços de modificar gentamicina C1 i isepa-

micina. Existeixen almenys vint-i-quatre enzims AAC(6')I identificats tant en grampositius com en gramnegatius, i tan sols dos AAC(6')II.

Una particularitat dins el grup la constitueix l'enzim bifuncional AAC(6')/APH(2'') detectat en grampositius (Ferretti *et al.*, 1986). Ambdues activitats es troben codificades per gens adjacents, la lectura dels quals es produeix amb l'aparició d'una única proteïna capaç d'exercir les dues funcions, que confereix resistència pràcticament a tots els antibiòtics aminoglicòsids d'importància clínica, exceptuant l'estreptomicina, espectinomicina i apramicina. Estudis duts a terme sobre aquest enzim han demostrat la possible expressió dissociada d'ambdues activitats, i ha estat trobada en *S. aureus* una forma de l'enzim que tan sols expressa l'activitat acetiladora (Goñi *et al.*, 1991).

L'enzim AAC(2') produeix resistència a gentamicina, tobramicina, dibekacina, netilmicina i 6'-etil-netilmicina. La més freqüent és l'AAC(2')Ia produïda pel grup d'organismes *Providencia/Proteus* (Shimizu *et al.*, 1985), però també han estat detectades les AAC(2')Ib, Ic, Id i Ie, amb un 63-79 % d'homologia, en *M. tuberculosis*, microorganisme en el qual es troben com a enzim codificat per gens cromosòmics (Ainsa *et al.*, 1997), malgrat que no es coneix

gens bé la seva funció en aquest microorganisme, ja que no intervenen en la resistència als antibiòtics.

APH: Catalitzen la fosforilació dependent d'ATP, de grups hidroxil específics de l'anti-biòtic. Poden utilitzar com a cofactor ATP o altres nucleòtids, ja que en realitat prenen un fosfat del cofactor i el transfereixen a l'aminoglicòsid.

Hi ha set classes de fosfotransferases: *APH(3')*, *APH(2'')*, *APH(3'')*, *APH(4)*, *APH(7'')*, *APH(6)*, *APH(9)*. La família més nombrosa és la de les *APH(3')*, que modifiquen l'hidroxil en posició 3' de kanamicina. A més a més, es caracteritzen per conferir resistència variable a d'altres antibiòtics, com neomicina, butirosina, lividomicina, amikacina, isepamicina o gentamicina B (Mitsuhashi, 1975). Existeixen set isoenzims identificats, d'*APH(3')I* a *APH(3')VII*.

L'enzim *APH(2'')*Ia constitueix l'extrem C-terminal del suara esmentat enzim bifuncional *AAC(6')/APH(2'')*. Aquest, com s'ha fet esment, confereix resistència a gairebé tots els aminoglicòsids disponibles en clínica. Ha estat trobat en estafilococs, enterococs i estreptococs. Recentment s'han identificat els enzims *APH(2'')*Ib, Ic i Id en enterococs (Chow *et al.*, 1997; Tsai i Smith, 1998; Kao *et al.*, 2000).

L'enzim *APH(3'')* modifica específicament l'estreptomocina al grup hidroxil 3'' (Heinzel *et al.*, 1988), de la mateixa manera que l'enzim *APH(6)* ho fa al grup hidroxil 6.

L'enzim *APH(4)* modifica la higromicina, que és un antibiòtic d'ús exclusiu en veterinària. La seva presència es troba associada generalment a la presència de l'enzim *AAC(3)IV*, ja que els gens que codifiquen ambdós enzims normalment es troben formant un operó (Sallauze *et al.*, 1990).

Els enzims *APH(7'')* i *APH(9)* confereixen resistència a higromicina i espectinomocina, respectivament, i no són significatius en clínica.

ANT: Com en els casos anteriors, hi ha cinc tipus de nucleotidiltransferases, segons si mo-

difiquen l'antibiòtic en el grup hidroxil 2'', 3'', 4', 6 o 9.

Les *ANT(2'')* confereixen resistència a gentamicina, tobramicina, dibekacina, sisomicina i kanamicina, i es troben àmpliament distribuïdes entre els gramnegatius (Cameron *et al.*, 1986).

L'enzim *ANT(3'')* confereix resistència davant estreptomocina i espectinomocina, i ambdues molècules modifiquen els hidroxils 3'' i 9, respectivament, raó per la qual també s'anomena *ANT(3'')(9)* (Davies i Smith, 1978; Hollingshead i Vapnek, 1985).

