

CARACTERIZACION DE ENZIMAS PLASMIDICOS MODIFICADORES DE AMINOGLICOSIDOS EN UN AISLADO CLINICO DE *Serratia marcescens*

Por
M. GLORIA BLANCO, M. CARMEN MENDOZA

y
CARLOS HARDISSON

Departamento Interfacultativo de Microbiología.
Universidad de Oviedo

RESUMEN

Se estudia la naturaleza de la resistencia a nueve antibióticos aminoglicósidos que expresa un aislado clínico de *Serratia marcescens*. Esta cepa alberga dos plásmidos de resistencia de masa molecular 50 y 85 megadaltons respectivamente, que pueden cotransferirse por conjugación a *Escherichia coli*. La expresión fenotípica de las resistencias ha sido correlacionada con las actividades adeniltransferasa y acetiltransferasa tanto en células transconjugantes de *E. coli*, albergando uno o ambos plásmidos, como en segregantes plasmídicos obtenidos por tratamiento con bromuro de etidio, que habían perdido algunas marcas de resistencia a aminoglicósidos. Se encontró que el plásmido de 50 Mdal. codifica una adeniltransferasa cuyo perfil de sustratos incluye estreptomina y espectinomicina. El plásmido de 85 Mdal. codifica tres enzimas diferentes: una adeniltransferasa similar a la anterior pero con menor afinidad por los sustratos; una acetiltransferasa con fuerte afinidad por gentamicina, tobramicina y sisomicina y menor por kanamicina y deoxikanamicina B; y una fosfo-transferasa cuyo perfil incluye al menos kanamicina, neomicina, aminosidina y ribostamicina.

SUMMARY

The nature of resistance to nine aminoglycoside antibiotics shown in a clinical isolate of *Serratia marcescens* is studied. This strain carries two resistance plasmids of 50 and 85 megadaltons in size that were cotransferred by conjugation to *Escherichia coli*. The phenotypic resistance has been correlated with the adenyltransferase and acetyltransferase activities of the *E. coli* transconjugants harboring one or both plasmids, and in plasmidic segregants obtained by ethidium bromide treatment which showed loss of some resistance markers to aminoglycosides. It was found that the plasmid of 50 Mdal. codifies an adenyltransferase with a profile of substrates which includes streptomycin and spectinomycin, whereas the 85 Mdal. plasmid codifies three different enzymes: an adenyltransferase similar to the preceding, but with less affinity for the substrates; an acetyltransferase with strong affinity for gentamicin, sisomicin and tobramycin, but weak for kanamycin and deoxykanamycin B; and a phosphotransferase whose profile includes at least kanamycin, neomycin, aminosidin and ribostamicine. The experimental data obtained indicate that in the resistance to nine aminoglycosides in the nosocomial strain of *S. marcescens* three different enzymes are implicated.

INTRODUCCION

Los aminoglicósidos constituyen un grupo de antibióticos cuya utilización es básica en la quimioterapia actual. Su espectro de acción incluye fundamentalmente bacterias Gram-negativas, micobacterias y *Staphylococcus aureus*. En cuanto a su modo de acción tienen un efecto bactericida, sobre las cepas susceptibles, relacionado con la interferencia en la síntesis protéica a nivel de la subunidad ribosómica 30 S. Este hecho determina la utilización en terapia de estos antibióticos, debido a la existencia de grandes diferencias entre el sistema ribosómico de las bacterias y el de las células eucariotas.

La resistencia a los aminoglicósidos, en situaciones clínicas, se ha planteado desde poco tiempo después de su introducción en terapia, estando determinada predominantemente por la existencia de plásmidos de resistencia (plásmidos R) que codifican la síntesis de enzimas periplásmicos específicos que modifican químicamente al aminoglicósido provocando un bloqueo en su sistema de transporte⁵. Los mecanismos de modificación descritos comprenden: acetilación de grupos amino, adenilación y fosforilación de grupos hidróxilo². Para que la modificación tenga lugar, además del enzima y del aminoglicósido sustrato, se requiere la presencia de un catión divalente y de un cofactor (acetil-coenzima A para la N-acetilación y un nucleótido para la O-adenilación y O-fosforilación).

