

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DEL DIAGNÓSTICO.
ÁREA DE MICROBIOLOGÍA



**RESISTENCIA PLASMÍDICA A
FLUORQUINOLONAS EN
ENTEROBACTERIAS**

TESIS DOCTORAL

M^a Lourdes Viñuela Sandoval Julio 2015

Sin estudiar enferma el alma. (Séneca).

*Lo que sabemos es una gota de agua; lo que ignoramos
es el océano. (Isaac Newton)*

La felicidad constante es la curiosidad. (Alice Munro).

La vejez es la pérdida de la curiosidad. (Azorín).

AGRADECIMIENTOS

"¡Ábrete, Sésamo [...] se maravilló de todo lo que veía".

(Alí Babá y los cuarenta ladrones. Las mil y una noches).

Dedicado a todas las personas que alguna vez abrieron puertas para que yo las cruzase, unas conducían al conocimiento y otras a las emociones y sentimientos.

ABREVIATURAS

- AC NALI: ácido nalidíxico
- AEMPS: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios
- AINE: antiinflamatorio no esteroideos
- Ala: alanina
- AMOX: amoxicilina
- Arg: arginina
- Asn: asparragina
- Asp: ácido aspártico
- ATP: adenosín trifosfato
- ATS: American Thoracic Society
- AUC: área bajo la curva
- BLAST: Basic Local Alignment Search Tool
- BLEE: betalactamasa de espectro extendido

- CAZ: ceftazidima
- CBM: concentración bactericida mínima
- CDC: Centers for Disease Control and Prevention
- CIM: concentración inhibitoria mínima
- C_{max}: concentración máxima en suero
- CIPRO: ciprofloxacino
- CPM: concentración preventiva de mutantes
- CTX: cefotaxima
- CXM: cefuroxima
- Cys: cisteína
- DNA: desoxirribonucleico ácido
- dNTP: desoxirribonucleótidos trifosfato.
- ECDC: European Center for Disease Prevention and Control
- EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

- EE UU: Estados Unidos de América
- EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica
- F: biodisponibilidad
- FDA: Food and Drug Administration
- FOSFO: fosfomicina
- Gln: glutamina
- Glu: ácido glutámico
- Gly: glicina
- GM: gentamicina
- His: histidina
- ICAAC: Intescience Conference of Antimicrobial Agents and Chemotherapy
- IDSA: Infectious Diseases Society of America
- Ile: isoleucina
- IM: intramuscular

- ITS: infecciones de transmisión sexual
- ITU: infecciones del tracto urinario
- IV: intravenosa
- Leu: leucina
- Lys: lisina
- MATE: Multidrug and Toxic compound Extrusion
- Met: metionina
- MFS: Major Facilitator superfamily
- NAC: neumonía adquirida en la comunidad
- NCBI: National Center for Biotechnology Information
- NLM: National Library of Medicine
- OMS: Organización Mundial de la Salud
- PAE: efecto postantibiótico
- PAS: ácido paramino salicílico

- PCR: Polymerase Chain Reaction
- PD: farmadineámicos
- Phe: fenialanina
- PK: farmacocinéticos
- PMQR: Plasmid- Mediated Quinolone Resistance
- PO: posología oral
- Pro: prolina
- QRDR: Quinolone Resistance-Determining Region
- RND: Resistance Nodulation Division
- Ser: serina
- SMR: SamII Multidrug Resistance
- SNC: sistema nervioso central
- t_{1/2}: semivida plasmática
- TBE: tris, borato y EDTA

- Thr: treonina
- Tris: trihidroximetilaminometano
- Tyr: tirosina
- Trp: triptófano
- UE: Unión Europea
- V: voltios
- Val: valina
- Vd: volumen de distribución
- VIH: virus inmunodeficiencia humana
- VS: ventana de selección
- WHO: World Health Organization
- WT: Wild Type (cepa salvaje)

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	7
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	8
3.1 CLASIFICACIÓN DE LAS QUINOLONAS.....	9
3.2 ESTRUCTURA QUÍMICA.....	11
3.3 MECANISMO DE ACCIÓN.....	14
3.3.1 TOPOISOMERASA II O DNA GIRASA.....	16
3.3.2 TOPISOMERASA IV.....	20
3.3.3 UNIÓN QUINOLONAS-TOPOISOMERASAS.....	22
3.4 ACTIVIDAD <i>IN VITRO</i>	26
3.5 FARMACOCINÉTICA Y FARMACODINAMIA.....	30
3.5.1 FARMACOCINÉTICA.....	33

3.5.2 FARMACODINAMIA.....	35
3.6 INTERACCIONES CON OTROS FÁRMACOS.....	37
3.7 INDICACIONES TERAPÉUTICAS.....	43
3.7.1 INFECCIONES DEL TRACTO URINARIO.....	43
3.7.2 INFECCIONES DE TRANSMISIÓN SEXUAL (ITS).....	45
3.7.3 INFECCIONES GASTROINTESTINALES.....	49
3.7.4 INFECCIONES DE LAS VÍAS RESPIRATORIAS.....	50
3.7.5 INFECCIONES ÓSEAS Y DE PRÓTESIS ARTICULARES.....	56
3.7.6 INFECCIONES DE LA PIEL Y TEJIDOS BLANDOS.....	58
3.7.7 INFECCIONES INTRAABDOMINALES.....	58
3.7.8 PROFILAXIS QUIRÚRGICA.....	60
3.7.9 PACIENTES NEUTROPÉNICOS.....	60
3.8 EFECTOS ADVERSOS.....	61

3.8.1 EFECTOS ADVERSOS COMUNES.....	62
3.8.2 EFECTOS ADVERSOS INFRECIENTES.....	63
3.9 MECANISMOS DE RESISTENCIA.....	69
3.9.1 MECANISMOS DE RESISTENCIA CROMOSÓMICOS.....	74
3.9.1.1 MODIFICACIONES EN LAS TOPOISOMERASAS II Y IV.....	74
3.9.1.2 ALTERACIONES EN LA MEMBRANA.....	81
3.9.1.3 SISTEMAS DE EXPULSIÓN ACTIVA.....	83
3.9.2 MECANISMOS DE RESISTENCIA PLASMÍDICA.....	90
3.9.2.1 GENES <i>qnr</i>	96
3.9.2.2 AAC(6')-Ib-cr.....	112
3.9.2.3 BOMBAS DE EXPULSIÓN.....	117
4 MATERIAL Y MÉTODOS.....	124
4.1 SELECCIÓN DE LAS CEPAS.....	124

4.2 AMPLIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE GENES.....	125
4.2.1 EXTRACCIÓN DEL DNA.....	127
4.2.2 DETECCIÓN DE GENES.....	127
4.2.3 VERIFICACIÓN DE RESULTADOS.....	130
4.2.4 PURIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE LOS AMPLIFICADOS.....	132
4.2.5 INTERPRETACIÓN DE LAS SECUENCIAS.....	134
5 RESULTADOS.....	137
6 DISCUSIÓN.....	149
7 CONCLUSIONES.....	170
8 BIBLIOGRAFÍA.....	173

INTRODUCCIÓN

1.INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas han sido una de las causas más importantes de mortalidad en la historia del género humano, llegando incluso, cuando se manifestaban en forma de epidemias, a condicionar el desarrollo de las naciones. Se calcula que la llamada Peste Negra, que se extendió por Europa a mediados del siglo XIV, acabó con la vida de la mitad de la población, lo que dio lugar a importantes consecuencias socio-económicas.

El inicio de la era antibiótica en el siglo XX y el posterior desarrollo de numerosas moléculas de antimicrobianos hicieron creer por un tiempo que la lucha contra las bacterias había sido ganada por el hombre. Sin embargo, actualmente parece que es la especie más antigua, los procariontes, la que está ganando la partida al *Homo sapiens*. “We are on the very real, very frightening precipice of a post-antibiotic era with mortality rates for infections increasing “ (Murray 2014).

Pero no es sólo el aumento incesante de mecanismos de resistencia por parte de las bacterias lo que nos ha conducido a este escenario tan aterrador, también han surgido nuevos patógenos, a la vez que falta investigación para el desarrollo de más antibióticos.

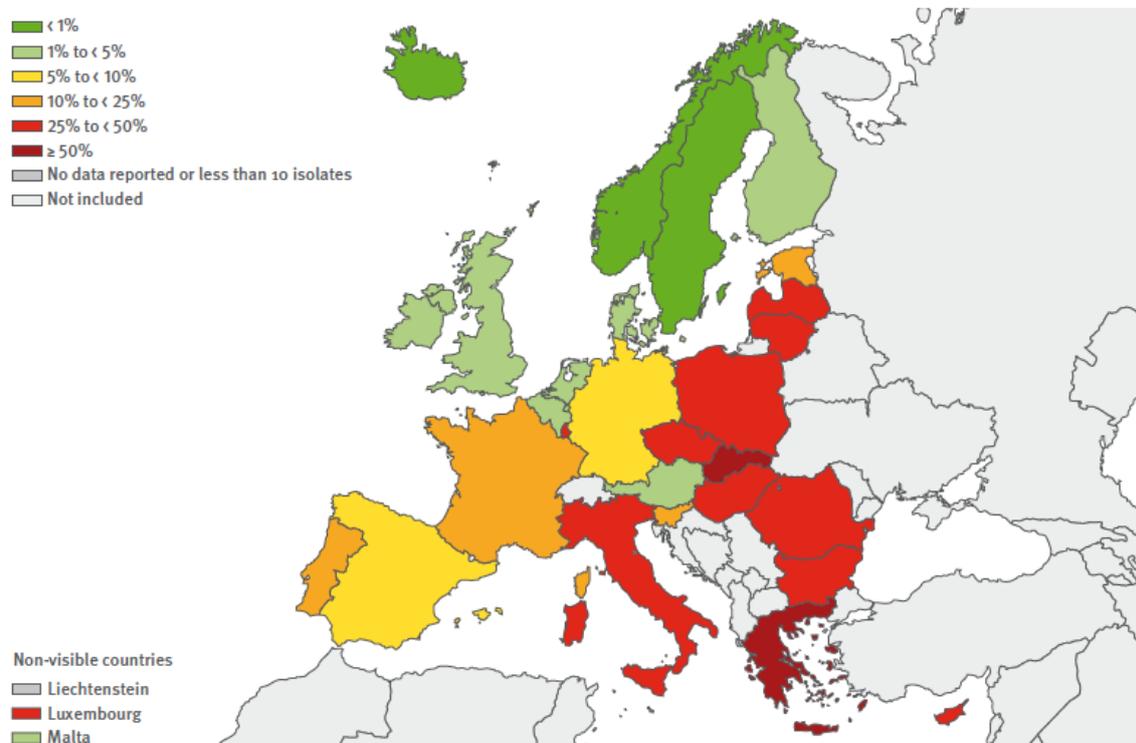
Entre 2008 y 2011 el porcentaje de aislados multirresistentes (a cefalosporinas de tercera generación, aminoglucósidos y fluorquinolonas) aumentó en trece de los veintiocho países de la UE (Figura 1) (ECDC Annual Epidemiological Report 2013).

Figura 1.

Pocentaje de *K. pnemoniae* en sangre o LCR con multirresistencia a cefalosporinas de 3^a, fluorquinolonas y aminoglucósidos. UE 2011.

Tomada de European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) 2013

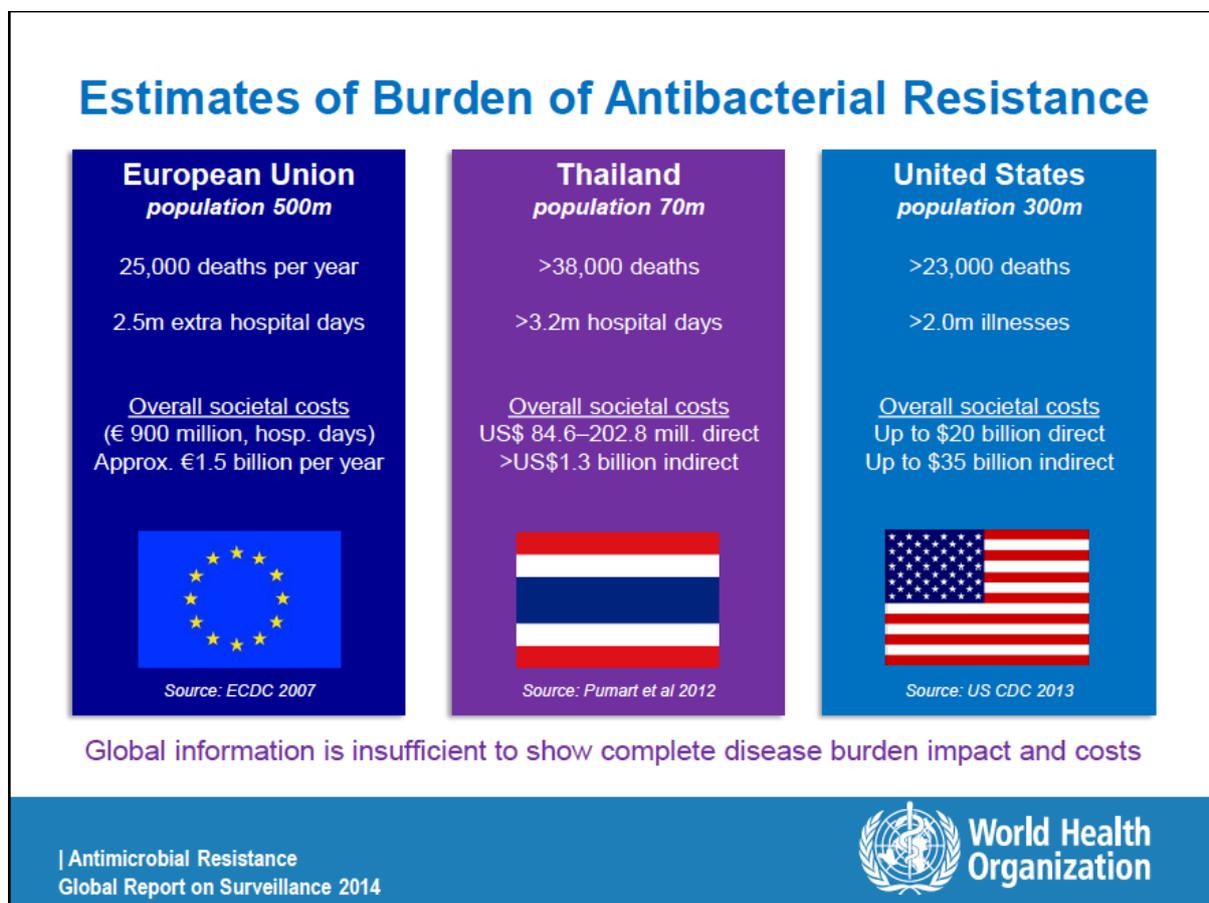
Figure 2.6.2. *Klebsiella pneumoniae*: percentage (%) of invasive (blood and cerebrospinal fluid) isolates with multidrug resistance (resistant to third-generation cephalosporins, fluoroquinolones and aminoglycosides), EU/EEA, 2011



Source: EARS-Net. Only data from countries reporting more than 10 isolates are shown.

La voz de alarma ante esta amenaza global ya ha sido dada ante el congreso de EE UU por asociaciones científicas (Murray 2014). Por otra parte, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha publicado el primer informe mundial sobre resistencia a los antibióticos (WHO 2014).

Figura 2.
Costes estimados de la resistencia bacteriana en distintas zonas geográficas.
Tomada de Antimicrobial Resistance Global Report on surveillance 2014
OMS



Las diferencias entre las infecciones por cepas resistentes vs cepas sensibles es enorme, no sólo en riesgo de muerte, sino en costes socio-sanitarios (Figura 2).

Una mayor comprensión de los mecanismos de resistencia bacterianos nos ayudará a preservar mejor nuestro arsenal antibiótico y también podría contribuir al diseño de dianas terapéuticas novedosas.

Las quinolonas han sido y son una de las familias de antibióticos más ampliamente utilizadas tanto en humanos como en animales, debido a su eficacia, disponibilidad oral y baja toxicidad relativa, además de ser todas ellas obtenidas por síntesis con bastante facilidad. Este uso masivo y, en muchas ocasiones, injustificado ha propiciado la selección de resistencias.

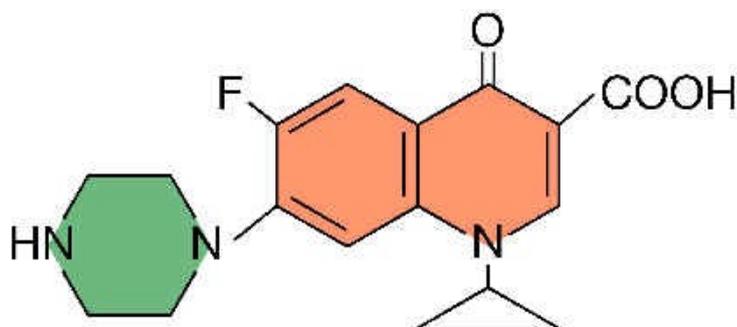
Aunque el ácido nalidíxico (primera quinolona usada en clínica) se descubrió en 1962, fue la adición de un átomo de flúor en la estructura flumequina y, sobre todo, la síntesis de norfloxacinó en 1978 la que inició una etapa diferente en el empleo de la quinolonas; su uso se extendió para el tratamiento de muy diversas patologías, en profilaxis, como promotores del crecimiento del ganado e incluso alguna de ellas llegó a ser considerada el fármaco casi perfecto, como fue el caso del ciprofloxacino, introducido en clínica en 1987 (Figura 3) (García Rodríguez et al, 2006).

En efecto, el norfloxacinó cuenta con un átomo de flúor en posición 6 que junto con un anillo de piperacina en posición 7 mejoraban

la farmacocinética de la molécula, conferirían mayor potencia y un espectro más amplio (Appelbaum et al., 2000) (Mandell et al., 2010). Pronto se vio que se podía modificar el núcleo de estos antimicrobianos para optimizar estas propiedades. Por ejemplo, se prolongó la vida media y se obtuvieron compuestos cuya dosificación se hacía una vez al día (Andriole 2005). En los tres años posteriores a la patente de norfloxacinó se sintetizaron nuevas moléculas, como enoxacinó (1980), ciprofloxacino (1981) y ofloxacino (1982), que, dada su excelente absorción desde el tracto intestinal, alcanzaban niveles adecuados en sangre y por tanto podían usarse en infecciones sistémicas (Appelbaum et al., 2000).

Figura 3.

Estructura de ciprofloxacino.
Tomada de www.ugr.es



Esta amplia utilización ha condicionado sin duda la emergencia y selección de resistencias frente a estos fármacos. El mecanismo de resistencia principal es cromosómico y es una alteración en las dianas del antibiótico, las topoisomerasas. La disminución de la concentración del fármaco en el interior de la bacteria, bien por impermeabilización de la pared, bien mediante sistemas de expulsión activa es otra forma de resistencia, también cromosómica. De los citados mecanismos, es sin duda el cambio en las topoisomerasas el más importante, siendo los sistemas de expulsión de poca relevancia (Rodríguez- Martínez, 2005).

Pero en 1998 se describen por primera vez mecanismos de resistencia a quinolonas de transmisión horizontal; se trata del gen *qnr* situado, dentro de un elemento móvil, en un plásmido conjugativo portador de genes de resistencias a múltiples antibióticos, el cual fue aislado a partir del cultivo urinario de un paciente en Birmingham, Alabama (EE.UU.) (Martínez-Martínez et al., 1998). Posteriormente han sido descritos otros tipos de *qnr*: *qnrA*, *qnrC*, *qnrS*, *qnrVC*. Además, diversos genes albergados también en plásmidos producen resistencia frente a quinolonas. Se trata de *aac(6')-Ib-cr*, que codifica una acetilasa, capaz de inactivar asimismo a los aminoglucósidos, y *qepA*, y otras bombas de expulsión que disminuyen los niveles del antibiótico dentro de la bacteria (Fàbrega et al., 2009) (Rodríguez- Martínez et al., 2011).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Los estudios disponibles reflejan que, por lo general, estos mecanismos de resistencia plasmídicos generan discretos incrementos de resistencia, fundamentalmente a las fluoroquinolonas más antiguas, aunque la combinación de varios de estos mecanismos puede generar resistencia clínica (Rodríguez- Martínez, 2005) (Albert, 2014).

