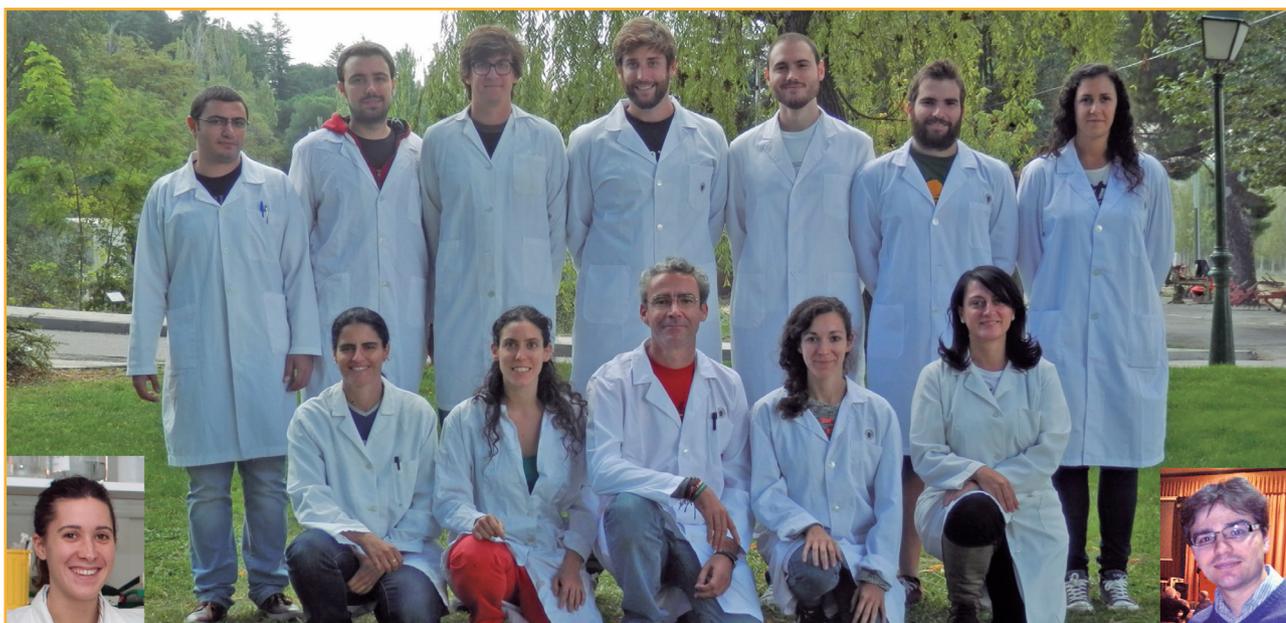


# Unidad de resistencia a antibióticos

Bruno González-Zorn

Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria y VISAVET,  
Universidad Complutense de Madrid

bgzorn@ucm.es



**Foto de grupo.** Arriba: Elias Dahdouh, Daniel Thomas-López, Gabriel Moyano, Andreas Hofer, José F. Delgado, Alfonso Santos-López, Cristina Bernabé-Balas. Abajo: Natalia Montero, Laura Carrilero, Bruno González-Zorn, Belén Gutiérrez, Mónica Suárez. Cuadrantes: Cristina Martínez-Ovejero y Rafael Ortega-Huedo.

La resistencia a antibióticos representa actualmente una de las mayores amenazas del siglo XXI. Su avance conlleva, no solamente un elevado coste sanitario, sino que supone un coste en vidas humanas que se estima en más de 30.000 muertes anuales en la Unión Europea.