Actualmente el método de elección para la valoración de las distintas actividades enzimáticas es el radioenzimático, descrito inicialmente por OZANNE¹¹ y ampliando y modificajoo por BENVENISTE y DAVIES¹, que se basa en la valoración de la transferencia al aminoglicósido de los cofactores, que intervienen en la reacción, marcados radioactivamente.

El objeto del presente trabajo ha sido poner de manifiesto si la resistencia a nueve aminoglicósidos, habitualmente utilizados en clínica, que presentaba la cepa de origen hospitalario de *Serratia marcescens* CSC 29381 era debida a la presencia de enzimas modificadores de aminoglicósidos de origen plasmídico. Para ello hemos desarrollado los siguientes puntos:

- 1.-Elección de un sistema de células apropiado.
- 2.-Caracterización de los elementos genéticos extracromosómicos portadores de las resistencias.
- 3.-Valoración de las distintas actividades enzimáticas implicadas en la resistencia a aminoglicósidos.

MATERIALES Y METODOS

Cepas bacterianas

Serratia marcescens CSC 29381, aislada de una muestra de tejido pulmonar en el Servicio de Microbiología de la Ciudad Sanitaria «Ntra. Sra. de Covadonga»

de Oviedo, no pigmentada y resistente a ampicilina, carbenicilina, cefalosporina, sulfadiazina, trimetoprim-sulfametoxazol, tetraciclina, fosfomicina, a ocho aminoglicósidos (estreptomina, gentamicina, sisomicina, tobramicina, kanamicina, neomicina, aminosidina, ribostamicina) y al aminociclitol espectinomicina.

Serratia marcescens CECT 159, cepa neotipo, sensible a todos los antibióticos anteriormente descritos.

Escherichia coli K12 W3110, resistente a la rifampicina. Dos transconjugantes de *E. coli* W3110 que en experimentos previos de conjugación habían recibido alguno de los siguientes bloques de resistencia, Tc 1: ampicilina, carbenicilina, fosfomicina, estreptomina y espectinomicina. Tc 2: todos los del Tc 1 y además sulfadiazina, trimetoprim-sulfametoxazol, cefalosporina, tetraciclina y los aminoglicósidos gentamicina, sisomicina, kanamicina, neomicina, aminosidina y ribostamicina.

Pruebas de sensibilidad a antibióticos

La resistencia a los antibióticos fue determinada por técnicas de difusión en agar recomendadas por la O.M.S. (antibiograma, replica en placas conteniendo antibióticos y C.I.M.) con las modificaciones descritas en trabajos previos^{7,8}.

Obtención de segregantes

El método utilizado se basó en las técnicas descritas por SALISBURY, HEDGES y DATTA¹² y TOMOEDA *et al.*¹³ utilizando bromuro de etidio en concentraciones subinhibitorias (150-200 $\mu\text{g/ml}$).

Aislamiento del ADN plasmídico

El ácido desoxirribonucleico plasmídico fue extraído de las células por el método del lisado claro de CLEWELL y HELINSKI³ parcialmente modificado⁸.

Electroforesis en geles de agarosa y estimación del peso molecular

Las bandas de ADN plasmídico fueron visualizadas por electroforesis de geles de agarosa en placas horizontales aplicando el método de MEYERS *et al.*⁹. Para la estimación de la masa molecular de los plásmidos problema se incluyeron en los geles plásmidos patrones de masa molecular conocida. La electroforesis fue realizada durante 5 horas a 100 m.A. Después de haber sido teñidas con bromuro de etidio, las placas fueron visualizadas en un transiluminador de luz ultravioleta, y posteriormente fotografiadas.