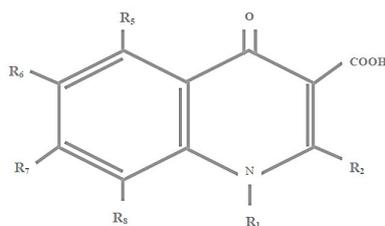
Por otra parte, algunos trabajos que secuencian regiones de los genes codificadores de las topoisomerasas más amplias de lo que se ha venido haciendo durante años, encuentran perfiles de mutaciones más heterogéneos de lo que se venía considerando un comportamiento prácticamente sistemático en la selección de resistencia a fluoroquinolonas en enterobacterias. De este modo, la combinación resistencia a ácido nalidíxico/sensibilidad a ciprofloxacino, que antes se consideraba condicionada de forma casi unívoca por la presencia de una mutación característica en *gyrA*, y que constituye la piedra angular en el desarrollo de resistencia de alto nivel, puede tener un origen más diverso del que presentaba hace unos años, y con un potencial evolutivo probablemente también distinto,

El objetivo principal planteado en este estudio ha sido conocer la prevalencia de los mecanismos de resistencia plasmídica a fluoroquinolonas en aislamientos de *E. coli* resistentes a ácido nalidíxico y sensibles a ciprofloxacino, y la posible existencia de otras mutaciones cromosómicas también implicadas en dicho perfil de resistencia

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3. QUINOLONAS

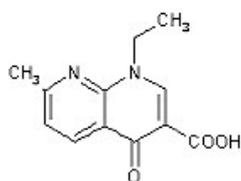
Figura 4. Estructura química de distintas quinolonas



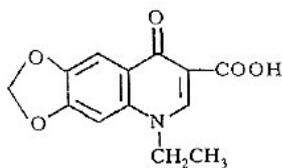
Anillo 4-quinolona

NO FLUORADAS

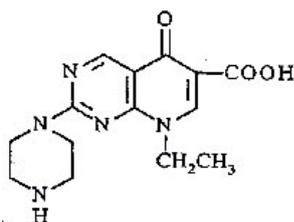
ÁCIDO NALIDÍXICO



ÁCIDO OXOLÍNICO

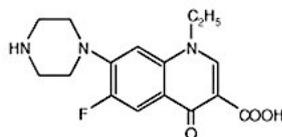


ÁCIDO PIPEMÍDICO

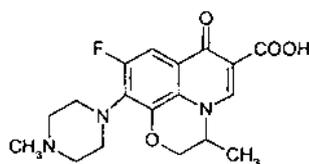


FLUORADAS DE SEGUNDA GENERACIÓN

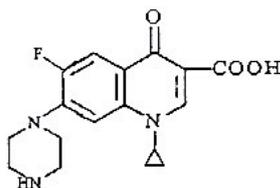
NORFLOXACINO



OFLOXACINO

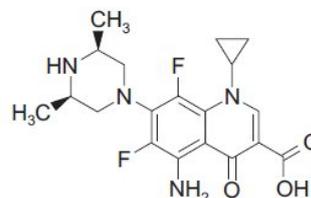


CIPROFLOXACINO

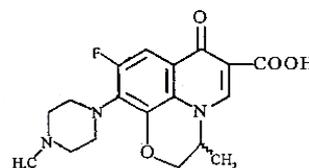


FLUORADAS DE TERCERA Y CUARTA GENERACIÓN

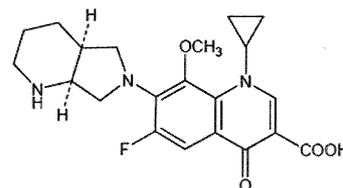
ESPARFLOXACINO



LEVOFLOXACINO



MOXIFLOXACINO



3.1 CLASIFICACIÓN DE LAS QUINOLONAS

Las quinolonas pueden clasificarse en función de su estructura química, de su aparición en el tiempo y de otros parámetros, pero es la clasificación por generaciones la más utilizada en Medicina. Presenta analogía con otras familias de antibióticos, y se basa principalmente en su espectro de acción (Tabla 1) (García Rodríguez et al. 2006).

Aunque han sido numerosas las moléculas investigadas, no todas se han utilizado en clínica debido a sus efectos secundarios; otras han sido abandonadas porque propiciaban un aumento excesivo de las resistencias o simplemente han sido superadas por otros fármacos.

Tabla 1.
 Clasificación simplificada de las quinolonas por generaciones.
 Modificada de García Rodríguez et al., 2006. Datos de ICAAC 2012
 ❖ Utilizados en España.

QUINOLONAS	ESPECTRO DE ACTIVIDAD
1ª GENERACIÓN	
Ácido nalidíxico ❖ Cinoxacino Ácido pipemídico ❖ Flumequina	Enterobacterias
2ª GENERACIÓN	
Lomefloxacino Enoxacino Ofloxacino ❖	Gramnegativos <i>Pseudomonas</i> Grampositivos (poca acción sobre <i>S. aureus</i> , <i>S. pneumoniae</i> y patógenos intracelulares)
3ª GENERACIÓN	
Ciprofloxacino ❖ Pefloxacino Levofloxacino ❖ Esparfloxacino Gatifloxacino ❖	Igual que la 2ª generación, pero mejor actividad sobre <i>S. pneumoniae</i> y patógenos intracelulares
4ª GENERACIÓN	
Moxifloxacino ❖ Trovafloxacino Gemifloxacino Sitafoxacino	Como la 3ª generación y acción sobre anaerobios
5ª GENERACIÓN	
Garenoxacino DX-619, WCK-771, WCK-1153, DW-286 Ev-035, DS-8587, KPI-10 (ICAAC 2012) Delafloxacino, Nemonoxacino, JNJ-Q2	Algunas como la 4ª generación y otras con diseño específico contra bacterias multirresistentes

3.2 ESTRUCTURA QUÍMICA

Únicamente las moléculas derivadas de la 4-oxoquinolina o 4-quinolona serían quinolonas en sentido estricto, pero se ha aceptado y generalizado el nombre de quinolonas para otros compuestos que comparten el mismo mecanismo de acción. Así por ejemplo, la considerada primera quinolona, el ácido nalidíxico, es en realidad una 4-naftiridona (Gutiérrez 2004).

Las quinolonas comparten en su mayoría un núcleo común que es una estructura bicíclica que consta de dos anillos, uno de ellos de tipo piridona, con un ácido carboxílico libre en posición 3 y un átomo de nitrógeno en posición 1. El anillo restante puede ser de diversos tipos (Figura 4).

Para que estas moléculas tengan actividad biológica, ha de activarse el núcleo bicíclico. Para ello, el nitrógeno de la posición 1 debe incorporar una cadena lineal o cíclica (García Rodríguez et al, 2006).

Clínicamente se clasifican en cuatro grupos, según la incorporación de más átomos de carbono:

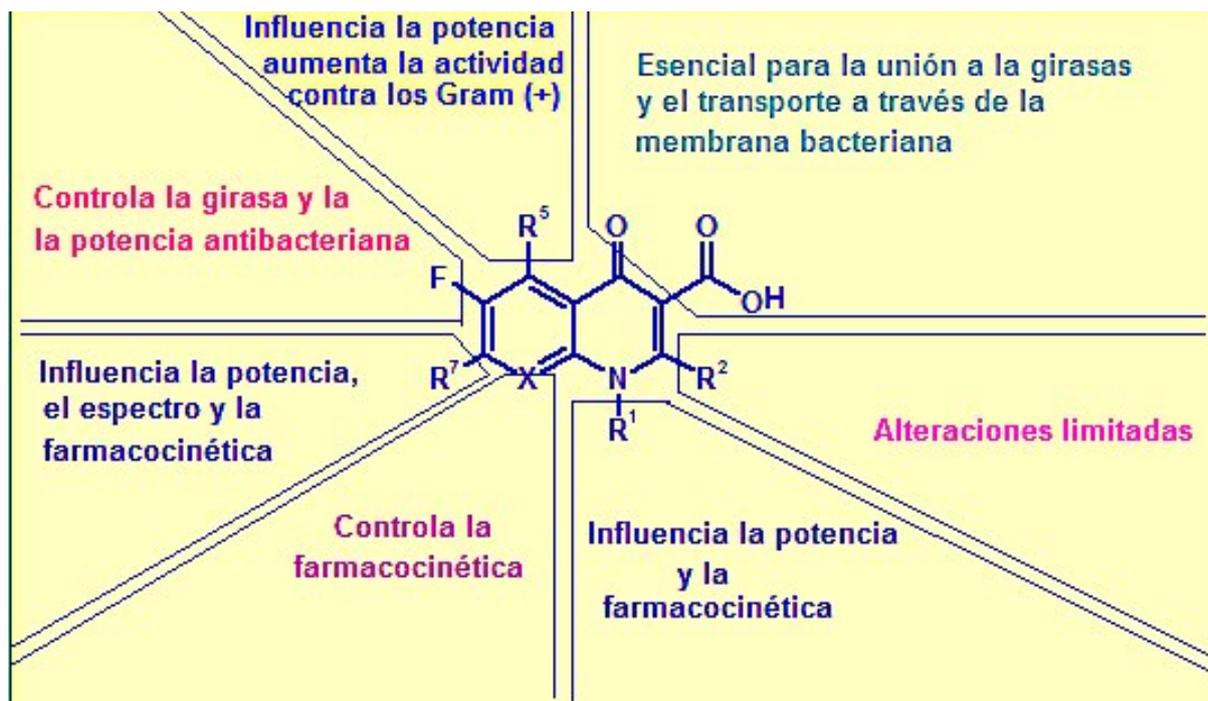
- naftiridinas (posiciones 1 y 8)
- cinolonas (posiciones 1 y 2)
- quinolonas (posición 1)

- piridopirimidinas (posiciones 1, 6 y 8)
- posteriormente se ha añadido un quinto grupo, las quinolicinas

Figura 5.

Relación entre estructura y acción.

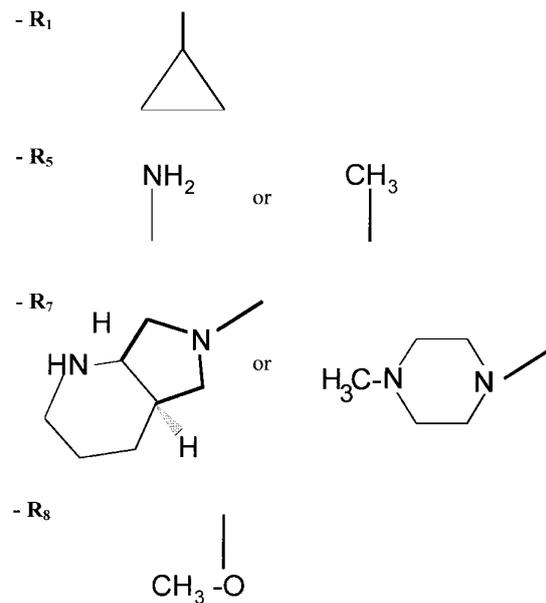
Tomada de <http://www.alipso.com/monografias4/Sintesis-de-Antibioticos/>



La relación entre la actividad de estas moléculas y su estructura química es patente, mejorando su espectro y actividad antibiótica al incorporar un átomo de flúor en la posición 6 de la molécula, salvo en el caso de garenoxacino. El átomo de flúor está en la posición 9 cuando la quinolona es tricíclica y tanto en este caso como si está en la mencionada posición 6 (quinolonas bicíclicas) este átomo de flúor controla la unión y acción sobre el complejo DNA-girasa, así como la penetración en el interior de la bacteria, viéndose aumentada su potencia. Como ya mencionamos, este fue el factor clave para el desarrollo de nuevas y más eficaces moléculas (Chu et al., 1989) (Figura 5).

Otras modificaciones en las posiciones 1, 7 y 8 son esenciales para potenciar la actividad antimicrobiana. Por ejemplo una aminopirrolidina en posición 7 mejora la acción ante Gram positivos, mientras que la adición de un grupo piperacínico en esta misma posición lo logrará frente a microorganismos Gram negativos. Una exitosa sustitución en la posición 1 con el grupo ciclopropil corresponde a ciprofloxacino. En cambio las posiciones 2, 3 y 4 no pueden cambiarse sin que la actividad del antibiótico decaiga notablemente (Peterson, 2001) (Figuras 5 y 6).

Figura 6.
Distintos grupos usados en
las moléculas de quinolonas.
Tomada de Peterson (2001).



3.3 MECANISMO DE ACCIÓN

Las quinolonas penetran en la célula a través de las porinas de la pared bacteriana o de la bicapa lipídica por un mecanismo de difusión pasiva, pasando posteriormente al interior de la membrana citoplasmática; en las bacterias Gram positivas, que carecen de porinas y de lipopolisacáridos, el paso se efectúa por difusión simple. Una vez dentro de la célula, inhiben la síntesis de DNA. Para ello se unen al complejo que forman la topoisomerasa II (DNA girasa) y la topoisomerasa IV con el DNA bloqueándolo, tras lo que la célula muere en poco tiempo (García Rodríguez et al., 2006).

Estas dos enzimas forman parte de la familia de topoisomerasas II y son imprescindibles en la replicación, transcripción y recombinación del DNA bacteriano, así como en la compactación, decatenación y segregación de los cromosomas una vez terminada la replicación del DNA. (Forterre et al., 2007). El nombre de topoisomerasas deriva de que son las enzimas que regulan la topología del DNA al controlar el número de vueltas con que cada cadena de DNA se trenza con su homóloga (García Rodríguez et al., 2006). Como se explica en detalle más adelante, la función principal de girasa es formar superenrollamientos negativos en el DNA, mientras que la acción más importante de topoisomerasa IV es separar las moléculas de DNA tras su replicación.

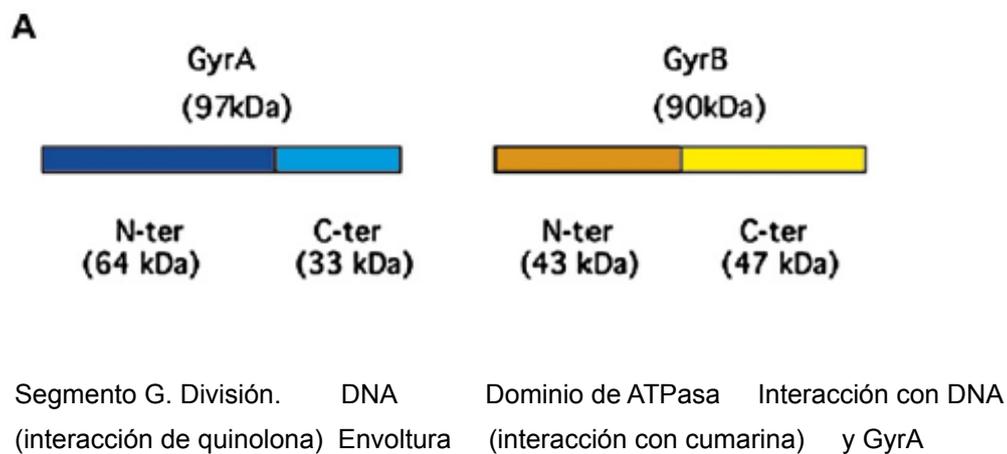
La diana principal de las quinolonas en la mayor parte de las bacterias Gram negativas es la topoisomerasa II, actuando la topoisomerasa IV como diana secundaria. En las bacterias Gram positivas sucede lo contrario (Saiki AYC et al., 1999) (Fukuda et al., 1999) (Drlica et al., 2008). Puesto que ambas enzimas tiene funciones diferentes, es probable que la bacteria responda de distinta forma a las quinolonas según qué topoisomerasa sea el blanco primario (Cheng et al. 2013). Hasta ahora se cree que un alto nivel de resistencia a quinolonas sólo se alcanza cuando ambas enzimas presentan mutaciones (Taléns-Visconti et al., 2002). Por ello, diseñar fármacos que inhiban estas dos topoisomerasas con una potencia similar ha sido un objetivo ampliamente buscado (East et al., 2008) (Anderson et al., 2010). Algunas fluorquinolonas como gatifloxacino, moxifloxacino o clinafloxacino han mostrado esta doble capacidad inhibitoria en *Staphylococcus aureus* (Takei et al., 2001).

3.3.1 TOPOISOMERASA II O DNA GIRASA

Hasta 2004 se creyó que la DNA girasa sólo se encontraba en el genoma bacteriano, no en células eucariotas, pero en ese año fue aislada en el DNA de *Arabidopsis thaliana* (Wall et al., 2004) y posteriormente se ha encontrado en el genoma de otras plantas (Evans-Roberts et al., 2010). Que la topoisomerasa II no se encuentre en eucariotas, al menos no el reino animal, la convierte en una diana ideal para los antibióticos y, como ya hemos mencionado, sin esta enzima la célula bacteriana no puede sobrevivir. Su acción y estructura son muy similares a las de la topoisomerasa IV, pero no totalmente idénticas, ya que ambas topoisomerasas actúan en diferentes fases de la replicación del DNA. La girasa desarrolla su actividad consumiendo energía en forma de ATP (Levine et al., 1998).

La estructura de la topoisomerasa II consta de dos subunidades A y B en forma de tetrámero (dos monómeros alfa en subunidad A y dos monómeros β en subunidad B). El gen *gyrA* codifica la subunidad A, implicada en la unión y separación del DNA. La subunidad B es codificada por el gen *gyrB* y tiene actividad ATPasa (Fábrega et al., 2009) (Figura 7).

Figura 7.
Estructura de la topoisomerasa II
Modificada de (Nöllmann et al., 2007).



Es en el dominio N-terminal (N-terminal domain NTD) de *gyrA* donde las quinolonas actúan. NTD es también el lugar de unión con el segmento G, que veremos posteriormente. El dominio C-terminal (C-terminal domain CTD) es la parte de *gyrA* que se une al DNA, el cual es envuelto por la enzima, formándose un superenrollamiento positivo conocido como envoltura quiral (Nöllmann et al., 2007) (Forterre et al., 2007).

La DNA girasa regula la estructura helicoidal del DNA, la transcripción, iniciación y elongación durante la replicación del mismo y produce asimismo superenrollamientos negativos en el DNA, algo que

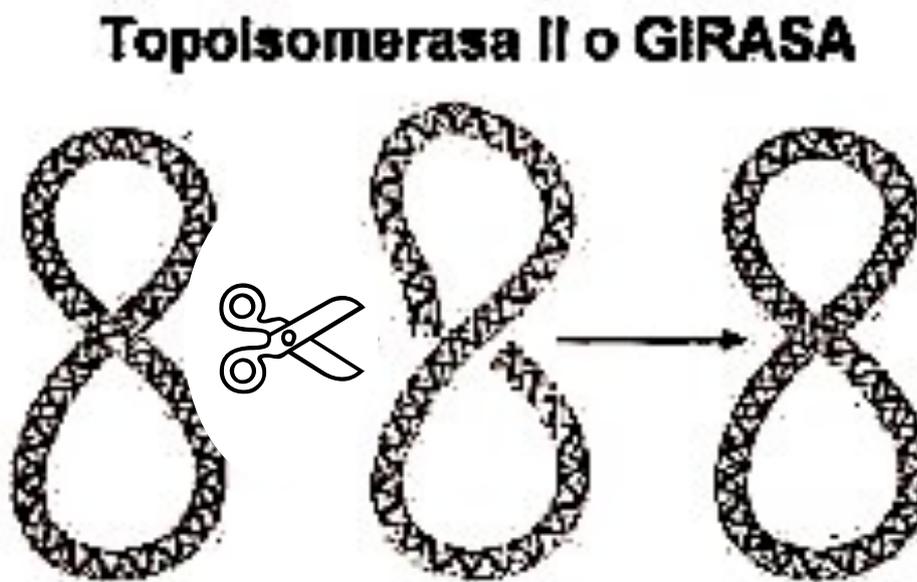
únicamente esta enzima puede conseguir, y que resulta esencial para la expresión de muchos promotores y en los primeros pasos de la replicación de DNA. En efecto, los superenrollamientos negativos relajan el estrés producido por una torsión excesiva cuando tiene lugar la separación de las dos hebras de DNA. DNA girasa también elimina los superenrollamientos positivos que se acumulan delante de la horquilla de replicación, que se van formando a medida que avanza la acción de la polimerasa. En definitiva, si la girasa no actuase, la torsión acumulada en la molécula de DNA frenaría el proceso, y además se perdería el equilibrio en la estructura helicoidal del cromosoma (otra de las funciones de girasa) (Nöllmann et al., 2007) (Forterre et al., 2007) (Mandell et al., 2010).

Para realizar estos enrollamientos negativos las topoisomerasas II rompen coordinadamente ambas hebras del DNA, se crea una puerta (G o gate segment) transitoria por la que pasa un fragmento de DNA (T o transport segment) también doble. Posteriormente esta puerta se sella de nuevo (Figura 8). El resultado es la conversión de un giro positivo en uno negativo y el número de uniones se reduce en -2. Este proceso es ATP-dependiente. Las topoisomerasa tipo I realizan este proceso con una sola hebra de DNA y no consumen ATP.

Figura 8.

Acción de la topoisomerasa II de izquierda a derecha: corta ambas hebras de DNA, pasa el fragmento intacto a través de la brecha (gate), vuelve a sellarse la brecha.

Modificada de biologia.laguia2000.com



Corte de la doble hebra Paso a través de la brecha o puerta Sellado de la brecha
de un cadena doble

El NTD de *gyrA* se une al fragmento G, mientras que el CTD de *gyrA* se une al DNA que está elongándose, lo envuelve y se forma así el

fragmento T, que es llevado a la entrada de la puerta G. Tras el paso del fragmento T la puerta se cierra y el ATP se encarga de restaurar la enzima para un nuevo ciclo (Nöllmann et al. 2007) (Mandell et al., 2010).

3.3.2 TOPOISOMERASA IV

La topoisomerasa IV se descubrió en 1990, mientras que la girasa lo fue en 1976. Parte de las funciones atribuidas a ésta correspondían en realidad a la primera. Así, la decatenación de las moléculas de DNA formadas tras la replicación del mismo, es una función de la topoisomerasa IV, siendo, por tanto, imprescindible en la fase final de dicha replicación (Nöllmann et al., 2207) (Levine et al., 1998).