Les *ANT(4')(4'')* confereixen resistència davant aquells antibiòtics aminoglicòsids que continguin en llur molècula un grup 4', com és el cas de tobramicina, amikacina o isepamicina (Jacoby *et al.*, 1990). Com a exemple d'especificitat podem esmentar que l'enzim *ANT(4')I* és específic de grampositius, mentre que l'*ANT(4')II* ho és de gramnegatius (Schwotzer *et al.*, 1978; Miller *et al.*, 1980; Jacoby *et al.*, 1990).

Per acabar, els enzims *ANT(6)* i *ANT(9)* modifiquen exclusivament estreptomocina i espectinomocina, respectivament, i són propis de grampositius (Davies i Smith, 1978; Murphy, 1985; Ounissi *et al.*, 1990).

BASES GENÈTIQUES

Respecte de l'origen dels gens que codifiquen els EMAG, s'han establert diverses teories. Així, podrien tenir llur origen en microorganismes productors d'antibiòtics, on constituïrien llur mecanisme de protecció (Benveniste i Davies, 1973b; Cundliffe, 1989) o podria haver succeït que davant la pressió selectiva exercida per l'ús d'antimicrobians, alguns gens del metabolisme bacterià haguessin evolucionat per a donar lloc a aquests gens de resistència (Piepersberg *et al.*, 1988).

Els gens de resistència en gramnegatius es troben localitzats en plasmidis R conjugatius, en transposons i en integrons. Aquests plas-

midis es disseminen entre bacteris, els transposons es propaguen entre replicons i els integrons, que es troben formant part dels transposons, capten nous gens, els empaqueten en cassettes i contribueixen a llur expressió fenotípica.

En grampositius, com ara enterococs i estreptococs, l'intercanvi de gens es fa per altres mecanismes, com ara la conjugació mitjançada per plasmidis mobilitzables, amb la participació de transposons conjugatius cromosòmics.

Els gens que codifiquen els enzims modificadors es troben localitzats tant al cromosoma com en plasmidis transferibles. Tanmateix, molts es troben associats a elements transposables. La presència d'aquests gens en plasmidis i transposons és la responsable de la ràpida disseminació entre els diferents gèneres i espècies bacterians.

L'expressió dels gens que codifiquen els EMAG sembla ésser constitutiva, si bé es poden seleccionar soques resistents amb concentracions subinhibitòries d'antibiòtic i, fins i tot, promoure l'augment del nombre de còpies dels plasmidis que els contenen.

Metilació de l'rRNA 16S

Aquest mecanisme, que ha estat descrit recentment, té el seu origen en els microorganismes productors d'aminoglicòsids, que l'empren com a mecanisme defensiu davant llurs propis productes, i implica la metilació post-transcripcional de l'rRNA amb la utilització de S-adenosil-metionina com a cofactor.

Els aminoglicòsids actuen produint errors de lectura en la traducció i impeding la translocació (Davies i Davis, 1968). Per a això, s'uneixen a un motiu altament conservat de l'rRNA 16S, i produeixen alteracions en la funció del ribosoma. L'alteració per substitució o metilació de les bases implicades en la unió entre l'rRNA 16S i els aminoglicòsids pot produir la pèrdua d'afinitat per l'antibiòtic i resistèn-

cia a l'hoste (Cundliffe, 1990; Kotra *et al.*, 2000; Prammananan *et al.*, 1998).

De moment, s'ha trobat en *Enterobacteriaceae* (gens *armA*) (Galimand *et al.*, 2003), en *P. aeruginosa* (gens *rmtA*) (Yokayama *et al.*, 2003) i en *S. marcescens* (gens *rmtB*) (Doi *et al.*, 2004).

En tots els casos, els gens que codifiquen aquestes metilases es troben localitzats en plasmidis conjugatius i confereixen resistència a kanamicines i gentamicines, és a dir, davant les desoxiestreptamines 4,6-disubstituídes, i no es veuen afectades les 4,5-disubstituídes, ni apramicina, estreptomycina o espectinomycina.