Las movilidades relativas de los plásmidos problema fueron correlacionadas frente al logaritmo de las masas moleculares de los plásmidos standards.

Para el ensayo radioenzimático nos basamos en el método descrito por BENVENISTE y DAVIES¹ según el siguiente protocolo:

1.-Obtención de extractos enzimáticos crudos.

Para la preparación de los extractos enzimáticos crudos las células fueron crecidas a 37°C en un medio LB (Luria Broth) hasta la fase logarítmica de crecimiento, sometidas a centrifugación y lavado con tampón (tris-clorato 10 mM, cloruro magnésico 10 mM y β-mercaptoetanol 3 mM, pH 7,8). Las células resuspendidas en el mismo tampón fueron sometidas a un proceso de sonicado durante 3 intervalos de 45 segundos. Los extractos enzimáticos resultantes fueron centrifugados a 45.000 rpm durante 60 minutos, y el sobrenadante, que es el extracto enzimático crudo, fue mantenido en hielo hasta proceder al ensayo radioenzimático.

2a.-Componentes integrantes de la mezcla reactiva para la valoración de la actividad adeniltransferasa:

10 μl. de ATP (¹⁴C) con una actividad de 10 μCi/μmol/ml.

10 μl. de una solución de 1 mg/ml del antibiótico sustrato (estreptomicina, espectinomicina, kanamicina, gentamicina, neomicina).

10 μl. de extracto enzimático crudo.

10 μl. de tampón (Tris 1 M, cloruro magnésico 1 M, cloruro amónico 2 M y DTT 0,5 M) pH 7,8.

2b.-Componentes de la mezcla reactiva para la valoración de la actividad acetiltransferasa:

10 μl. de Acetil-coenzima A (¹⁴C) con una actividad de 25 μCi/ml.

10 μl. de una solución de 1 mg/ml de antibiótico sustrato (gentamicina, sisomicina, tobramicina, kanamicina, neomicina, aminosidina, amikacina).

10 μl. de extracto enzimático crudo.

10 μl. de tampón pH 5,8 (ácido cítrico 0,6 M, citrato sódico 0,6 M, acetato magnésico 1 M, DTT 0,5 M), o bien tampón pH 7,6 (Tris base 1 M, cloruro magnésico 1 M, cloruro amónico 1 M, DTT 0,5 M).

3.-Desarrollo y valoración de la reacción.

Después de incubada la mezcla 30 minutos a 30°C; alícuotas de 20 μl. fueron pipeteadas en filtros de fosfocelulosa Whatman P-81, de 1 cm². Estos filtros, al estar cargados negativamente, permiten la unión electrostática de los aminoglicósidos, que tienen naturaleza catiónica. Los filtros fueron introducidos en 200 ml. de agua destilada a 80°C durante 2 ó 3 minutos y lavados tres veces en agua destilada fría. Una vez secos se procedió a la lectura de la radioactividad fijada en un contador de centelleo que registra cuentas por minuto. Puesto que la reacción de modificación es estequiométrica, la suma de radioactividad fijada es directamente proporcional a la cantidad de enzima presente en el extracto. Para hallar el

perfil de sustrato del enzima, los valores, obtenidos en cuentas por minuto, para los distintos sustratos se expresan en forma de porcentajes relativos a uno de ellos al que se le da el valor de 100.

RESULTADOS

I. ELECCIÓN DEL SISTEMA DE CÉLULAS

En la literatura se cita que un determinado enzima puede modificar diferentes antibióticos aminoglicósidos y que un determinado aminoglicósido puede ser modificado por más de un tipo de enzimas^{5,10}. Para poder aplicar el método radioenzimático necesitábamos un sistema de células apropiado en el que no se solapasen los efectos de los diferentes tipos de posibles enzimas responsables de la resistencia múltiple a aminoglicósidos que expresaba el aislado clínico de *S. marcescens* CSC 29381. Con este fin intentamos obtener y seleccionar distintos tipos de segregantes plasmídicos en la cepa de *S. marcescens* y en los dos tipos de células transconjugantes de *E. coli* que habían recibido distintas marcas de resistencia de *S. marcescens* en experimentos previos de conjugación. Para ello los tres tipos de células fueron crecidas en presencia de 150-200 µg/ml de bromuro de etidio. El bromuro de etidio es un agente intercalante que, a concentraciones subinhibitorias, actúa impidiendo la replicación del ADN plasmídico sin afectar a la replicación del ADN cromosómico.