La resistencia a antibióticos, sin embargo, es un fenómeno natural originado por el hecho de que los antibióticos son producidos por microorganismos en el medio ambiente desde hace miles de años, y los mecanismos de resistencia a los mismos vienen existiendo en la naturaleza de forma análoga. Desde que utilizamos los antibióticos clínicamente, entre la Primera y la Segunda Guerra Mundial, estamos seleccionando esos mecanismos allí donde los utilizamos: en granjas, en hospitales y en el medio ambiente, donde acaban mediante su utilización en acuicultura o por las

propias aguas residuales. Aunque la identificación y descripción epidemiológica de los mecanismos de resistencia es interesante y lleva realizándose desde hace varias décadas, nosotros entendemos que la resistencia a antibióticos es un fenómeno ecológico cuyo fundamento abordamos en nuestro grupo (Gonzalez-Zorn y Escudero, 2013). Nuestro objetivo es intentar comprender a nivel básico cuál es el flujo de mecanismos de resistencia a antibióticos en nuestro ecosistema Tierra, utilizando distintas aproximaciones reduccionistas.

Cuando comenzamos nuestra andadura, identificamos un mecanismo de resistencia desconocido hasta ese momento en *Escherichia coli*. Se trataba de *armA* (*aminoglycoside resistance methyltransferase*), una metiltransferasa del ARN 16S que anula la utilidad de todos los aminoglucósidos en

la práctica clínica (Gonzalez-Zorn *et al*, 2005a). Secuenciando la plataforma genética del mismo advertimos cómo este elemento es capaz de ser transferido por conjugación entre enterobacterias y por transposición entre plásmidos de distinta naturaleza (Gonzalez-Zorn *et al*, 2005b). De el primer momento decidimos centrar parte de nuestra actividad en este mecanismo, que proviene originalmente de *Streptomyces* ambientales productores de aminoglicósidos, los cuales se protegen de su suicidio por la acción de aminoglicósidos que ellos mismos producen precisamente metilando su ribosoma con una metiltransferasa del ARN16S. En colaboración con compañeros de distintos países hemos identificado que este mecanismo se encuentra en patógenos aislados de alimentos (Granier *et al*, 2011), en animales de producción y de compañía (Hidalgo *et al*, 2013) y en hospitales (Hidalgo *et al*, 2012), lo que nos ha permitido conocer las bases de su diseminación a nivel mundial. En paralelo, hemos estudiado cuáles son las consecuencias para una bacteria de metilar un residuo en su ARN16S, habida cuenta de que las bacterias ya metilan un gran número de residuos en su ribosoma para optimizar su funcionamiento. Mediante espectrometría de masas y técnicas bioquímicas complementarias hemos identificado que esta familia de metiltransferasas metila el residuo m<sup>7</sup> del nucleótido G1405 del ARN16S (Gutiérrez *et al*, 2012). Este hecho modifica el patrón de metilaciones del ribosoma, reprogramándolo en un nuevo estado de metilación cuyas consecuencias estamos estudiando. Hemos observado cómo el *fitness cost* de estas metiltransferasas es nulo cuando se integran en el cromosoma (Gutiérrez *et al*, 2013), lo que probablemente sea clave para su diseminación actual en *Salmonella* (Hopkins *et al*, 2010).

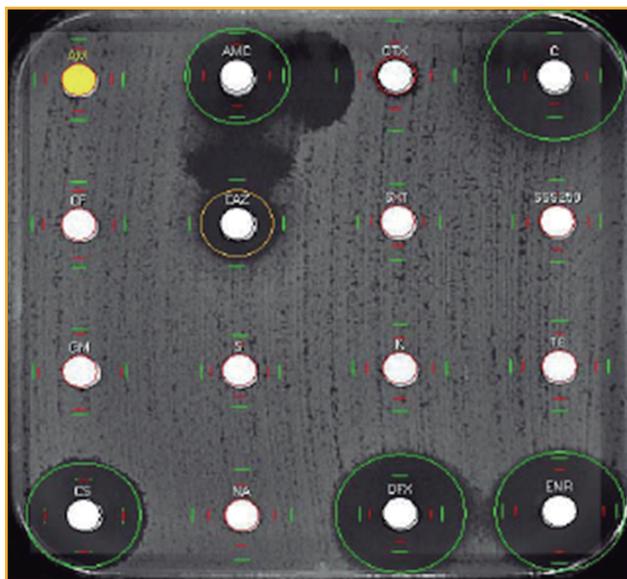
En esta línea, hemos descubierto una nueva metiltransferasa de esta familia, RmtF, ampliamente distribuida en el

Reino Unido y la India (Hidalgo *et al*, 2013), que también metila el residuo m<sup>7</sup>G1405 del ARNr 16S. Hemos secuenciado más de 50 plásmidos conjugativos con esta metiltransferasa procedentes de un mismo Hospital en Lucknow (India) para establecer las bases ecológicas y evolutivas que han determinado su aparición y diseminación entre enterobacterias hospitalarias (Rahman *et al*, 2014 y datos no publicados).