Futur de la resistència als antibiòtics aminoglicòsids

La resistència als antibiòtics aminoglicòsids en soques clíniques varia en funció de l'antibiòtic específic, del microorganisme, del mecanisme de resistència i de l'àrea geogràfica, entre d'altres factors. S'han establert programes d'estudi, com per exemple el SENTRY, desenvolupat als Estats Units, Canadà, Amèrica del Sud i Europa (Schmitz *et al.*, 1999).

En aquests estudis es posa de manifest la complexitat de l'epidemiologia de la resistència als aminoglicòsids, per la gran quantitat d'enzims modificadors que existeixen per a aquests antibiòtics, i també per la presència de mecanismes de resistència dispersos, diferents de la desactivació enzimàtica.

També han demostrat que amb les diferents pautes d'ús dels antibiòtics, tant en intensitat com en diversitat, s'han seleccionat diferents combinacions d'enzims modificadors entre diferents països, i tot sovint entre diferents hospitals d'un mateix país.

Si els patrons de resistència dels enzims modificadors resten influïts per l'ús clínic d'aquests antibiòtics (Miller *et al.*, 1997), cal suposar que la definició de polítiques antibiòtiques restrictives conduiria envers la reducció de la resistència a aquests agents. Però, atès que els

gens que codifiquen els EMAG es troben molt sovint en plasmidis i transposons, juntament amb determinants de resistència davant altres antimicrobians, podem dir que el consum total d'antimicrobians pot influir en l'epidemiologia de la resistència als aminoglicòsids.

Davant d'aquesta situació, un dels majors reptes que es presenten actualment és el desenvolupament de molècules que siguin «immunes» als mecanismes de resistència presents als bacteris. Malgrat això, la dificultat que suposa aconseguir noves molècules d'antibiòtic, amb el coneixement cada cop més gran que es té dels EMAG, fa que els esforços s'adrecin envers la descoberta de substàncies inhibidores de llur activitat, que ens puguin permetre rescatar l'activitat dels antibiòtics aminoglicòsids (Wright, 1999). Existeixen precedents als estudis desenvolupats amb la 7-hidroxitropolona com a inhibidor de l'enzim ANT(2''), on es posa de manifest que la dificultat d'aquesta estratègia és deguda a l'alt nombre d'enzims diferents a inhibir, i al fet que llurs mecanismes bioquímics en molts casos romanen sense estudiar. Per aquesta raó els estudis actuals busquen inhibidors adreçats envers una característica comuna. Així, el descobriment que l'estructura de l'APH(3')III és molt semblant a la de les cinases de proteïna eucariotes ha suggerit la possibilitat que els inhibidors de les proteïna-cinases puguin ésser actius davant les APH(3'). Els estudis al voltant d'això mostren resultats alleujadors (Daigle *et al.*, 1997; Burk i Berghuis, 2002).

També, l'aparició de resistència mitjançada per metilases, que a més es transfereix per conjugació, pot proporcionar una nova perspectiva en la disseminació de la resistència als antibiòtics aminoglicòsids i, per tant, en les vies emprades per a tractar de contenir-la.

