

Prevalencia de los genes *tetA* y *tetB* como mecanismo de resistencia a tetraciclina y minociclina en aislamientos clínicos de *Acinetobacter baumannii*

Sara Martí^a, Felipe Fernández-Cuenca^{b,c}, Álvaro Pascual^{b,c}, Anna Ribera^a, Jesús Rodríguez-Baño^d, Germán Bou^e, José Miguel Cisneros^f, Jerónimo Pachón^f, Luis Martínez-Martínez^{b,c}, J. Vila^a y Grupo de Estudio de Infección Hospitalaria (GEIH)*

^aServei de Microbiologia, Centre de Diagnòstic Biomèdic, Hospital Clínic de Barcelona. ^bDepartamento de Microbiología. Facultad de Medicina. Universidad de Sevilla. ^cServicio de Microbiología y ^dSección de Enfermedades Infecciosas. Hospital Universitario Virgen Macarena. Sevilla. ^eServicio de Microbiología Hospital Juan Canalejo. A Coruña. ^fServicio de Enfermedades Infecciosas. Hospitales Universitarios Virgen del Rocío. Sevilla. *Actualmente trabaja en el Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Santander. España.

INTRODUCCIÓN. Doscientas veintiuna cepas clínicas de *Acinetobacter baumannii* fueron recogidas de 25 hospitales en España. El objetivo de estudiar este grupo de cepas era ver el predominio de los genes *tetA* y *tetB* en una colección de cepas de *A. baumannii* no relacionadas epidemiológicamente.

MÉTODOS. Las cepas fueron distribuidas en 79 clones por análisis del ADN cromosómico mediante digestión con *Sma*I y electroforesis de campo pulsado. La concentración inhibitoria mínima (CIM) a tetraciclina y minociclina se determinó por E-test. Una cepa en representación de cada clon resistente a tetraciclina fue estudiada mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores específicos para *tetA* y *tetB*.

RESULTADOS. Cincuenta y nueve (74,7%) de los 79 clones eran resistentes a tetraciclina (CIM ≥ 16 mg/l), 40 de los cuales (50,6% del total) eran resistentes además a minociclina (CIM > 1 mg/l). Se tomó una cepa en representación de cada clon resistente a tetraciclina para estudiar la prevalencia de los genes *tetA* y *tetB*. El análisis por PCR de las cepas dio como resultado que un total de 39 cepas representativas de otros tantos clones (66%) poseían el gen *tetB*, mientras que sólo ocho (13,6%) fueron positivos para el gen *tetA*. Doce cepas no tenían ninguno de estos dos genes. Ninguna de las cepas analizadas presentaba ambos genes.

CONCLUSIÓN. Aunque la resistencia a tetraciclina es superior a minociclina en aislamientos clínicos de *A. baumannii*, el gen *tetB* que afecta ambos agentes antimicrobianos es más prevalente que el gen *tetA* que sólo afecta a tetraciclina.

Palabras clave: *A. baumannii*. Tetraciclina. Minociclina. *tetA*. *tetB*.

Prevalence of the *tetA* and *tetB* genes as mechanisms of resistance to tetracycline and minocycline in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates

INTRODUCTION. Two hundred twenty-one *Acinetobacter baumannii* clinical strains were collected from 25 hospitals in Spain. The aim of this study was to analyze the prevalence of the *tetA* and *tetB* genes in a collection of *A. baumannii* strains that were not epidemiologically related.

METHODS. The strains were distributed in 79 clones by genomic DNA analysis with low frequency restriction enzymes and pulsed-field gel electrophoresis. The MICs for tetracycline and minocycline were determined by the E-test. One strain representing each of the tetracycline-resistant clones was analyzed by polymerase chain reaction (PCR) with specific primers for the *tetA* and *tetB* genes.

