

Antonio Galiana<sup>1</sup>  
Laura Sánchez-Guillén<sup>1</sup>  
Juan Carlos Rodríguez<sup>2,3</sup>  
Rosa Cremades<sup>1</sup>  
Miguel Santibañez<sup>4</sup>  
Rafaela Ferrari<sup>1</sup>  
Montserrat Ruiz-García<sup>1</sup>  
Pilar López<sup>1</sup>  
Gloria Royo<sup>1,3</sup>

# Caracterización de la expresión de genes asociados con el sistema AcrAB/TolC y la permeabilidad de membrana en aislados de *Salmonella* spp. con y sin mutación en *gyrA*

<sup>1</sup>Servicio Microbiología. Hospital General Universitario de Elche, Alicante

<sup>2</sup>Servicio Microbiología. Hospital General Universitario de Alicante, Alicante

<sup>3</sup>Departamento de Producción Vegetal y Microbiología. Universidad Miguel Hernández, Elche, Alicante

<sup>4</sup>Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria. Instituto de Investigación Marqués de Valdecilla (IDIVAL), Santander, Spain

---

## RESUMEN

**Introducción.** Se han estudiado los genes *marA*, *soxS*, *ramA*, *acrB* y *ompF* para caracterizar los mecanismos del sistema de expulsión activa AcrAB/TolC y las alteraciones en la permeabilidad de membrana que reducen la sensibilidad a fluoroquinolonas en *Salmonella* spp.

**Métodos.** Se detectaron las mutaciones en los genes *marA*, *soxS*, *ramA*, *acrB* y *ompF* y se cuantificó su nivel de expresión en presencia y ausencia de ciprofloxacino calculando su valor de nivel de cambio por qPCR. Los datos se analizaron estadísticamente mediante el programa SPSS 19.0.

**Resultados.** No se encontraron mutaciones en ninguno de los genes, pero la expresión de los genes reguladores de AcrAB/TolC y del gen estructural *acrB* se vieron afectados por la presencia de ciprofloxacino tanto en las cepas con mutación en *gyrA* como en las cepas silvestres. La activación del gen *marA* en presencia del fármaco fue mayor en las cepas silvestres (nivel de cambio de 0,823) que en las mutantes (nivel de cambio de 0,158;  $p=0,049$ ). Se vio una disminución de la expresión del gen *ompF* en presencia de ciprofloxacino en cepas con mutación (nivel de cambio de -0,949  $p=0,017$ ).

**Conclusión.** La disminución de la sensibilidad a fluoroquinolonas en *Salmonella* spp es un proceso complejo, donde intervienen diferentes mecanismos bacterianos. Este estudio encuentra gran diferencia en el grado de participación de los mecanismos estudiados entre las cepas con y sin mutación en *gyrA*. Mientras que las cepas silvestres activan el sistema de expulsión activa, especialmente a través del gen *marA*, las cepas con mutación reprimen la expresión del gen *ompF*, relacionado con las porinas.

## Characterization of gene expression associated with both the AcrAB/TolC system and the membrane permeability, in *Salmonella* spp isolates with and without *gyrA* mutation

### ABSTRACT

**Introduction.** The *marA*, *soxS*, *ramA*, *acrB* and *ompF* genes have been studied in order to characterize mechanisms of AcrAB-TolC active efflux pumps and membrane permeability alterations that reduce fluoroquinolones susceptibility in *Salmonella* spp.

**Methods.** Mutations in *marA*, *soxS*, *ramA*, *acrB* and *ompF* genes were detected, as well as their expression levels in presence and absence of ciprofloxacin, calculating the level of change between them by qPCR. Data were analysed by using SPSS 19.0.

**Results.** No mutations in these genes were found, but both AcrAB-TolC regulatory genes and structural *acrB* gene expression were affected by ciprofloxacin in both mutant strains and wild type bacterial strains (WT). The activation of the *marA* gene in presence of drug was higher in WT strains (level of change 0.823) than in mutants strains (level of change 0.158;  $p=0.049$ ). In *gyrA* mutants, a reduction in *ompF* gene expression in presence of ciprofloxacin was found (level of change -0.949  $p=0.017$ ).

**Conclusion.** The reduction of fluoroquinolones susceptibility in *Salmonella* spp is a complex process, in which several different bacterial mechanisms are involved. This study has found a high difference in the degree of participation among studied mechanisms, between bacterial strains with and without *gyrA* mutation. Whereas WT strains activated efflux pumps especially through *marA* gene, mutants suppressed *ompF* gene expression related to porins.