En células de *S. marcescens* no se obtuvieron segregantes en los que se hubiesen eliminado todas o parte de las marcas de resistencia, mientras que en células transconjugantes de *E. coli* se obtuvieron distintos tipos de segregantes y, ante los resultados obtenidos, fue seleccionado el sistema de células que se incluye en la Tabla I.

II. ANÁLISIS DEL ADN PLASMÍDICO

Con objeto de caracterizar el plásmido o plásmidos de resistencia presentes en los distintos tipos de células seleccionadas, cultivos independientes de toda ellas fueron crecidos, lisados y analizado el ADN plasmídico, presente en los lisados, por electroforesis en geles de agarosa. En la Figura 1 se muestran los resultados obtenidos, puede observarse que en los lisados de *S. marcescens* CSC 29381 aparecen dos bandas que corresponden a dos plásmidos de 85 y 50 megadaltons de masa molecular, a los que hemos designado como pUO 320 y pUO 321 respectivamente. Dos bandas de la misma masa aparecen en *E. coli* Tc 2, mientras que en *E. coli* Tc 1 solamente aparece la banda de 50 Mdal. y en *E. coli* Tc 2 segregante 1 la de 85 Mdal. En los otros dos tipos de segregantes obtenidos a partir de células de *E. coli* Tc 2 se observa la banda de 50 Mdal. y una banda con movilidad ligeramente superior a la del plásmido de 85 Mdal. (pUO 320) por lo

TABLA I
Correlación entre niveles de resistencia a aminoglicósidos (C.I.M.) y presencia de plásmidos en el sistema de cepas elegido

Cepa	Concentración inhibitoria mínima (µg/ml)											Plásmidos	
	Sm	Sp	Gm	Si	Tm	Km	Nm	Am	Rib	DKB	Ak	Masa molecular (megadaltons)	Denominación
<i>S. marcescens</i> CSC 29381	64	> 128	128	64	16	> 128	> 128	> 128	> 128	8	2	85 ; 50	(a) pUO 320 ; pUO 321
<i>S. marcescens</i> CECT 159	2	16	< 1	< 1	1	2	2	1	8	2	1	-	-
<i>E. coli</i> K12 W3110	< 1	8	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	-	-
Transconjugante 1	32	128	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	- 50	- pUO 321
Transconjugante 2	32	> 128	32	16	4	> 128	128	> 128	> 128	2	1	85 ; 50	pUO 320 ; pUO 321
Tc-2 segregante 1	16	64	16	8	< 1	> 128	16	> 128	> 128	< 1	< 1	85	- pUO 320 ;
Tc-2 segregante 2	32	> 128	16	16	4	< 1	< 1	< 1	2	2	4	≈ 83 ; 50	(b) pUO 320Δ ¹ ; pUO 321
Tc-2 segregante 3	32	> 128	< 1	2	< 1	128	128	> 128	> 128	< 1	< 1	≈ 83 ; 50	(c) pUO 320Δ ² ; pUO 321

Símbolos.-Sm: estreptomina; Sp: espectinomina; Gm: gentamicina; Si: sisomicina; Tm: tobramicina; Km: kanamicina; Nm: neomicina; Am: amikacina; Rib: ribostamicina; DKB: deoxikanamicina B; Ak: amikacina.

(a) pUO: plásmido de la Universidad de Oviedo.

(b) y (c): Deleciones en el plásmido pUO 320.

