

Desarrollo de resistencia al cloranfenicol en *Salmonella typhimurium*

TREJO LEÓN ÁNGEL JESÚS, VERA LÓPEZ JUAN CARLOS

Resumen— Las bacterias son microorganismos que cuentan con mecanismos de defensa que favorecen su resistencia a los medicamentos. La resistencia a los antibióticos es un problema de salud pública que representa un riesgo en aumento para la población que consume indiscriminadamente este tipo de drogas. Partiendo de una cepa silvestre de *Salmonella typhimurium* a la cual se le administraron concentraciones progresivamente mayores de cloranfenicol (0.075M-1.175M); se desarrolló resistencia a la concentración mínima inhibitoria (1.175M). Lo cual emula un inadecuado seguimiento al tratamiento con cloranfenicol; esto comprueba la facilidad con la que estos organismos se adaptan a los antibióticos

I.- INTRODUCCIÓN

En México las enfermedades gastrointestinales infecciosas representan uno de los riesgos sanitarios más frecuentes que enfrenta la población según la Secretaría de Salud en el 2016. La salmonelosis, causada por la bacteria *Salmonella sp.*, es una de las enfermedades de transmisión alimentaria más comunes según el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) (2016)

El género *Salmonella* pertenece a la familia Enterobacteriaceae, son bacilos gramnegativos, no formadores de esporas, anaerobios facultativos, provistos de flagelos y móviles. En las bacterias se puede desarrollar resistencia a los fármacos por automedicación, “La resistencia antimicrobiana es la capacidad de las bacterias para soportar el efecto de los antibióticos sobre ellas. Las bacterias que originalmente eran vulnerables al efecto de un medicamento antimicrobiano y que posteriormente no lo son, se consideran bacterias fármaco-resistentes.” (Instituto Nacional de Salud Pública, 2017 “Resistencia bacteriana a los antibióticos”). [2]

La *Salmonella typhimurium* es un bacilo gram negativo, lo que quiere decir que cuenta con dos membranas (una externa y una interna, que protege el citoplasma). En la membrana exterior existe un complejo de lipopolisacáridos cuya parte lipídica actúa como una endotoxina llamada “Lípido A”, que es responsable de la capacidad patogénica del microorganismo.

Esta bacteria se desarrolla en ambientes ricos en nutrientes y a temperaturas entre 26 a 37°C ya que su hábitat principalmente es el intestino de organismos como el ser humano. Con frecuencia las personas se infectan cuando ingieren alimentos contaminados. Para combatir infecciones por *Salmonella* se usa una amplia gama de antibióticos, entre ellos, el cloranfenicol.

ÁNGEL JESÚS TREJO LEÓN Y JUAN CARLOS VERA LOPEZ pertenecen a la preparatoria de la UNIVERSIDAD LA SALLE UNIDAD CONDESA y realizaron el proyecto dentro del curso de 5to año de Preparatoria, Ciclo 2017-2018. (Email:angel.trejo1609@gmail.com) .
Asesoró BIÓLOGO LAURO AYALA GARDUÑO (laayala@hotmail.com)

“El cloranfenicol es un antibiótico de amplio espectro, que no se prescribe como primera elección, pero que puede ser una alternativa importante en casos específicos donde otros antibióticos, no sean adecuados para el tratamiento de las infecciones o en pacientes alérgicos a β -lactámicos.” (Morales, Herrera, et. al., 2007) [4]. Su primera síntesis química fue en 1948.

En *Salmonella sp.*, el cloranfenicol inhibe la síntesis de proteínas bloqueando la actividad de la enzima peptidil transferasa evitando la formación del enlace peptídico.

Según la experimentación de inhibición de Afonyushkin VN., et al. (2017, p. 467-473) [1] en donde se probaron diversas concentraciones de cloranfenicol para comprobar el efecto inhibitorio, se determinó que la concentración mínima inhibitoria (MIC) es la de 1.175M.

. Automedicación

El incremento de la automedicación y falta de seguimiento al tratamiento establecido por el médico pueden aumentar la resistencia a los antibióticos y la evasión de los mismos por parte de las bacterias, ha generado un aumento en los costos de los tratamientos, además de complicaciones subsecuentes como la septicemia, el shock séptico y la muerte.

