

UNIVERSIDAD DE CONCEPCION



TITULO:

Caracterización molecular de la resistencia a fenicoles en bacilos Gram negativos
aislados de pisciculturas de las VIII y X Regiones de Chile

Tesis de Magíster presentada a la Escuela de Graduados de la Universidad de
Concepción como parte de los requisitos para optar al grado de Magíster en Ciencias,
mención Microbiología

Por

Claudia Lissette Fernández Alarcón

2006

RESUMEN

La industria de la salmonicultura en Chile utiliza en forma intensiva antibióticos como oxitetraciclina y florfenicol durante el proceso de cultivo. Existe evidencia que estos agentes antimicrobianos se acumulan bajo las balsas jaulas durante los tratamientos, llegando a cambiar la composición bacteriana de los sedimentos y alterar la degradación de otros desperdicios. Por lo tanto, es esperable la ocurrencia de procesos de selección de bacterias resistentes a estos antibacterianos, las que son portadoras de diferentes determinantes genéticos de resistencia, y que debido a su posible codificación extracromosomal, pueden ser diseminados a otras bacterias susceptibles en diversos ambientes.

En consecuencia, esta práctica estaría creando reservorios ambientales de resistencia transferible a antibacterianos en los sistemas de cultivo en Chile, con importantes efectos ambientales y riesgos potenciales para la salud humana y animal. Esto hace necesario evaluar el rol de estos sistemas como reservorios y medio de diseminación de genes de resistencia a antimicrobianos.

Por lo anterior, en esta tesis se plantearon como objetivos principales, investigar la presencia de los determinantes genéticos más frecuentemente involucrados en la resistencia a fenicoles, así como la factibilidad de su transferencia a otras bacterias susceptibles. En el período comprendido entre marzo 2004 y febrero 2005, se recolectaron 198 cepas de bacilos Gram negativos, resistentes a fenicoles. Las cepas fueron obtenidas desde muestras de salmones, agua y sedimento, así como también del alimento extraído administrado a los peces. Las muestras provinieron de los centros de cultivos de salmones localizados en Polcura y las Trancas, en la VIII Región, y en los Lagos Rupanco y Llanquihue, en la X Región de Chile.

Se determinó los perfiles de resistencia a diversos agentes antimicrobianos, así como el nivel de resistencia que presentaban las cepas a fenicoles y otros antimicrobianos. Se investigó la presencia de los genes *floR*, *cmlA* y *cat* que codifican resistencia a florfenicol y cloranfenicol. Además, se detectó, la participación de bombas de eflujo multidrogas, mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria en presencia y ausencia del inhibidor de eflujo MC 207,110. Se detectaron los genes estructurales *acrB*, *mexX* y *mexA*, de estas bombas de eflujo y mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se

relacionó la presencia de los determinantes de resistencia con la incidencia de integrones. Finalmente, se investigó la capacidad de transferencia de los genes de resistencia a fenicoles hacia cepas receptoras susceptibles, por conjugación bacteriana.

La mayoría de las cepas aisladas (80%) corresponde a cepas de bacilos Gram negativos no fermentadores y 20% a cepas de bacilos Gram negativos fermentadores. De éstas, 93% de las cepas fueron resistentes a cloranfenicol y 100% a florfenicol. Más del 50% de las cepas seleccionadas, fueron resistentes a ampicilina, flumequina y ácido oxolínico. También se detectó la resistencia a tetraciclina, enrofloxacin, estreptomycin y la asociación del sulfametoxazol/trimetoprim, en menor frecuencia.

Se observó un elevado nivel de resistencia entre las cepas resistentes a fenicoles, determinándose que la CMI₅₀ y CMI₉₀ para florfenicol fue de 128 y >256 µg/mL, respectivamente. En el caso de cloranfenicol los valores fueron también de 128 y >256 µg/mL para la CMI₅₀ y CMI₉₀, respectivamente.