Como ya se dijo, las estructuras de las topoisomerasas II y IV están relacionadas. La topoisomerasa IV consta también de dos subunidades, siendo la codificada por *parC* homóloga de *gyrA* y la codificada por *parE* homóloga de *gyrB*. Sus funciones también son similares, siendo la de *parC* superponible a la de *gyrA* y la de *parE* a la de *gyrB* (Levine et al., 1998). Estas subunidades se denominan GrlA y GrlB en Gram positivos (Aldred et al., 2013), aunque otros autores postulan llamarlas sólo así en el caso de *S. aureus* (Hooper 1999).

Ambas topoisomerasas, II y IV, pueden actuar como decatenasas, pero DNA girasa es mucho menos efectiva en esta función y no puede llevarla a cabo hasta el final. Así pues, es la topoisomerasa IV la encargada de separar los cromosomas, una vez completada la

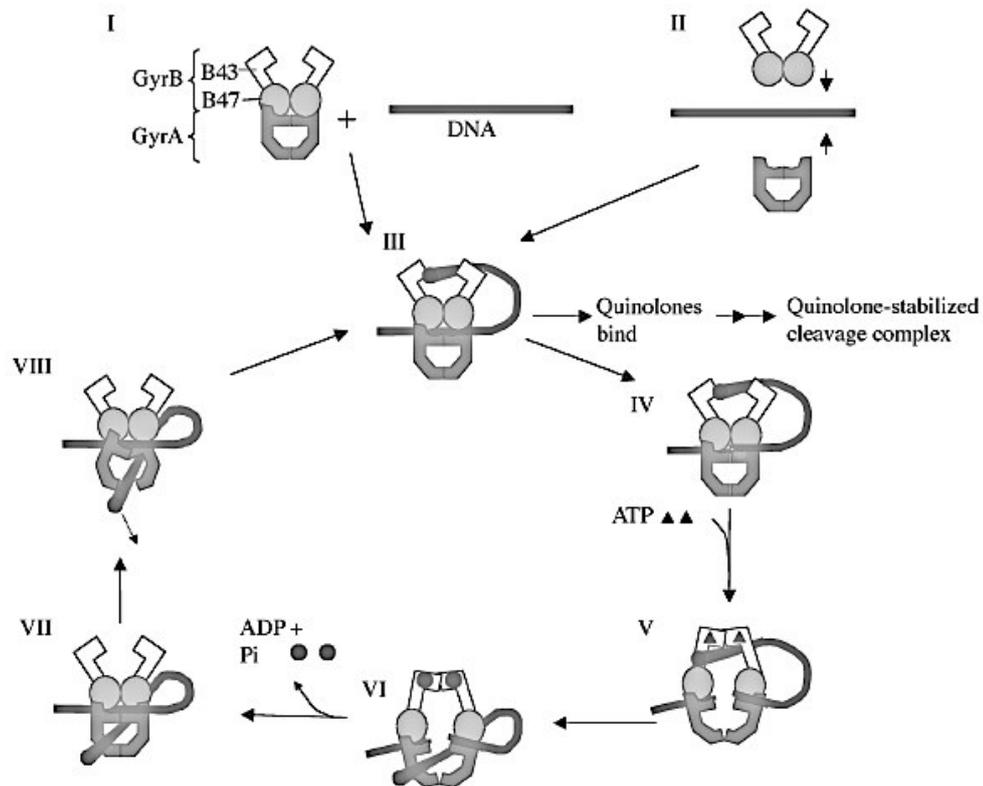
replicación del DNA y antes de la división celular (Nöllmann et al., 2007) (Forterre et al., 2007) (Levine et al., 1998).

La topoisomerasa IV no está presente en el DNA de todas las bacterias, (por ejemplo carecen de ella *Mycobacterium spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter spp.*). En cambio sí lo está girasa. Tampoco la primera produce superenrollamientos negativos, pero es capaz de relajar enrollamientos positivos *in vitro*. Sin embargo su principal función es la separación de las moléculas de DNA en la fase final de su replicación, como ya hemos mencionado (Forterre et al., 2007) (Fàbrega et al., 2009). Esta función la realiza la girasa en los microorganismos que carecen de topoisomerasa IV. Además la girasa parece ser clave para que la topoisomerasa IV actúe (Martínez- Robles et al., 2009) (Mandell et al., 2010).

Ambas topoisomerasas son inhibidas por quinolonas, pero también por otros fármacos como cumarinas, entre las que se encuentra la novobiocina, y fármacos antitumorales (Fàbrega et al., 2009).

3.3.3 UNIÓN QUINOLONAS-TOPOISOMERASAS

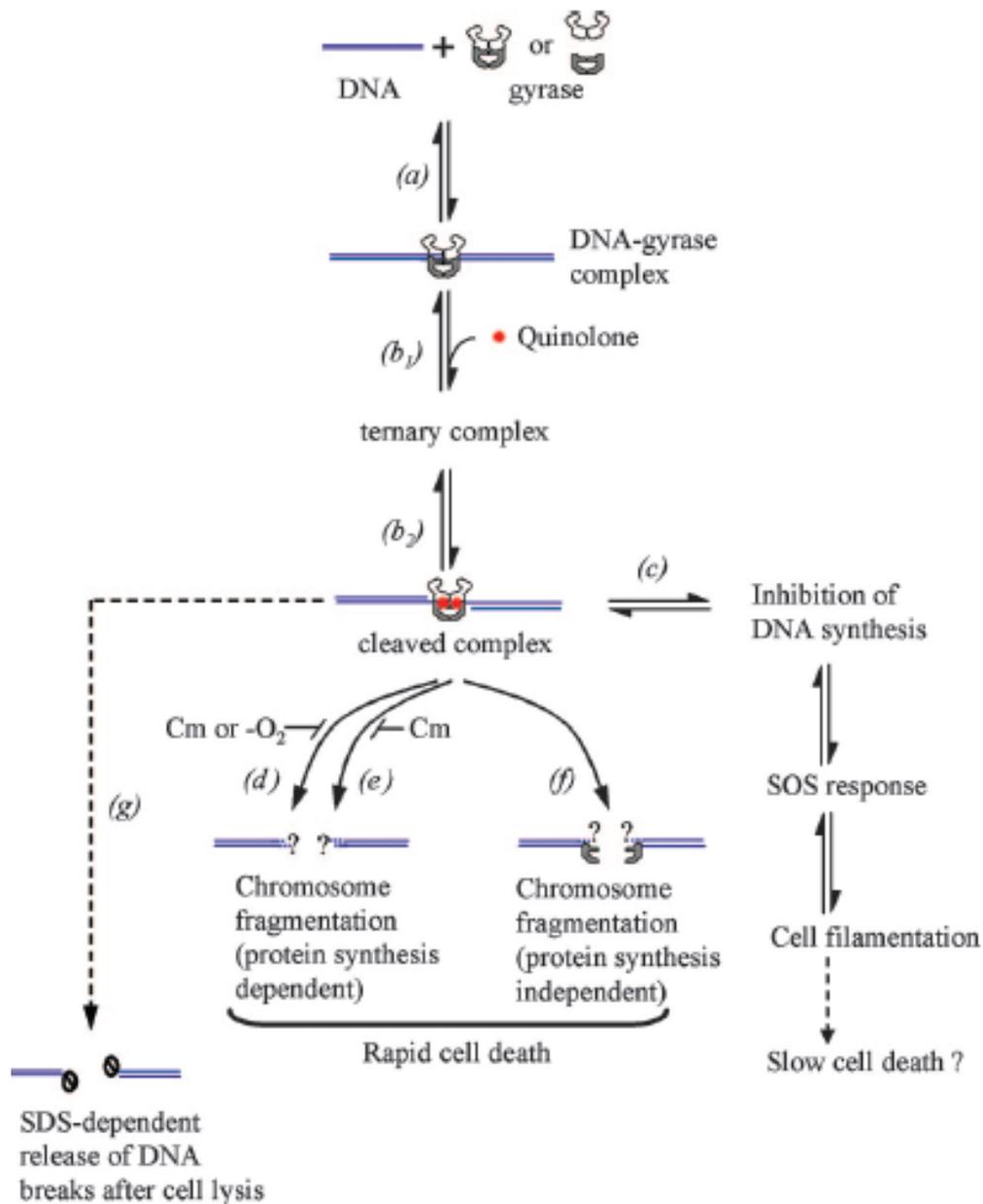
Figura 9.
Ciclo de la DNA girasa y lugar de actuación de las quinolonas.
Modificada de Hawkey 2003



Las quinolonas alteran la topología del DNA formando un complejo ternario con la topoisomerasa y el DNA (Shea et al., 2000). Su acción letal puede describirse en dos partes: en la primera se forman

complejos reversibles con DNA escindido, bloqueándose la horquilla de replicación. Por tanto, no se produce síntesis de DNA y la bacteriostasis ocurre inmediatamente (Figura 9) (Cheng et al., 2013). Cuando la diana principal es la topoisomerasa IV, este efecto no es tan rápido. Se explica porque esta topoisomerasa actúa detrás de la horquilla de replicación, mientras que la girasa lo hace delante (Hawkey PM, 2003) (Cheng et al., 2013). Los complejos formados por quinolona-enzima y DNA son reversibles, pero la acción letal no lo es y se produce por eventos no totalmente conocidos (Hawkey PM 2003) (Drlica et al., 2008). Las quinolonas estabilizan estos complejos, impidiendo la ruptura de las hebras de DNA y su posterior sellado; secundariamente inhiben la actividad ATPasa. (Vetting et al., 2011). Se induce la respuesta SOS celular, que conduce a la formación de bacterias filamentosas, pero estos sucesos no parecen producir la muerte celular con rapidez. En la segunda parte de esta acción letal se requieren altas concentraciones del fármaco. Las brechas de DNA son liberadas por dos vías: una de ellas dependiente de la síntesis de proteínas y la otra independiente. Cada escalón que lleva a la muerte celular depende de la estructura de las diferentes quinolonas, las antiguas quinolonas parecen necesitar de la síntesis proteica, mientras que algunas de las fluorquinolonas no precisarían de ella. Esta última vía plantea posibilidades prometedoras, ya que los fármacos que actuaran a través de ella podrían ocasionar letalidad sin que hubiese crecimiento celular, aspecto muy importante en el caso de microorganismos como *Mycobacterium tuberculosis*, que pueden tener un estado latente (Drlica et al., 2008) (Cheng et al., 2013) (Figura 10).

Figura 10.
Esquema del mecanismo de acción de las quinolonas sobre girasa como blanco principal.
Tomada de Drlica et al., 2008.



Una forma de acción secundaria, más débil, de las quinolonas es el daño producido en la membrana celular. Se han estudiado algunos mecanismos potenciales utilizando ciprofloxacino, pero se desconoce cuántos mecanismos pueden estar implicados en este deterioro de la membrana (Cheng et al., 2013).

A pesar de los diferentes modelos cristalográficos fármaco-enzima-DNA, que explican ciertas acciones de las quinolonas, queda mucho aún por explorar en este campo. Al ser estos complejos reversibles, se piensa que no conducen a la muerte celular, y menos a la velocidad con que se produce ésta en el caso de algunas moléculas como levofloxacino. Se ha propuesto un modelo de fragmentación de cromosomas, tras el que se activaría el sistema SOS, se favorecería la aparición de una población de bacterias altamente tóxica reactiva al oxígeno, que es probablemente la responsable directa de los efectos de las quinolonas (Drlica et al., 2009) (Rodríguez- Martínez et al. 2011). El efecto paradójico que ocurre cuando con altas dosis de antibiótico disminuye la letalidad tampoco tiene explicación satisfactoria, aunque se postula que a altas concentraciones del fármaco también se ven inhibidas la síntesis proteica y la de RNA (Wolfson et al., 1989).

El mejor entendimiento de los genes activados por la célula en las respuestas de estrés podrían ser la diana de futuras moléculas que mejorasen la acción de las quinolonas y son mecanismos aún poco comprendidos. Por ejemplo, sabemos que a través de la respuesta SOS las bacterias pueden sobrevivir y además desarrollar resistencias frente a quinolonas, debido a que este mecanismo antiestrés induce

heterogeneidad genética y por ende propicia la emergencia de dicha resistencia (Cheng et al., 2013).

3.4 ACTIVIDAD *IN VITRO*

La actividad *in vitro* de las quinolonas (tabla 2) varía enormemente si consideramos su clasificación por generaciones. Las de primera generación, como el ácido nalidíxico o el ácido pipemídico, únicamente actuaban frente a algunas enterobacterias, además tan solo en orina se alcanzaban altas concentraciones del fármaco. La segunda generación amplió el espectro de actividad a un grupo mucho mas extenso de bacilos Gram negativos aerobios; con la tercera generación (levofloxacino) se abarcaron también los cocos Gram positivos y la cuarta generación (moxifloxacino) es eficaz contra microorganismos anaerobios (Mensa et al., 2014). Hay que señalar que las primeras quinolonas no podían utilizarse en infecciones sistémicas porque su pobre absorción oral no les permitía alcanzar concentraciones séricas apropiadas (Appelbaum et al., 2000)

Así pues, las fluorquinolonas son muy eficaces *in vitro* frente a cocos y bacilos Gram negativos, incluyendo enterobacterias, cocos como *Neisseria gonorrhoeae*, otras bacterias Gram negativas como *Haemophilus influenzae* y *Legionella pneumophila*, género *Moraxella*,

Gardnerella, *Vibrio*, *Aeromonas* y otros bacilos Gram negativos no fermentadores como *Pseudomonas aeruginosa* (Wolfson et al., 1985).

Tabla 2.
 Actividad in vitro de algunas quinolonas. CIM 90mg/L
 Modificada de Mensa et al. 2014

Organismo	Moxifloxacino	Levofloxacino	Norfloxacino	Ciprofloxacino
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,12	0,5	2	0,5
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0,12	0,5	1	0,5
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0,25	1	8	1
<i>Streptococcus agalactiae</i>	0,25	1	8	1
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	0,25	1	8	2
<i>E. coli</i>	0,12	0,06	0,12	0,06
<i>Klebsiella</i>	0,12	0,12	0,12	0,03
<i>Enterobacter</i>	0,25	0,12	0,12	0,03
<i>Serratia marcescens</i>	2	1	2	0,25
<i>Citrobacter spp.</i>	1	0,25	0,5	0,12
<i>Salmonella spp.</i>	0,12	0,06	0,12	0,06
<i>Shigella spp.</i>	0,06	0,12	0,12	0,06
<i>P. mirabilis</i>	0,25	0,5	0,25	0,06
<i>P. vulgaris</i>	0,25	0,25	0,12	0,06

Tabla 2. Continuación

<i>P. aeruginosa</i>	4	2	2	0,5
<i>Vibrio</i>	0,25	0,06	0,06	0,03
<i>Acinetobacter spp.</i>	0,25	0,25	3	0,5
<i>N. meningitidis</i>	0,03	0,01	0,12	≤0,01
<i>N. gonorrhoeae</i>	0,015	0,015	0,03	0,002
<i>Clostridium spp.</i>	0,5	8	32	8
<i>Haemophilus influenzae</i>	0,06	0,12	0,12	0,06
<i>B. fragilis</i>	2	4	32	8
<i>Chlamydia trachomatis</i>	0,12	1	16	1

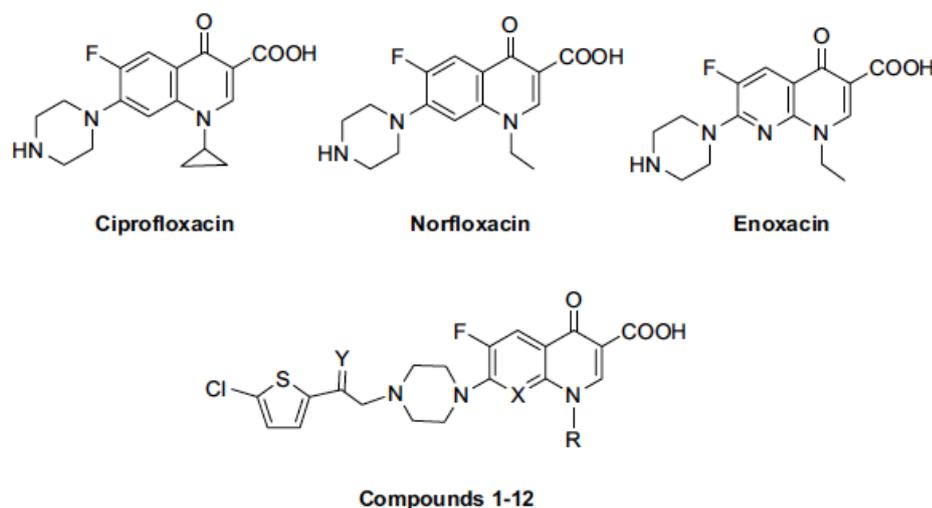
Son consideradas como fármacos de segunda línea por la OMS para el tratamiento de la tuberculosis, ya que poseen un amplio y potente espectro frente a *Mycobacterium spp* (Ahmed et al. 2012).

También tienen actividad frente a *Brucella*, *Yersinia*, *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Chlamydia*, *Helicobacter pylori*, otros bacilos Gramnegativos no fermentadores como *Stenotrophomonas maltophilia* o *Acinetobacter* (García Rodríguez et al., 2006). En cuanto a los microorganismos Gram positivos, actúan frente a *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*. Ya hemos visto que la cuarta generación de quinolonas es activa frente a anaerobios, incluyendo *Bacteroides fragilis* (Mensa et al., 2014).

Hay que mencionar también la actividad *in vitro* de las quinolonas frente a *Plasmodium*, lo que significa un potencial prometedor en este campo. Las quinolonas de uso clínico se obtuvieron por primera vez durante un proceso de síntesis de cloroquina. A su vez, este compuesto deriva de la molécula de quinina, que es un alcaloide vegetal utilizado tradicionalmente contra el paludismo (Beteck et al., 2014).

Las topoisomerasas de los mamíferos también son inhibidas por esta familia de antibióticos. Introduciendo un nuevo residuo en el anillo de piperacina, el N [2-(5-clorotiofen-2-yl)-2-oximinoetil], el perfil de las moléculas cambia y se convierten en fármacos citotóxicos, utilizados en terapia antineoplásica (Figura 11) (Foroumadi et al., 2009).

Figura 11.
Estructura de quinolonas con anillo de piperazina (ciprofloxacino, norfloxacino y enofloxacino) y el sustituyente N.
Tomada de Foroumadi et al. 2009



La concentración inhibitoria mínima (CIM) de las quinolonas se ve poco afectada por el tamaño del inóculo, o la presencia de suero. En cambio, la presencia de orina disminuye la actividad *in vitro* de algunas moléculas, así como el pH inferior a 5 y la presencia de magnesio o de calcio (Wolfson et al., 1985) (Mandell et al., 2010).

3.5 FARMACOCINÉTICA Y FARMACODINÁMICA

La forma tradicional de uso de los antibióticos ha cambiado al tener en cuenta los aspectos farmacodinámicos del medicamento y la familia donde más se ha notado esta influencia ha sido la de las quinolonas, por ser la más estudiada (Barberán 2005). El conocimiento de los parámetros farmacodinámicos (PD) y farmacocinéticos (PK) de un antimicrobiano es imprescindible para optimizar la posología y duración del tratamiento. Se conseguirán así mayores tasas de curación y se minimizará, además, la aparición de resistencias. Son las complejas relaciones entre huésped, microorganismo y antibiótico lo que tratan de poner en claro estos valores e índices. La farmacocinética estudia la relación que existe entre la dosis administrada de un fármaco y su concentración plasmática, e implica el estudio de la absorción, distribución y biotransformación de dicho fármaco. En este parámetro influyen el peso, la edad, algunas enfermedades y ciertas peculiaridades genéticas del paciente. La farmacodinámica es la relación existente entre

la concentración del medicamento y el efecto que ocasiona en el organismo (Schmidt et al., 2008) (Adembri et al., 2009).

