

Mecanismo de resistencia a quinolonas en cepas de *Salmonella typhimurium*

Quinolone resistance mechanism in *Salmonella typhimurium* strains

CASTRO, D.¹, RUIZ, J.², SANTAMARÍA, J. A.¹, VILA, J.² y BORREGO, J. J.¹

¹ Departamento de Microbiología. Universidad de Málaga. Campus Universitario Teatinos. 29071. Málaga.

² Servicio de Microbiología. Hospital Clínico y Provincial. Universidad de Barcelona. Villarroel, 170. 08036. Barcelona.

RESUMEN

Se ha investigado el mecanismo de resistencia a quinolonas en 42 cepas de *Salmonella typhimurium* resistentes al ácido nalidixico y productoras de brotes de toxoinfecciones alimentarias. Los análisis de las proteínas de membrana externa y lipopolisacáridos de estas cepas no mostraban diferencias con cepas susceptibles de este mismo serotipo. Se secuenciaron un fragmento de PCR de 285 bp que contenía la región que determina la resistencia a las quinolonas del gen *gyrA*, así como un fragmento de 237 bp de la región homóloga del gen *parC*. Todos las cepas resistentes presentaban un cambio del aminoácido Ser-83 a Phe en la proteína GyrA, pero ningún cambio en la proteína ParC. Estos resultados indican que esta mutación en el gen *gyrA* juega un importante papel en la adquisición de la resistencia al ácido nalidixico.

Palabras clave: *Salmonella typhimurium*. Quinolonas. Resistencia. PCR. *GyrA*. *ParC*.

ABSTRACT

The mechanism of quinolone resistance in 42 food-borne strains of *Salmonella typhimurium* which showed nalidixic acid resistance was investigated. Analysis of outer membrane proteins and lipopolysaccharides from both quinolone-susceptible and resistant did not shown any differences among the clinical isolates tested. A 285 bp PCR fragment containing the quinolone resistance determining region of the *gyrA* gene and a 237 bp PCR fragment containing the region of *parC* homologous to the quinolone-resistance determining region of the *gyrA* gene, were sequenced. All the resistant strains presented a change at Ser-83 to Phe in the GyrA protein, but no changes were observed in the ParC protein. These findings indicate that this mutation in *gyrA* gene plays a major role in the acquisition of nalidixic acid resistance in clinical isolates of *S. typhimurium*.

Key words: *Salmonella typhimurium*. Quinolones. Resistance. PCR. *GyrA*. *ParC*.

Recibido: 19-12-96

Aceptado: 30-1-97

BIBLID [0004-2927(1997) 38:1; 63-69]

INTRODUCCIÓN

La salmonellosis aguda en la población es una enterocolitis autolimitada que, generalmente, no requiere una terapia específica. Sin embargo, en algunos casos se hace necesario la aplicación de una terapia antimicrobiana, no existiendo una buena correlación entre la susceptibilidad *in vitro* de las cepas con la eficacia "in vivo". La explicación más convincente de esta diferencia se debe a que parece que se necesita alcanzar una adecuada concentración intracelular (en los macrófagos) de los antimicrobianos. La incidencia de cepas multirresistentes de *Salmonella* ha conllevado el uso de las fluoroquinolonas para el tratamiento de las salmonellosis. Estos antimicrobianos presentan una buena actividad *in vitro* contra cepas de *Salmonella* spp., y debido su capacidad para penetrar en las células han sido considerados agentes muy efectivos contra estos patógenos.

El mecanismo de la resistencia a la quinolona ha sido abordado, en el presente estudio, mediante dos estrategias: (i) *determinación del mecanismo de permeabilidad del antimicrobiano*: mediante análisis de la acumulación de las quinolonas, así como de las proteínas de la membrana externa (Omp) y de los lipopolisacáridos (LPS), tanto de las cepas resistentes como de las sensibles a estos quimioterápicos; y (ii) *determinación molecular de las bases de resistencia de la quinolona*: mediante secuenciación del ADN de la región determinante de resistencia a las quinolonas de los genes *gyrA* y *parC*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas bacterianas

Se aislaron un total de 42 aislados clínicos de *S. typhimurium* resistentes al ácido nalidixico de diversos brotes de toxiinfecciones alimentarias desde 1989 a 1992. Dos cepas susceptibles a la quinolona se eligieron como controles para determinar el mecanismo de resistencia a las quinolonas.

Pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos

Se realizaron por el método de dilución en agar (1). Aproximadamente 10^4 ufc/ml de cada aislado se inocularon con un replicador multipunto en medio de cultivo que contenía diluciones seriadas de ciprofloxacina (Bayer, Leverkusen, Alemania) o ácido nalidixico (Prodesfarma, Barcelona).

Las pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos se realizaron también por el método de difusión en disco (2), utilizando agar Mueller-Hinton (BBL Microbiology Systems, Becton Dickinson, Cockeysville, Md).

Pruebas de acumulación a quinolonas

Las pruebas de acumulación y permeabilidad de las quinolonas se determinaron aplicando el método de Chapman & Georgopapadokou (3) con las modificaciones introducidas por Mortimer & Piddock (4).

Análisis de Omp y LPS

El análisis de las proteínas de membrana externa (Omp) se realizaron por PAGE-SDS siguiendo el método de Chart & Trust (5). Las membranas citoplasmáticas se solubilizaron selectivamente con sarcosinato-lauril sódico siguiendo el método de Filip et al. (6). Las proteínas se detectaron en los geles por tinción con azul brillante de Coomassie.

El análisis de lipopolisacáridos (LPS) se realizó mediante electroforesis en geles discontinuos de poliacrilamida-SDS de lisados bacterianos digeridos con proteinasa K (7). Los LPS se detectaron usando la tinción con sales de plata descrita por Tsai & Frasch (8) y modificada por Castro et al. (9).

Amplificación y secuenciación de las regiones de ADN que determinan la resistencia a las quinolonas (genes *gyrA* y *parC*)

La reacción de PCR se realizó siguiendo las condiciones especificadas por Vila et al. (10) utilizando un DNA Thermal Cycler 480 (Perkin-Elmer). Los "primers" y nucleótidos libres se eliminaron usando el QiaQuick spin PCR purification kit (Qiagen Inc., Chatsworth, Calif). El ADN de la muestra fue secuenciado utilizando el kit de secuenciación TaqDyeDeoxyTerminator Cycle (Applied Biosystems) y analizado en un secuenciador automático (Applied Biosystems 373A). 20 μ l de la mezcla de la reacción PCR fue digerido con 10 U del enzima de restricción *Hinf* I, y los productos de la digestión separados por electroforesis en geles (1,5% NuSieve + 1% agarosa). El número de acceso a la EMBL de la secuencia parcial del gen *gyrA* en cepas de *S. typhimurium* sensibles y resistentes a las quinolonas es X86695.

RESULTADOS

Durante el periodo de 1989 a 1992 se aislaron 42 cepas de *Salmonella typhimurium* de origen clínico que presentaban resistencia al ácido nalidixico en diversas zonas de la provincia de Málaga. Todas estas cepas fueron tipadas por diferentes métodos para encontrar marcadores epidemiológicos (11).

La susceptibilidad a antimicrobianos no pudo usarse como marcador epidemiológico, ya que todas las cepas analizadas poseían el mismo resistotipo, con la excepción de la resistencia/susceptibilidad al ácido nalidixico (Tabla 1). Para determinar si el descenso en la permeabilidad a las fluoroquinolonas contribuye a su resistencia, se analizaron la acumulación de ciprofloxacina, la integridad del LPS y la composición de sus Omps. La cinética de acumulación de ciprofloxacina se completa a los 5 min (Tabla 1), por lo que se utilizó este tiempo para calcular el nivel de acumulación, no observándose diferencias significativas entre las cepas analizadas. Por otro lado, se han apreciado ligeras diferencias en los perfiles de Omp de las cepas (Fig. 1-A), aunque no hay una clara relación entre los niveles de expresión de las Omps específicas y la acumulación de las quinolonas. Las largas cadenas del polisacárido-O componente del LPS se visualizaron tanto en las cepas sensibles como en las resistentes al ácido nalidixico (Fig. 1-B).