El estudio de las metiltransferasas y su existencia en bacterias ambientales nos llevó a interesarnos por la captación genética y su transmisión (Gutiérrez *et al*, 2009). En colaboración con otros grupos, dimos con la implicación del mecanismo SOS en la captación de cassettes de resistencia en los integrones bacterianos (Cambray *et al*, 2009, Guerin *et al*, 2010). Desde entonces seguimos trabajando en el sistema SOS como mecanismo de regulación de la resistencia a antibióticos y su diseminación.

La tercera línea de trabajo de nuestro laboratorio se basa en el descubrimiento reciente, de que los plásmidos pequeños tienen una relevancia mucho mayor de lo que se pensaba hasta el momento. Los primeros hallazgos se basaron en la identificación de un plásmido pequeño, pB1000, que confería resistencia a beta-lactámicos en *Haemophilus parasuis* (San Millán *et al*, 2007). Poco después determinamos que pB1000 era responsable de esta resistencia también en el patógeno humano *Haemophilus influenzae* (San Millán *et al*, 2010), y que el mismo se combina con mutaciones cromosómicas para conferir resistencia a un amplio rango de beta-lactámicos incluyendo cefalosporinas de 3<sup>a</sup> generación (San Millán *et al*, 2010). Posteriormente, identificamos que otros plásmidos pequeños también pueden conferir resistencia a beta-lactámicos en *H. influenzae* (Søndergaard *et al*, 2012). De hecho, en *Pasteurella multocida*, la multiresistencia a antibióticos se determina por la acumulación de plásmidos pequeños, en los que cada uno porta uno, máximo dos genes de resistencia a antibióticos, definiendo una nueva forma de multiresistencia a antibióticos en bacterias (San Millán *et al*, 2009). Cuáles son los motivos por los que para la bacteria es conveniente poseer este nuevo mecanismo de multiresistencia basado en plásmidos pequeños es lo que estamos intentando desentrañar. Hemos visto, además, que prácticamente todos los aislados clínicos de enterobacterias poseen, al menos, un plásmido ColE1. Por lo tanto, estos plásmidos pequeños ubicuos parecen tener un papel biológico relevante, en cuya investigación nos estamos centrando. Una de las aproximaciones de Biología Sintética que estamos llevando a cabo se basa en evolucionar *in vitro* plásmidos de la familia *Pasteurellaceae* en *E. coli*, utilizando esta última bacteria como fábrica de nuevos replicones para su utilización biotecnológica. Esto permitiría ampliar el rango de plásmidos utilizables en diversos procesos, y nos permite a su vez conocer los fundamentos biológicos de la coexistencia y adaptación de plásmidos en bacterias.

Desde que iniciamos el Grupo hemos trabajado en programas de cooperación internacional colaborando con la University for Development Studies en la Región Norte de Ghana. Hemos construido allí un laboratorio de Seguridad Alimentaria que está en funcionamiento actualmente y formado en nuestro laboratorio durante cuatro años a una persona que está



Antibiograma. Una *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  multiresistente tras la adquisición de un plásmido por conjugación.

actualmente a cargo del mismo (Saba *et al.*, 2012 y 2013). Con la ayuda de la OMS y de la International Foundation for Science estamos ahora equipando el laboratorio microbiológico del hospital, para permitir diagnosticar y tratar adecuadamente las principales infecciones bacterianas. Además, impartimos cursos a sus alumnos y personal de Microbiología y Biotecnología. Actualmente colaboramos también con la Facultad de Medicina de la Universidad de Balamand, Líbano.