RESULTS. Fifty-nine (74.7%) out of the 79 clones were tetracycline-resistant (MIC ≥ 16 mg/l) and 40 (50.6% of the total) were also minocycline-resistant (MIC > 1 mg/l). One strain representative of each tetracycline-resistant clone was taken to study the prevalence of the *tetA* and *tetB* genes. The PCR analysis showed that 39 strains representing the same number of clones (66%) had the *tetB* gene, while only 8 (13.6%) were positive for the *tetA* gene. Twelve strains did not have any of these genes. None of the analyzed strains had both genes.

CONCLUSION. Although resistance to tetracycline in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates is greater than that to minocycline, the *tetB* gene, which affects both antimicrobial agents, has a higher prevalence than the *tetA* gene, which affects only tetracycline.

Key words: *A. baumannii*. Tetracycline. Minocycline. *tetA*. *tetB*.

Correspondencia: Dr. J. Vila.
Servicio de Microbiología. Centro de Diagnóstico Biomédico.
Hospital Clínic. Villarroya, 170.
08036 Barcelona. España.
Correo electrónico: jvila@ub.edu

*Al final del artículo se ofrece la relación de los miembros del Grupo de Estudio de Infección Hospitalaria (GEIH).

Manuscrito recibido el 24-2-2005; aceptado el 12-4-2005.

Introducción

Acinetobacter baumannii es un bacilo gramnegativo que se encuentra frecuentemente colonizando y/o infectando pacientes ingresados en hospitales españoles¹. Aunque se han comunicado casos de infecciones adquiridas en la comunidad, *A. baumannii* está generalmente asociado a brotes de infecciones nosocomiales en pacientes debilitados. En los últimos años, ha habido un incremento en el número de infecciones intrahospitalarias causadas por este microorganismo¹. La capacidad de *A. baumannii* para causar infecciones nosocomiales se relaciona con su habilidad para desarrollar rápidamente resistencia a los antibióticos, junto con la capacidad que tiene este organismo para sobrevivir durante mucho tiempo en el hábitat hospitalario².

El elevado nivel de resistencia a los agentes antimicrobianos ocasiona frecuentemente un problema para elegir el antimicrobiano adecuado para el tratamiento de infecciones ocasionadas por este microorganismo. De hecho, en estos momentos, la mayoría de las cepas de *A. baumannii* que causan infecciones nosocomiales son resistentes a múltiples antibióticos, incluyendo en ocasiones a los carbapenemes, considerados de elección para el tratamiento de infecciones graves ocasionadas por patógenos multiresistentes³. Por este motivo, es interesante investigar todas las potenciales alternativas terapéuticas. Recientemente, Wood et al⁴ han descrito que la doxiciclina y minociclina podrían ser una posible opción terapéutica para tratar infecciones por *A. baumannii*.

Las tetraciclinas son antibióticos de amplio espectro que presentan un efecto bacteriostático debido a la asociación reversible entre el antibiótico y el ribosoma⁵. Estos antibióticos actúan uniéndose a la subunidad 30S del ribosoma de la bacteria durante la fase inicial de la síntesis de proteínas; de este modo, evitan la unión del aminoacyl-tRNA a su lugar de unión en el ribosoma⁶.

Esta clase de antibióticos ha sido ampliamente usada, pero después de su introducción en la agricultura y para uso veterinario, la resistencia a estos antibióticos aumentó considerablemente. Uno de los problemas ha sido el uso de tetraciclinas como promotores de crecimiento y en 1969, el *Swann report* sugirió que el uso de dosis subterapéuticas de antibióticos podría contribuir al incremento de bacterias patógenas en humanos resistentes a estos antibióticos⁵.