En Latinoamérica existen reportes de detección de cepas de *Salmonella typhi* resistente al cloranfenicol, teniendo niveles de resistencia que llegan al 80% lo cual obliga al uso de medicamentos más sofisticados. Siendo esto un problema de salud pública es de suma importancia el entender cómo una bacteria puede desarrollar resistencia alterando las condiciones en un ambiente controlado, de ahí surge la pregunta:

¿Cómo se puede desarrollar experimentalmente resistencia al cloranfenicol en *Salmonella typhimurium*?

La resistencia a los antibióticos actúa por medio de un operón, el cual es un grupo de genes estructurales cuya expresión está regulada por los mismos elementos de control (promotor y operador) y genes reguladores. Los principales mecanismos que tiene la *Salmonella typhimurium* para expresar un fenómeno de resistencia al cloranfenicol son:

1.- Bombas de eflujo

Las bombas de eflujo reconocen y expulsan cualquier molécula que entre a la bacteria mediante la P-glicoproteína que es una molécula transportadora de membrana que localiza

y expulsa hacia el exterior agentes externos, evitando así el daño a la célula.

El gen regulador de la resistencia a los antibióticos es: *ramRA*, y una mutación causada por la exposición al cloranfenicol, provoca la sobreexpresión de la proteína RamA y la proteína encargada directamente de las bombas de eflujo llamada AcrAB-TolC (Acridine resistance protein AB-Outer Membrane Protein C). El mecanismo de acción de esta bomba es dependiente de ATP y se localiza en la membrana externa de la célula, recubierta por la endotoxina.

Este mecanismo provoca que, las bacterias sobrevivientes, transfieran la información genética de las bombas de eflujo desarrolladas a las futuras generaciones, “En una población de bacterias a las que se aplica un antibiótico, la mayor parte muere, pero sobreviven dos o tres que tienen los patrones de metilación adecuados y que empiezan a generar bombas de eflujo rápidamente. Los descendientes de estas bacterias tendrán las bombas de eflujo encendidas y heredarán los patrones de metilación que les permitirán seguir produciendo otras” (Mendoza, L., 2018) [5] Lo anterior significa un aumento en su capacidad de resistencia.

2.- Acetilación del Antibiótico

La activación del gen *cat* traduce la proteína CAT (Cloranfenicol acetil transferasa). La proteína CAT acetila la molécula del antibiótico volviéndola ineficaz, pues el enlace entre los grupos acetilo a los grupos hidroxilo del cloranfenicol impide la unión al ribosoma bacteriano y ahí es en donde entra la P-glicoproteína que expulsa la molécula de la célula, impidiendo de esta forma su unión a los ribosomas bacterianos.

El gen *cat* se localiza en plásmidos de la misma *Salmonella typhimurium*, y en un sitio cromosómico, al igual que el *ramRA*

Hipótesis

La exposición a concentraciones progresivamente mayores de cloranfenicol en *Salmonella typhimurium*, favorece el desarrollo de resistencia a este antibiótico.

Objetivo

Desarrollar resistencia al cloranfenicol administrando concentraciones progresivamente mayores en una cepa silvestre de *Salmonella typhimurium*

Se usó una cepa de *Salmonella typhimurium* silvestre ya que implica un menor riesgo al momento de realizar la experimentación, pues es de menor impacto patogénico para los seres humanos que la *Salmonella typhi* y tiene los mismos mecanismos de resistencia a los antibióticos.

II.- CONCEPTOS BÁSICOS

Automedicación: Utilización de medicamentos sin el seguimiento médico adecuado

Resistencia antimicrobiana: Es el proceso por el cual un organismo deja de ser afectado por un antimicrobiano al que anteriormente era sensible.

Antibiótico: Es una sustancia que mata o impide el crecimiento de ciertas clases de microorganismos sensibles al mismo.

Bombas de eflujo: proteínas que expulsan moléculas dañinas para la bacteria

Acetilación: modificación química del antibiótico mediante la proteína *cat*.

III.-METODOLOGÍA PROPUESTA

1.- Se sembró *Salmonella typhimurium* en seis cajas de Petri con medio de cultivo agar/peptona (23g/L y 3g/L respectivamente), formando un tapete bacteriano.

2. Se prepararon diferentes soluciones de cloranfenicol a partir de la concentración mínima inhibitoria reportada, disminuyendo cada vez la concentración a la mitad quedando así: 1.175M, 0.60M, 0.30M, 0.15M, 0.075M.