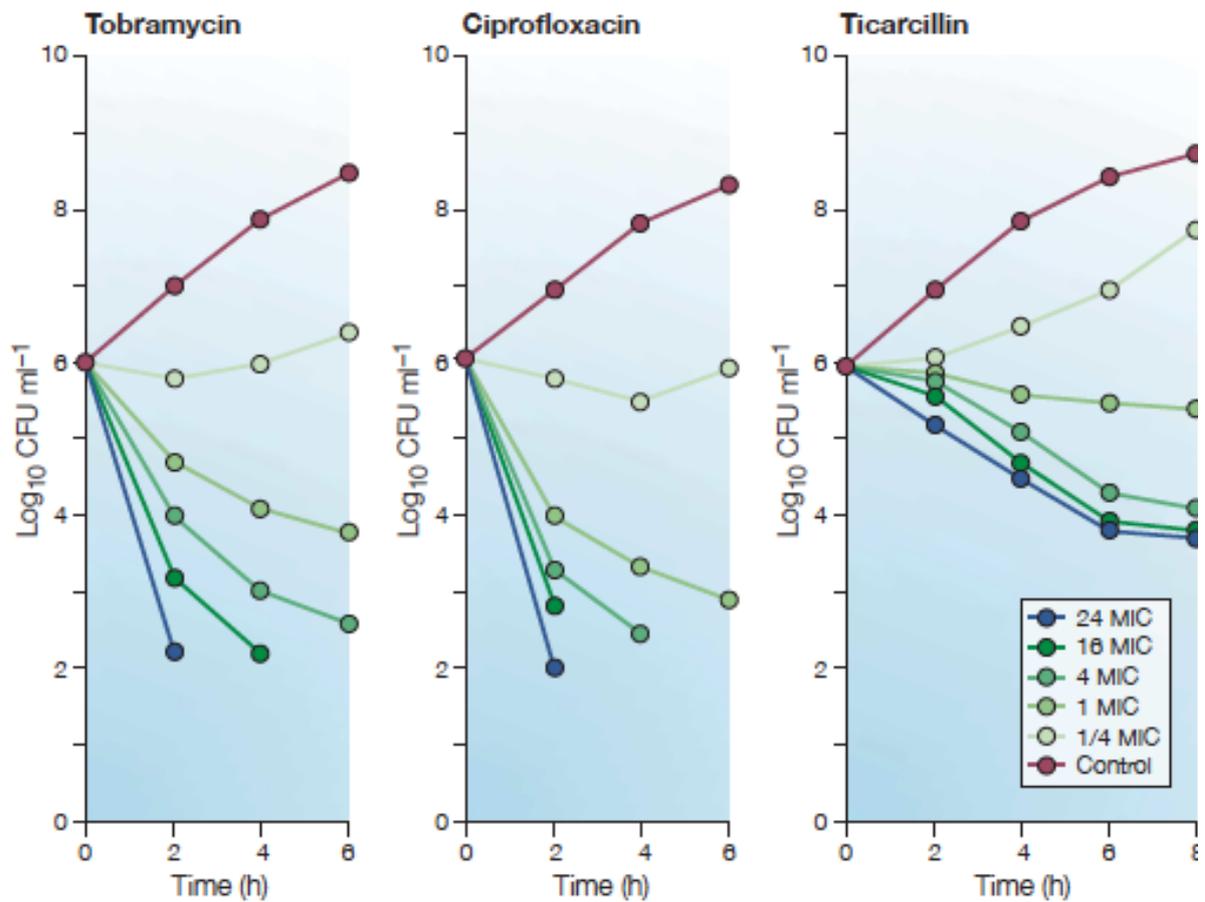
Los estudios realizados sobre la absorción y distribución de los medicamentos en el organismo se han llevado a cabo mayoritariamente con voluntarios sanos, pero los valores farmacocinéticos pueden variar notablemente en sujetos obesos, enfermos críticos (en los que aumenta el fluido corporal tras la resucitación, hay hipoalbuminemia, interacción con otros fármacos, disfunción de múltiples órganos y aumento de la permeabilidad capilar), enfermos renales, hepáticos, inmunodeprimidos, etc. (Adembri et al., 2009).

Gracias a los modelos de simulación PK/PD se han podido planificar ensayos clínicos, predecir el comportamiento de nuevos fármacos y diseñar los regímenes de dosificación óptimos, tanto de estos como de medicamentos ya utilizados en clínica. Uno de los más exitosos es el Montecarlo, un avanzado modelo estadístico que se convierte en una potente herramienta para predecir un resultado terapéutico (Schmidt et al., 2008).

En qué parámetros farmacodinámicos deben basarse estos modelos matemáticos es motivo de controversia. La concentración inhibitoria mínima (CIM) ha sido un valor ampliamente utilizado, pero este umbral estático refleja pobremente las condiciones alcanzadas *in vivo*. Ignora, por ejemplo, la distribución tisular y la unión a proteínas. Un modelo dinámico basado en las curvas de letalidad (kill curves) (Figura 12) es propuesto como una aproximación más racional a los

acontecimientos que tienen lugar en el cuerpo humano cuando actúa el antibiótico (Mueller et al., 2004) (Schmidt et al., 2008).

Figura 12.
Curvas de letalidad (kill curves) comparando la acción de tobramicina, ciprofloxacino y ticarcilina.
Tomada de www.nature.org



3.5.1 FARMACOCINÉTICA

Las fluorquinolonas son absorbidas rápidamente cuando se administran por vía oral en voluntarios sanos, aunque de manera variable según la molécula considerada; la concentración máxima en suero (C_{max}) se alcanza, por término medio, a las dos horas (Hooper et al., 1985). Ni la comida ni la aclorhidia afectan significativamente a su absorción, aunque en algunos casos pueden retrasar el alcance de la C_{max} , que sería parcialmente el reflejo de las diferencias en la absorción intestinal (Hooper et al., 1985) (Mandell et al., 2010).

La biodisponibilidad es alta para muchos de estos fármacos y en conjunto es superior al 50%. Su unión a las proteínas plasmáticas es pobre en general y se unen sobre todo a albúmina. Su difusión tisular es buena, siendo el volumen de distribución elevado, en la mayor parte de los casos superior al volumen total de agua del cuerpo (Tabla 3). La concentración intracelular alcanzada es alta, superior a la sérica para la mayoría de ellos, por lo que pueden ser útiles frente a patógenos intracelulares. La concentración de quinolonas en saliva, LCR, fluido prostático y hueso es generalmente inferior a la alcanzada en suero (García Rodríguez et al., 2006) (Mandell et al., 2010).

Tabla 3.

Algunos parámetros farmacocinéticos de las fluorquinolonas más usadas en España. Modificada de Alós 2009.

*Porcentaje de la dosis acumulada en orina a las 24 horas

C_{max} :concentración máxima en suero. t_{1/2} :semivida plasmática. F: biodisponibilidad. Vd: volumen de distribución. Porcentaje de la dosis acumulado en orina a las 24 horas

	Dosis oral mg	C _{max} mg/l	t _{1/2} h (%)	F (l/kg)	Vd (%)	Excreción renal %*
Norfloxacin	400	1,6	3-4	40-60	0,6	30-50
Ciprofloxacino	500	2,5	4	70-75	2,0-3,0	60-70
Levofloxacino	500	5,0	7,0	>95	1,4	80
Moxifloxacino	400	3,5	12,0	90	3,0	40

La concentración registrada en orina y riñón (recordemos que el primer uso de estos antibióticos fue frente a infecciones urinarias) varía según la molécula considerada, siendo muy elevada, multiplicando por varios cientos la concentración sérica, por ejemplo en el caso de norfloxacino, ciprofloxacino y ofloxacino, cuyo metabolismo es prioritariamente renal (ofloxacino) o mixto (norfloxacino y ciprofloxacino). En cambio es muy inferior en moxifloxacino, cuya vía de eliminación principal es la biliar. Son metabolizados también mayoritariamente por vía

renal levofloxacin y gatifloxacin. Entre un 10% y un 15% del ciprofloxacino inyectado intravenosamente se excretará a través de la pared intestinal (Wolfson et al., 1989) (Alós 2009) (Mandell et al., 2010) (Tabla 3).

La vida media para su eliminación del suero varía desde tres horas para norfloxacino y ciprofloxacino a once horas para pefloxacino y doce para moxifloxacino (Wolfson et al., 1989) (Mandell et al., 2010).

3.5.2 FARMACODINÁMICA

Desde el punto de vista farmacodinámico, los antimicrobianos pueden dividirse en dos grandes grupos:

- los de actividad tiempo-dependiente, con mínimo o nulo efecto postantibiótico (PAE), como los betalactámicos
- los que tienen actividad concentración-dependiente y muestran un PAE prolongado, como las fluorquinolonas (Mueller et al., 2004)

En este último tipo de antimicrobianos, se consideran parámetros importantes para predecir el éxito clínico el cociente C_{max}/CIM (concentración dependientes) y el cociente área bajo la curva de concentración sérica/tiempo (AUC o ABC) y la CIM (AUC/CIM) (tiempo dependientes), siendo este último el que mejor describe la actividad de

las fluorquinolonas (Rybak 2006) (Alós 2009). En ellas, la concentración bactericida mínima (CBM) y la CIM suelen ser similares y existen pocas diferencias al aumentar el inóculo, salvo en el caso de *Pseudomonas* (Alós 2009).

Se consideran valores de AUC/CIM de 100-125 frente a Gram negativos y de 25-35 ante Gram positivos para que las fluorquinolonas alcancen éxito (Barberán 2005) (Schmidt et al., 2008) (Figuras 13 y 14).

El PAE en las quinolonas varía según el microorganismo considerado (Alós 2009).

Figura 13.
Área bajo la curva.

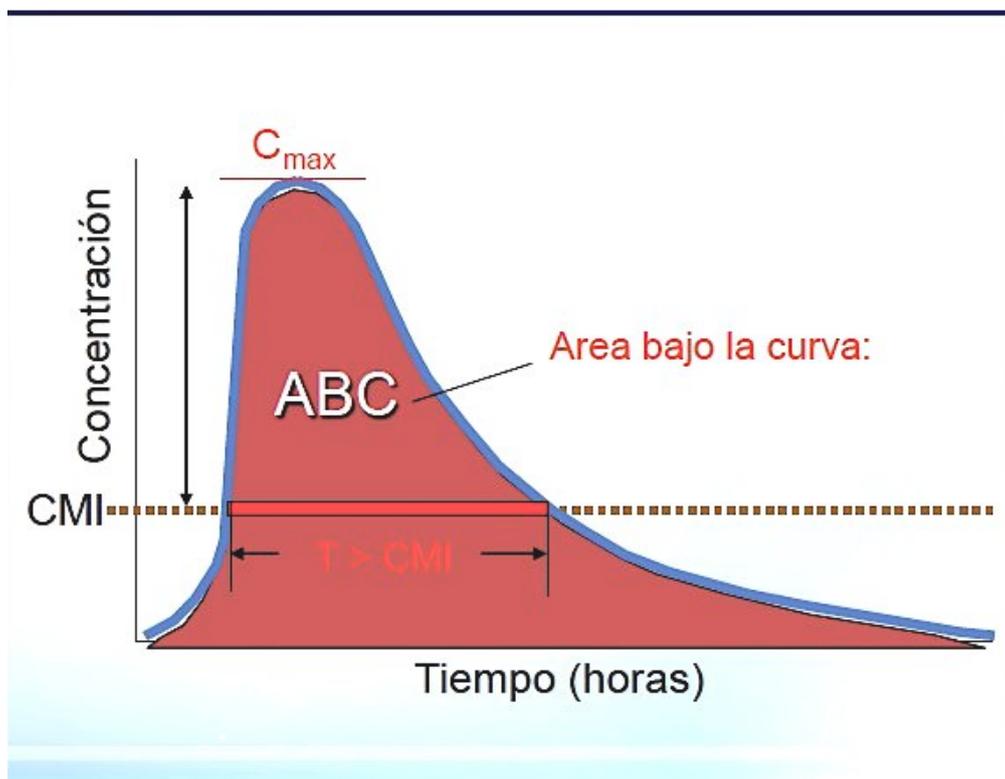
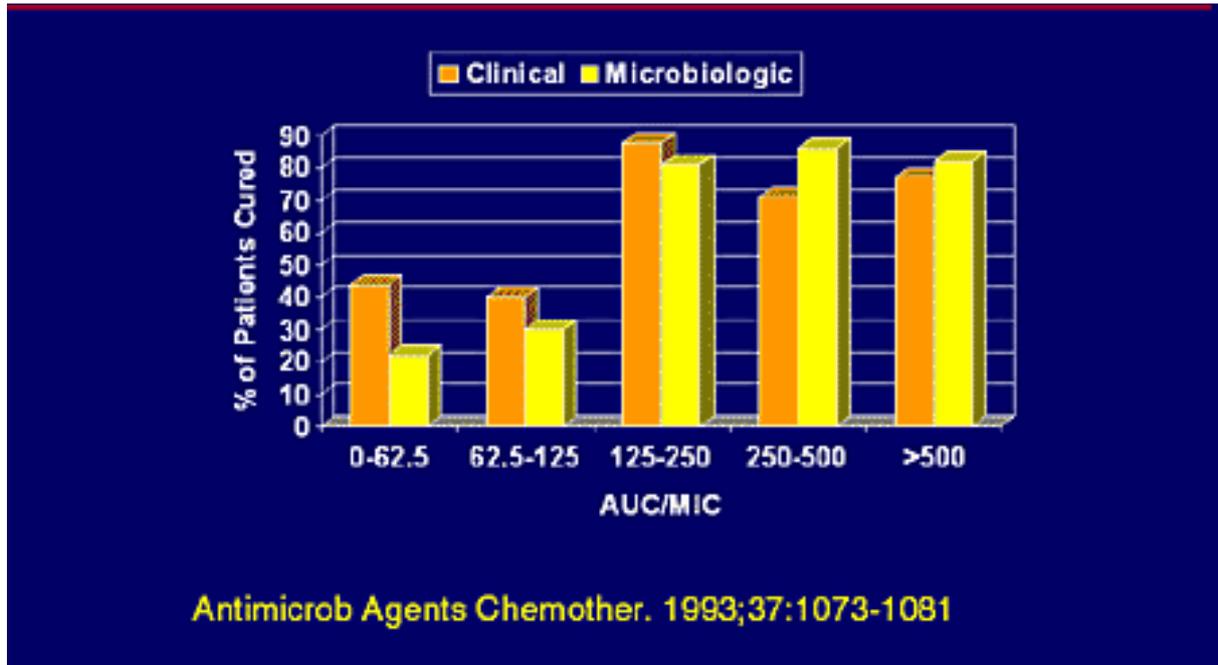


Figura 14.
Relación entre cociente AUC/CIM y resultados para ciprofloxacino.
Tomada de www.nature.org



3.6 INTERACCIONES CON OTROS FÁRMACOS

Las quinolonas forman quelatos insolubles con cationes di o trivalentes, lo cual tiene repercusiones farmacocinéticas y farmacodinámicas. Si se administran junto con productos que contengan cobre, hierro, zinc, magnesio, calcio o aluminio (de mayor a menor efecto quelante), como pueden ser antiácidos, suplementos vitamínicos o nutricionales, la biodisponibilidad disminuirá en una proporción variable,

pero que puede llegar hasta el 90%. Para evitarlo, debe separarse su ingesta al menos dos horas (Wolfson et al., 1989) (Serra 2008) (Alós 2009) (Mandell et al., 2010).

El mecanismo principal de eliminación de la teofilina y la cafeína es el citocromo P450, el cual es inhibido por algunos miembros de esta familia antibiótica; por tanto la vida media de ambos fármacos aumenta cuando se ingieren con ellos, siendo el efecto mayor o menor según qué quinolona esté implicada (Wolfson et al., 1989) (Alós 2009).

La asociación de algunas quinolonas y antiinflamatorios no esteroideos (AINES) favorece la aparición de convulsiones, ya que éstas inactivarían o competirían por su lugar de unión con los receptores GABA. Estos receptores son los más potentes neurotransmisores inhibidores en el sistema nervioso central (SNC) de los mamíferos, y su anulación implica un estado de estimulación.

Pero no todos estos antibióticos poseen este potencial y también depende de a qué AINE se asocien. Por ejemplo, se ha visto a través de modelos farmacodinámicos desarrollados en roedores que incluso AINES del mismo grupo pueden aumentar o no el efecto convulsivante de las fluorquinolonas. Así, algunos derivados del ácido propiónico como zaltoprofeno o losoprofeno tienen una acción débil en este sentido, pero otros derivados del mismo ácido, como fenbufeno, flurbiprofeno y ketoprofeno son potentes activadores de este efecto (Kim J et al., 2009).

En cuanto a las fluorquinolonas, se ha visto una relación entre ciertos grupos situados en la posición 7, como piperacina o pirrolidina y el potencial epileptógeno, siendo éste menor si en la citada posición va, por ejemplo, un grupo metilo. Ejemplos de un grupo de piperacina en posición 7 son ciprofloxacino, enoxacino, ofloxacino y norfloxacino. Encontramos un grupo metilo en moléculas como levofloxacino, gatifloxacino o esparfloxacino (estas dos últimas retiradas del mercado). Presenta también muy baja inducción convulsivante moxifloxacino, que tiene un segundo anillo fusionado a la pirrolidina en posición 7 (tabla 4). (Gutiérrez 2004)(Owens et al., 2005).

Tabla 4.
 Interacciones medicamentosas de algunas fluorquinolonas
 Tomada de García Rodríguez et al. 2006

	Ciprofloxacino	Levofloxacino	Moxifloxacino
Alimentos	Sí	No	No
Cationes Ca, Mg, Al, Zn Fe	Sí	Sí	Sí
Sucralfato	Sí	Sí	Sí
Antagonistas H ₂	Sí	No	No
Cafeína	Sí	Sí	±
Teofilina	±	Sí	±
Warfarina	±	No	No
AINE	Si	No	No
Digoxina	No	±	No
Ciclosporina	±	Sí	No
Diazepam	Sí	No	No
Rifampicina	Sí	No	No

Además, ciprofloxacino y norfloxacino, administrados con teofilina o foscarnet ven aumentado también su potencial convulsivante (Owens et al., 2005) (Serra 2008).

El efecto de la warfarina, así como la toxicidad renal de la ciclosporina se ven aumentados, si se utilizan concomitantemente con esta familia de antimicrobianos. Además, si se administran junto con insulina o antidiabéticos orales, pueden producir hipo o hiperglucemia (Alós 2009). Sin embargo, estas alteraciones del metabolismo glicídico son infrecuentes y no están totalmente explicadas (Mandell et al., 2010).

El uso prolongado de corticoides sistémicos y fluorquinolonas puede ocasionar rupturas tendinosas. (Mensa et al., 2014) La asociación con furosemida puede producir hipomagnesemia (Serra 2008).

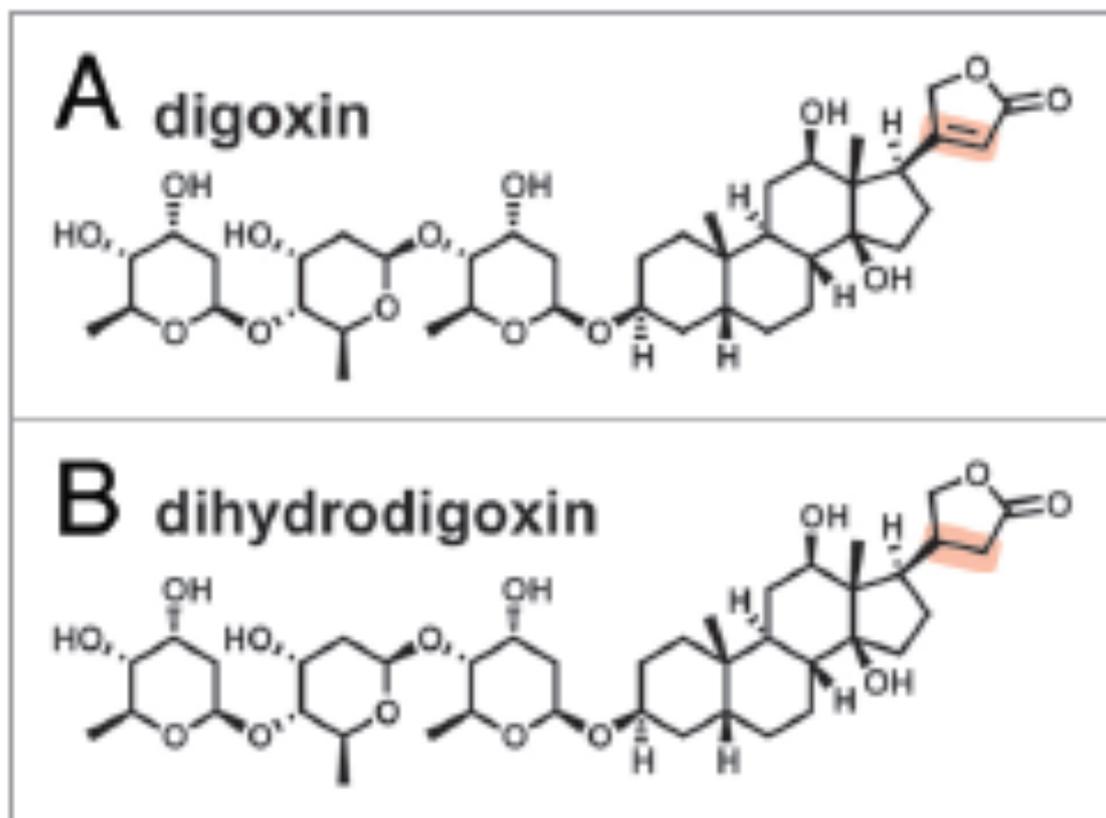
Si se administran estos antibióticos junto con probenecid, diuréticos de asa, tiazidas, betalactámicos, AINES, metotrexate o cimetidina, los niveles urinarios de aquéllos pueden disminuir, aumentando en cambio los plasmáticos (Serra 2008).

El potencial para ocasionar arritmias de las fluorquinolonas es en conjunto escaso. Varía según la molécula considerada, la dosis y la medicación concomitante. La Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) estableció tres niveles de riesgo en cuanto a su efecto inductor del alargamiento del intervalo QT. Este extremo será desarrollado con más detalle en el apartado “ 2.8 Efectos adversos”. Debe evitarse la asociación de estos antibióticos con fármacos que

prolonguen el espacio QT, como son los antidepresivos tricíclicos, antipsicóticos, macrólidos y antiarrítmicos de clase I o III (Falagas et al., 2007) (Serra 2008).

