

# Mecanismo de resistencia a ciprofloxacina en *Aeromonas hydrophila* y *Stenotrophomonas maltophilia* aisladas de aguas residuales de Las Palmas de Gran Canaria

González-Lama, Z.\*; Lupiola, P. A.\*; Ruiz, J.\*\* y Vila, J.\*\*

\* Microbiología. Facultad de Veterinaria de Las Palmas.

\*\* Servicio de Microbiología. Hospital Clínico de Barcelona.

## MECHANISM OF RESISTANCE TO CIPROFLOXACIN IN *AEROMONAS HYDROPHILA* AND *STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA* ISOLATED FROM SEWAGE FROM LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

**RESUMEN:** Se han estudiado en cinco cepas diferentes de *Aeromonas hydrophila* (2) y *Stenotrophomonas maltophilia* (3), aisladas de aguas residuales de Las Palmas de Gran Canaria, sus concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) frente a la fluoroquinolona ciprofloxacina. También fueron investigados fragmentos de los genes que codifican a la gyrA de las regiones (QRDRs) que determinan la resistencia a quinolonas de estos microorganismos. Hemos encontrado que las cepas que presentaban unas CMI de 0,06 mg/l a ciprofloxacina (CIP) (3) no presentaban ninguna mutación en estos genes; mientras que en las que tenían una CMI de 0,25 mg/l a CP, se había producido una mutación en el codón 83 que corresponde a la serina (Ser), al igual que ocurre en otras cepas resistentes a quinolonas descritas por otros autores.

**Palabras clave:** Resistencia, Ciprofloxacina, *Aeromonas hydrophila*, *Stenotrophomonas maltophilia*, sewage.

**SUMMARY:** We have studied in five different strains of *Aeromonas hydrophila* (2) and *Stenotrophomonas maltophilia* (3), isolated from sewage of Las Palmas de Gran Canaria, their Minimal Inhibitory Concentrations (MICs) to fluoroquinolone ciprofloxacin (CIP). Also we research the quinolone-resistance determining region (QRDRs) of gen gyrA in these strains. We found that strains with a MIC 0,06mg/l to CIP the mutations of gen gyrA were absent (3), while the strains with a MIC to CIP 0,25 mg/l a change at positions 83 (Ser) was developed. This mutation is similar to described by other authors.

**Key words:** Resistance, Ciprofloxacin, *Aeromonas hydrophila*, *Stenotrophomonas maltophilia*, sewage.

### Introducción

El género *Aeromonas* comprende especies que han sido aisladas del ambiente, especialmente de muestras acuáticas, tanto naturales como de aguas residuales, suelo y heces humanas (14), diferentes especies de *Aeromonas* pueden producir gastroenteritis, así como infecciones fuera del intestino en pacientes inmuno deprimidos (11), además la mayoría de estas especies son patógenos primarios de peces (4). *Stenotrophomonas maltophilia* ha sido aislada de varios

ambientes, aunque principalmente produce infecciones hospitalarias (2). El desarrollo de los antibacterianos quinolonas, desde el descubrimiento del ácido nalidixico, hace alrededor de 40 años (13), en un principio eran solo activas contra bacterias Gram negativas, las quinolonas de amplio espectro se desarrollaron hace aproximadamente 10 años con la síntesis de las fluoroquinolonas. Como por ejemplo la ciprofloxacina y la ofloxacina; estos antibióticos sintéticos tienen un amplio rango de actividad, ya que son capaces de actuar sobre bacterias