3.- Todos los lotes control y experimentales se elaboraron por duplicado

4.- Dos cajas representaron el grupo control; otras dos cajas se marcaron como controles negativos y se les colocaron a cada una cinco discos de papel filtro esterilizados e impregnados de cloranfenicol con las concentraciones mínima inhibitoria según reportado por Afonyushkin, VN y la concentración comercial de cloranfenicol oftálmico (1.175M y 5M respectivamente).

5.- En las primeras cajas experimentales, se colocaron cinco discos de papel filtro esterilizados e impregnados de cloranfenicol con la concentración de 0.075M. (mínima concentración para desarrollar resistencia progresivamente) Los discos se colocaron de manera equidistante.

6.- Los medios se incubaron durante 48 horas a 30°C

7.- Se registró el crecimiento bacteriano y se localizaron las colonias que hayan crecido alrededor de los discos de inhibición (con antibiótico), para tomar de ahí una muestra y formar tapetes bacterianos en nuevos medios de cultivo.

8.- A estas cajas se les colocaron discos de inhibición impregnados con antibiótico a una concentración al doble de la anterior.

9.- Se dejaron incubar por 48hrs. y se repitió el proceso hasta llegar a la concentración mínima inhibitoria. (1.175M)

10. Se registraron fotografías del crecimiento bacteriano (aumento de colonias bacterianas) y al final se comparó el resultado con los controles.

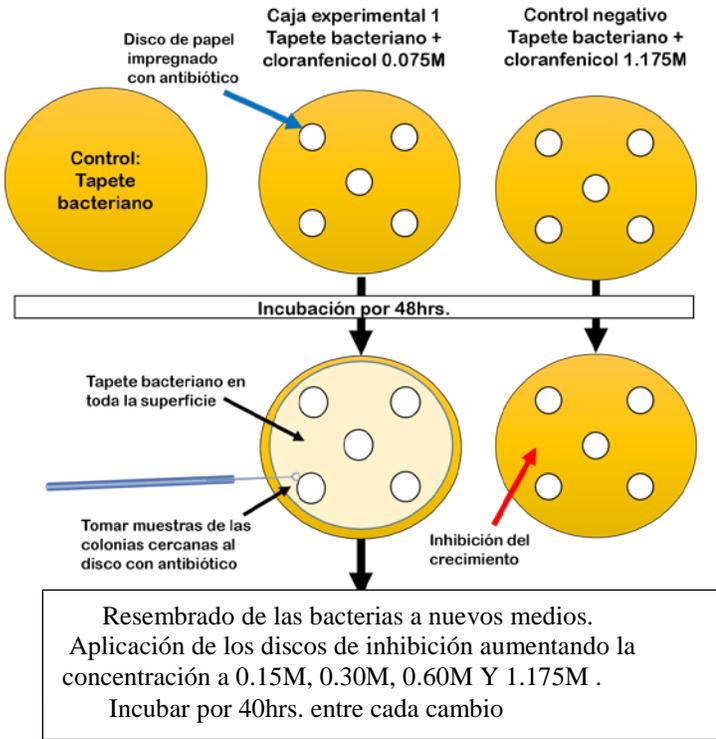


Fig. 1: Diagrama de flujo del procedimiento empleado

IV.-RESULTADOS OBTENIDOS

En las cajas de control positivo crecieron tapetes uniformes de colonias de *Salmonella typhimurium* después de 48 hrs. de incubación a 30°C. En las cajas de control negativo (1.175M y 5M) no hubo crecimiento de colonias de *Salmonella typhimurium*. Cabe señalar que la concentración 5M es la vendida comercialmente y sólo se usó como referencia.

En el primer cultivo experimental (caja 1), se realizó un tapete bacteriano sembrando la bacteria en zigzag. Posteriormente se impregnaron discos de papel filtro con cloranfenicol al 0.075M y se colocaron sobre el medio. Se dejó incubar a 30°C durante 48 hrs. y se observó el crecimiento de colonias. Se tomaron muestras de las bacterias que crecieron alrededor de los discos (en contacto con el antibiótico) y se trasladaron a un nuevo medio de cultivo donde se repitió este procedimiento, utilizando discos con cantidades cada vez mayores del antibiótico (0.15M, 0.30M, 0.60M y 1.175M consecutivamente).