Con respecto a la digoxina es necesario referirse a la acción que ejercen algunos antimicrobianos, como quinolonas, macrólidos, tetraciclinas, sobre la microflora intestinal, por ejemplo sobre un bacilo anaerobio Gram positivo, *Eggerthella lenta* (antiguo denominado *Eubacterium lentum*) que convierte a la digoxina en un compuesto inactivo (Figura 15). Esta bacteria está presente en un 10% de la población, incrementándose este porcentaje hasta el 30% en la población urbana. Los niveles de digoxina pueden llegar a multiplicarse por dos, al no ser inactivada, cuando *E. lenta* es suprimida (Wade et al., 1999) (Owens et al. 2005).

Figura 15.
Estructura química de digoxina y su metabolito cardio-inactivo (dihidrodigoxina).
Tomada de Haiser et al. 2014.



3.7 INDICACIONES TERAPÉUTICAS

Como se ha comentado, esta familia antibiótica es ampliamente utilizada tanto en el ámbito hospitalario como en tratamientos extrahospitalarios, debido a su espectro de acción, biodisponibilidad, eficacia, baja toxicidad y formulación oral y parenteral. Este gran uso ha condicionado que las tasas de resistencia sean enormes en algunas zonas geográficas y ha propiciado que se intente restringir su uso para prevenir la aparición de dichas resistencias, incluso aunque sean apropiadas para combatir el microorganismo en cuestión.

3.7.1 INFECCIONES DEL TRACTO URINARIO

Junto con el tratamiento de infecciones gastrointestinales, el primer uso de las quinolonas fueron las infecciones del tracto urinario (ITU) producidas por bacterias Gram negativas. Actualmente, en muchos países, entre los que se encuentra España, el aumento de resistencias no hace recomendable su uso en terapia empírica (Gupta et al., 2011).

El pH urinario y la presencia de magnesio pueden reducir la eficacia de las fluorquinolonas, pero la concentración que alcanzan muchos de estos antibióticos en orina hace que su acción terapéutica no se vea comprometida (Mandell et al. 2010).

En el tratamiento de la cistitis aguda no complicada en mujeres jóvenes, infección de gran incidencia, la Guía de la Infectious Diseases Society of America (IDSA) publicada en 2011 no recomienda su uso, no por falta de eficacia, puesto que alcanzan buenos resultados tanto clínicos como bacteriológicos, sino por otras consideraciones, prefiriendo reservar esta clase de antibióticos para los casos en los que otros agentes antibacterianos no puedan utilizarse. La principal objeción esgrimida para restringir el uso de fluorquinolonas es la inducción de resistencias en la microbiota del paciente y el segundo motivo es la estrecha relación que existe entre el uso de estos antibióticos y la prevalencia de infección por *Staphylococcus aureus* meticilin-resistente (SAMR) (Gupta et al., 2011).

En caso de optar por utilizar fluorquinolonas en este cuadro clínico, norfloxacin, ofloxacin, ciprofloxacino o levofloxacino serían los fármacos recomendados, administrados en regímenes cortos de tres días de duración (Mandell et al., 2010) (Gupta et al. 2011).

En cuanto al tratamiento de la pielonefritis aguda en este mismo colectivo de pacientes, la citada Guía IDSA del 2011 presenta a las fluorquinolonas como tratamiento de primera línea, siendo ciprofloxacino y levofloxacino por vía oral, una vez al día, en regímenes de cinco a siete días, los fármacos recomendados.

Estos antibióticos son una buena opción para el tratamiento de la prostatitis. Se concentran en tejido y fluido prostático (en este último alcanza niveles más bajos que en el parénquima) y las tasas de

erradicación son superiores a las de trimetoprim-sulfametoxazol, según algunos estudios (Mandell et al. 2010).

3.7.2 INFECCIONES DE TRANSMISIÓN SEXUAL (ITS)

Las infecciones bacterianas de transmisión sexual en sentido estricto son cinco: sífilis, gonorrea, linfogranuloma venéreo, también conocida como enfermedad de Duran-Nicolas-Favre, donovanosis también denominada granuloma inguinal o granuloma venéreo y chancroide o chancro blando. En un sentido más amplio, abarcaría a cualquier infección que se contagiara por contacto sexual. Definir “contacto sexual” incluye las numerosas variantes del erotismo, no necesariamente circunscritas al aparato genital (Fuchs et al., 2014).

Dentro del grupo de las ITS en sentido estricto, las fluorquinolonas son utilizadas en:

- **Gonorrea**

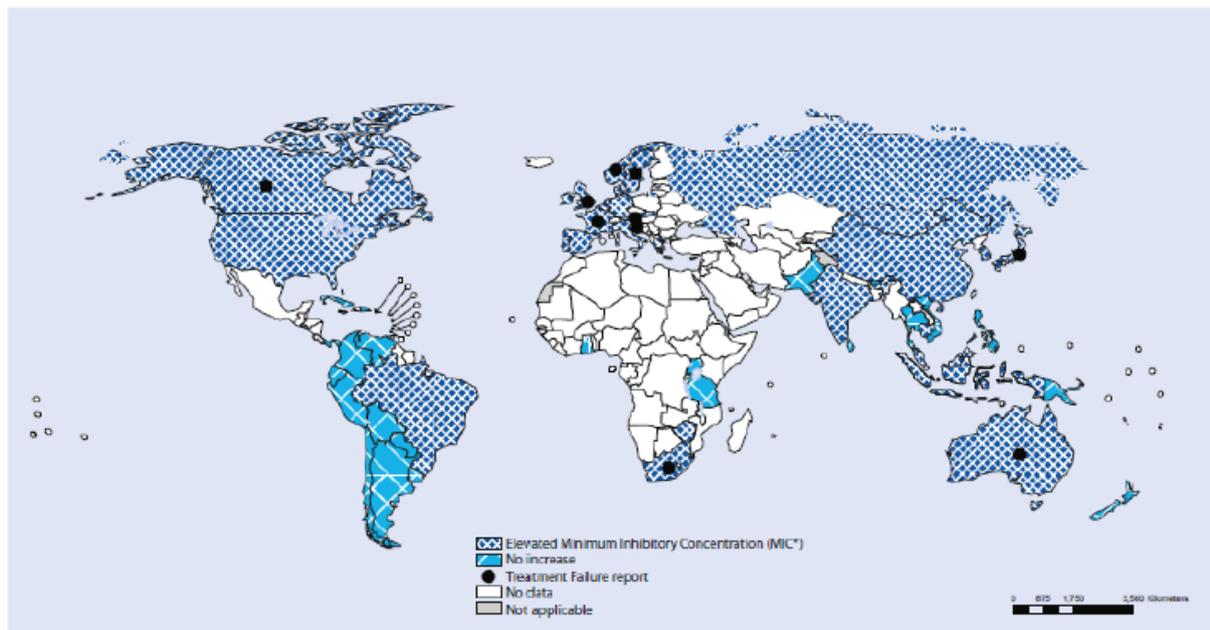
Es la segunda ITS bacteriana más frecuente, después de las causadas por *Chlamydia*, pero se considera que las cifras manejadas están por debajo de las reales en muchos países (Bignell et al., 2013). Debido al aumento de la resistencia en *Neisseria gonorrhoeae* frente a fluorquinolonas en los EE UU, los Centers for Disease Control and

Prevention (CDC) de este país eliminaron en 2007 esta opción terapéutica para el tratamiento de la gonorrea; el que hace dos años este mismo organismo excluyera también a las cefalosporinas orales, es un indicador del serio problema que supone la multirresistencia alcanzada por esta bacteria, que no se limita a EE UU, como se verá mas adelante (MMWR. CDC 2012).

Figura 16.

Detección de la creciente falta de sensibilidad a cefalosporinas de 3ª generación y fallos en el tratamiento desde 2010.

Modificada de WHO 2014



El cultivo de este microorganismo sigue siendo el método de referencia para el diagnóstico. Permite evaluar la sensibilidad de la cepa y la utilización adecuada de antibióticos. Si nos hallamos ante un caso sensible a fluorquinolonas, y la ceftriaxona no puede utilizarse, se

recomienda ciprofloxacino oral 500 mg en una sola dosis u ofloxacino oral 400mg también en dosis única. En una Guía europea del 2013 para el diagnóstico y tratamiento de la gonorrea en adultos, también se recomienda en la infección no complicada la biterapia de ceftriaxona+ azitromicina o ceftriaxona + doxiciclina, como en el documento del 2012 que actualiza la Guía del 2010 de los CDC y la razón es la misma: el alto nivel de resistencia a fluorquinolonas que *Neisseria gonorrhoeae* ha alcanzado en un breve plazo de tiempo (Figura 16) (Bignell et al., 2013).

- **Linfogranuloma venéreo (LGV)**

Es una infección endémica de zonas tropicales y subtropicales, infrecuente hasta hace poco tiempo en países industrializados, pero desde 2003 se han dado brotes en Europa, especialmente entre varones homosexuales VIH positivos. Está causada por *Chlamydia trachomatis*, serovars L1, L2 o L3. Ofloxacino o moxifloxacino se consideran como tratamiento alternativo en la Guía Nacional del 2013 del Reino Unido (White et al. 2013), mientras que la Guía de los CDC del 2010, postula a levofloxacino u ofloxacino como una de las terapias secundarias. (Workowsky et al., 2010).

En otras ITS, la más frecuente en la Unión Europea (UE), causadas por *Chlamydia* serovars D-K, cuyo clínica corresponde a uretritis, proctitis, cervicitis y faringitis, moxifloxacino se considera un tratamiento de segunda línea (Fuchs et al. 2014), siendo de nuevo

levofloxacino u ofloxacino los fármacos recomendados en la Guía CDC 2010 (Workowsky et al. 2010).

- **Chancroide**

La incidencia global de esta infección (agente etiológico *Haemophilus ducreyi*) está disminuyendo, aunque aún es endémica en el sudeste asiático y en algunos países africanos. Se considera a ciprofloxacino como segunda línea de tratamiento en algunas guías europeas (Kemp et al., 2011) (STI-Treatment Pocket Guide 2014/2015).

- **Granuloma inguinal**

El granuloma inguinal o donovanosis, causado por *Klebsiella granulomatis*, es una enfermedad moderadamente contagiosa, que causa úlceras genitales y tiende a la cronicidad. Su incidencia ha decrecido mucho en los últimos años, pero todavía existen casos nuevos en Sudáfrica, Brasil, India, Papúa Nueva Guinea, Caribe y alguno en Australia. Otra vez vuelve a considerarse a ciprofloxacino como una elección alternativa al tratamiento principal en algunas guías europeas (Tabla 5), pero no en todas, puesto que las fluorquinolonas no son mencionadas en la Guía europea para el manejo y tratamiento de la donovanosis del 2010. En cambio, la Guía de los CDC de ese mismo año, considera también a ciprofloxacino como terapia de segunda línea. (O'Farrell et al., 2010) (STI-Treatment Pocket Guide 2014/2015).

Tabla 5.
 Modificada de STI-Treatment Pocket Guide 2014/2015

ENFERMEDAD	TERAPIA ESTÁNDAR	TERAPIA ALTERNATIVA
Epididimitis	Doxiciclina 100mg PO 14d <u>Si gonorrea sospechada o probada:</u> Ceftriaxona 1,0g IV/IM más Azitromicina 1,5g PO ambas como dosis única	Si ITS es improbable (varones añosos): Ofloxacino 200mg PO 14d Ciprofloxacino 500mg PO 14 d
Chancroide/Chancro blando <i>Haemophilus ducreyi</i>	Azitromicina 1,5g PO como dosis única	Ceftriaxona 250mg IM como dosis única Ciprofloxacino 500mg PO 3d Eritromicina 500mg PO 7d
Granuloma inguinal (Donovanosis) <i>Klebsiella granulomatis</i>	Cotrimoxazol 960mg PO 21d (1Tabl =160mg TMP + 800mg SMO)	Doxiciclina 100mg PO 21d (no en embarazo) Azitromicina 1,0g/semana Ciprofloxacino 500mg PO 21d

3.7.3 INFECCIONES GASTROINTESTINALES

Estos antibióticos se han utilizado a menudo en el tratamiento de las infecciones del aparato digestivo. Su espectro de acción frente a los patógenos habituales como *Salmonella*, *Campylobacter* o *Shigella*, y su administración oral los hacía adecuados para este uso. Tras la ingesta

oral encontramos altas concentraciones del fármaco en heces en el caso de norfloxacin, ofloxacin y ciprofloxacino. Las concentraciones alcanzadas en bilis son superiores a las séricas para estas tres fluorquinolonas, sobre todo para ciprofloxacino (Wolfson et al. 1989). Este antibiótico, dispensado intravenosamente, presenta entre un 10% y un 15% de secreción transintestinal (Mandell et al., 2010). Se usan para erradicar portadores asintomáticos de *Salmonella*, en el tratamiento de la fiebre tifoidea, en algunos casos de diarrea del viajero, en el cólera, shigelosis y campilobacteriosis, pero tanto *Campylobacter* como *Vibrio spp.* han desarrollado altas tasas de resistencia (García Rodríguez et al., 2006).

3.7.4 INFECCIONES DE LAS VÍAS RESPIRATORIAS

Se han utilizado frecuentemente fluorquinolonas como terapia de infecciones de las vías respiratorias altas y bajas, pero de entre ellas algunas han demostrado mayor efectividad y mejor espectro frente a los patógenos más comunes en estas localizaciones y se han dado en denominar “quinolonas respiratorias”. Algunas son: levofloxacino, moxifloxacino, gemifloxacino (García Rodríguez et al., 2006).

En efecto, como ya mencionamos en el apartado actividad *in vitro*, muchos microorganismos son sensibles a estos antimicrobianos, incluidos los patógenos intracelulares, por lo que los agentes etiológicos

más comunes en el caso de la neumonía de adultos de origen comunitario quedarían en su mayor parte cubiertos (Tabla 6).

Tabla 6.
Agentes etiológicos más comunes de neumonía comunitaria. Modificada de Mandell et al. 2007

TIPO DE PACIENTE	ETIOLOGÍA
AMBULATORIO	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Mycoplasma pneumoniae</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Chlamydophila pneumoniae</i> Virus respiratorios
HOSPITALIZADO PLANTA	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Mycoplasma pneumoniae</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Legionella spp.</i> Aspiración Virus respiratorios
HOSPITALIZADO UCI	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Legionella spp.</i> <i>Haemophilus influenzae</i> Bacilos Gram negativos

- **NEUMONÍA ADQUIRIDA EN LA COMUNIDAD (NAC)**

La Guía publicada por la IDSA junto con la American Thoracic Society (ATS) en 2007 considera las fluorquinolonas como primera línea de tratamiento en estas neumonías, tanto en los pacientes ambulatorios con alguna comorbilidad, como en los hospitalizados, estén en UCI o no; en este último supuesto, también se administran junto a betalactámicos antipseudomónicos, para cubrir una posible implicación de *Pseudomonas* (Mandell et al., 2007).

Cuando se trata a niños mayores de tres meses, estos fármacos se recomiendan si existe alergia a betalactámicos y en el período de convalecencia, por su buena biodisponibilidad cuando se usan por vía oral. El uso de ciprofloxacino en pacientes pediátricos, desde un año de edad, fue autorizado por la Food and Drug Administration (FDA) de EE UU al no demostrarse mayor toxicidad sobre el cartílago de crecimiento que con otros antibióticos (Evans et al. 2005) (Bradley et al., 2011).

En cuanto a otras referencias, más próximas a nuestro país, una Guía europea y otra española, recomiendan levofloxacino y moxifloxacino como una de las terapias de elección, incluso en neumonías graves sin shock séptico, siendo este último el preferido. Ciprofloxacino o levofloxacino se encuentran entre los antibióticos que se añaden a betalactámicos (piperacilina/tazobactam, ceftazidima o un carbapenem) cuando *Pseudomonas* está implicada. Sin embargo se excluye a ciprofloxacino del tratamiento de la NAC, por no cubrir neumococo. En cambio las fluorquinolonas se consideran superiores a los macrólidos,

especialmente levofloxacino, en el tratamiento de la legionelosis (Menéndez et al. 2010) (Mandell et al. 2010) (Woodhead et al., 2011).

- **NEUMONÍA NOSOCOMIAL**

Se incluyen también en este apartado las neumonías asociadas a ventilación mecánica y las adquiridas en entornos relacionados con cuidados médicos. Tanto en monoterapia para los casos sin riesgo de agente etiológico multirresistente, como en terapia asociada para los que sí presentan este riesgo, las fluorquinolonas vuelven a aparecer como uno de los fármacos de tratamiento de primera línea (ATS Guidelines 2005).

- **OTRAS INFECCIONES RESPIRATORIAS**

Esta familia antimicrobiana se utiliza como uno de los tratamientos empíricos en las reagudizaciones de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y de las bronquiectasias (Mandell et al. 2010) (Woodhead et al., 2011).

En sinusitis aguda los estudios comparativos con betalactámicos o macrólidos demuestran igualdad en la respuesta clínica (Alós 2009) (Mandell et al. 2010).

Las fluorquinolonas son uno de los fármacos utilizados en el tratamiento de las otitis medias agudas. Los preparados tópicos de estos

antimicrobianos, especialmente cuando no hay integridad del tímpano, son recomendables, dado su perfil de seguridad y espectro (Rosenfeld et al., 2014).

La otitis externa maligna, causada generalmente por *Pseudomonas aeruginosa*, suele responder bien al tratamiento por vía oral con ciprofloxacino (García Rodríguez et al., 2006) (Alós 2009).

En la erradicación de portadores nasales de meningococo, ciprofloxacino se ha mostrado eficaz (Wolfson et al., 1989) (Alós 2009).

● INFECCIONES POR MICOBACTERIAS

Las fluorquinolonas se utilizan como fármacos de segunda línea en tuberculosis, para cepas multirresistentes a los antituberculosos de primera línea y en situaciones especiales, como pacientes con hepatopatía crónica (González-Martín et al., 2010).

Respecto a las micobacterias no tuberculosas, hay pocos estudios y la mayoría de actividad *in vitro*. En el caso de *Mycobacterium avium*, moxifloxacino parece más eficaz que otras quinolonas, pero su papel no ha sido definido. Se recomienda evaluar la sensibilidad a fluorquinolonas en enfermedad producida por *M. kansasii* resistente y de rutina para *M. fortuitum*, *M. abscessus* y *M. chelonae*. Son fármacos usados como alternativa en *M. malmoense*, *M. smegmatis*, *M. szulgai*, *M. xenopi*. La mayor parte de las cepas aisladas de *M. gordonae*, *M.*

genavense, *M. mucogenicum*, *M. simiae* se muestran susceptibles *in vitro* a estos antibióticos (tabla 7) (Griffith et al., 2007).

Tabla 7. Tomada de González-Martín et al. 2010

CATEGORÍA	FÁRMACO	DOSIS EN ADULTOS
Inyectables	Amicacina Capreomicina* Kanamicina	15 mg/kg/día
Fluoroquinolonas	Moxifloxacino* Levofloxacino Ofloxacino	400 mg/24h 500 mg/12h 400 mg/12h
Otros	Cicloserina PAS Protionamida*	15-20 mg/kg/día (en 2-3 dosis) 10-15 mg/kg/día (en 2 dosis) 8-12 mg/kg/día (en 2-3 dosis)
PAS: ácido paramino salicílico * Fármacos de utilización preferente en cada grupo		

3.7.5 INFECCIONES ÓSEAS Y DE PRÓTESIS ARTICULARES

Son muy efectivas en el tratamiento de la osteomielitis aguda y crónica, especialmente interesantes en esta última ya que la terapia es larga y puede efectuarse de forma ambulatoria. Se utiliza sobre todo ciprofloxacino. Son fármacos de segunda elección en el caso de que la etiología sea *Pseudomonas aeruginosa* o *Staphylococcus aureus* y hay que estar atentos a la aparición de resistencias en el curso del tratamiento, también reseñadas en el caso de *Serratia marcescens* (Alós 2009) (Mandell et al., 2010).

Se han utilizado con éxito en artritis sépticas, aunque existen aún pocos estudios que avalen su uso (Mandell et al. 2010).

En las infecciones de prótesis articulares, tras el desbridamiento y la conservación de la prótesis, son fármacos de primera o segunda elección según el microorganismo implicado (Tabla 8). Además cirpofloxacino o levofloxacino junto a rifampicina son parte de la terapia oral, que se establece tras el tratamiento por vía intravenosa, en el caso de *Staphylococcus spp.*; también cuando se extirpa la prótesis, esté después planeada o no la reimplantación (Osmon et al, 2012).

Tabla 8.
 Modificada a partir de Osmon et al., 2012

ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS EN EL TRATAMIENTO CONSERVADOR DE PRÓTESIS INFECTADAS		
AGENTE ETIOLÓGICO	TTO PRINCIPAL	ALTERNATIVA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cefepima 2 g IV/12h o Meropenem 1g IV/8 h	Ciprofloxacino 750 mg VO/12 h o Ceftazidima 2 g IV/8h
<i>Enterobacter spp.</i>	Cefepima 2 g IV/12h o Ertapenem 1 g IV/24h	Ciprofloxacino 750 mg VO o 400mg IV/12h
Enterobacteriaceas	Betalactámico IV basado en sensibilidad <i>in vitro</i> o Ciprofloxacino 750 mg VO	
Estreptococos betahemolíticos	Penicilina G 20-24 millones de U IV/24h continuamente o dividido en 6 dosis o Ceftriaxona 2g IV/24h.	Vancomicina 15mg/kg IV/12h

3.7.6 INFECCIONES DE LA PIEL Y TEJIDOS BLANDOS

Estos antibióticos no son los óptimos para el tratamiento de este tipo de infecciones, ya que como agentes etiológicos predominan los microorganismos Gram positivos, presentando muchos de ellos altas tasas de resistencia, por ejemplo cepas de SAMR; aun así han llegado a utilizarse con éxito, sobre todo en infecciones polimicrobianas. En monoterapia o asociados a otros antimicrobianos son fármacos de segunda elección en el pie diabético (García Rodríguez et al., 2006) (Alós 2009).