Gram negativas (29) como frente a Gram positivos incluidos los estreptococos y estafilococos. Tienen un amplio uso en infecciones intrahospitalarias, genito-urinarias, respiratorias, gastrointestinales, de los tejidos blandos y de la piel, tanto en humanos como en animales (3). El mecanismo de acción de estos antibióticos es la unión de las quinolonas a la DNA girasa (23) produciendo un rápido efecto bactericida. La resistencia a las fluoroquinolonas (Ruiz, J. 2003) puede resultar de mutaciones producidas en el cromosoma bacteriano en las

subunidades diana (gyr A y gyr B) de la topoisomerasa II bacteriana; también en alteración de proteínas de la membrana externa como la ompF ( 5, 10, 30), reflujo del antibiótico (22) y mutaciones en la topoisomerasa IV (10, 12). No estaba claro que la resistencia a quinolonas estuviese mediada por plásmidos (21) hasta hace poco tiempo en que fue descrita en especies de *Aeromonas* de origen ambiental (7). Resistencia a fluoquinolonas han sido estudiadas en *E. coli* (26) y otras bacterias Gram negativas (15, 16), *Aeromonas hydrophila* (1, 9), *Stenotrophomonas maltophilia* (19, 25, 27) y en otros microorganismos multirresistentes (29).

### Material y Métodos

Los microorganismos utilizados en este estudio proceden de aguas residuales de Las Palmas de Gran Canaria. Las cepas fueron aisladas en el medio Agar de Mac Conkey suplementado con ampicilina, con el fin de seleccionar bacterias resistentes a antibióticos.

Ciprofloxacina nos fue suministrada por los laboratorios Genavisa, S.A (Reus, España)

La susceptibilidad a los antimicrobianos fue determinada por el método de microdilución en caldo de acuerdo con las recomendaciones del NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standard guidelines. Villanova, PA, USA.2005).

Las diferentes secuencias de los genes que codifican la resistencia a quinolonas (gyrA, gyr B, parC y parE) fueron amplificadas mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando el método y cebadores (primers) previamente descritos (28,29) Los productos de PCR fueron procesados, para la secuenciación del ADN y análisis, en un secuenciador automático de ADN.

### Resultados y discusión

Para este trabajo hemos estudiado cinco cepas pertenecientes a las espe-

cies *Aeromonas hydrophila* (2) y *Stenotrophomonas maltophilia* (3). Todas ellas eran resistentes a varios antibióticos beta-lactámicos. Con respecto a las quinolonas de las cinco cepas objeto de este estudio tan solo una de *Aeromonas hydrophila* y otra de *Stenotrophomonas maltophilia* presentaban resistencia al ácido nalidixico y una CMI de 0,25 mg/l frente a ciprofloxacina; el resto de las cepas eran sensibles al ácido nalidixico y presentaban una CMI de 0,06 mg/l a la ciprofloxacina. Al estudiar las secuencias de genes que codifican la resistencia a quinolonas, encontramos que las cepas que presentaban una CMI de 0.25 mg/l frente a ciprofloxacina presentaban una mutación en la Ser-83 del gen gyrA; mientras que las cepas que tenían una CMI de 0.06 mg/l a ciprofloxacina no presentaban ninguna mutación. En *E. coli* se han descrito mutaciones en la gyrA en la región denominada de resistencia a quinolonas (QRDR) entre las posiciones 67 a 106, se producen mutaciones en los codones 67, 81, 83, 84, 87 y 106 de la gyrA habiéndose observado que estas mutaciones son las responsables del desarrollo de la resistencia a quinolonas en *E. coli* (6, 8 18, 26, 28, 31). Algunos autores no han encontrado relación entre la resistencia a quinolonas y la presencia de mutaciones en los genes gyrA o parC en cepas de *Stenotrophomonas maltophilia* resistentes a quinolonas (19, 25, 27). En aislados clínicos de *S. maltophilia* se ha descrito que la resistencia a quinolonas se debe a mecanismos de reflujo del antibiótico ( 20, 22). Por el contrario nosotros si hemos encontrado una mutación de la gyrA en la Ser-83, como ya hemos descrito en este apartado, que está relacionada con la resistencia a quinolonas. En *Aeromonas hydrophila*, otros autores si han encontrado mutaciones en el gen gyrA en la posición Ser-83 (1, 9); al igual que nosotros. También dicha mutación ha sido observada en otras especies de *Aeromonas* (17, 24).