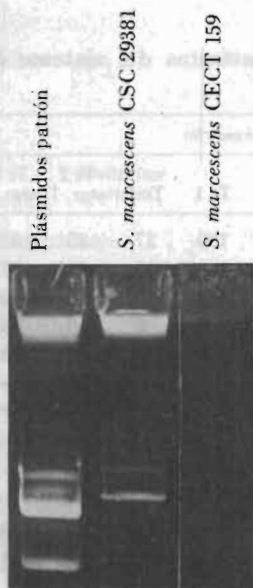


Fig. 1a

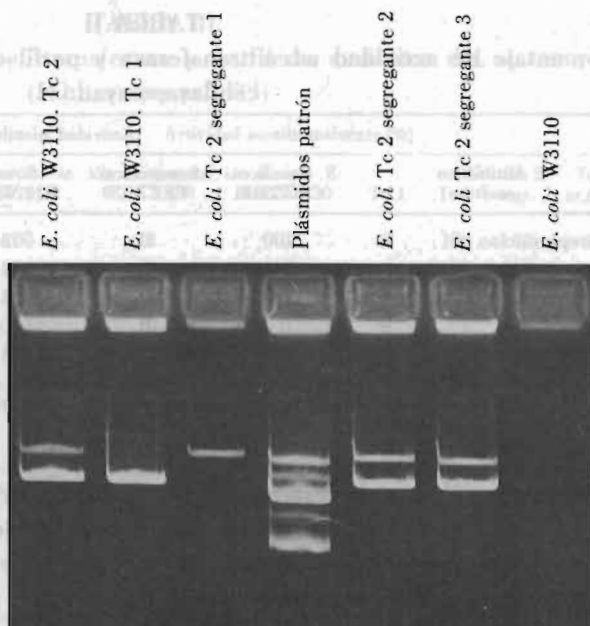


Fig. 1b

Fig. 1.—Electroforesis en geles de agarosa de plásmidos de resistencia a aminoglicósidos en *S. marcescens* (figura 1a), y en derivados de *E. coli* W3110 (figura 1b). Masa molecular de los plásmidos patrón: R124 (77 Mdal.); R1 (62 Mdal.); R1-dRd19K (47 Mdal.); RP4 (34 Mdal.); R388 (21 Mdal.).

que suponemos que este plásmido, en ambos casos, ha sufrido una delección de aproximadamente 2-3 Mdal. Los segregantes que han perdido la expresión fenotípica de todas las resistencias no presentan ninguna banda de ADN extracromosómico. En la Tabla I se correlaciona el tipo y niveles de resistencia que expresan diferentes tipos de células con la masa molecular de los plásmidos que albergan.

III. VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA ADENILTRANSFERASA

Para valorar la posible actividad adeniltransferasa de las cepas seleccionadas, las células fueron crecidas y lisadas y los extractos enzimáticos crudos fueron ensayados en presencia de ATP (^{14}C). En la Tabla II se relacionan los porcentajes de actividad de los extractos de los diferentes tipos de células frente a cinco moléculas de aminoglicósidos y se puede observar que, mientras los procedentes de la cepa neotipo, *S. marcescens* 159, no muestran actividad, los del aislado clínico *S. marcescens* CSC 29381 muestran actividad y con un perfil de sustratos específico para estreptomycin y espectinomycin. Esta actividad también la muestran los dos tipos de células transconjugantes y los distintos tipos de

TABLA II

Porcentaje de actividad adeniltransferasa y perfil de sustratos del sistema de células ensayado (1)

Antibiótico sustrato	Actividad adeniltransferasa (%)						
	<i>S. marcescens</i> CSC 29381	<i>S. marcescens</i> CECT 159	<i>E. coli</i> K12 W3110	Tc 1	Tc 2	Tc 2 segr. 1	Tc 2 segr. 2
Estreptomina	100	0	13	100	37	25	37
Espectinomicina	145	0	4	140	49	28	72
Kanamicina	0	0	4	3	0	1	0
Gentamicina	0	0	0	0	0	0	0
Neomicina	0	0	1	0	1	0	0