Para establecer si la resistencia a las quinolonas observadas era debido a una mutación o alteración de la ADN girasa y/o a la topoisomerasa IV, se amplificaron y secuenciaron la región determinante de la resistencia a las quinolonas del gen *gyrA* y la región homóloga del gen *parC* de las cepas de *S. typhimurium*. Un fragmento del gen *gyrA* de 343 bp se amplificó de cada aislado, y se determinaron 285 bp de la secuencia (Fig. 2).

La secuencia nucleotídica exhibía un 91% de identidad con la región correspondiente en *Escherichia coli* (12), mientras que la secuencia aminoácida de la proteína GyrA de *S. typhimurium* mostraba un 100% de identidad con la de *E. coli*.

Los fragmentos del gen *gyrA* de la resistencia a la quinolona de los

TABLA 1.—Mutaciones en el gen *gyrA* de los aislados de *Salmonella typhimurium* resistentes a las quinolonas.

Cepa	Acumulación de ciprofloxacina ^a	CMI (µg/ml) Ciprofloxacina	Ácido Nalidixico	Cambio aminoácido ^{**}
S18 [†]	30,53 ± 4,35q	<0,06	4	—
S4 [†]	27,54 ± 2,67	<0,06	4	—
I [‡]	30,09 ± 2,57	0,25	1024	Ser-83 a Phe
II [‡]	23,14 ± 1,28	0,25	1024	Ser-83 a Phe
III [‡]	21,19 ± 3,40	0,25	1024	Ser-83 a Phe
IV [‡]	22,73 ± 7,74	0,25	1024	Ser-83 a Phe
V [‡]	29,29 ± 6,85	0,25	1024	Ser-83 a Phe

* Resultados media aritmética de tres experimentos.

** Posición aminoácida equivalente a la serina-83 de la proteína GyrA de *Escherichia coli*.

† Aislados clínicos de *S. typhimurium* sensibles al ácido nalidixico, usados como controles.

‡ Aislados clínicos de *S. typhimurium* resistentes al ácido nalidixico, representativos de cada grupo epidemiológico obtenido utilizando otros marcadores epidemiológicos (Borrego et al., 1992).