3.7.7 INFECCIONES INTRAABDOMINALES

Ciprofloxacino, levofloxacino y moxifloxacino en monoterapia o asociados a metronidazol son recomendados en la Guía IDSA de 2010, tanto para el tratamiento empírico de infecciones intraabdominales complicadas como de las vías biliares, pero advierte de la conveniencia de evitar esta familia antibiótica si la epidemiología local así lo aconseja y/ o evaluar la susceptibilidad individual, cuando sea posible, con el mismo propósito. En la población pediátrica ciprofloxacino más metronidazol o un aminoglucósido queda reservado para los casos de alergia a betalactámicos (tabla 9) (Solomkin et al., 2010).

Tabla 9.
 Modificada a partir de Solomkin et al. 2010

TRATAMIENTO EMPÍRICO INICIAL DE LA INFECCIÓN INTRAABDOMINAL COMPLICADA DE ORIGEN EXTRABILIAR Y COMUNITARIA			
REGIMEN	NIÑOS	ADULTOS MODERADA GRAVEDAD	ADULTOS ALTA GRAVEDAD
AGENTE ÚNICO	Ertapenem, Meropenem, Imipenem-cilastatina, Ticarcilina/clavulánico, Piperacilina/tazobactam	Cefoxitina, Ertapenem, Moxifloxacino , Tigeciclina, Ticarcilina/clavulánico	Imipenem/cilastatina, Meropenem, Doripenem y Piperacilina/Tazobactam
COMBINACIÓN	Ceftriaxona, Cefotaxima, Cefepime o Ceftazidima, Gentamicina o Tobramicina, cada uno en combinación con Metronidazol o Clindamicina y con o sin ampicilina	Cefazolina, Cefuroxima, Ceftriaxona, Cefotaxima, Ciprofloxacino o Levofloxacino cada uno en combinación con Metronidazol	Cefepime, Ceftazidima, Ciprofloxacino o Levofloxacino cada uno en combinación con Metronidazol

La fluorquinolonas se utilizaron durante años para la prevención de la peritonitis espontánea en la cirrosis hepática con buenos resultados, pero seleccionaron cepas de enterobacterias resistentes en este grupo. (García Rodríguez et al. 2006).

3.7.8 PROFILAXIS QUIRÚRGICA

El alto nivel de resistencias existentes ante estos fármacos, su fuerte relación con el incremento de SAMR y la destrucción de la microbiota que conlleva su utilización no los hacen ideales para ser usados como profilaxis. Aún así son uno de los antibióticos de primera elección en cirugía oftálmica y en ciertas intervenciones urológicas.

Se administran cuando existe alergia severa a betalactámicos en procedimientos de cirugía gastroduodenal, intestinal, colorrectal, de vías biliares, histerectomía por vía vaginal o abdominal y trasplante hepático, renal o pancreático (Bratzler et al., 2013).

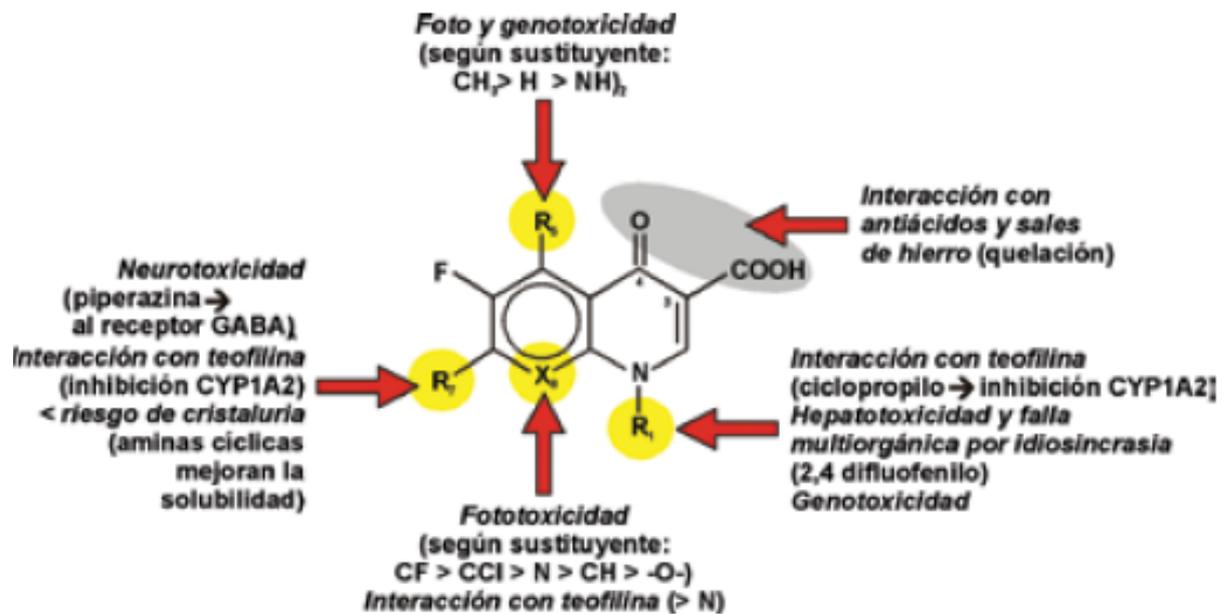
3.7.9 PACIENTES NEUTROPÉNICOS

El uso rutinario de fluorquinolonas en pacientes neutropénicos de bajo riesgo no está justificado, pero en los casos de previsible neutropenia profunda y duradera levofloxacino y ciprofloxacino han demostrado su eficacia, demostrando mayores tasas de supervivencia. Se prefiere levofloxacino si existe alta probabilidad de mucositis oral y por tanto riesgo de infección por estreptococos (Freifeld AG et al. 2010).

3.8 EFECTOS ADVERSOS

Como ya hemos señalado, esta familia antibiótica tiene un perfil de seguridad bueno, similar al de otros antibióticos, siendo menos tóxicas las moléculas más recientes. (García Rodríguez et al., 2006) (Mandell et al. 2010). Algunas se retiraron del mercado por toxicidad como grepafloxacino, esparfloxacino, gatifloxacino, temafloxacino o trovafloxacino, pero ciprofloxacino y levofloxacino llevan alrededor de veinte años utilizándose a nivel mundial (Serra 2008).

Figura 17.
Relación entre la estructura química y los efectos adversos.
Tomada de Serra 2008.



Podemos agrupar los efectos adversos que producen en dos apartados: efectos comunes o esperables y efectos idiosincrásicos o no esperados.

Algunos de los efectos indeseables pueden ser explicados por las características de la molécula, por ejemplo la fototoxicidad (Figura 17) (Owens et al., 2005) (Serra 2008).

Debido a que son fármacos que producen irritación local, no deben usarse por vía intramuscular (IM) y en su utilización intravenosa (IV), para minimizar el riesgo de flebitis, deben de perfundirse lentamente y con solución glucosada isotónica (Serra 2008).

3.8.1 EFECTOS ADVERSOS COMUNES

En general no son graves y no precisan de la suspensión del tratamiento. Afectan al tracto gastrointestinal (anorexia, náuseas, vómitos, diarrea con menor frecuencia) y al SNC en forma de mareos, cefalea, y más raramente insomnio y alteraciones del estado de ánimo ((Owens et al., 2005) (Mandell et al. 2010).

Aunque la acción nociva sobre los cartílagos de crecimiento en animales jóvenes está demostrada, cada vez hay más experiencia del uso de estos antimicrobianos en niños con fibrosis quística, con otitis

media de repetición y otros cuadro clínicos y los síntomas articulares han sido raros y reversibles (Mandell et al., 2010).

Las artropatías se manifiestan con dolor, rigidez e inflamación y se explica por el efecto quelante del fármaco con el magnesio, que puede alterar la actividad de los condrocitos (Mensa et al., 2014).

Las tendinitis y ruptura de tendones, aunque poco frecuentes, parecen ser más comunes con fluorquinolonas que con otros antibióticos, siendo bilateral en la mitad de los casos. Como ya comentamos en el apartado de interacciones medicamentosas, el uso de corticoides por vía sistémica aumenta el riesgo de que se produzcan estas lesiones. También lo hacen la edad avanzada del paciente o el que éste practique deporte (Owens et al. 2005).

3.8.2 EFECTOS ADVERSOS INFRECIENTES

Es necesario considerarlos porque pueden llegar a ser muy graves.

Las convulsiones asociadas al uso de estos antibióticos son raras y su riesgo aumenta con ciertas comorbilidades como epilepsia, trauma cerebral o anoxia (Owens et al. 2005). Ya vimos en el apartado de interacciones con otros fármacos que el uso de ciertos AINEs o de

teofilina incrementa esta posibilidad y que no todas las fluorquinolonas presentan el mismo potencial .

La posibilidad de distintas fluorquinolonas de producir alargamiento del intervalo QT ha sido clasificada por la AEMPS en tres apartados, de menor a mayor

- fluorquinolonas con riesgo potencial de inducir prolongación de QT : gemifloxacino y moxifloxacino
- fluorquinolonas con bajo riesgo de alargar QT: levofloxacino, norfloxacino y ofloxacino
- fluorquinolonas con riesgo muy bajo de producir más duración de QT: enoxacino, pefloxacino, prulifloxacino y rufloxacino

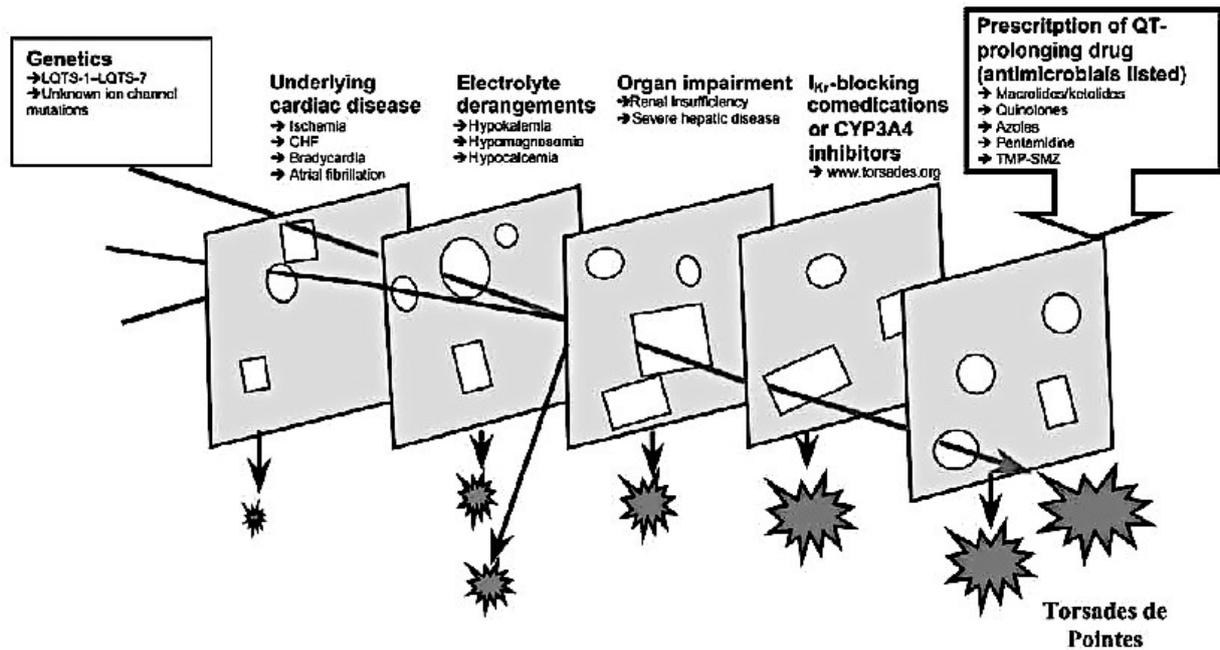
Gemifloxacino, enoxacino, prulifloxacino y rufloxacino no están autorizados en España (AEMPS 2010).

Hemos comentado que asociar estos antibióticos a ciertos medicamentos como antidepresivos o antiarrítmicos potencia la probabilidad de alteración en el intervalo QT. También lo hacen algunas alteraciones electrolíticas como hipopotasemia, hipomagnesemia o hipocalcemia (Mensa et al. 2014).

La mayor parte de los pacientes que reciben una medicación que alargue el intervalo QT no desarrollan arritmias. Parece que éstas ocurren en la denominada población susceptible. Se han identificado siete genotipos del síndrome del alargamiento de QT, referidos a mutaciones en un gen regulador del canal de potasio, *KCNE2*. En estos pacientes los antimicrobianos que deben evitarse son los macrólidos, quinolonas y azoles (Owens et al., 2005).

Pacientes con factores de riesgo para desarrollar Torsade des pointes (TdP) deben ser cuidadosamente evaluados si van a ser tratados con fluorquinolonas, especialmente moxifloxacino. Aunque la inducción de este cuadro por esta familia de antibióticos no es común, es siempre grave y potencialmente mortal (Ibrahim et al. 2001) (Falagas et al., 2007). Estos factores son varios y la suma de varios de ellos conduce a una situación de peligro (Figura 18).

Figura 18.
Factores de riesgo para presentar TdP.
Tomada de Owens et al. 2005



Reacciones de anafilaxia mediadas por IgE son menos comunes que con los betalactámicos (Mensa et al. 2014).

Los efectos cutáneos indeseables más comunes son exantema y prurito. La fotosensibilidad es aún más rara y está altamente ligada a la estructura química. Las llamadas quinolonas bihalogenadas, con un radical de cloro o de flúor en posición ocho y a la vez uno de flúor en

posición seis, han demostrado un significativo potencial fototóxico (Saravolatz et al., 2003) (Owens et al., 2005). Fleroxacino y lomefloxacino fueron retiradas del mercado por este motivo (Tabla 10) (Serra 2008).

Tabla 10.
Riesgo de fototoxicidad de mayor a menor
de distintas quinolonas.
Realizada a partir de (Saravolatz et al.,
2003) y (Owens et al. 2005).

Lomefloxacino
Fleroxacino
Clinafloxacino
Esparfloxacino
Enoxacino
Pefloxacino
Ciprofloxacino
Grepafloxacino
Gemifloxacino
Levofloxacino
Norfloxacino
Ofloxacino
Trovafoxacino
Gatifloxacino
Moxifloxacino

Es conocido que la quinina produce hipoglucemia porque bloquea los canales K^+ -ATP de las células beta del páncreas, cuya consecuencia es la liberación de insulina. Dado que la estructura química de las quinolonas está relacionada con la de la quinina se explica, al menos en parte, que estos fármacos tengan efectos estimulantes en la producción de insulina. Gatifloxacino y clinafloxacino fueron retirados por este efecto.

Los casos de hiperglucemia asociados al uso de estos antibióticos carecen de explicación (Saravolatz et al., 2003) (Owens et al. 2005) (Mensa et al., 2014).

La infección por *Clostridium difficile* constituye un proceso multifactorial en el que están implicados la exposición al microorganismo presente en el entorno, edad del paciente, enfermedad de base y exposición a un antibiótico inactivo o con baja actividad frente a esta bacteria. Las fluorquinolonas cumplen esta última premisa, especialmente con la cepa NAP1 resistente a esos antimicrobianos (Owens et al., 2005) (Mensa et al. 2014).

Se han descrito también casos de aumento reversible de las transaminasas, anemia, leucopenia, trombocitosis, eosinofilia también reversibles al suprimir la medicación, cristaluria y nefritis intersticial, eritema multiforme y síndrome hemolítico urémico. Trovafloxacino fue retirado por producir hepatopatía grave (Serra 2008) (Mensa et al. 2014).

La seguridad en el embarazo no ha sido establecida para ninguna de las quinolonas, pero estudios llevados a cabo en mujeres que

utilizaron norfloxacino o ciprofloxacino durante el primer trimestre de gestación no demostraron aumento del riesgo teratógeno. Deben evitarse durante la lactancia materna, ya que son excretadas por la leche (Mandell et al. 2010).

3.9 MECANISMOS DE RESISTENCIA

Si nos fijamos en nuestro entorno más proximo, verificamos que el fenómeno mundial de la resistencia a los antibióticos nos afecta plenamente. Comparando el perfil de sensibilidad que presentan los aislados correspondientes a muestras de orina, trabajadas durante el año 2009 en el Hospital de Salamanca, con los obtenidos diez años atrás, vemos que enterobacterias como *Escherichia coli*, el agente etiológico más común en ITUs, ha visto su sensibilidad disminuida (Tabla 11) (Viñuela et al. 2013).

Tabla 11.
 Sensibilidad de *E. coli* en muestras de orina a lo largo de diez años. Elaboración propia

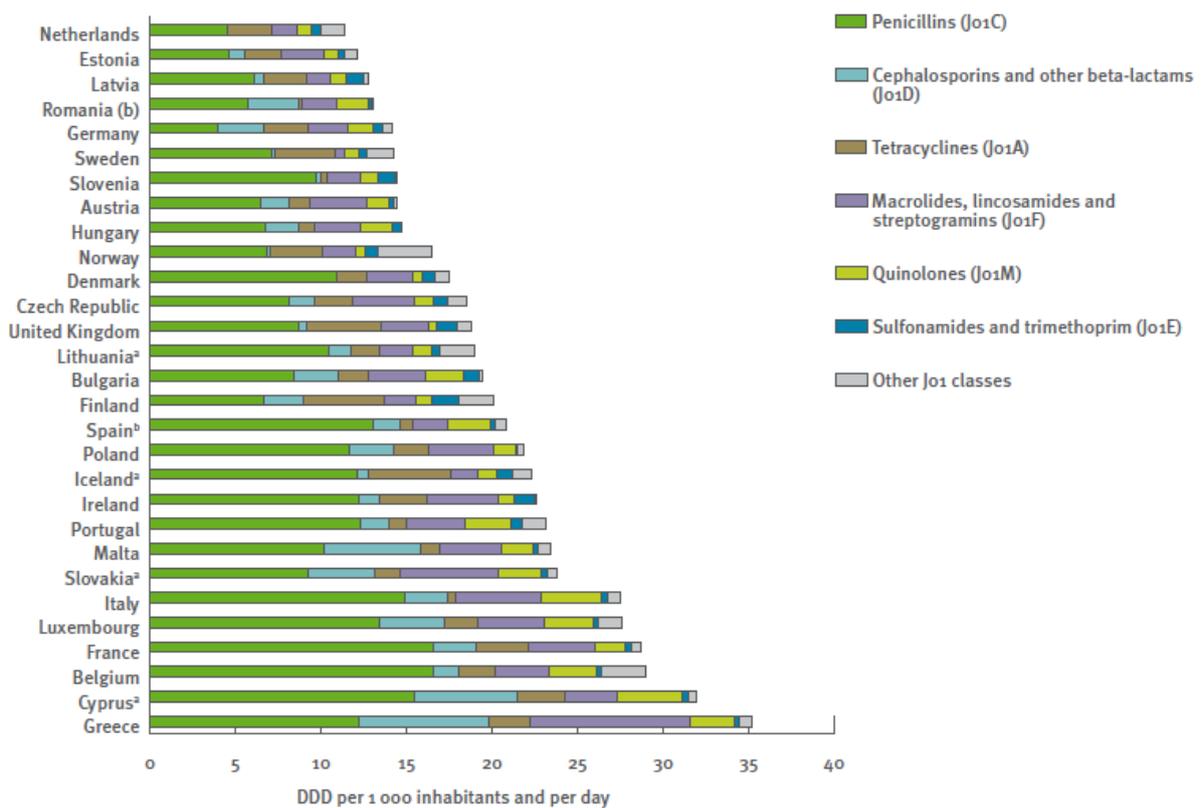
AMOX: amoxicilina
 A/C: amoxicilina ácido clavulánico
 AC NALI: ácido nalidíxico
 CIPRO: ciprofloxacino
 CTX: cefotaxima
 CXM: cefuroxima
 CAZ: ceftazidima
 FOSFO: fosfomicina
 GM: gentamicina
 n: número de aislados con *E. coli*
 p: $p < 0,05$, es significativa estadísticamente

			AMOX	A/C	AC NALI	CIPRO	CTX	CXM	CAZ	FOSFO	GM
1999	<i>E. coli</i> n 1819	SENSIBLE	800	1668	1092	1259	1783	1502	1748	1786	1670
		%	44%	92%	60%	69%	98%	83%	96%	98%	92%
2009	<i>E. coli</i> n 2937	SENSIBLE	1044	2229	1623	1951	2838	2511	2856	2827	2670
		%	36%	76%	55%	66%	97%	86%	97%	96%	91%
		p	<0,000	<0,000	<0,000	<0,003	<0,003	<0,005	<0,005	<0,0001	<0,25

La resistencia bacteriana es un proceso complejo y multifactorial y no siempre se puede establecer una relación directa entre el consumo de antibióticos y la aparición de aquélla. El uso del antimicrobiano eliminará la población bacteriana sensible, seleccionando de esta forma los microorganismos resistentes, pero otros muchos factores influirán en la implantación y expansión de esta nueva población bacteriana, por ejemplo la diseminación de clones o las características del microorganismo.