BIBLIOGRAFIA

- AINSA, J. A.; PEREZ, E.; BERTHET, F. X.; GICQUEL, B.; MARTIN, C. (1997). «Aminoglycoside 2'-N-acetyltransferase genes are universally present in mycobacteria: characterization of the aac(2')-Ic gene from *Mycobacterium tuberculosis* and the aac(2')-Id gene from *Mycobacterium smegmatis*». *Mol. Microbiol.*, vol. 24, pàg. 431-441.
- BENVENISTE, R.; DAVIES, J. (1971). «Enzymatic acetylation of aminoglycoside antibiotics by *Escherichia coli* carrying an R factor». *Biochemistry*, vol. 10, pàg. 1787-1796.
- (1973a). «Aminoglycoside antibiotic-inactivating enzymes in actinomycetes similar to those present in clinical isolates of antibiotic-resistant bacteria». *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, vol. 70, pàg. 2276-2280.
- (1973b). «Mechanisms of antibiotic resistance in bacteria». *Ann. Rev. Biochem.*, vol. 42, pàg. 471-506.
- BRYAN, L. E. (1984). *Antimicrobial drug resistance*. Orlando: Academic Press, pàg. 241-277.
- BUCKEL, P.; BUCHERGER, A.; BOCK, A.; WITIMAN, H. G. (1977). «Alteration of ribosomal protein L6 in mutants *E. coli* resistant to gentamicin». *Mol. Gen. Genet.*, vol. 158, pàg. 47-54.
- BURK, K. D.; BERGHUIS, A. (2002). «Protein kinase inhibitors and antibiotic resistance». *Pharmacol. Ther.*, vol. 93, pàg. 283-292.
- CAMERON, F. H.; GROOT OBBINK, D. J.; ACKERMAN, V. P.; HALL, R. M. (1986). «Nucleotide sequence of the AAD(2'') aminoglycoside adenyltransferase determinant *aadB*. Evolutionary relationship of this region with those surrounding *aadA* in R538-1 and *dhfrII* in R388». *Nucl. Acid. Res.*, vol. 14, pàg. 8625-8635.
- CARTER, A. P.; CLEMONS, W. M.; BRODERSEN, D. E.; MORGAN-WARREN, R. J.; WMBERL, B. T.; PAMAKRISHNAN, V. (2000). «Functional insights from the structure of 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics». *Nature*, vol. 407, pàg. 340-348.
- CHOW, J. W.; ZERVOS, M. J.; LERENER, S. A.; THAL, L. A.; DONBEDIAN, S. M.; JAWORSKI, D. D.; TSAI, S.; SHAW, K. J.; CLEWEL, D. B. (1997). «A novel gentamicin resistance gene in *Enterococcus*». *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 41, pàg. 511-514.
- COHN, D. L.; BUSTREO, F.; RAVIGLIONE, M. C. (1997). «Drug-resistant tuberculosis: review of the worldwide situation and the WHO/IUATLD Global Surveillance Project. International Union against tuberculosis and lung disease». *Clin. Infect. Dis.*, vol. 24 (supl. 1), pàg. S121-S130.
- CUNDLIFFE, E. (1989). «How antibiotic-producing organisms avoid suicide». *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 43, pàg. 207-233.
- (1990). «Recognition sites for antibiotics within rRNA.» A: HILL, W. E.; MOORE, P. B.; DAHLBERG, A.; SCHLESINGER, D.; GARRETT, R. A.; WARNER, J. R. [ed.] *The ribosome: structure, function, and evolution*. Washington, DC: American Society for Microbiology, pàg. 479-490.
- DAIGLE, D. M.; MCKAY, G. A.; WRIGHT, G. D. (1997). «Inhibition of aminoglycoside antibiotic resistance enzymes by protein kinase inhibitors». *J. Biol. Chem.*, vol. 272, pàg. 24755-24758.