Los genes *cat*, *catIII* y *cmlA*, que codifican resistencia a cloranfenicol, no fueron detectados mediante la técnica utilizada durante este estudio, a pesar de observarse un elevado número de cepas fenotípicamente resistentes a cloranfenicol. El gen *floR* fue detectado sólo en 24 de las 198 cepas analizadas correspondiendo a las especies fermentadoras de carbohidratos *Enterobacter aerogenes*, *Raoultella terrigena*, *Kluyvera ascorbata*, *Citrobacter youngae* y *Citrobacter freundii*. Además, este gen fue detectado en 2 cepas no fermentadoras, una de ellas identificada como *Sphingobacterium multivorum*. La otra no está identificada.

Este es el primer hallazgo de la presencia del gen *floR* en cepas aisladas de centros de cultivos de salmónidos en Chile. Además, de ser el primer informe de este gen en centros dulceacuícolas en Chile, esta es la primera vez que se informa de la presencia del gen *floR* en estas especies, y más aún en cepas de bacilos Gram negativas no fermentadoras.

Para determinar la participación de sistemas transportadores de multidrogas en la resistencia a fenicoles, se determinó la CMI en presencia y ausencia de un inhibidor de bombas de eflujo, *Phe-Arg-β-naftilamida* (MC 207, 110). La participación de estos sistemas se evidenció por la disminución de la CMI en presencia del inhibidor al menos cuatro veces, en

comparación a la CMI en ausencia del inhibidor . El inhibidor aumentó la susceptibilidad de las cepas no sólo a cloranfenicol y florfenicol, sino que también a otros antibióticos estructuralmente no relacionados como ácido oxolínico, flumequina y en menor grado a tetraciclina, estreptomicina y ampicilina.

Los genes *mexA* y *mexX*, que codifican proteínas estructurales de bombas multidrogas que confieren resistencia a una serie de antibióticos, entre ellos cloranfenicol y tetraciclinas, no fueron detectados mediante la técnica utilizada durante este estudio, a pesar de observarse un elevado número de cepas en las cuales habría participación de las bombas de eflujo, de acuerdo a la disminución de la CMI en presencia del inhibidor. Por su parte, el gen *acrB* fue detectado en 5 de las 130 cepas bacterianas ensayadas.

Se detectó la presencia del integrón de clase 1, en 20 de 150 cepas bacterianas ensayadas y la presencia del integrón clase 2, en 2 de 100 cepas bacterianas ensayadas. No se encontró relación entre la presencia de estas estructuras genéticas y la presencia de los genes que estarían participando en la resistencia a fenicoles.

En tres de las cepas estudiadas, que presentaron el gen *floR*, se realizaron experimentos de conjugación. La transferencia de genes de resistencia a fenicoles y otros antimicrobianos no fue observada durante este estudio con la metodología utilizada.

Estos resultados estarían indicando que la resistencia a fenicoles que presentan las cepas de bacilos Gram negativos asociadas a cultivos de salmónidos se debe principalmente, a mecanismos de eflujo de los compuestos. El eflujo de fenicoles por medio de un sistema de transporte específico codificados por el gen *floR*, sería el principal mecanismo de resistencia en cepas de bacilos Gram negativos fermentadores y los sistemas transportadores de multidrogas, estarían principalmente asociados a la resistencia a fenicoles en cepas de bacilos Gram negativos no fermentadores. Además, mecanismos adicionales de resistencia a fenicoles, no descritos anteriormente, estarían implicados en la resistencia a estos antimicrobianos en un importante grupo de cepas de bacilos Gram negativos.

Estudios como éste servirán de plataforma para diseñar programas educativos, que permitirán un uso más adecuado de los agentes antibacterianos en los centros de cultivos dulceacuícolas en Chile, permitiendo implementar normas que disminuyan su efecto sobre el ambiente e

impedir el flujo de genes de resistencia hacia bacterias que tienen importancia como patógenos humanos o de animales.