---

## INTRODUCCIÓN

Los sistemas de expulsión activa son unos de los principales mecanismos bacterianos de resistencia a fármacos y está

---

Correspondencia:  
Dr. Juan Carlos Rodríguez  
Hospital General Universitario de Alicante  
Sección de Microbiología  
C/ Pintor Baeza 10 - 03010 Alicante  
Teléfono: 605104019  
E-mail: rodriguez\_juadia@gva.es

mediado por los transportadores de membrana, siendo sinérgico con otros mecanismos como la alteración en la permeabilidad de membrana<sup>1-6</sup>.

La sobreexpresión de las bombas de expulsión y los cambios en las porinas contribuyen a la reducción de la sensibilidad por disminución de la concentración intracelular de antibiótico y, por ello, es de interés conocer las bases funcionales de estos sistemas para comprender los mecanismos asociados a la disminución de la sensibilidad de los microorganismos<sup>1,6,7</sup>.

La finalidad de este estudio es proveer datos acerca de la función de los principales genes asociados con el sistema AcrAB/TolC y la permeabilidad de membrana en la disminución de la sensibilidad a fluoroquinolonas en *Salmonella* spp.

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Cepas.** Diez aislados clínicos de *Salmonella enteritidis*, tres de los cuales carecían de mutación en los genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE* y siete con una única mutación en *gyrA*. Ninguna de las diez cepas poseían plásmidos con genes *qnr* (*qnrA*, *qnrB1*, *qnrB5*, *qnrB19*, *qnrS1*, *qnrC*, *qnrD*) ni *aac* (6')-Ib-cr<sup>8</sup> (tabla 1). La cepa *Salmonella enterica* ATCC 43971 se utilizó como control para normalizar la qPCR y, así, cuantificar cada gen. Las mutaciones en los genes de la girasa y la presencia de plásmidos fueron caracterizados por secuenciación en la región de DNA previamente descrita<sup>9</sup>.

**Estudios fenotípicos.** La concentración mínima inhibitoria (CMI) a ciprofloxacino de todos los aislados fue determinada mediante microdilución (Wider, Soria Melguizo, España) y confirmada por dilución en placa, de acuerdo con las guías de CLSI<sup>10</sup>.

**Detección de mutaciones en genes relacionados con la regulación del sistema de bomba de expulsión activa AcrAB/TolC y en el gen estructural *acrB*.** Los genes del operón *marRAB* y *soxRS* y los genes represores *ramR* y *acrR*, involucrados en la regulación de la expresión de *acrAB*, junto con gen estructural *acrB*, fueron amplificados y secuenciados como describe O'Regan et al<sup>11</sup>.

**Cuantificación de los niveles de expresión de los genes *marA*, *soxS*, *ramA*, *acrB* y *ompF*.** Se creció cada cepa a 37°C durante toda la noche en medio mínimo MOPS<sup>5</sup> y se diluyó 100 veces. Después, cada cultivo se incubó en agitación a 37°C con ciprofloxacino (a la mitad de la CMI) y sin antibiótico hasta alcanzar una densidad óptica de 0,6 (aproximadamente a las 6 horas). Los cultivos fueron congelados a -80°C para más tarde extraer el ARN<sup>12</sup>.

Tras el tratamiento con DNasa (Ambion, USA), el cDNA de cada muestra fue sintetizado usando 4µl de ARN y la transcriptasa inversa MMLV (Invitrogen, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este cDNA se utilizó en una qPCR *singleplex* para cada gen utilizando sondas y *primers* diseñados por nuestro laboratorio (tabla 2); la expresión del gen estructural 16S ARNr fue usado como control interno. Se realizó cada medida por triplicado; el valor de la cuantificación se calculó a partir de la media de los tres valores.