- DAVIS, B. D. (1987). «Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides». *Microbiol. Rev.*, vol. 51, pàg. 341-350.
- DAVIES, J. (1986). «Aminoglycoside-aminocyclitol antibiotics and their modifying enzymes». A: LORIAN, V. [ed.] *Antibiotics in laboratory medicine*. 2a ed. Baltimore: Williams & Wilkins, cap. 21, pàg. 790-809.
- DAVIES, J.; DAVIS, B. D. (1968). «Misreading of ribonucleic acid code words induced by aminoglycoside antibiotics». *J. Biol. Chem.*, vol. 243, pàg. 3312-3316.
- DAVIES, J.; SMITH, D. I. (1978). «Plasmid-determined resistance to antimicrobial agents». *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 32, pàg. 469-518.
- DOI, Y.; YOKOYAMA, K.; YAMANE, K.; WACHINO, J.; SHIBATA, N.; YAGI, T.; SHIBAYAMA, K.; KATO, H.; ARAKAWA, Y. (2004). «Plasmid-mediated 16S rRNA methylase in *Serratia marcescens* conferring high-level resistance to aminoglycosides». *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 48, pàg. 491-496.
- EDSON, R. S.; TERRELL, C. L. (1999). «The aminoglycosides». *Mayo Clinic Proc.*, vol. 74, pàg. 519-528.
- ELIPOULOS, G. M.; MOELLERING, R. C. (1996). «Antimicrobial combinations». A: LORIAN, V. [ed.] *Antibiotics in laboratory medicine*, 4a ed. Baltimore: Williams & Wilkins, pàg. 330-383.
- FERRETTI, J. J.; GILMORE, K. S.; COURVALIN, P. (1986). «Nucleotide sequence analysis of the gene specifying the bifunctional 6'-aminoglycoside acetyltransferase 2''-aminoglycoside phosphotransferase enzyme in *Streptococcus faecalis* and identification and cloning of gene regions specifying the two activities». *J. Bacteriol.*, vol. 167, pàg. 631-638.
- FILLASTRE, J. P.; MORIN, J. P.; GODIN, M.; VIOTTE, G.; OLIER, B.; JOSSE, S. (1982). «Néprototoxicité des aminoglycosides». A: MODAÏ, J. [ed.] *Les aminosides*. Paris: Librairie Arnette, pàg. 69-102.
- GALIMAND, M.; COURVALIN, P.; LAMBERT, T. (2003). «Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* due to 16S rRNA methylation». *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 47, pàg. 2565-2571.
- GILBERT, D. N. (2000). «Aminoglycosides». A: MANDELL, G. L.; BENETT, J. E.; DOLIN, R. [ed.] *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and practice of infectious diseases*, 5a ed. Filadèlfia: Churchill Livingstone, pàg. 307-336.
- GOÑI, P.; RIVERA, M. J.; AGUDO, M. C.; MADERO, P.; GÓMEZ-LUS, R. (1991). «6'-N-aminoglycoside acetyltransferase activity in gentamicin-kanamycin resistant *Staphylococcus* spp.» *J. Chemother.*, supl. 4, pàg. 173-175.
- HAAS, M. J.; DOWDING, J. E. (1975). «Aminoglycoside-modifying enzymes». A: HASH, L. H. [ed.] *Methods in enzymology*, vol. XLIII: *Antibiotics*. Nova York: Academic Press Inc., pàg. 611-640.
- HEDGES, R. W.; SHANNON, K. P. (1984). «Resistance to apramycin in *Escherichia coli* isolated from animals: detection of a novel aminoglycoside-modifying enzyme». *J. Gen. Microbiol.*, vol. 130, pàg. 473-482.
- HEINZEL, P.; WERBITZKY, P. O.; DISTLER, J.; PIEPERSBERG, W. (1988). «A second streptomycin resistance gene from *Streptomyces griseus* codes for streptomycin-3''-phosphotransferase». *Arch. Microbiol.*, vol. 150, pàg. 184-192.
- HOLLINGSHEAD, S.; VAPNEK, D. (1985). «Nucleotide sequence analysis of a gene encoding a streptomycin/spectinomycin adenyltransferase». *Plasmid*, vol. 13, pàg. 17-30.
- JACOBY, G. A.; BLASER, M. J.; SANTANAM, P.; HÄCHLER, H.; KAYSER, F. H.; HARE, R. S.; MILLER, G. H. (1990). «Appearance of amikacin and tobramycin resistance due to 4'-aminoglycoside nucleotidyltransferase [ANT(4')-II] in gram-negative pathogens». *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 34, pàg. 2381-2386.
- KAO, S. J.; YOU, I.; CLEWEL, D. B.; DONBEDIAN, S. M.; ZERVOS, M. J.; PETRIN, J.; SHAW, K. J.; CHOW, J. W. (2000). «Detection of the high-level aminoglycoside resistance gene *aph(2)Ib* in *Enterococcus faecium*». *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 44, pàg. 2876-2879.
- KOTRA, L. P.; HADAD, J.; MOBASHERY, S. (2000). «Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance». *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 44, pàg. 3249-3256.
- MAGNET, S.; COURVALIN, P.; LAMBERT, T. (2001). «Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454». *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 45, pàg. 465-470.
- MILLER, G. H.; SABATELLI, F. J.; HARE, R. S.; GLUPCZYNSKI, Y.; MACKAY, P.; SHLAES, D.; SHIMIZU, K.; SHAW, K. J.; GROUPS SAARS (1997). «The most frequent aminoglycoside resistance mechanisms change with time and geographic area: a reflection of aminoglycoside usage patterns?» *Clin. Infect. Dis.*, vol. 24 (supl. 1), pàg. S46-S62.
- MILLER, G. H.; SABATELLI, F. J.; HARE, R. S.; WAITZ, J. A. (1980). «Survey of aminoglycoside resistance patterns». *Dev. Ind. Microbiol.*, vol. 21, pàg. 91-104.
- MITSUHASHI, S. (1975). «Proposal for a rational nomenclature for phenotype, genotype and aminoglycoside-aminocyclitol modifying enzymes». A: MITSUHASHI, S.; ROSIVAL, L.; KRUMERY, V. *Drug inactivating enzymes and antibiotic resistance*. Berlín: Springer-Verlag KG, pàg. 115-119.
- MURPHY, E. (1985). «Nucleotide sequence of a spectinomycin adenyltransferase AAD(9) determinant from *Staphylococcus aureus* and its relationship to AAD(3')(9)». *Mol. Gen. Genet.*, vol. 200, pàg. 33-39.
- OUNISSI, H.; DERLOT, E.; CALIER, C.; COURVALIN, P. (1990). «Gene homogeneity for aminoglycoside-modifying enzymes in gram-positive cocci». *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 34, pàg. 2164-2168.
- PHILLIPS, I.; SHANNON, K. (1984). «Aminoglycoside resistance». *J. Med. Bull.*, vol. 40, pàg. 28-35.
- PIEPERSBERG, W.; DISTLER, J.; HEINZEL, P.; PEREZ-GONZALEZ, J. A. (1988). «Antibiotic resistance by modification: many resistance genes could be derived from cellular control genes in actinomycetes—a hypothesis». *Actinomycetologica*, vol. 2, pàg. 83-98.
- PRAMMANANAN, T.; SANDER, P.; BROWN, B. A.; FRISCH-