Los principales mecanismos de resistencia a tetraciclinas son: a) la protección ribosomal, y b) la expulsión activa^{6,7}. La protección ribosomal es debida a la unión de una proteína citoplasmática al ribosoma que impedirá que la tetraciclina se una a esta diana⁶. Uno de los genes relacionados con la protección ribosomal es *tetM*; este gen se ha descrito en un aislamiento clínico de *A. baumannii*, sin embargo tiene una baja prevalencia en aislamientos clínicos⁸. El mecanismo de resistencia mejor estudiado es la expulsión activa de las tetraciclinas. Los genes *tet* codifican una proteína de membrana citoplasmática (Tet) que actúa como un transportador activo; esta proteína intercambia un protón por un complejo tetraciclina-cation⁶. El proceso de resistencia está regulado por 2 genes: uno codifica una bomba de expulsión activa y el otro una proteína represora; la actividad de estos genes está regulada por la presencia o ausencia de tetraciclina⁵. En bacterias gramnegativas, los genes que más comúnmente producen resistencia a tetraciclina son *tetA-tetE*, *tetG* y *tetH*. El gen *tetA*, junto con el gen *tetR* (codifica la proteína reguladora de *tetA*) se han localizado en un transposón en aislamientos clínicos de *A. baumannii*⁹, lo que indica la posibilidad de adquisición por transferencia horizontal entre microorganismos. *TetA* y *tetB* son los determinantes de resistencia a tetraciclinas más ampliamente distribuidos en *Enterobacteriaceae*⁷.

El objetivo de este estudio fue estudiar el predominio de los genes *tetA* y *tetB* en una colección de cepas de *A. baumannii* no relacionadas epidemiológicamente, aisladas de diversos hospitales españoles.

Métodos

Cepas

En este estudio se analizaron un total de 79 cepas representativas de cada uno de los 79 clones no relacionados entre ellos por los criterios y métodos anteriormente referidos¹. Brevemente: las cepas de *A. baumannii* habían sido recogidas en 25 hospitales españoles participantes en el estudio GEIH Ab 2000. Estas cepas fueron identificadas como *A. baumannii* mediante ARDRA (análisis del patrón de restricción resultante de la digestión con enzimas de restricción de elevada frecuencia de corte del producto de amplificación del ADNr 16S). La relación epidemiológica se determinó mediante análisis del cromosoma bacteriano digerido con una enzima de restricción de baja frecuencia de corte *SmaI* y electroforesis de campo pulsado (PFGE).

PCR de los genes *tetA* y *tetB*

La detección de los genes *tetA* y *tetB* se hizo mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores específicos para *tetA* (5'-GTA ATT CTG AGC ACT GTC GC-3' y 5'-CTG CCT GGA CAA CAT TGC TT-3') y para *tetB* (5'-TTG GTT AGG GGC AAG TTT TG-3' y 5'-GTA ATG GGC CAA TAA CAC CG-3'). Los controles utilizados fueron cepas de *Salmonella* sp. procedentes del Hospital Clínic, Barcelona, que contenían los genes *tetA* y *tetB*. Una colonia de cada aislamiento clínico fue resuspendida en 25 µl de agua y hervida durante 10 min. La amplificación se realizó usando 200 µM dNTPs, 0,5 µM de cada cebador y 2,5 unidades de *Taq* polimerasa en un volumen final de 50 µl. Las condiciones de amplificación fueron de 30 ciclos de 94 °C durante 1 min, 55 °C durante 1 min y 72 °C durante 1 min, con una extensión final de 72 °C durante 5 min. El producto de PCR fue separado en un gel de agarosa al 1,5%. Se tomó una cepa en representación de cada uno de los 59 clones resistentes a tetraciclina (40 de estos clones también eran resistentes a minociclina) para estudiar el predominio de los genes *tetA* y *tetB* (tabla 1).

TABLA 1. Resultados del análisis mediante PCR de 59 clones; presencia de los genes *tetA/tetB* en las cepas analizadas

	<i>tetA</i> ⁺	<i>tetB</i> ⁺	<i>tetA</i> / <i>tetB</i> ⁺
Número de clones <i>tet</i> [®] (n = 59)	8 (13,6%)	39 (66%)	12 (20,3%)
CIM (mg/l) Tet			
Límites	64-128	128	16-128
CIM 50	64	128	16
CIM 90	128	128	128
CIM (mg/l) Mino			
Límites	0,250-1	2-64	0,125-2
CIM 50	0,380	8	0,380
CIM 90	1	16	0,750

PCR: reacción en cadena de la polimerasa; CIM: concentración inhibitoria mínima; Tet: tetraciclina; Mino: minociclina.

Determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos

La sensibilidad a tetraciclina y minociclina fue determinada por E-test siguiendo las instrucciones de los productores (AB Biodisk®, Sölna, Sweden). Se tomó como punto de corte para tetraciclina una CIM de 16 mg/l (las cepas con una CIM de 16 mg/l se consideraron resistentes) y para minociclina una CIM > 1 mg/l (las cepas con una CIM de 1 mg/l se consideraron sensibles).

Resultados y discusión

De 221 cepas estudiadas, 131 (59,3%) fueron resistentes a tetraciclina y minociclina, 40 (18%) fueron resistentes a tetraciclina, pero sensibles a minociclina, y el resto (22,6%) sensibles. Agrupadas por clones, 59 (74,7%) de los 79 clones eran resistentes a tetraciclina, de los cuales 40 (50,6% del total de clones) eran también resistentes a minociclina. No había ninguna cepa sensible a tetraciclina y resistente a minociclina.

Las cepas de *A. baumannii* elegidas para este estudio fueron analizadas mediante PCR con cebadores específicos para los genes *tetA* y *tetB*. El tamaño de los productos de PCR era de 950 pb para el gen *tetA* y 650 pb para *tetB* y se correspondía con el tamaño de los controles positivos usados para estos 2 genes (fig. 1). El análisis por PCR de las cepas dio como resultado que un total de 39 clones (66%) poseían el gen *tetB*, mientras que sólo 8 clones (13,6%) fueron positivos para el gen *tetA*. El análisis de la cepa representativa de cada uno de los 12 clones restantes no mostró la presencia de *tetA* ni *tetB*, pese a presentar un fenotipo propio de las *tetA*⁺ (tabla 1). La CIM de las cepas con el gen *tetB* eran siempre de 128 mg/l, mientras que la mitad de las cepas que tenían el gen *tetA* tenían una CIM de 64 mg/l.

Los resultados también demostraron que hay una relación entre la presencia del gen *tetB* y la resistencia a tetraciclina y minociclina. Las cepas resistentes a tetraciclina presentaron esta resistencia por adquisición del gen *tetA*, *tetB* o posiblemente otro gen *tet*. Treinta y nueve de las 40 cepas resistentes a tetraciclina y minociclina adquirieron esta resistencia debido a la presencia del gen *tetB*; se encontró sólo una cepa que no tenía el gen *tetB* y que, sin embargo, era resistente a tetraciclina y minociclina (en este caso podría haber otro gen que afectara la resistencia a la minociclina). Esta cepa tiene una CIM a tetraciclina y minociclina que es similar a otras cepas (CIM tetraciclina = 128 mg/l y CIM minociclina = 2 mg/l); todas las cepas que tenían esta CIM eran positivas para el gen *tetB*. Estos resultados confirman la conclusión de Guardabassi et al¹⁰ cuando afirmaba que los genes *tetA* y *tetB* estaban presentes frecuentemente en aislamientos clínicos de *A. baumannii* resistentes a tetraciclina, mientras que eran infrecuentes en cepas acuáticas de *Acinetobacter* spp.¹⁰

Las tetraciclinas no han sido generalmente usadas para tratar infecciones causadas por *A. baumannii*, y aun así, la resistencia de este microorganismo a las tetraciclinas es muy alta. Los genes *tetA* y *tetB* están ampliamente diseminados entre las bacterias gramnegativas y se encuentran normalmente localizados en transposones que a su vez están insertados dentro de plásmidos, lo que les proporciona movilidad y les facilita la diseminación entre diferentes tipos de bacteria. *A. baumannii* puede colonizar el tracto intestinal de pacientes hospitalizados fundamentalmente en hospitales con una endemia elevada¹¹. Este ni-