**Tabla 1** Características de las cepas

Cepa	CMI ciprofloxacino (mg/L)	<i>gyrA</i>	Grupo
ATCC43971	0,016	WT	Silvestre
c294	0,023	WT	Silvestre
c8245	0,023	WT	Silvestre
c10174	0,032	WT	Silvestre
c238	0,25	D87N	mutación <i>gyrA</i>
c47	0,25	D87N	mutación <i>gyrA</i>
c100	0,38	S83F	mutación <i>gyrA</i>
c107	0,38	S83Y	mutación <i>gyrA</i>
c126	0,5	S83F	mutación <i>gyrA</i>
c212	0,75	S83Y	mutación <i>gyrA</i>
c216	0,75	D87N	mutación <i>gyrA</i>
c81	1	S83F	mutación <i>gyrA</i>

**Tabla 2** Primers y sondas usados en la qPCR.

Primers y sondas	Secuencia 5'-3'
16s-F	CGTGTGTGAAATGTTGGGTAA
16s-R	CCGCTGGCAACAAGGATAA
16s-sonda	TCCCAGCAACGAGCGCAACC
acrB-F	TGAAGACCAGGGCGTATTCCT
acrB-R	TTTTGCGTCCGCTCTTG
acrB-sonda	ACAATGGTCCAGCTCCCCCGG
soxS-F	CGGAATACACGCGAGAAGGT
soxS-R	GAGCGCCCGATTITTTGATATC
soxS-sonda	TGCTGCGATACATAGCCCAGGTCCA
marA-F	GACCCGGACGTTCAAAAATAT
marA-R	TCGCCATGCATATTGGTGAT
marA-sonda	TGATGTGCCGCCACACAATACCG
ramA-F	CCAGAAGGTGTATGATATTTGTCTCAAG
ramA-R	GGTTGAACGTGCGGGTAAA
ramA-sonda	TTGATTCCAGCAAACCTTTACGCG
ompF-F	GACCTACCGTAACTCTGA
ompF-R	GTCGAACTCATATGCCATG
ompF-sonda	TAACCTACGCCATCGCCATTCT

**Análisis estadístico.** Los valores del nivel de expresión obtenidos por qPCR para cada gen en ambos tratamientos (presencia y ausencia de ciprofloxacino) fueron dados como valores de nivel de cambio calculados por el método  $2^{-\Delta\Delta Ct^{13}}$  y estandarizado por los niveles de expresión de cada gen de la cepa ATCC 43971 en ausencia de antibiótico.

**Tabla 3** Incremento de la variable intragrupo y diferencia entre grupos expresada como valor de nivel de cambio

Genes	Grupo	Incremento de la variable intragrupo					Diferencia entre grupos			
		Valor de cambio	SD	95%	CI	p-valor	Valor de cambio	95%	CI	p-valor
<i>soxS</i>	mut <i>gyrA</i>	1,3	0,519	0,867	1,734	0				
	silvestre	1,268	0,245	0,659	1,878	0,012	-0,032	-0,567	0,503	1,00
<i>ramA</i>	mut <i>gyrA</i>	0,843	0,335	0,563	1,124	0				
	silvestre	1,006	0,151	0,63	1,382	0,007	0,163	-0,176	0,501	0,307
<i>marA</i>	mut <i>gyrA</i>	0,158	0,497	-0,258	0,573	0,399				
	silvestre	0,823	0,159	0,427	1,219	0,012	0,67	0,002	1,338	0,049
<i>acrB</i>	mut <i>gyrA</i>	1,092	0,376	0,744	1,44	0				
	silvestre	1,144	0,295	0,41	1,877	0,021	0,052	-0,517	0,621	0,569
<i>ompF</i>	mut <i>gyrA</i>	-0,949	0,362	-1,284	-0,614	0				
	silvestre	0,249	0,239	-0,344	0,842	0,212	1,198	0,664	1,733	0,017

Incremento de la variable intragrupo diferencia entre los valores de cambio en presencia de ciprofloxacino menos el valor en ausencia de los genes de cada grupo. Diferencia entre grupos: diferencia entre el aumento del valor de cambio en el incremento de la variable intragrupo para cada gen entre los grupos.

Se calcularon las medias con su desviación estándar para el valor de nivel de cambio. Se obtuvo el aumento de la variable intragrupo (diferencia entre el valor del nivel de cambio en presencia de ciprofloxacino menos el valor del nivel de cambio en ausencia, para cada gen en ambos grupos) y se utilizó la t de Student para los pares de datos, calculándose su IC95%. Además, se hizo un análisis de grupos independientes para cada gen en el que se analizaron los valores de nivel de cambio obtenidos a partir de la diferencia del incremento de la variable intragrupo entre el grupo silvestre (WT) menos grupo con mutación en *gyrA*, analizándose mediante un test no paramétrico (Mann Whitney's U test). Se obtuvo el IC95% de los valores de estas diferencias entre grupos, considerándose estadísticamente significativo un p-valor de 0,05, siendo todos los test bilaterales. Los datos se analizaron estadísticamente mediante el programa informático SPSS 19.0.