Lo más importante a lo largo de estos años no han sido nuestros hallazgos ni proyectos o publicaciones. Lo más importante ha sido la confianza que tantos grupos nacionales e internacionales han depositado en nosotros para colaborar, para enviarnos a sus investigadores y para aceptarnos en los suyos. Especialmente, gracias a los primeros que confiaron en un grupo recién creado para realizar sus Tesis o Postdoc: JA Escudero, A San Millán, L Hidalgo, S Matrat y CKS Saba.

## REFERENCIAS

- Cambrey G, Sánchez-Alberola N, Campoy S, Guerin E, Da Re S, González-Zorn B, Ploy MC, Barbé J, Mazel D, Erill I. (2011). Prevalence of SOS-mediated control of integron integrase expression as an adaptive trait of chromosomal and mobile integrons. *Mob DNA*. 30;2(1):6.
- Escudero JA, San Millán A, Catalán A, G de la Campa A, Rivero E, López G, Domínguez L, Moreno MA, González-Zorn B. (2007). First characterization of fluoroquinolone resistance in *Streptococcus suis*. *Antimicrob Agents Chemother* 51:777-782.
- Escudero JA, San Millán A, Gutiérrez B, Hidalgo L, La Ragione RM, Abuoun M, Galimand M, Ferrándiz MJ, Domínguez L, de la Campa AG, González-Zorn B. (2011). Fluoroquinolone efflux in *Streptococcus suis* is mediated by SatAB and not by SmrA. *Antimicrob Agents Chemother* 55:5850-5860.
- Escudero JA, San Millán A, Montero N, Gutiérrez B, Ovejero CM, Carrilero L, González-Zorn B. (2013). SatR is a repressor of fluoroquinolone efflux pump SatAB. *Antimicrob Agents Chemother* 57: 3430-3433.
- González-Zorn B, Escudero JA. (2013). Ecology of antimicrobial resistance: humans, animals, food and environment. *Int Microbiol* 15:101-109.
- González-Zorn B, Teshager T, Casas M, Porrero MC, Moreno MA, Courvalin P, Domínguez L. (2005a). *armA* and aminoglycoside resistance in *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis* 11:954-956.
- González-Zorn B, Teshager T, Porrero MC, Moreno MA, Domínguez L. (2005b). Genetic basis for the dissemination of *armA*. *J Antimicrob Chemother* 56:583-585.
- Granier SA, Hidalgo L, San Millán A, Escudero JA, Gutiérrez B, Brisabois A, González-Zorn B. (2011). *ArmA* methyltransferase in monophasic *Salmonella enterica* isolated from food. *Antimicrob Agents Chemother* 55:5262-5266.
- Guerin E, Cambrey G, Sánchez-Alberola N, Campoy S, Erill I, da Re S, González-Zorn B, Barbé J, Ploy MC, Mazel D. The SOS response controls integron recombination. *Science*. 2009 May 22;324(5930):1034.
- Gutiérrez B, Douthwaite S, González-Zorn B. (2013). Indigenous and acquired modifications in the aminoglycoside binding sites of *Pseudomonas aeruginosa* rRNAs. *RNA Biol* 10:1324-1332.
- Gutiérrez B, Escudero JA, San Millán A, Hidalgo L, Carrilero L, Ovejero CM, Santos-López A, Thomas-López D, González-Zorn B. (2012). Fitness cost and interference of *Arm/Rmt* aminoglycoside resistance methyltransferases with the *RsmF* housekeeping methyltransferase. *Antimicrob Agents Chemother* 56:2335-2341.
- Gutiérrez B, Herrera-León S, Escudero JA, Hidalgo L, González-Sanz R, Arroyo M, San Millán A, Echeita MA, González-Zorn B. (2009). Novel genetic environment of *qnrB2* associated with TEM-1 and SHAV-12 on pB1004, an IncHI2 plasmid, in *Salmonella* Bredeney BB1047 from Spain. *J Antimicrob Chemother* 64:1334-1336.