Al llegar a la concentración mínima inhibitoria (1.175M) se compararon los resultados con la caja del control negativo inicial donde se habían sembrado bacterias silvestres que no tenían resistencia. Al comparar se pueden observar colonias que se desarrollaron cerca de los círculos de inhibición.



Figura 2: Comparación entre las cajas experimentales con cloranfenicol 1.175M y la caja del control negativo inicial (1.175M con cepa silvestre)

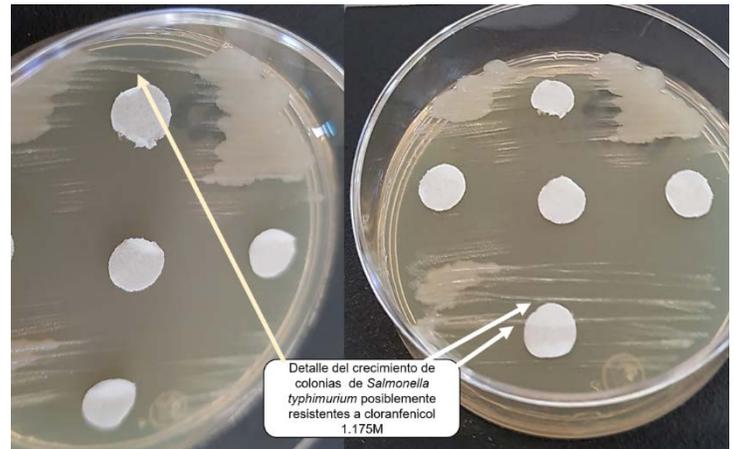


Figura 3: Detalle aumentado donde se observan colonias de *Salmonella typhimurium* creciendo cerca de los círculos de inhibición con cloranfenicol al 1.175M.

-Análisis de resultados

Las colonias de bacterias crecieron de una forma abundante en las concentraciones de 0.075 a 0.6M de cloranfenicol, sin presentar halos de inhibición, es decir se presentó tapete bacteriano en toda la caja. Aunque cuando se llegó a la concentración mínima inhibitoria (1.175M), se observaron zonas de inhibición dispersos en toda la caja y a pesar de esto, algunas colonias crecieron cerca de los discos impregnados con antibiótico, dichas colonias por su cercanía, se supone son bacterias fármaco-resistentes a la concentración mínima inhibitoria.

El desarrollo de resistencia en estas colonias puede ser por las bombas de eflujo, el cual es un mecanismo de defensa que reconoce mediante la P-glicoproteína a la molécula del antibiótico, activando el sistema AcrAB-ToIC (Bombas de eflujo) que confiere la resistencia antimicrobiana estimulando al gen *ramRa* para que exprese la proteína RamA. La constante exposición de la bacteria al antibiótico pudo generar una sobreexpresión del gen *ramRa* generando así más RamA y por consiguiente más P-glicoproteínas, es decir más bombas de eflujo.

Otra posible explicación de la generación de resistencia podría ser la Acetilación ya que la constante exposición al antibiótico pudo haber estimulado al gen *cat* que produce la proteína CAT (Cloranfenicol acetil transferasa) la cual es responsable del enlace de dos grupos acetilo a la molécula del cloranfenicol, evitando que esta se una al ribosoma bacteriano.

El mecanismo que la bacteria en este caso podría haber activado, serían las bombas de eflujo, ya que es el más empleado por esta bacteria, “En *Salmonella*, la pérdida de susceptibilidad a antibióticos está predominantemente asociada a mutaciones en la región reguladora *ramRA*” (Fàbrega A, Ballesté-Delpierre C, Vila J., 2015) [3]. Además de que es el mecanismo que se puede usar con mayor rapidez pues la P-Glicoproteína se encuentra en la membrana. También existe la probabilidad de que haya usado los dos mecanismos simultáneamente en la aplicación de la concentración 1.175 M.

Para determinar si el mecanismo empleado fue el de bombas de eflujo se recomienda usar la técnica Southern Blot la cual es una técnica de laboratorio utilizada para detectar una secuencia específica de DNA, consiste en una enzima de restricción que corta una muestra de DNA en fragmentos que se separan mediante electroforesis en gel. Posteriormente, los fragmentos de DNA son transferidos del gel a la superficie de una membrana. Por último, la membrana se expone a una sonda de DNA marcada con un marcador radiactivo o químico para determinar si la P-glicoproteína fue sintetizada.