## RESULTADOS

No se encontraron mutaciones en los genes asociados con la regulación de la bomba de flujo AcrAB/TolC estudiado, ni se encontraron mutaciones en el gen estructural *acrB* en ninguna de las cepas.

Se observó que la expresión de los genes *soxS*, *ramA*, *marA* y *acrB* aumentaba después de la exposición a ciprofloxacino en todas las cepas estudiadas en ambos grupos, mientras que la expresión del gen *ompF* se reprimía en el grupo de cepas con mutación en *gyrA* (tabla 3, figura 1). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión de los genes *soxS*, *ramA* o *acrB* después de la exposición a

ciprofloxacino entre el grupo con mutación en *gyrA* y el grupo WT, como se muestra en las diferencias entre los valores de los grupos (tabla 3).

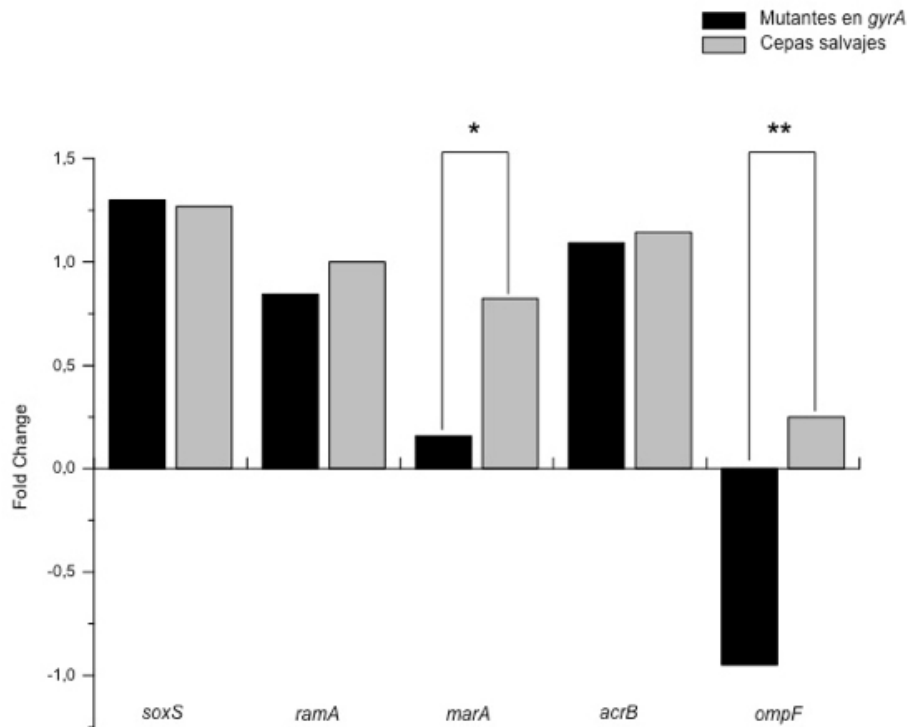
En el caso del gen *marA*, los valores de la diferencia del nivel de cambio entre los grupos fueron estadísticamente significativos (0,670; p=0,049), siendo la expresión de este gen mayor en el grupo WT en presencia de ciprofloxacino como muestran los valores de la variable intragrupo (0,823) si se comparan con el grupo con mutación en *gyrA* (0,158) (tabla 3, figura 1).

La expresión del *ompF* asociado con la permeabilidad de membrana muestra un patrón muy diferente. Seguido a la exposición de ciprofloxacino, se encontró que el gen era reprimido solo en el grupo que contenía mutación en *gyrA* como muestran los valores de nivel de cambio del incremento de la variable intragrupo (-0,949), encontrándose diferencias estadísticamente significativas cuando eran analizados los valores de nivel de cambio entre grupos (1,198, p=0,017) (tabla 3, figura 1).

## DISCUSIÓN

La disminución de la sensibilidad a fluoroquinolonas en *Salmonella* spp es un serio problema de salud en aumento, asociado a fallo terapéutico tras el tratamiento con estos antibióticos en algunos procesos infecciosos causados por este patógeno.