- Hidalgo L, Gutiérrez B, Ovejero CM, Carrilero L, Matrat S, Saba CK, Santos-López A, Thomas-López D, Hoefer A, Suárez M, Santurde G, Martín-Espada C, González-Zorn B. (2013). *Klebsiella pneumoniae* sequence type 11 from companion animals bearing *ArmA* methyltransferase, DHA-1 Beta-lactamase, and *QnrB4*. *Antimicrob Agents Chemother* 57:4532-4534.
- Hidalgo L, Hopkins KL, Gutiérrez B, Ovejero CM, Shukla S, Douthwaite S, Prasad KN, Wodford N, González-Zorn B. (2013). Association of the novel aminoglycoside resistance determinant *RmtF* with NDM carbapenemase in *Enterobacteriaceae* isolated in India and the UK. *J Antimicrob Chemother* 68:1543-1550.
- Hidalgo L, Hopkins KL, Wareham DW, Gutiérrez B, González-Zorn B. (2012). Association of extended-spectrum Beta-lactamase VEB-5 and 16S rRNA methyltransferase *armA* in *Salmonella enterica* from the United Kingdom. *Antimicrob Agents Chemother* 56: 4985-4987.
- Hopkins KL, Escudero JA, Hidalgo L, González-Zorn B. (2010). 16S rRNA Methyltransferase *RmtC* in *Salmonella enterica* ser. Virchow. *Emerg Infect Dis* 16:712-715.
- Rahman M, Shukla SK, Prasad KN, Ovejero CM, Pati BK, Tripathi A, Singh A, Srivastava AK, González-Zorn B. (2014). Prevalence and molecular characterisation of New Delhi metallo-beta-lactamases NDM-1, NDM-5, NDM-6 and NDM-7 in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* from India. *Int J Antimicrob Agents* 44:30-37.
- Saba CK, Escudero JA, Herrera-León S, Porrero MC, Suárez M, Dominguez L, Demuyakor B, González-Zorn B. (2013). First identification of *Salmonella* Urbana and *Salmonella* Ouakam in humans in Africa. *J Infect Dev Ctries* 7:691-695.
- Saba CKS, González-Zorn B. (2012). Microbial food safety in Ghana: a metha-analysis. *J Infect Dev Ctries* 6: 828-835.
- San Millán A, Escudero JA, Catalán A, Nieto S, Farelo F, Gibert M, Moreno MA, Domínguez L, González-Zorn B. (2007). Beta-lactam resistance in *Haemophilus parasuis* is mediated by plasmid pB1000 bearing *blaROB-1*. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 2260-2264.
- San Millán A, Escudero JA, Gutiérrez B, Hidalgo L, García N, Llagostera M, Domínguez L, González-Zorn B. (2009). Multiresistance in *Pasteurella multocida* is mediated by coexistence of small plasmids. *Antimicrob Agents Chemother* 53:3399-3404.
- San Millán A, García-Cobos S, Escudero JA, Hidalgo L, Gutiérrez B, Carrilero L, Campos J, González-Zorn B. (2010). *Haemophilus influenzae* clinical isolates with plasmid pB1000 bearing *blaROB-1*. Fitness cost and interspecies dissemination. *Antimicrob Agents Chemother* 54:1506-1511.
- San Millán A, Giuffrè M, Escudero JA, Hidalgo L, Gutiérrez B, Cerquetti M, González-Zorn B. (2011). Contribution of *ROB-1* and *PBP3* mutations to the resistance phenotype of a Beta-lactamase-positive amoxicillin/clavulanic acid-resistant *Haemophilus influenzae* carrying plasmid pB1000 in Italy. *J Antimicrob Chemother* 66:96-99.
- Søndergaard A, San Millán A, Santos-López A, Nielsen SM, González-Zorn B, Nørskov-Lauritsen N. (2012). Molecular organization of small plasmids bearing *blaTEM-1* and conferring resistance to  $\beta$ -lactams in *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 56:4958-60.
- Zacharczuk K, Piekarska K, Szych J, Jagielski M, Hidalgo L, San Millán A, Gutiérrez B, Rastawicki W, González-Zorn B, Gierczynski R. (2011). Plasmid-borne 16S rRNA methylase *ArmA* in aminoglycoside-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Poland. *J Med Microbiol*. 60:1306-11.