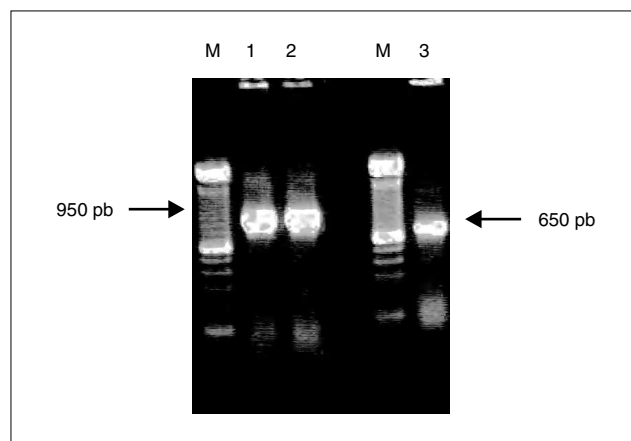


Figura 1. Amplificación mediante PCR de los genes *tetA* y *tetB*. Carriles M, marcador de ADN de 100 pb; carriles 1 y 2, gen *tetA*; carril 3, gen *tetB*.

cho ecológico presenta las condiciones óptimas para que *A. baumannii* adquiera los genes *tetA* y *tetB* mediante transferencia horizontal a partir de otras bacterias gramnegativas presentes en él.

El gen *tetB* codifica la bomba de expulsión más eficaz y de esta manera proporciona resistencia a tetraciclina y también a minociclina⁷. Los resultados obtenidos en este trabajo están de acuerdo con esta descripción del gen *tetB* ya que el 95% de las cepas resistentes a minociclina tenían el gen *tetB*, en contraposición a las cepas resistentes únicamente a tetraciclina, en las cuales diferentes genes *tet* podían estar involucrados en esta resistencia.

En un estudio piloto reciente realizado en Estados Unidos, Wood et al⁴, sugieren que la minociclina o la doxiciclina podrían ser efectivas en el tratamiento de neumonías causadas por cepas de *A. baumannii* multirresistentes. Según este estudio, la terapia con minociclina o doxiciclina fue efectiva en 6 de los 7 pacientes incluidos. Sin embargo, en España la utilización de esta clase de antibióticos queda invalidada por la elevada frecuencia de resistencias¹².

Como conclusión se puede decir que las cepas clínicas de *A. baumannii* aisladas en España son frecuentemente resistentes a tetraciclina debido a la adquisición de los genes *tetB* y, en menor medida *tetA*. El menor número de cepas resistentes a minociclina es debido a que hay menos genes que proporcionan resistencia a este antimicrobiano; en este estudio, únicamente TetB proporcionaba resistencia a minociclina.

Agradecimiento

Los autores agradecen al Grupo de Estudio de Infección Hospitalaria (GEIH) su colaboración para el desarrollo de este estudio. Este trabajo ha sido apoyado parcialmente por una ayuda de investigación de Merck Sharp & Dohme, España, y por la Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (Instituto de Salud Carlos III, C03/14).

Relación de miembros del GEIH

Javier Ariza, M.^a Ángeles Domínguez, Miquel Pujol y Fe Tubau (Ciutat Sanitaria i Universitaria Vall d'Hebron, Barcelona); Juan Pablo Horecaja y Anna Ribera (Hospital Clínic i Provincial, Barcelona); Jordi Cuquet, Carmina Martí y Dolors Navarro (Hospital General de Granollers, Barcelona); Francisco Álvarez Lerma y Margarita Salvadó