### Conclusión

En las estirpes estudiadas de *S. maltophilia* y *A. hydrophila*, aisladas de aguas residuales de Las Palmas de Gran Canaria la resistencia a ciprofloxacina (fluoroquinolona), está relacionada con una mutación en el gen gyrA en la posición Ser-83.

### Bibliografía

- Alcaide, E.< Blasco, M. D. y Esteve, C. (2010). Mechanisms of quinolone resistance in *Aeromonas* species isolated from humans, water and eels. Research in Microbiology, 161, 40-45.
- Almeida, M. T. G.; Rubio, F. G.; Garcia, D. O.; Pavarino-Bertelli, E. C.; Suarez, M. C. N.; y Martinez, M. B. (2007). Genetic relatedness among clinical Strains of *Stenotrophomonas maltophilia* in tertiary care hospital settings in Sao Paulo state, Brazil. Brazilian Journal of Microbiology. 38, 278-284.
- Andriole, V. T. (2000). The quinolones. 3ª Ed. Academic Press. USA.
- Austin, B. y Adams, C. (1996). En The genus *Aeromonas*. John Willey & sons, Cichester. UK. pp. 197-229.
- Bryan, L. E.; Bedart, J.; Wong, S. y Chamberland, S. (1989). Quinolone antimicrobials agents: Mechanisms of action and resistance development. Clin. Invest. Med. 12: 14-19.
- Cambau, E.; Bordon, F.; Collatz, E. y Gutmann, L. (1993) Novel gyrA point mutation in a strains of *E. coli* resistant to fluoroquinolones but not to nalidixic acid. Antimicrob. Agents Chemother. 37: 1247-52.
- Cattoir, V.; Poirel, L.; Aubert, C.; Soussy, C. J. y Nordmann, P. (2008). Unexpected occurrence of plasmid mediated quinolone resistance determonants in environmental *Aeromonas spp.* Emerg. Infect. Dis. 14: 231-7.