(1) Los porcentajes de actividad están calculados en relación a la estreptomina, e independientemente para *S. marcescens* y *E. coli*.

segregantes. Hemos de resaltar que los porcentajes de adenilación mostrados por el Tc-1, que sólo presenta resistencia a aminoglicósidos estreptidínicos (estreptomina) y al aminociclitol espectinomicina, son superiores a los valorados en las células Tc 2, que además presentaban resistencia a por lo menos 6 aminoglicósidos deoxi-estreptamínicos (Tabla II).

Cuando se correlaciona la expresión fenotípica de la resistencia (CIM) (Tabla I) con el porcentaje de actividad adeniltransferasa (Tabla II) se observa que todas las cepas resistentes a estreptomina y espectinomicina presentan actividad adeniltransferasa con un perfil de sustratos que incluye solamente estas dos moléculas.

IV. VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA ACETILTRANSFERASA

Para valorar la actividad acetiltransferasa de las cepas seleccionadas, los extractos enzimáticos crudos del sistema de cepas elegido fueron ensayados en presencia de Acetil-CoA. Solamente se ha ensayado dicha actividad frente a los aminoglicósidos deoxi-estreptamínicos ya que, en la literatura, nunca se ha descrito una acetiltransferasa con afinidad por los aminoglicósidos estreptidínicos. En la Tabla III se relacionan los porcentajes de actividad de los extractos enzimáticos del sistema de células seleccionado frente a ocho aminoglicósidos deoxi-estreptamínicos, observándose que mientras que en el caso de la cepa neotipo, *S. marcescens* CECT 159, no se presenta actividad, los extractos procedentes del aislado clínico de *S. marcescens* CSC 29381 muestran actividad acetilante con gran especificidad de sustrato por gentamicina, tobramicina y sisomicina y en menor grado por kanamicina y DKB. Dicha actividad también la presentan las células Tc 2 y su segregante de tipo 2. Sin embargo, como era de esperar, las células sensibles fenotípicamente a los antibióticos deoxi-estreptamínicos ensayados no presentan actividad enzimática acetilante.

TABLA III

Porcentaje de actividad acetiltransferasa y perfil de sustratos del sistema de células ensayado (1)

Antibiótico sustrato	Actividad acetiltransferasa (%)						
	<i>S. marcescens</i> CSC 29381	<i>S. marcescens</i> CECT 159	<i>E. coli</i> K12 W3110	Tc 1	Tc 2	Tc 2 segr. 2	Tc 2 segr. 3
Gentamicina	100	1	2	2	100	80	0
Tobramicina	108	0	0	0	27	22	0
Sisomicina	106	3	1	1	20	12	0
Kanamicina	63	0	0	0	5	2	0
DKB	61	0	0	0	2	5	0
Neomicina	6	3	3	2	0	2	1
Aminosidina	1	0	1	1	0	2	0
Amikacina	3	4	1	1	2	2	0

(1) Los porcentajes de actividad están calculados en relación a la gentamicina, e independientemente para *S. marcescens* y *E. coli*.

TABLA IV

Enzimas plasmídicos modificadores de aminoglicósidos del aislado clínico *S. marcescens* CSC 29381

Nombre sistemático	Actividad enzimática	ENZIMA		PLASMIDO	
		Rango sustratos	Punto de modificación	Masa molecular	Denominación
AAD (3'')	Nucleotidil-transferasa	Sm Sp	3''- hidroxilo de la amino- hexosa III de la Sm, 9'- hidroxilo de la actinamina de la Sp	85 Mdal.	pUO 320
AAD (3'')	Nucleotidil-transferasa	Sm Sp	3''- hidroxilo de la amino- hexosa III de la Sm, 9'- hidroxilo de la actinamina de la Sp	50 Mdal.	pUO 321
AAC (3)-II	Acetiltransferasa	Gm, Si, Tm y *(Km, DKB)	3- amino del anillo de deoxi-estreptamina	85 Mdal.	pUO 320
APH (3')	Fosfotransferasa	Km, Nm, Am, Rib	3'- hidroxilo de la amino- hexosa I de la molécula	85 Mdal.	pUO 320

* Con baja afinidad.