(Hospital del Mar, Barcelona); Fernando Chaves y Antonio Sánchez Porto (Hospital del SAS de la Línea de la Concepción, Cádiz); Fernando Rodríguez López y Elisa Vidal (Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba); Alejandro Beceiro (Hospital Juan Canalejo, A Coruña); Manuel de la Rosa (Hospital Virgen de las Nieves, Granada); Fernando Chaves y Manuel Lisazoain (Hospital 12 de Octubre, Madrid); Paloma García Hierro y Josefa Gómez Castillo (Hospital Universitario de Getafe, Madrid); Belén Padilla (Hospital Universitario Gregorio Marañón, Madrid); Jesús Martínez Beltrán (Hospital Ramón y Cajal, Madrid); Manuel López Brea y Lucía Pérez (Hospital Universitario de La Princesa, Madrid); Manuel Causse y Pedro Manchado (Complejo Hospitalario Carlos Haya, Málaga); Inés Dorronsoro y José Javier García Irure (Hospital de Navarra, Pamplona); Almudena Tinajas (Hospital Santo Cristo de Piñor, Orense); Gloria Esteban y Begoña Fernández (Hospital Santa María Nai, Orense); Nuria Borrell y Antonio Ramírez (Hospital Universitario Son Dureta, Palma de Mallorca); Isabel Álamo y Diana García Bardeci (Hospital de Gran Canaria Dr. Negrín, Las Palmas de Gran Canaria); José Ángel García Rodríguez (Hospital Universitario de Salamanca); Carmen Fariñas y Carlos Fernández Mazarrasa (Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander); Eduardo Varela y Mercedes Treviño (Hospital Universitario de Santiago de Compostela, A Coruña); Ana Barreros y Trinidad Prados (Hospitales Universitarios Virgen del Rocío, Sevilla); Frederic Ballester (Hospital Universitari Sant Joan de Reus, Tarragona); María Eugenia García Leoni y Ana Leturia (Hospital Nacional de Paraplégicos, Toledo); Susana Brea y Enriqueta Muñoz (Hospital Virgen de la Salud, Toledo); Joaquina Sevillano e Irene Rodríguez Conde (Policlínico de Vigo SA, Vigo).

Bibliografía

- Rodríguez-Baño J, Cisneros JM, Fernández-Cuenca F, Ribera A, Vila J, Pascual A, et al. Clinical features and epidemiology of *Acinetobacter baumannii* colonization and infection in Spanish hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2004;25:819-24.
- Vila J. Mechanisms of antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Rev Med Microbiol.* 1998;9:87-97.
- Bergogne-Bérézin E, Towner KJ. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev.* 1996;9:148-65.
- Wood GC, Hanes SD, Boucher BA, Croce MA, Fabian TC. Tetracyclines for treating multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia. *Intensive Care Med.* 2003;29:2072-6.
- Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2001;65:232-60.
- Canton R, Valdezate S, Mir N. Resistencia a los antimicrobianos. En: García-Sánchez JE, López R, Prieto J, editores. *Antimicrobianos en medicina. Sociedad Española de Quimioterapia*; 1999. p. 41-67.
- Roberts MC. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiol Rev.* 1996;19:1-24.
- Ribera A, Ruiz J, Vila J. Presence of the TetM determinant in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:2310-2.
- Ribera A, Roca I, Ruiz J, Gibert I, Vila J. Partial characterization of a transposon containing the *tet(A)* determinant in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother.* 2003;52:477-80.
- Guardabassi L, Dijkshoorn L, Collard JM, Olsen JE, Dalsgaard A. Distribution and in-vitro transfer of tetracycline resistance determinants in clinical and aquatic *Acinetobacter* strains. *J Med Microbiol.* 2000;49:929-36.
- Corbella X, Pujol M, Ayats J, Sendra M, Ardanuy C, Domínguez MA, et al. Relevance of digestive tract colonization in the epidemiology of nosocomial infections due to multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin Infect Dis.* 1996;23:329-34.
- Fernández-Cuenca F, Pascual A, Ribera A, Vila J, Bou G, Cisneros JM, et al. Diversidad clonal y sensibilidad a los antimicrobianos de *Acinetobacter baumannii* aislados en hospitales españoles. Estudio multicéntrico nacional: proyecto GEIH-Ab 2000. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2004;22:267-71.