8. Everett, M. J.; Jin, Y. F., Ricci, V. y Piddock, L. J. V. (1996). Contribution of individual mechanisms to fluoroquinolone resistance in 36 *E. coli* strains isolated from humans and animals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 2380-6.
9. Goñi-Urriza, M.; Arpin, C.; Capdepu, M.; Dubois, V.; Caumette, P. y Quentin, C. (2002). Type II topoisomerase quinolone resistance –determining regions of *Aeromonas caviae*, *A. hydrophila*, and *A. sobria* complexes and mutations associated with quinolone resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 350-9.
10. Gootz, T. D. y Brighty, K. E. (1996). Fluoroquinolone antibacterials: SAR, mechanism of action, resistance and clinical aspects. *Med. Res. Rev.* 16: 433-486.
11. Janda, M. y Abbot, S. L. (1998). Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas* an expanding panorama of species disease presentations, and unanswered questions. *Clin. Infect. Dis.* 27: 332-344.
12. Janoir, C.; Zeller, V.; Kitzis, M. D. Moreua, N. J. y Gutmann, L. (1996). High level fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae* requires mutations in *parC* and *gyrA*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 2760-2764.
13. Leshner, G. Y.; Froelich, E. D.; Gruet, M. D. et.al. (1962). 1,8 naphthyridine derivatives. A new class of chemotherapeutic agents. *J. Med. Pharmacol. Chem.* 5: 1063-1068.
14. Martin-Canahan, A. y Joseph, S. W. (2005). En Brennan, D.J., Krieg, N.R. Staley, J.T. y Ganity, G.N. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2ªEd.) Part B vol.2, Springer, New York. pp. 556-578.
15. Mensa, L.; Marco, F.; Vila, J.; Gascon, J. y Ruiz, J. (2008). Quinolone resistance among *Shigella spp.* Isolated from travellers returning from India. *CMI* 14: 279-281.
16. Merino, L. A.; Alonso, J. M.; Ruiz, J. y Vila, J. (2007). Resistance to quinolones in *Salmonella infantis* due to overexpression of an active efflux system and a mutation in the *gyrA*. *Enf. Infect. Microb. Clin.* 25: 357-358.
17. Oppegard, H. y Sorung, H. (1994). *gyrA* mutations in quinolone-resistant isolates of fish pathogen *Aeromonas salmonicida*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 2460-2464.
18. Oram, M. y Fisher, L. M. (1991). 4-quinolone resistance mutations in DNA gyrase of *E. coli* clinical isolates identified by using the polymerase chain reaction. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 387-9.
19. Ribera, A.; Domenech-Sanchez, R.; Ruiz, J.; Benedi, V. J.; Jimenez de Anta, M. T. y Vila, J. (2002). Mutations in *gyrA* and *parC* are not relevant for quinolone resistance in epidemiological unrelated *Stenotrophomonas maltophilia* Clinical isolates. *Microb. Drug Resist.* 8: 245-51.
20. Ribera, A.; Ruiz, J.; Jimenez de Anta, M. T. y Vila, J. (2002). Effect of an efflux pump inhibitor on the MIC of nalidixic acid for *Acinetobacter baumannii* y *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 49: 697-8.
21. Ruiz, J. (2003). Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations decreased accumulation and DNA gyrase protection. *J. Antimicrob. Chemother.* 51: 1109-1117.
22. Sanchez, P.; Alonso, A.; Campanario, E.; Alos, I. y Martinez, J. L. (2000). Accumulation and efflux of quinolones by clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Rev. Esp. Quimioter.* 13: 176-81.
23. Shen, L. S.; Mitscher, L. A.; Sharma, P. N.; O'Daniel, T.; Chu, W. T. y Cooper, C. S. (1989). Mechanism of inhibition of DNA gyrase by quinolone antibacterials: A cooperative drug-DNA binding model. *Biochemistry*, 28: 3886-3894.
24. Shina, S.; Chattopadhyay, S.; Bhattacharya, S. K.; Nair, G. B. y Ramamurthy, T. (2004). An unusually high level of quinolone resistance associated with type II topoisomerase mutations in quinolone resistance-determining regions of *Aeromonas caviae* isolated from diarrhoeal patients. *Res. Microbiol.* 155: 827-829.
25. Tao, C. M.; Lu, X. J. y Li, P. (2006). Investigating the fluoroquinolone molecular resistant mechanism of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 37: 266-9.
26. Tavio, M. M.; Vila, J.; Ruiz, J.; Martin-Sanchez, A. M. y Jimenez de Anta, M. T. (1999). Mechanisms involved in the development of resistance to fluoroquinolones in *Escherichia coli* isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 44: 735-742.
27. Valdezate, S.; Vindel, A.; Saez-Nieto, J. A.; Baquero, F. y Canton, R. (2005). Preservation of topoisomerase genetic sequences during in vivo and in vitro development of high-level resistance to ciprofloxacin in isogenic *Stenotrophomonas maltophilia* Strains. *J. Antimicrob. Chemother.* 56: 220-3.
28. Vila, J.; Ruiz, J.; Marco, F.; Barcelo, A.; Goñi, P.; Giral, E. et al. (1994). Association between double mutation in *gyrA* gene of ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *E.coli* and minimal inhibitory concentration. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 2477-9.
29. Vila, J.; Sanchez-Cespedes, J.; Sierra, J. M.; Piqueras, M.;

Nicolas, E.; Freixas, J. y Giralt, E. (2006). Antibacterial evaluation of a collection of norfloxacin and ciprofloxacin derivatives against multiresistant bacteria. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 28:19-24.

30. Wolfson, J. S. y Hooper, (1989). Bacterial resistance to quinolones: Mechanisms and clinical importance. *Rev.Infect.Dis.* 11 (Suppl. 5) S960-S968.  
31. Yoshida, H.; Bogaki, M.; Naka-

mura, M. y Nakamura, S. (1990). Quinolone resistance-determining region in DNA gyraseA gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 1271-2.