Este fenómeno ocurre debido a la interacción de diferentes mecanismos bacterianos, siendo el más importante la presencia de mutaciones en el gen *gyrA*. La alteración en la permeabilidad de la membrana y la actividad de los sistemas de expulsión activa están también involucrados e incluso se han llegado a asociar a fenómenos de multiresistencia<sup>9,14</sup>.



**Figura 1** Incremento de la variabilidad intragrupo

\* El nivel de expresión de *marA* es mayor en WT que en cepas con mutación en *gyrA* ( $p=0,049$ ).

\*\* El nivel de expresión de *ompF* es mayor en cepas con mutación en *gyrA* que en cepas silvestre ( $p=0,017$ ).

Debido a la complejidad de estos dos últimos mecanismos, no se conoce bien su implicación<sup>15</sup> y en nuestro trabajo se destaca la marcada diferencia entre cepas con y sin mutaciones en *gyrA*. En cepas sin mutación en *gyrA*, principalmente se activan los sistemas de expulsión activa estudiados, especialmente a través de los genes *marA*, mientras que cepas con mutación combinan la protección ofrecida por dicha mutación con la activación de los sistemas de expulsión activa y la represión de los genes asociados con la porina más importante en la membrana bacteriana (OmpF) que, probablemente, es regulada por el sensor de osmolaridad EnyZ<sup>16</sup>, ya que, durante el estudio, las cepas con mutación en *gyrA* fueron expuestas a concentraciones extracelulares de ciprofloxacino mayores que las de cepas WT. Esta diferencia contribuye a un mejor conocimiento de la secuencia temporal y la interacción entre los diferentes mecanismos de resistencia y complementa los datos previamente aportados por Singh et al<sup>17</sup>. Este último, muestra que la resistencia temprana de bajo nivel a fluoroquinolonas es conferida por la sobreexpresión de *acrAB* y precede y facilita el desarrollo de un nivel de resistencia alto mediado por la(s) mutación(es)<sup>18</sup>.

Por generación espontánea de mutantes, en un modelo *in vitro* de exposición repetida a fluoroquinolonas de cepas sensibles, se comprobó que RamA juega un papel predominante en la resistencia a ciprofloxacino mediante el aumento del nivel

de los genes *acrAB*<sup>19-20</sup>. Estos datos se complementan por los obtenidos en nuestro estudio donde se muestra que los genes de *marA* tienen diferencias en la expresión entre muestras clínicas susceptibles a fluoroquinolonas y aquellas con sensibilidad reducida a estos compuestos. Estos datos pueden formar la base para el diseño de sistemas inhibitorios de los dos genes aplicables a la práctica clínica en el futuro.

Se conoce que en los mutantes con sensibilidad disminuida a fluoroquinolonas, los niveles transcripcionales de *ramA* están directamente asociados con el aumento en la expresión de la bomba de flujo para múltiples fármacos AcrAB-TolC y la disminución de la expresión de la proteína OmpF de la porina<sup>21</sup>. Nuestro estudio confirma que el gen para la proteína OmpF de la porina está reprimido en cepas con mutaciones en *gyrA*, por lo que ambos mecanismos pueden estar interrelacionados. Este fenómeno puede deberse a una disminución o bloqueo completo de la síntesis, a la expresión de una proteína de porina alterada o a una expresión alta de los sistemas de expulsión activa; *marA* y *ramA* puedan desencadenar una compleja cascada de regulación para controlar la permeabilidad de membrana<sup>22,23</sup>. Aunque nuestros datos reflejan que este complejo fenómeno difiere dependiendo de si hay o no mutación en el gen *gyrA*, futuros estudios deberán demostrar dicha dependencia y averiguar el papel que juega la osmolaridad del medio extracelular en la regulación de los sistemas de permeabilidad de membrana en presencia de antibióticos.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo está subvencionado en parte por la Fundación de la Comunidad Valenciana para la investigación biomédica, la docencia y la cooperación internacional y el desarrollo del Hospital General Universitario de Elche. FIBELX-CO11/01 y AP-169/11 (Consejería de Sanitat. Generalitat Valenciana).

## DECLARACIÓN DE TRANSPARENCIA

Nada que declarar.