También se puede usar el ensayo de eflujo con rodamina 123 (un marcador) pegándolo al cloranfenicol, para determinar la funcionalidad de la P-glicoproteína gracias a la fluorescencia que puede adquirir y así analizar si realizó una expulsión del antibiótico.

Para determinar si el mecanismo empleado fue el de acetilación del antibiótico se recomienda la técnica Northern Blot la cual es una técnica de laboratorio utilizada para detectar una secuencia específica de RNA, las moléculas de RNA en una muestra se separan por tamaño mediante electroforesis en gel. Posteriormente, los fragmentos de RNA son transferidos del gel a la superficie de una membrana. Por último, la membrana se expone a una sonda de RNA marcada con un marcador radiactivo o químico para determinar si la proteína CAT fue usada para acetilar el antibiótico.

La importancia de este trabajo radica en que se comprobó que, al variar las concentraciones de antibiótico, se desarrollaron bacterias fármaco-resistentes; un ejemplo en la vida cotidiana es que algunas personas cuando se les receta un antibiótico con una cierta dosis optan por cambiar la dosis o los tiempos de la misma, sobre todo por que presentan mejoría

o desaparición aparente de los síntomas iniciales. Esto puede ocasionar que las personas no terminen con el tiempo previamente establecido, el tratamiento indicado por el médico.

El trabajo consistió en probar diferentes dosis que generaron una resistencia progresiva, algunas colonias de bacterias pudieron haber sobrevivido a la concentración mínima inhibitoria por desarrollo de resistencia

V.-CONCLUSIONES

Se desarrolló resistencia al cloranfenicol mediante la administración de concentraciones progresivamente mayores (0.075M, 0.15M, 0.30M, 0.60M y 1.175M) en una cepa silvestre de *Salmonella typhimurium*. Esto permite inferir, que la automedicación con dosis inadecuadas de antibióticos da lugar a resistencia a los fármacos

Sobre los agradecimientos

Agradecemos el apoyo y guía en la revisión de este trabajo a la Bióloga Claudia Barajas Lemus y al Maestro en Ciencias Jorge Alan Velázquez López.

REFERENCIAS

- [1] Afonyushkin VN. et al. (2017): “Change Resistance of *Salmonella enterica* and *Pseudomonas aeruginosa* against Antibacterial and Immobilization of Activities of Chloramphenicol” EC Gastroenterology and Digestive System 2.6. Rusia. :467-473. Recuperado de: <https://www.econicon.com/ecgds/pdf/ECGDS-02-00069.pdf>
- [2] Instituto Nacional de Salud Pública (2017) “Resistencia bacteriana a los antibióticos” Recuperado de: <https://www.insp.mx/avisos/3476-resistencia-bacteriana.html>
- [3] Fàbrega A, Ballesté-Delpierre C, Vila J. (2017) “Differential impact of *ramRA* mutations on both *ramA* transcription and decreased antimicrobial susceptibility in *Salmonella typhimurium*”. J Antimicrob Chemother. Estados Unidos. p. 13-17
- [4] Morales G., Yolanda Elizabeth, Herrera, Ma. Carmen, Muñoz R., Jesús, Cloranfenicol, un antibiótico clásico como alternativa en el presente. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas [en línea] 2007, 38 (enero-marzo): [Fecha de consulta: 11 de abril de 2018] Disponible en: <<http://ucsj.redalyc.org/articulo.oa?id=57938108>> ISSN 1870-0195.
- [5] Mendoza, L. (2018) “Contra la Resistencia bacteriana a los antibióticos”. El Universal. Recuperado de: <http://www.eluniversal.com.mx/cultura/contra-la-resistencia-bacteriana-los-antibioticos>

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA NO CITADA

- [1] COFEPRIS, SENASICA (2016) “Programa de secuenciación genómica de *Salmonella* en México” Recuperado de: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/225247/4_Programa_de_secuenciacion_genomica_de_salmonella_en_Mexico_COFEPRIS_SENASICA.pdf
- [2] PROFECO (2011) “Sondeo en línea sobre hábitos de consumo de medicamentos” Recuperado de: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/112684/cons_med_2010.pdf
- [3] Bradley, G., Thompson JR., J. (2016) “Genética Clínica”. McGrawHill Education. Segunda Edición. Inglaterra. Pp. 164-175