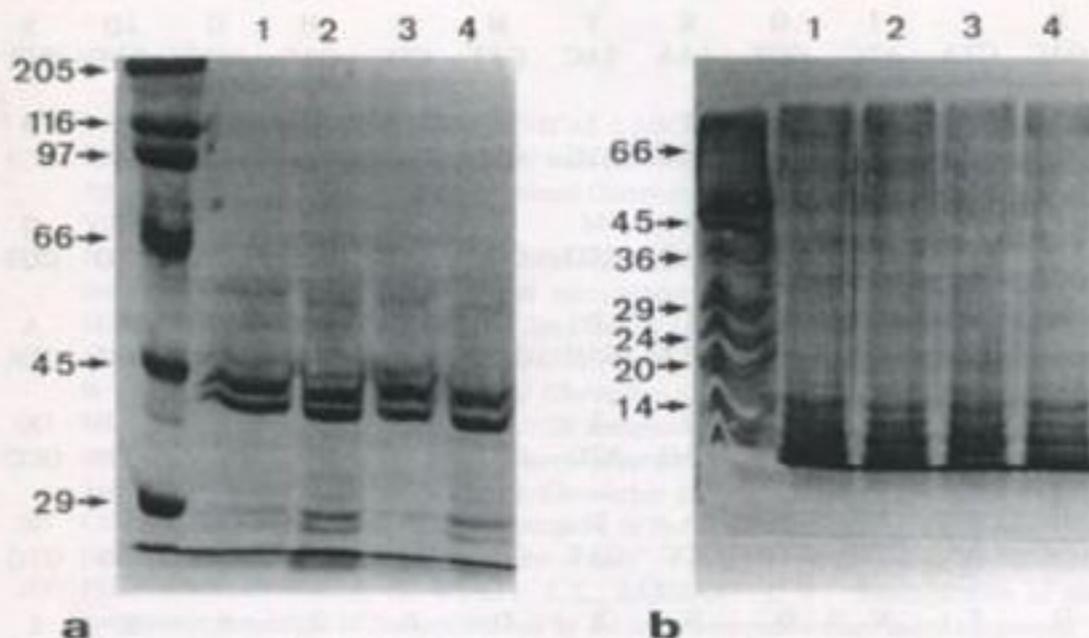


Fig. 1.—Perfiles de OMP (A) y de LPS (B) obtenidos de cepas de *Salmonella typhimurium* susceptibles a las quinolonas (calles 1 y 2) y resistentes a las quinolonas (calles 3 y 4). Los marcadores de masas moleculares (en kilodaltons, kDa) se indican a la izquierda.

aislados clínicos de *S. typhimurium* difieren en solo una posición nucleotídica del perfil que presentan los aislados sensibles al quimioterápico. Poseen un cambio de citosina por timina en posición 251, lo que provoca una sustitución de la serina 83 por la fenilalanina en la proteína GyrA.

La digestión del producto de PCR por el enzima *Hinf* I de una cepa de *S. typhimurium* sensible a la quinolona genera 4 fragmentos de 149 bp, 99 bp, 52 bp y 43 bp. Uno de los sitios de restricción del *Hinf* I en las cepas estudiadas portando una mutación en el codón 83 fue eliminada, resultando solo 3 fragmentos: 151 bp, 149 bp y 43 bp.

En la Tabla 1 se especifica las mutaciones en el gen *gyrA* que conducen a los cambios en los aminoácidos. Todos los aislados clínicos que presentaban una CMI de ciprofloxacina de $>0,125$ $\mu\text{g/ml}$ y de ácido nalidixico de >256 $\mu\text{g/ml}$ mostraban un cambio en la Ser-83 por fenilalanina, mientras que en las cepas sensibles a las quinolonas no se apreció cambios en estos aminoácidos. Las regiones secuenciadas comprendían desde los aminoácidos 68 hasta 166, no apreciándose ningún otro cambio aminoacídico.

Un fragmento génico de 291 bp correspondientes al gen *parC* se amplificó para los aislados sensibles y resistentes, y se determinaron una secuencia de 237 bp, no apreciándose ninguna mutación respecto de la secuencia original descrita por Luttinger et al. (13).

D	V	I	G	K	Y	H	P	H	G	↓D	S
GAC	GTA	ATC	GGT	AAA	TAC	CAT	CCC	CAC	GGC	GAT	TCC
A	V	Y	D	T	I	V	R	M	A	Q	P
GCA	GTG	TAT	GAC	ACC	ATC	GTT	CGT	ATG	GCG	CAG	CCA
F	S	L	R	Y	M	L	V	↓D	G	Q	G
TTC	TCG	CTG	CGT	TAC	ATG	CTG	GTG	GAT	GGT	CAG	GGT
N	H	G	S	I	D	G	D	S	A	A	A
AAC	TTC	GGT	TCT	ATT	GAC	GGC	GAC	TCC	GCG	GCG	GCA
M	R	Y	T	E	I	R	L	A	K	I	A
ATG	CGT	TAT	ACG	GAG	ATC	CGT	CTG	CGC	AAA	ATC	GCC
H	E	L	M	A	D	L	E	K	E	T	V
CAC	GAA	CTG	ATG	GCC	GAT	CTC	GAA	AAA	GAG	ACG	GTG
D	F	V	D	N	Y	D	G	T	E	K	I
GAT	TTC	TGG	GAT	AAC	TAT	GAC	GGT	ACG	GAA	AAA	ATT
P	D	V	M	P	T	K	I	P	↓N	L	
CCG	GAC	GTC	ATG	CCG	ACC	AAA	ATT	CCG	AAT	CTT	

Fig. 2.—Secuencia nucleotídica de la región que determina la resistencia a las quinolonas del gen *gyrA* de *Salmonella typhimurium*. La secuencia aminoacídica deducida se muestra arriba de la secuencia nucleotídica. Las posiciones de los sitios de restricción del *HinfI* se indican con flechas.