Pero aunque no podamos ignorar otros factores que condicionan el resultado final, existen evidencias que establecen la asociación entre el uso masivo de fluorquinolonas y la pérdida de sensibilidad tanto en Gram negativos como en Gram positivos. Este enorme consumo ha tenido lugar no sólo en medicina, sino también en veterinaria, en animales de granja, que pueden a su vez trasladar cepas resistentes a los humanos (figura 19) (Oteo et al. 2004).

Figura 19.
 Uso de antibióticos sistémicos en pacientes ambulatorios en la UE en 2011
 expresados en DDD por 1000 habitantes por día.
 Tomada de European Centre for Disease Prevention and Control 2013



Así pues, esta familia de antimicrobianos ha perdido en gran parte su utilidad por las altas tasas de resistencia que han surgido en diferentes microorganismos (Drlica et al., 2009). Esta resistencia ha surgido de forma independiente, no clonal, en muchas ocasiones (Rodríguez - Martínez et al. 2011).

La aparición de resistencias en fluorquinolonas puede deberse a la presencia de uno o más de los siguientes mecanismos:

- DE ORIGEN CROMOSÓMICO, que a su vez abarcan:

A) Modificaciones en las topoisomerasas

B) Disminución de la concentración del antibiótico en el interior de la bacteria, debido a alteraciones en la permeabilidad de las membranas y/o a pérdida de porinas

C) Actuación de sistemas de expulsión activa que impiden que el fármaco permanezca en el interior bacteriano.

- DE ORIGEN PLASMÍDICO, la resistencia se extiende a través de elementos genéticos móviles.

De todos estos mecanismos, los que revisten mayor importancia son las alteraciones en las dianas del antibiótico: las topoisomerasas.

Otra forma de resistencia muy común es la inactivación del antibiótico por parte de la bacteria, mediante reacciones de oxidación,esterificación ,etc. No obstante, en el caso de esta familia antibiótica, únicamente se habían descrito hongos capaces de degradar estas moléculas. Hasta que en 2006 se estableció que una variante de Aac(6') (enzima que modifica a los aminoglucósidos), la Aac(6')-Ib-cr confería resistencia de bajo nivel a quinolonas, además de inactivar a los amonoglicósidos. (Ruiz 2012). Se verá más detalladamente en el apartado de mecanismos de resistencia plasmídicos: 2.9.2.2

3.9.1 MECANISMOS DE RESISTENCIA CROMOSÓMICOS

3.9.1.1 MODIFICACIONES EN LAS TOPOISOMERASAS II Y IV

La resistencia a las quinolonas tiene lugar porque se producen mutaciones cromosómicas en los genes que codifican la girasa (*gyrA* y *gyrB*) la topoisomerasa IV (*parC* y *par E*). Habitualmente, en el caso de los Gram negativos, la primera enzima es la diana principal y en los Gram positivos, lo es la segunda (Morgan-Linnell et al. 2009) (Mandell et al. 2010) (Mensa et al. 2014). Sin embargo, en *Streptococcus pneumoniae* cualquiera de las dos topoisomerasas puede serlo, dependiendo de la quinolona implicada (Fàbrega et al., 2009).

Una sola mutación en la diana principal de una bacteria determinada puede llevar a un aumento de la CIM, pero para que alcance significación clínica suelen requerirse varias mutaciones. Esta resistencia es en general cruzada entre todos los componentes de esta familia antibiótica, aunque con diferente intensidad. Cuando las dos dianas, principal y secundaria presentan mutaciones, la resistencia suele ser mayor y su nivel es determinado por la concentración de antimicrobiano necesaria para inhibir a la enzima más sensible, que habitualmente es la que menos mutaciones acumula. (Hooper 2000) (Mandell et al. 2010) (Mensa et al. 2014).

Estas mutaciones ocurren sobre todo en una parte de los genes que codifican las topoisomerasas y que se ha denominado región determinante de la resistencia a quinolonas (QRDR, quinolone-resistance determining region). Abarca distintas posiciones según el gen y el microorganismo implicados. Así por ejemplo las alteraciones descritas en el gen *gyrA* de *E. coli* comprenden las posiciones de aminoácidos entre la 67 Ala (alanina) y la 106 Gln (glutamina). (Tabla 12) (Ruiz 2003).

Tabla 12.
 Las mutaciones de aminoácidos más frecuentes en GyrA y ParC de *E. coli*,
Salmonella spp. y *Klebsiella pneumoniae*

Microorganismo	CAMBIO DE AMINOÁCIDO			
	GyrA		ParC	
	WT	Mutante	WT	Mutante
<i>Escherichia coli</i>	Ser83	Leu/Trp/ Ala/Val	Gly 78	Asp/Lys
	Asp 87	Asn/Val/Gly/Tyr/ His	Ser 80	Leu/Ile/Arg
	Gln 106	His /Arg	Glu 84	Lys/Gly/Val
<i>Salmonella spp.</i>	Ala 67	Pro	Gly 78	Asp
	Ser-83	Phe/Tyr/Ala	Ser 80	Arg/Ile
	Asp 87	Asn/Tyr/Gly/Lys	Glu 84	Lys/Gly
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Ser 83	Phe/Tyr	Ser 80	Ile/Arg
	Asp 87	Gly/Asn/Ala	Glu 84	Gly/Lys

Las mutaciones en la QRDR producen cambios en los nucleótidos y se altera la secuencia de aminoácidos. Como consecuencia la girasa se modifica y su afinidad con las quinolonas queda muy

disminuida, por lo que que la unión del fármaco al complejo DNA-girasa no tiene lugar (García Rodríguez et al. 2006) (Alós 2009).

En estudios realizados *in vitro* y en modelos animales se ha visto que la resistencia ante estos fármacos se produce escalonadamente. Si la concentración de éstos queda por debajo de la CIM del primer mutante, aunque alcance valores superiores a la CIM establecida para inhibir cepas silvestres, estaremos ante el primer escalón de la resistencia. Superar la CIM, que permitiría la emergencia de este primer mutante es lo que se denomina concentración preventiva de mutaciones (CPM). Se ha formulado la teoría de la ventana de selección (VS), definida como el intervalo de concentraciones entre la situada por encima de la CIM y la que se encuentra por debajo de CPM. La presión selectiva no existiría en valores inferiores a los de la CIM de la cepa silvestre, porque los posibles mutantes no tendrían ventajas biológicas respecto a la población susceptible. Tampoco ocurriría por encima de CPM porque el crecimiento a esa concentración requeriría la aparición simultánea de dos o más mutaciones, lo cual es poco probable. Por tanto es en las concentraciones de la VS donde se seleccionan los mutantes resistentes (Drilica et al., 2009).

Esta teoría postula que puede aparecer resistencia aunque eliminemos a la población susceptible utilizando la CIM adecuada, debido a que las mutaciones pueden hallarse en las bacterias incluso antes de iniciar la terapia antibiótica. Evitar las resistencias implica administrar en el tratamiento concentraciones de antibiótico más altas que las de la VS, ya que se impediría el crecimiento de los mutantes (Drilica et al. 2009).

La primera mutación espontánea sucede con una frecuencia baja, aunque depende de la especie bacteriana y puede preverse que la resistencia clínica se alcanzará antes en infecciones producidas por aquellos microorganismos cuya sensibilidad a quinolonas no sea muy alta, como es el caso de *P. aeruginosa* (Alós 2009). De hecho, las primeras resistencias en clínica frente a quinolonas tuvieron lugar en bacterias con baja sensibilidad intrínseca: ciprofloxacino y *S. aureus*, o *P. aeruginosa* (Rodríguez- Martínez et al. 2011).

El fenómeno de la resistencia a quinolonas entendido como sucesivas mutaciones no explica su alta frecuencia, dada la baja frecuencia de dichas mutaciones. Se estima que la posibilidad de una doble mutación simultánea está entre 10^{-14} y 10^{-16} . Podría ser mejor comprendido si aceptamos que elementos transferibles horizontalmente ocasionan, sin ser capaces de generar resistencia clínica por si mismos, a las bacterias una reducción de sensibilidad a estos antibióticos, que les permite sobrevivir en su presencia, mientras tienen lugar las mutaciones cromosómicas (Strahilevitz 2009) (Rodríguez- Martínez et al. 2011).

Utilizar fluorquinolonas con bacterias en cuyas topoisomerasas ya existe una mutación significa correr un alto riesgo de seleccionar nuevas mutaciones, que se añadirían a la existente y se traducirían en una resistencia de alto nivel (Oteo et al. 2004). Pero estas cepas con una sola mutación pueden pasar desapercibidas y extenderse, ya que seguirían siendo clínicamente sensibles considerando su CIM y el punto de corte (Drlica et al., 2009).

La resistencia mediada por la girasa es genéticamente recesiva, mientras que la mediada por la topoisomerasa IV es dominante. Ello explicaría parcialmente que la obtención de mutantes en *Streptococcus pneumoniae* es más elevada, hasta 1000 veces, con fluorquinolonas cuya diana principal es la topoisomerasa IV, que con las que actúan en la girasa (Drlica et al., 2009).

En enterobacterias, la primera mutación tiene lugar en *gyrA*, la segunda sucede en *parC* y se asocia con un nivel de resistencia moderado. Es la tercera mutación, que sería la segunda en *gyrA*, la que condiciona un alto nivel de resistencia, que sería máximo si se añade una cuarta mutación, segunda en *parC* (Fàbrega et al., 2009).

La causa más común de resistencia a fluorquinolonas en este grupo bacteriano es la mutación de una determinada serina en la girasa, Ser83 en *E. coli*, que suele ser sustituido por leucina (Leu). La segunda mutación más frecuente en este mismo enzima está a cuatro aminoácidos de distancia aguas abajo, suele ser Asp 87. No todas las mutaciones producen el mismo efecto. Las que tienen lugar en estos codones 83 y 87 condicionan un nivel de resistencia más alto que cuando ocurren en otros codones de la QRDR. Además se ha visto que diferentes características, como el tamaño o la polaridad del nuevo aminoácido, influyen también en la CIM resultante, por ejemplo Ser 83-Leu se asocia con una CIM más alta que Ser83-Ala (alanina) (Hopkins et al., 2005).

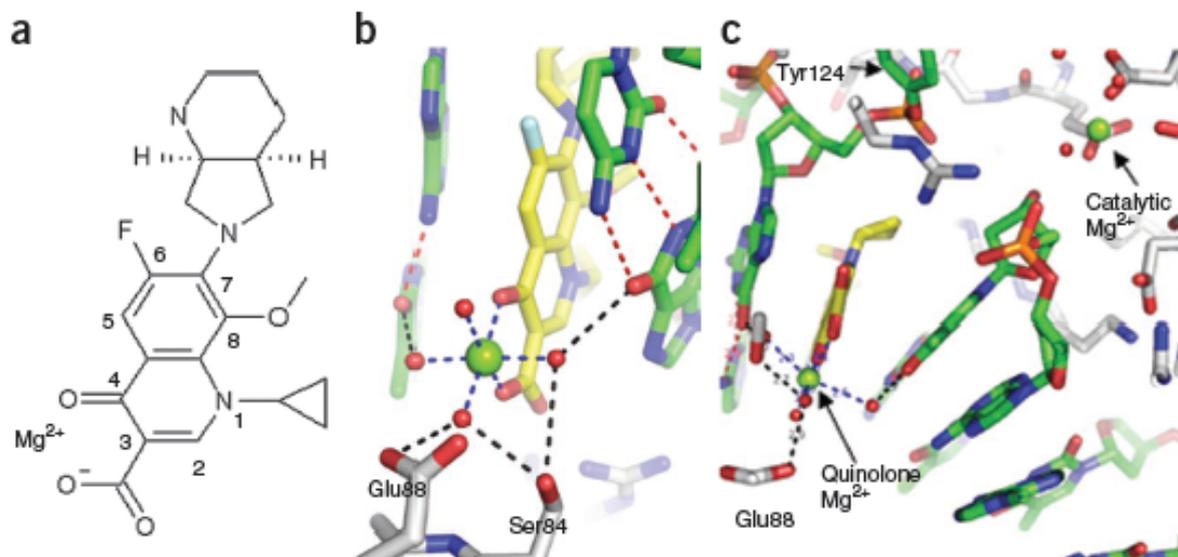
Sin embargo aunque hace más de diez años que se conoce la implicación del cambio de estos aminoácidos en la resistencia a

quinolonas, el mecanismo íntimo permanece aún inexplicado; el fármaco no establece contacto con estos aminoácidos, aunque se encuentra próximo a ellos (Aldred et al., 2013).

No obstante, recientemente se ha propuesto un modelo que explica satisfactoriamente cómo la alteración de los aminoácidos mencionados daría lugar a resistencia a estos antibióticos. Dicho modelo se ha realizado a partir de la actividad de moxifloxacino en la topoisomerasa IV de *Acinetobacter baumannii*. Moxifloxacino produce la quelación de un ión de magnesio (Mg^{2+}) no catalítico, al que se une por dos átomos de oxígeno, y que está coordinado con cuatro moléculas de agua, dos de estas moléculas establecen puentes de hidrógeno con Ser84 y con Glu 88 en ParC (equivalentes a Ser83 y Glu 87 en GyrA de *E. coli*) (Figura 20). El denominado puente ión metálico-agua se rompería parcialmente cuando sucede una mutación en Ser83 (Wohlkonig et al., 2010) (Aldred et al. 2013).

Figura 20.

- Un ión de Mg^{2+} media en la interacción de la quinolona con topoisomerasa IV.
- a) Estructura de moxifloxacino con el ión Mg^{2+}
 - b) Complejo de moxifloxacino (amarillo) con ParE28-ParC58 (gris) y DNA (verde). Mg^{2+} (esfera verde) coordinado con cuatro moléculas de agua (esferas rojas) y dos átomos de oxígeno de la quinolona
 - c) Existe una unión entre tirosina 124 (Tyr 124) y el DNA. Parece que la quinolona impide que la tirosina se aproxime al punto activo.
- Tomada de Wohlkonig et al., 2010.



3.9.1.2 ALTERACIONES EN LA MEMBRANA

Para llegar hasta las topoisomerasas II y IV presentes en el citoplasma bacteriano, las quinolonas deben atravesar la pared celular y

la membrana citoplasmática en los microorganismos Gram positivos y Gram negativos. La pared celular no parece oponer obstáculos a la difusión de moléculas tan pequeñas como las de estos antibióticos, cuyos pesos moleculares oscilan entre los 300 y 400 daltons (Hooper 1999).

La membrana externa de los Gram negativos puede ser atravesada por esta familia de antimicrobianos mediante dos caminos: a través de porinas y por difusión a través de la bicapa lipídica. El nivel de difusión dependerá del grado de hidrofobia de la molécula (Ruiz 2003).

Las alteraciones en la permeabilidad de la membrana en Gram negativos suelen ir asociadas a disminución en la expresión de porinas y se han descrito en *E. coli* y en otras bacterias Gram negativas.

Escherichia coli posee en su membrana externa tres porinas principales: OmpA, OmpC y OmpF. Cuando disminuye la expresión de OmpF, aumenta la CIM de algunas quinolonas, pero no de todas, y aumenta también la resistencia a otros antibióticos, como betalactámicos, tetraciclinas y cloranfenicol. (Ruiz 2003). Estas porinas en *Klebsiella pneumoniae* están codificadas por los genes *ompK35* y *ompK36* (Rodríguez- Martínez 2005).

La deficiencia en porinas sólo produce resistencia significativa a quinolonas cuando se asocia con otros mecanismos, bien sean bombas de expulsión o mutaciones en QRDR (Fàbrega et al. 2009). Se considera un mecanismo de resistencia poco importante como causa de resistencia individual. (Martínez- Martínez et al., 2003).

3.9.1.3 SISTEMAS DE EXPULSIÓN ACTIVA

Tabla 13.

Diversos sistemas de expulsión activa en bacterias Gram negativas y Gram positivas que originan resistencia a quinolonas.

Microorganismo	Sistema de expulsión
<i>A. baumannii</i>	AdeABC
<i>C. jejuni</i>	Cme ABC CmeDEF
<i>E. coli</i>	AcrAB AcrEF EmrAB MdfA YdhE
<i>P. aeruginosa</i>	MexAB-OprM MexCD-OprJ MexEF-OprN MexXY-OprM
<i>S. maltophilia</i>	SmeDEF SmeABC
<i>Vibrio cholerae</i>	VceAB
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	NorM
<i>B. subtilis</i>	Blt BmrA Bmr3
<i>S. aureus</i>	NorA NorB Nor C SdrM MepA
<i>S. pneumoniae</i>	PmrA PatA PatB

Muchas bacterias poseen como mecanismo de defensa bombas de transporte activo (tabla13) que expulsan compuestos tóxicos al exterior. La expresión o sobreexpresión de estos sistemas pueden conferir resistencia simultáneamente a diferentes familias de antibióticos no relacionadas entre sí y a otros compuestos (detergentes, tintes, etc). En bacterias Gram negativas estos mecanismos constan de tres componentes y en Gram positivas de uno. Por sí solos estas bombas dependientes de energía conducen a un bajo nivel de resistencia frente a quinolonas, pero contribuyen significativamente a elevar la producida por otros medios (Li 2005) (Rodríguez- Martínez 2005). Existen bombas específicas para determinadas moléculas y otras que actúan indiscriminadamente frente a diversas sustancias a la vez (Fàbrega et al. 2009). El aumento de CIM que producen en quinolonas es variable, según la que esté implicada, y por tanto también su importancia clínica (Ruiz et al., 2012).

La sobreexpresión de estos sistemas expulsivos puede ocurrir por diversos mecanismos: mutación en el gen local de represión, mutación en un gen global regulador, mutación en la región promotora del gen de una bomba expulsiva (proteína de transporte) o mutación en elementos de inserción localizados aguas arriba del gen de la bomba de flujo (Piddock 2006).

Se ha clasificado a estos mecanismos de expulsión activa en cinco superfamilias:

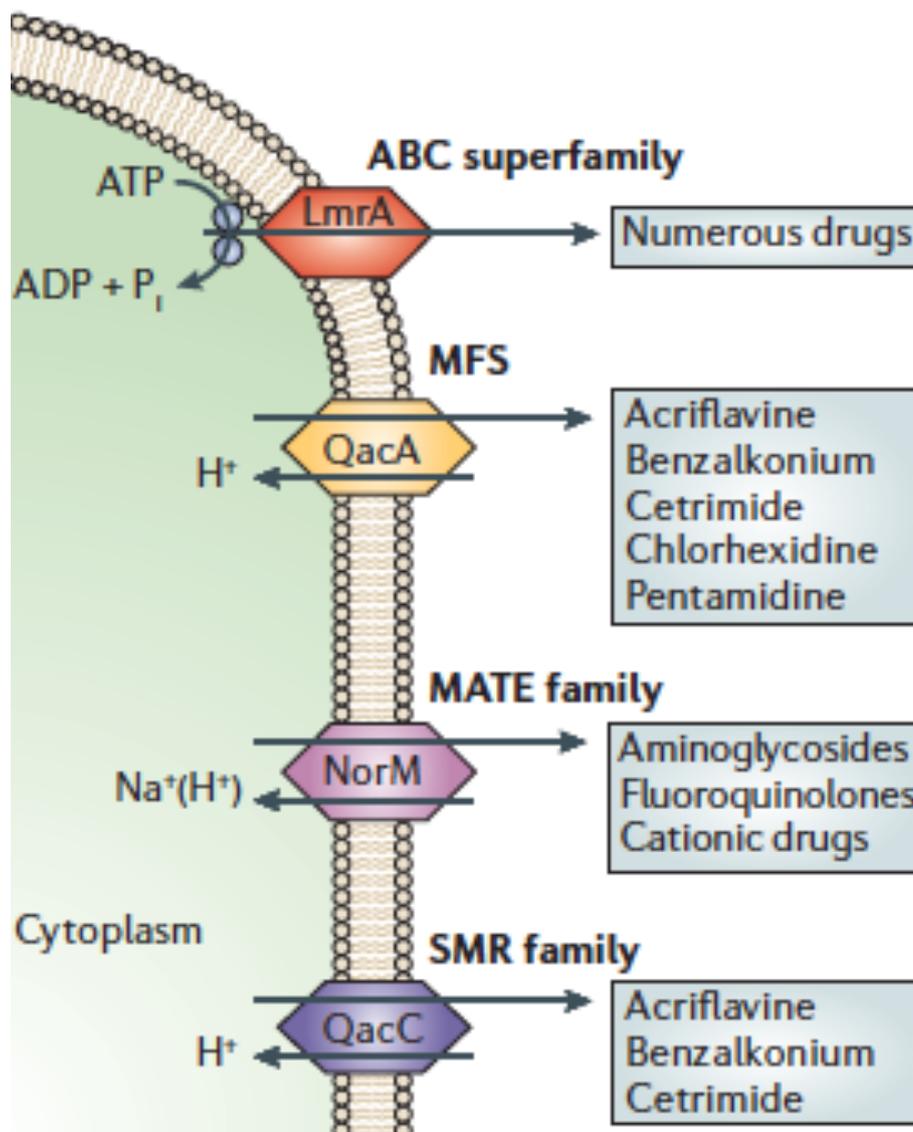
a) MFS (Major Facilitator Superfamily)