Al correlacionar la expresión fenotípica de la resistencia (Tabla I) con el porcentaje de actividad acetiltransferasa (Tabla III) se observa que todas las cepas resistentes fenotípicamente a gentamicina y sisomicina muestran actividad

acetilante con especificidad por gentamicina, sisomicina, tobramicina y en menor grado por kanamicina y DKB.

V. VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA FOSFOTRANSFERASA

La presencia de una actividad fosfotransferasa ha sido deducida atendiendo al estudio comparado de los fenotipos de resistencia (CIM) y el análisis de bandas de ADN plasmídico de las células del sistema elegido. Tanto las células de *S. marcescens* CSC 29381 como las derivadas de *E. coli* W3110, Tc 2 y los segregantes de tipo 1 y 3, presentan niveles de resistencia elevados a los aminoglicósidos kanamicina, neomicina, aminosidina y ribostamicina, mientras que frente a ninguno de estos sustratos existe una fuerte actividad acetiltransferasa o adeniltransferasa. Por otro lado, cuando se correlacionan dichas resistencias con la presencia de bandas de ADN plasmídico en las células segregantes, obtenidas por tratamiento con bromuro de etidio de *E. coli* TC 2, se observa que estas cuatro resistencias se transfieren y eliminan conjuntamente y están en una misma banda de ADN.

DISCUSION

Ante los resultados obtenidos podemos deducir que son tres los mecanismos implicados en la resistencia a aminoglicósidos que presenta el aislado clínico de *S. marcescens* CSC 29381. El primero corresponde a un enzima adenilante de grupos hidróxilo de la espectinomicina y de los aminoglicósidos estreptidínicos como la estreptomycin. Este perfil de sustratos corresponde al enzima estreptomycin adeniltransferasa caracterizado por BENVENISTE y DAVIES en 1971¹ y cuyo nombre sistemático actual es AAD (3''): nucleotidiltransferasa¹⁰. El segundo corresponde a un enzima acetilante de grupos amino, con afinidad fuerte por los aminoglicósidos deoxi-estreptamínicos: gentamicina, sisomicina y tobramicina y débil por kanamicina y DKB; este perfil de sustratos corresponde al del enzima descrito en 1974 por LE GOFFIC (citado en 6) en *Klebsiella* denominado en principio gentamicin-acetiltransferasa y cuyo nombre sistemático actual es AAC (3)-II acetiltransferasa¹⁰. La resistencia a los otros cuatro aminoglicósidos deoxi-estreptamínicos: kanamicina, neomicina, aminosidina y ribostamicina se transfería en bloque a células de *E. coli* y en este huésped era eliminada también en bloque por tratamiento con bromuro de etidio. Pero ni en la cepa parental de *S. marcescens* ni en células transconjugantes de *E. coli* resistentes a estos cuatro antibióticos se encontró actividad adeniltransferasa ni acetiltransferasa significativa frente a ninguno de ellos, lo que nos lleva a deducir que el tercer mecanismo de resistencia es debido a una fosfotransferasa de tipo APH (3') cuya caracterización más completa requeriría la valoración radioenzimática de dicha actividad frente a estos y a otros dos sustratos: butirosina y lividomicina¹⁰.