CONCLUSIONES

La resistencia a las quinolonas de las cepas de *S. typhimurium* estudiadas no está ligada a cambios de los procesos de permeabilidad/acumulación del antimicrobiano en los microorganismos.

La mutación en el gen *gyrA* de *S. typhimurium* en posición 251 determina la sustitución del aminoácido serina por fenilalanina en posición 83 de la proteína GyrA.

No se han determinado mutaciones en la región del gen homólogo *parC*, por lo que este gen parece no necesario para la adquisición de altos niveles de resistencia al ácido nalidixico, aunque pueda ser necesario para obtener altos niveles de resistencia a las fluoroquinolonas.

La mutación del gen *gyrA* en las cepas estudiadas es suficiente para proporcionar altos niveles de resistencia al ácido nalidixico y a bajos niveles de fluoroquinolonas.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 2nd ed. Approved standard M7-A2 (1990a). National Committee for Clinical Laboratory Standards, Vilanova, Pa.
- (2) NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS: Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 4th ed. Approved standard M2-A4 (1990b). National Committee for Clinical Laboratory Standards, Vilanova, Pa.
- (3) CHAPMAN, J. S., GEORGOPAPADOKOU, N. H.: "Routes of quinolone permeation" in *Escherichia coli* Antimicrob Agents Chemother (1988), 32:1187-1191.
- (4) MORTIMER, P. G. S., PIDDOCK, L.: "A comparison of methods used for measuring the accumulation of quinolones by *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*". *J Antimicrob Chemother* (1991), 28:639-653.
- (5) CHART, H., TRUST, T. J.: "Characterization of the surface antigens of the marine fish pathogens *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*". *Can J Microbiol* (1984), 30:703-710.
- (6) FILIP, C., FLETCHER, G., WULFF, J. L., EARHART, C. F.: "Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by the ionic detergent sodium lauryl sarcosinate". *J Bacteriol* (1973), 115:717-722.
- (7) HITCHCOCK, P. J., BROWN, T. M.: "Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels". *J Bacteriol* (1983), 154:269-277.
- (8) TSAI, C. M., FRASCH, C. E.: "A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels". *Anal Biochem* (1982), 119:115-119.
- (9) CASTRO, D., SANTAMARÍA, J. A., LUQUE, A., MARTÍNEZ-MANZANARES, E., BORREGO, J. J.: "Antigenic characterization of the etiological agent of the brown ring disease affecting Manila clams". *Syst Appl Microbiol* (1996), 19:231-239.
- (10) VILA, J., RUIZ, J., MARCO, F., BARCELO, A., GOÑI, P., GIRALT, E., JIMÉNEZ DE ANTA, M. T.: "Association between double mutation in *gyrA* gene of ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* and MICs". *Antimicrob Agents Chemother* (1994), 38:2477-2479.
- (11) BORREGO, J. J., CASTRO, D., JIMÉNEZ-NOTARIO, M., LUQUE, A., MARTÍNEZ-MANZANARES, E., RODRÍGUEZ-AVIAL, C., PICAZO, J. J.: "Comparison of epidemiological markers of *Salmonella typhimurium* isolated from different sources in Spain". *J Clin Microbiol* (1992), 30:3058-3064.
- (12) SWANBERG, S. L., WANG, J. C.: "Cloning and DNA sequencing of the *Escherichia coli gyrA*. A coding for the A subunit of DNA gyrase". *J Mol Biol* (1987), 197:729-736.
- (13) LUTTINGER, A. L., SPRINGER, A. L., SCHMID, M. B.: "A cluster of genes that affects nucleoid segregation in *Salmonella typhimurium*". *New Biol* (1991), 3:687-697.