- KORN, K.; ONYI, G. O.; ZHANG, Y.; BOTTFER, E.; WALLACE, R. J. (1998). «A single 16S ribosomal RNA substitution is responsible for resistance to amikacin and other 2-deoxystreptamine aminoglycosides in *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium chelonae*». *J. Infect. Dis.*, vol. 177, pàg. 1573-1581.
- RIENHART, K. W. J.; SUAMI, T. (1980). «Aminocyclitol antibiotics». *ACS Symposium Series 125. American Chemical Society*, pàg. 133-144.
- SALAUZE, D.; OTAL, I.; GÓMEZ-LUS, R.; DAVIES, J. (1990). «Aminoglycoside acetyltransferase 3-IV (*aacC4*) and hygromycin B 4-I phosphotransferase (*hph B*) in bacteria isolated from human and animal sources». *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 34, pàg. 1915-1920.
- SCHATZ, A.; BUGIE, E.; WASKMAN, S. A. (1994). «Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram-positive bacteria». *Proc. Soc. Exp. Biol.*, vol. 55, pàg. 66-69.
- SCHEWOTZER, U.; KAYSER, F. H.; SCHEWOTZER, W. (1978). «R-plasmid mediated aminoglycoside resistance in *Staphylococcus epidermidis*: structure determination of the products of an enzyme nucleotidylating the 4' and 4''-hydroxyl group of aminoglycoside antibiotics». *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 3, pàg. 29-33.
- SCHMITZ, F. J.; VERHOEF, J.; FLUIT, A. C. (1999). «Prevalence of aminoglycoside resistance in 20 European university hospitals participating in the European SENTRY Antimicrobial Surveillance Programme». *Eur. J. Clin. Microbiol.*, vol. 18, pàg. 414-421.
- SHIMIZU, K.; KUMADA, T.; HSIEH, W. C.; CHUNG, H. Y.; CHONG, Y.; HARE, R. S.; MILLER, G. H.; SABATELLI, F. J.; HOWARD, J. (1985). «Comparison of aminoglycoside resistance patterns in Japan, Formosa, and Korea, Chile and the United States». *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 28, pàg. 282-288.
- TSAI, S.; ZERVOS, M. J.; CLEWEL, D. B.; DONBEDIAN, S. M.; SAHMAND, D. F.; SHAW, K. J.; CHOW, J. W. (2000). «A new high-level gentamicin resistance gene *aph(2)IId* in *Enterococcus* spp.». *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 42, pàg. 1229-1232.
- UMEZAWA, H. (1987). «Studies on antibiotics and enzyme inhibitors». *Rev. Infect. Dis.*, vol. 9, pàg. 147-164.
- WASKAMAN, S. A. (1943). «Production and activity of streptomycin». *J. Bacteriol.*, vol. 46, pàg. 299-310.
- WRIGHT, G. D. (1999). «Aminoglycoside-modifying enzymes». *Curr. Op. Microbiol.*, vol. 2, pàg. 499-503.
- YOKOYAMA, K.; DOI, Y.; YAMANE, K.; KUROKAWA, H.; SHIBATA, N.; SHIBAYAMA, K.; YAGI, T.; KATO, H.; ARAKAWA, Y. (2003). «Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*». *Lancet*, vol. 6, pàg. 1888-1893.