Los determinantes genéticos responsables de los tres mecanismos de resistencia parecen estar localizados en moléculas de ADN extracromosómico de tipo plasmídico (factores R, o plásmidos de resistencia). En el aislado clínico de *S. marcescens* CSC 29381 coexisten dos de estos plásmidos, de masa molecular 85 y 50 Mdal. a los que hemos designado pUO 320 y pUO 321. Ambos plásmidos pueden cotransferirse mediante conjugación a *E. coli* y en este huésped son albergados de forma estable y expresan el mismo espectro de resistencia a aminoglicósidos que en el aislado clínico de *S. marcescens* aunque a distintos niveles. Cada uno de estos plásmidos también puede ser portado por *E. coli* de forma independiente y estable; cuando el plásmido albergado es el de 50 Mdal. (pUO 321) las células de *E. coli* (Tc 1) sólo presentan el enzima AAD (3''): nucleotidiltransferasa, mientras que cuando albergan el plásmido de 85 Mdal. (Tc 2) presentan los tres tipos de enzimas descritos.

En la TABLA IV se resumen las características de los enzimas presentes en el aislado clínico de *S. marcescens* CSC 29381 y se correlacionan con los plásmidos que los codifican.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. R. Alvarez, Jefe del Servicio de Bacteriología de la C. S. Covadonga por la cepa de *S. marcescens* CSC 29381.

BIBLIOGRAFIA

- 1) BENVENISTE, R. and J. DAVIES (1971).—Enzymatic acetylation of aminoglycoside antibiotics by *Escherichia coli* carrying an R-factor. *Biochem.*, **10**: 1.787-1.796.
- 2) — (1973).—Mechanisms of antibiotic resistance in bacteria. *Annu. Rev. Biochem.*, **42**: 471-506.
- 3) CLEWELL, D. B. and D. R. HELINSKI (1968).—Supercoiled circular DNA-protein complex in *Escherichia coli* purification and induced conversion to an open circular DNA form. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **62**: 1.159-1.166.
- 4) DATTA, N. and R. W. HEDGES (1972).—Host ranges of R-factor. *J. Gen. Microbiol.*, **70**: 456-460.
- 5) DAVIES, J. and D. I. SMITH (1978).—Plasmid resistance to antimicrobial agents. *Ann. Rev. Microbiol.*, **32**: 469-518.
- 6) HAAS, M. J. and J. E. DOWDING (1975).—Aminoglycoside-modifying enzymes. *Methods Enzymol.*, **43**: 611-628.
- 7) LLANEZA, J., F. J. MÉNDEZ, M. C. MENDOZA y C. HARDISSON (1979).—Transferencia por conjugación y eliminación por agentes curantes de un factor R de *Serratia marcescens*. *Arch. Fac. Med. Oviedo*, **1**: 359-366.
- 8) MENDOZA, C., J. M. GARCÍA, J. LLANEZA, F. J. MÉNDEZ, C. HARDISSON and J. M. ORTIZ (1980).—Plasmid-Determined Resistance to Fosfomicin in *Serratia marcescens*. *Antimicrob. Agents Chemoter.*, **18**: 215-219.
- 9) MEYERS, J. A., D. SÁNCHEZ, L. P. ELWELL and S. FALKOW (1976).—Simple agarose electrophoretic method for de identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.*, **127**: 1.529-1.537.
- 10) MITSUHASHI, S., S. YAMAGIDHI, T. SAWAI and H. KAWABE (1977).—*R-factor*. Ed. University Park Press.
- 11) OZANNE, B., R. BENVENISTE, D. TIPPER and J. DAVIES (1969).—Aminoglycoside antibiotics inactivation by phosphorylation in *E. coli* carrying R-factors. *J. Bacteriol.*, **100**: 1.144-1.146.
- 12) SALISBURY, W., R. W. HEDGES and N. DATTA (1971).—Two modes of curing transmissible bacterial plasmids. *J. Gen. Microbiol.*, **70**: 443-452.
- 13) TOMOEDA, N., M. INUZUKA, N. KUBO and S. NAKAMURA (1968).—Effective elimination of drug resistance and sex-factors in *Escherichia coli* by Sodium Dodecyl Sulfate. *J. Bacteriol.*, **95**: 1.078-1.089.