## BIBLIOGRAFÍA

- Bhardwaj AK, Mohanty P. Bacterial efflux pumps involved in multidrug resistance and their Inhibitors: rejuvenating the antimicrobial chemotherapy. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* 2012; 7:73-89.
- Baucheron S, Chaslus-Dancla E, Cloeckaert A. Role of TolC and parC mutation in high-level fluoroquinolone resistance in *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium* DT204. *J Antimicrob Chemother* 2004; 53:657-9.
- Piddock LJ, White DG, Gensberg K, Pumbwe L, Griggs DJ. Evidence for an efflux pump mediating multiple antibiotic resistance in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 3118-21.
- Ricci V, Piddock LJ. Ciprofloxacin selects for multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* mediated by at least two different pathways. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63:909-16.
- Fabrega A, Sanchez-Céspedes J, Soto S, Vila J. Quinolone resistance in the food chain. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 31: 307-15.
- Wain J, Kidgell C. The emergence of multidrug resistance to antimicrobial agents for the treatment of typhoid fever. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2004; 98:423-30.
- Nikaido H, Pagès JM. Broad-specificity efflux pumps and their role in multidrug resistance of Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 2012; 36:340-63.
- Gay K, Robicsek A, Strahilevitz J, Park CH, Jacoby G, Barrett TJ et al. Plasmid-mediated quinolone resistance in non-Typhi serotypes of *Salmonella enterica*. *Clin Infect Dis* 2006; 43: 297-304.
- Ferrari R, Cremades R, Galiana A, Oliveira T, Rodríguez JC. Mechanisms of resistance to fluoroquinolones in *Salmonella* spp. *Curr Drug Ther* 2011; 6: 51-54.
- Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty second informational supplement M100-522. 2012.
- O'Regan E, Quinn T, Pagès JM, McCusker M, Piddock L, Fanning S. Multiple regulatori pathways associated with high-level ciprofloxacin and multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis*: involvement of *ramA* and other global regulators. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53:1080-7.
- Bailey AM, Webber MA, Piddock LJ. Medium plays a role in determining expression of *acrB*, *marA*, and *soxS* in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:1071-4.
- Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 2008; 3: 1101-8.
- Swick MC, Morgan-Linnell SK, Carlson KM, Zechiedrich L. Expression of multidrug efflux pump genes *acrAB-tolC*, *mdfA*, and *norE* in *Escherichia coli* clinical isolates as a function of fluoroquinolone and multidrug resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55:921-4.
- Spengler G, Rodrigues L, Martins A, Martins M, McCusker M, Cerca P et al. Genetic response of *Salmonella enterica* serotype *Enteritidis* to thioridazine rendering the organism resistant to the agent. *Int J Antimicrob Agents* 2012; 39:16-21.
- Guillier M, Gottesman S, Storz G. Modulating the outer membrane with small RNAs. *Genes Dev* 2006; 20:2338-48.
- Singh R, Swick MC, Ledesma KR, Yang Z, Hu M, Zechiedrich L et al. Temporal Interplay between Efflux Pumps and Target Mutations in Development of Antibiotic Resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56: 1680-5.
- Meng J, Bai H, Jia M, Hou Z, Xue X, Zhou Y et al. Restoration of antibiotic susceptibility in fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* by targeting *acrB* with antisense phosphorothioate oligonucleotide encapsulated in novel anion liposome. *J Antibiot (Tokyo)* 2012; 65:129-34.
- Sun Y, Dai M, Hao H, Wang Y, Huang L, Almofti YA et al. The role of RamA on the development of ciprofloxacin resistance in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67:101-10.
- Kehrenberg C, Cloeckaert A, Klein G. Decreased fluoroquinolone susceptibility in mutants of *Salmonella* serovars other than *Typhimurium*: detection of novel mutations involved in modulated expression of *ramA* and *soxS*. *J Antimicrob Chemother* 2009; 64:1175-80.
- Zheng J, Tian F, Cui S, Song J, Zhao S, Brown EW et al. Differential gene expression by RamA in ciprofloxacin-resistant *Salmonella typhimurium*. *PLoS One* 2011; 6:e22161.
- Abouzeed YM, Baucheron S, Cloeckaert A. RamR mutations involved in efflux-mediated multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52:2428-34.
- Davin-Regli A, Bolla JM, James CE, Lavigne JP, Chevalier J, Garnotel E et al. Membrane permeability and regulation of drug "influx and efflux" in enterobacterial pathogens. *Curr Drug Targets* 2008; 9:750-9.