- b) el casete ABC, dependiente de ATP
- c) la familia RND (Resistance Nodulation Division)
- d) la familia SMR (Small Multidrug Resistance)
- e) la familia MATE (Multidrug and Toxic compound Extrusion)

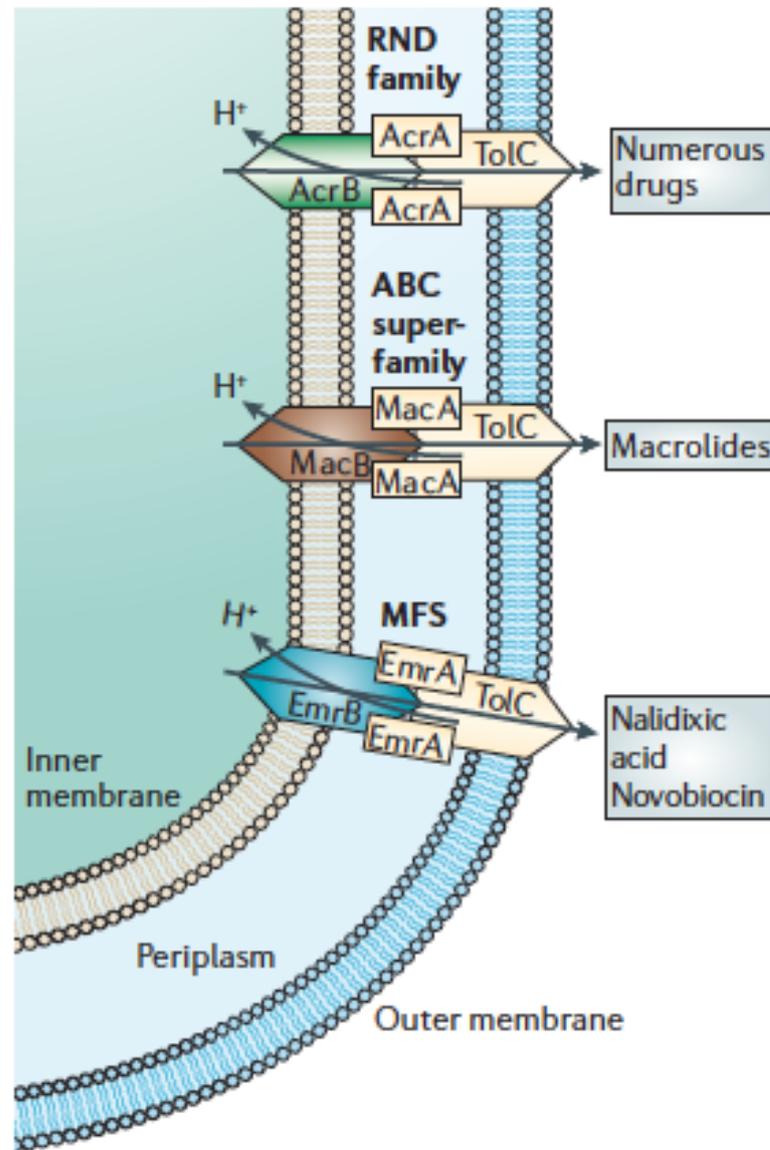
Excepto ABC, los demás sistemas utilizan como energía la fuerza motriz de protones (Figura 21) (Fàbrega et al. 2009).

En una misma bacteria pueden coexistir varias bombas expulsivas de una misma familia o de diferentes familias. Se especula con que estos sistemas podrían jugar un papel en la patogenicidad del microorganismo, extrayendo del interior celular bacteriano toxinas, adhesinas y otras proteínas fundamentales para la colonización e infección del huésped (figura 21) (Pidcock 2006).

Figura 21.
Diagrama de la estructura y la localización en la membrana de las cinco familias
de bombas expulsivas.
Tomada de Pidcock 2006.



BACTERIAS GRAM POSITIVAS



BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

En las bacterias Gram negativas, la mayoría de los sistemas expulsivos relacionados con resistencia clínica a antibióticos pertenecen a la familia RND, mientras que en Gram positivas son miembros de la familia MFS (Piddock 2006).

Únicamente la sobreexpresión de AcrAB-TolC se ha relacionado con la expulsión de quinolonas, aunque su verdadero papel en la adquisición de resistencia no está del todo claro (Swick et al., 2011). Pertenece a la superfamilia RND, descrita en bacterias Gram negativas, y sus tres componentes son:

✓ AcrA (la proteína de fusión de la membrana)

✓ AcrB (la proteína de transporte, dependiente de energía y anclada en la membrana interna)

✓ TolC (la proteína del canal externo de la membrana) (Fàbrega et al. 2009).

La inactivación de AcrAB produce sensibilidad a quinolonas en bacterias con mutaciones de resistencia en *gyrA*. (Yang et al., 2003). Se ha visto que aparece en fenotipos de bacterias multirresistentes (Swick et al. 2011).

Son cuatro los factores de transcripción que regulan los genes *acrAB*: Rob, MarA y SosX son activadores y AcrR es represor.(Fàbrega et al. 2009).

Por otra parte, se ha descrito un modelo en el que AcrAB forma parte de las señales de *quorum sensing* (Morgan -Linnell et al., 2009).

En Gram positivos una de las bombas más estudiados es NorA en *Staphylococcus aureus*, que saca del interior bacteriano las quinolonas hidrófilas, aunque no a las hidrófobas. Expulsa también otras moléculas como cloranfenicol o puromicina (Ruiz 2003). Otros sistemas expulsivos como NorB, NorC, MepR, SdrM y MepA también han sido descritos en *S. aureus* (Fàbrega et al. 2009).

Stenotrophomonas maltophilia merece una mención, puesto que en esta bacteria la resistencia quinolonas se adquiere mediante bombas de expulsión altamente eficaces y no por mutaciones en *gyrA* y/o *parC*. Se han identificado dos sistemas expulsivos en este microorganismo: SmeDEF y SmeABC, ambos miembros de la familia RND (Fàbrega et al., 2009).

Aunque se ha comprobado que ciertas sustancias, como reserpina, inhiben la acción de los sistemas expulsivos, su utilización en clínica está vedada por su toxicidad (Ruiz 2003).

El papel concreto que juegan las bombas expulsivas en la adquisición de resistencia de importancia clínica no es fácil de determinar, por varias razones:

✓ es difícil evaluar la actividad de la bomba (un reciente método facilita este proceso, mide la capacidad de retener o expulsar del interior de *S. aureus* bromuro de etidio)

✓ la respuesta bacteriana ante diversos sustratos no es una, sino que se basa en varias bombas, lo cual dificulta determinar la misión de cada una de ellas

✓ los sistemas moduladores de estos mecanismos son complejos, gobernados por reguladores globales y/o específicos, la interpretación de tantos datos es difícil y a menudo confusa.

✓ no hay una metodología estandarizada para abordar el estudio de estas bombas, por lo que la información se solapa y se mezcla (Costa et al. 2013).

3.9.2 MECANISMOS DE RESISTENCIA PLASMÍDICOS

Habían transcurrido tres décadas desde que comenzaron a usarse quinolonas en la práctica clínica y no se había descrito resistencia mediada por plásmidos, aunque era un mecanismo muy común en el caso de otros antimicrobianos. Se pensaba que, puesto que las

mutaciones de resistencia a quinolonas se producían en los cromosomas de la bacteria y eran hereditarias, la intervención de los plásmidos sería innecesaria para la supervivencia y diseminación de estas cepas. Otra razón aducida para la ausencia de mecanismos de transmisión horizontal era que estos antibióticos son de origen sintético, por tanto ausentes en la naturaleza y las bacterias no podrían haber desarrollado sistemas de defensa contra ellos (Courvalin 1990).

Sin embargo, en 1987 se describió resistencia a ácido nalidíxico mediada por un plásmido en *Shigella dysenteriae*, aunque el hallazgo no pudo ser confirmado (Martínez- Martínez et al. 1998).

Por primera vez se pudo demostrar la intervención de un plásmido en la adquisición de resistencia ante esta familia de antibióticos en 1998. En un aislado clínico procedente de un cultivo de orina, cuyo agente patógeno era *Klebsiella pneumoniae*, se demostró la presencia de un plásmido, el pMG252, que confería amplia resistencia a betalactámicos y también a quinolonas. Esto último fue un descubrimiento casual, tuvo lugar al estudiar las propiedades del citado plásmido, que al ser transferido producía un fenotipo de multirresistencia (a quinolonas, betalactámicos, cloranfenicol, aminoglucósidos, trimetoprim, sulfafurazol y cloruro de mercurio). La muestra clínica provenía de Birmingham, Alabama (EE UU) (Martínez- Martínez et al. 1998).

La presencia de este plásmido no ocasionaba la degradación del fármaco ni disminuía su concentración intracelular y tampoco modificaba la expresión de las porinas de la membrana, por lo que se propuso la

existencia de un nuevo mecanismo de resistencia (Martínez- Martínez et al., 1998) (Tran et al., 2002) (Rodríguez- Martínez 2005). La reducción de sensibilidad conferida por pMG252 es baja, pero amplifica el efecto de otros mecanismos de resistencia (Tran et al. 2002) (Martínez- Martínez et al. 2003). El bajo nivel de resistencia facilita la selección de mutantes con mayor nivel en presencia de concentraciones terapéuticas de antibiótico (Strahilevitz et al., 2009). Así se vio que la frecuencia de mutaciones espontáneas a ciprofloxacino y ácido nalidíxico era cien veces mayor en cepas de *E. coli* que albergaban el plásmido que en las que no lo tenían. Sin embargo pMG252 no tiene un efecto mutagénico generalizado y otras mutaciones cromosómicas ocurren con la frecuencia esperada. (Martínez- Martínez et al., 1998). Estos hallazgos han sido confirmados en trabajos posteriores (Rodríguez- Martínez et al., 2011).

No obstante, otros estudios concluyen que raramente ciprofloxacino y moxifloxacino seleccionan mutantes en las topoisomerasas de las cepas que albergan un plásmido con genes *qnr* y se propone que es porque dichos genes protegen a la QRDR (Cesaro et al., 2008) (Yang et al., 2014).

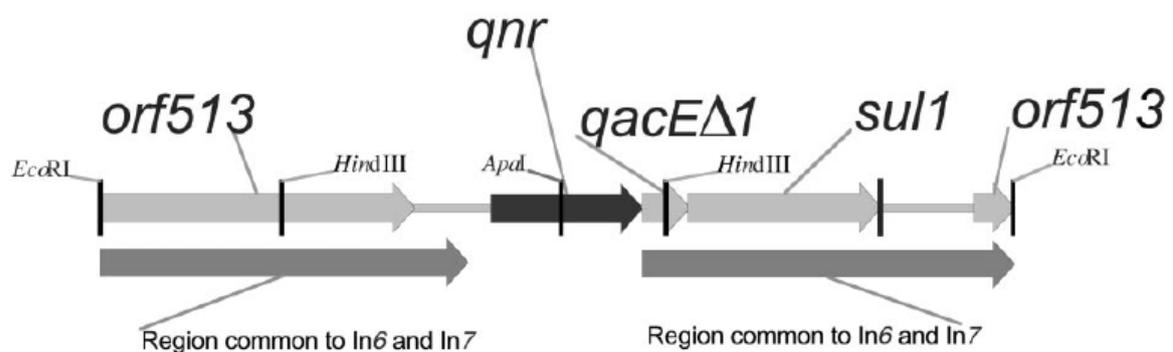
La resistencia mediada por plásmidos (PMQR) suele albergar multirresistencia a diversas familias antibióticas, por lo que puede seleccionarse resistencia a quinolonas por el uso de otros antimicrobianos y viceversa. Además, una población bacteriana puede, teóricamente, perder su susceptibilidad frente a un antibiótico mucho más rápidamente que a través de las mutaciones espontáneas, ya que la transmisión horizontal sucede con mayor facilidad. (Drlica et al., 2009).

El análisis de la secuencia de nucleótidos de pMG252 mostró que el gen responsable de la resistencia a quinolonas, denominado *qnr* (quinolone resistance), codifica una proteína de 218 aminoácidos. La proteína Qnr es miembro de la familia de los pentapéptidos repetidos. Recientemente se la ha llamado QnrA1 (figura 22) (Strahilevitz et al., 2009) (Rodríguez- Martínez et al., 2011).

Figura 22.

Fragmento de pMG252 que codifica resistencia a quinolonas. El gen *qnr* está situado inmediatamente aguas arriba de *qacE Δ* , que codifica resistencia frente a compuestos de amonio cuaternario y un gen que no se expresa *sul1*, que codifica resistencia a sulfonamidas. Dos copias de *orf513* encontradas en integrones In6 y In7 rodean a estos genes.

Tomada de Tran et al., 2002.



Estudios realizados *in vitro* demostraron que esta proteína protege a la girasa de *E. coli* de la acción de ciprofloxacino. (Li 2005). Posteriormente se constató que también lo hacía con topoisomerasa IV. (Tran et al., 2005b). QnrA une a la girasa y a sus dos subunidades A y B y para ello no se requiere que se haya constituido el complejo ternario enzima-DNA-quinolona; parece que la unión girasa-qnr ocurre antes de la formación de estos complejos. La interacción de Qnr con cualquiera de las dos topoisomerasas no depende de la presencia de DNA, quinolona o ATP. Por otra parte, se ha visto disminución de las uniones girasa-DNA cuando QnrA está presente. Al ofrecerse menos dianas girasa-DNA se entorpecería la acción de la quinolona. Sin embargo la naturaleza íntima del efecto de Qnr en la girasa se desconoce (Tran et al., 2005a) (Tran et al., 2005b).

Más recientemente se ha sugerido otro modelo alternativo de acción, esta vez basándose en QnrB1, cuya estructura también ha sido propuesta. En este modelo QnrB1 actuaría desestabilizando a la quinolona, que a su vez estaría bloqueando el complejo fármaco-girasa-DNA. Los autores de este nuevo modelo vieron que QnrB1 no protege a la girasa de la acción de la novobiocina, por lo que estiman que no puede postularse la unión de QnrB1 y la girasa (Vetting et al. 2011)

En los años 2005 y 2006 fueron descritos los genes *qnrB* y *qnrS*, respectivamente. En el año 2009 se publicaron los descubrimientos de los genes *qnrD* y *qnrC*. Posteriormente fue *qnrVC*. Los genes *qnr* suelen estar asociados a elementos móviles, están distribuidos ampliamente por todo el mundo y habitualmente presentan un alto grado de diversidad. La

resistencia que los *qnr* otorgan frente a quinolonas es siempre de bajo nivel (Wang et al., 2009) (Rodríguez- Martínez et al. 2011).

Otros dos mecanismos de resistencia a quinolonas conferida por plásmidos han sido descubiertos:

- la modificación del antibiótico que contenga un grupo piperacínico por una acetiltransferasa, la Aac(6')-Ib-cr. Las quinolonas sin este grupo no son afectadas. Esta enzima ha sido descrita por todo el mundo en plásmidos y también codificada en cromosomas (Ruiz et al., 2012).

- las bombas expulsivas.

La detección fenotípica de estas cepas es casi imposible, por lo que su prevalencia real es desconocida (Rodríguez- Martínez et al. 2011).

La importancia clínica de la resistencia mediada por plásmidos ha intentado evaluarse en distintos estudios. Un modelo experimental de neumonía en ratones utilizó en uno de los trabajos cepas de *K. pneumoniae* que albergaban QnrA1, en otro ensayo se usaron *E. coli* portadores de QnrA1, QnrB1 o QnrS1. La eficacia terapéutica de ciprofloxacino o levofloxacino era menor, manifestándose en porcentajes de mortalidad, en el grupo infectado con cepas portadoras de genes *qnr*, respecto al grupo al que se inocularon bacterias que carecían de plásmidos (Rodríguez- Martínez et al. 2008) (Dominguez- Herrera J, et al. 2013). La explicación nos remite a los parámetros PK/PD, ya que en el

cociente AUC/CIM, un aumento leve en CIM tiene como consecuencia un descenso del cociente. Recordemos que este parámetro, AUC/CIM, es el que mejor predice el comportamiento clínico de las fluorquinolonas, su disminución por debajo de 100, significa falta de eficacia de estos antibióticos frente a bacterias Gram negativas (Rodríguez- Martínez et al. 2011).

3.9.2.1 GENES *qnr*

Buscando el origen de estos genes, se estudió el genoma de múltiples bacterias y se encontraron en los cromosomas de bacterias Gram positivas y Gram negativas genes que codifican pentapéptidos repetidos similares a los albergados en los plásmidos que codifican resistencia a quinolonas. Dado el enorme número de variantes de *qnr*, su amplia distribución geográfica y en diferentes especies bacterianas, parece probable que existiesen mucho tiempo antes de su descubrimiento en 1998. (Strahilevitz et al., 2009).

Las investigaciones concluyeron que se originaron en bacterias cuyo hábitat es el agua, salada o dulce. Así por ejemplo, buscando el origen de *qnrA*, se secuenció el genoma de 48 bacterias Gram negativas, presentes en humanos, ganado y medio ambiente. Se encontraron genes muy similares al primer *qnr* (actualmente denominado *qnrA1*) que portaba el plásmido pMG252. En *Shewanella algae* cuatro: *qnrA3*, *qnrA4*, *qnrA5* y

qnrA7. En *Shewanella putrefaciens* fue localizado *qnrA2*. Ambas bacterias se encuentran tanto en agua salada como dulce. La función primitiva de *qnr* se desconoce, pero se especula con la posibilidad de que fuesen defensas para proteger a las topoisomerasas de toxinas naturales (Strahilevitz et al., 2009) (Ruiz et al. 2012) (Poirel et al., 2012).

Las quinolonas son excretadas sin metabolizar por los mamíferos, son degradadas por la luz solar y por algunos hongos ambientales, pero en conjunto la mayor parte del fármaco activo permanece en el medio ambiente. La relación entre este hecho y la gran difusión de los genes *qnr* no se conoce fehacientemente, aunque es inevitable plantearla. Se especula con la posibilidad de que el uso masivo de estos antibióticos en piscifactorías haya podido contaminar la fauna y la flora acuática (Strahilevitz et al., 2009) (Rodríguez- Martínez et al 2011) (Poirel et al., 2005) (Poirel et al., 2012). Diversos entornos acuáticos serían reservorios no sólo de bacterias con genes de resistencia clínica frente a antibióticos, sino también medios de difusión y evolución de genes de resistencia de bajo nivel (Wang et al. 2009).

Para tratar de ordenar el enorme número de secuencias descritas de los genes *qnr*, muchas de ellas repetidas parcialmente, especialmente de *qnrB*, un grupo de investigadores creó en el año 2008 un sistema de nomenclatura (Jacoby et al., 2008) y una base de datos de uso libre con todos los alelos descritos, que está disponible en <http://www.lahey.org/qnrStudies/>. Los diferentes alelos están ordenados alfanuméricamente con sus números de referencia en GenBank, tanto para la base de datos

de nucleótidos como para la de proteínas. Constan también referencias bibliográficas.

Lamentablemente, en GenBank hay un gran número de secuencias parciales de *qnr* con una nomenclatura no estandarizada, que datan de fechas anteriores al consenso (Ruiz et al. 2012).

CRITERIOS PARA LA DEFINICIÓN DE *qnr*

qnr se define como un alelo natural que codifica una proteína de la familia de los pentapéptidos repetidos, la cual confiere pérdida de sensibilidad frente a ácido nalidíxico o a fluorquinolonas (Strahilevitz et al., 2009). Las cinco familias, *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, y los futuros descubrimientos (*qnrVC* hasta la fecha) deben diferir entre sí en al menos un 30% en nucleótidos o aminoácidos derivados y deben mostrar resistencia a quinolonas. Los nuevos alelos tendrán uno o más aminoácidos distintos, el que un alelo de una familia establecida produzca resistencia a quinolonas es deseable, pero no imprescindible. Se han descrito genes *qnr* tanto en cromosomas de bacterias Gram positivas, como en Gram negativas. Se propone nombrar los genes a partir del organismo hospedador, por ejemplo *Vpqr* de *Vibrio parahaemolyticus* (Jacoby et al. 2008).

PENTAPÉPTIDOS REPETIDOS

Esta familia de proteínas se halla presente en los reinos procariota y eucariota. Están compuestas o contienen dominios de grupos de cinco secuencias de aminoácidos repetidas. La secuencia consenso sería [S,T,A,V] [D,N] [L,F] [S,T,R] [G], es decir [Serina, Treonina, Alanina o Valina]. [Ácido aspártico o Asparragina] [Leucina o Fenilalanina] [Serina, Treonina o Arginina] [Glicina] (Vetting et al., 2006). En las repeticiones de pentapéptidos ninguna posición se conserva enteramente, pero tienden a presentar un número restringido de aminoácidos respecto a la secuencia tipo y se basan en ella (Strahilevitz et al., 2009).

La función bioquímica de estas proteínas es prácticamente desconocida, únicamente desvelada en pocos casos. Algunos ejemplos son:

MfpA o proteínas muy similares están presentes en el genoma de muchas micobacterias e inhiben la acción de la girasa mediante su unión a esta enzima, por lo que producen cierta resistencia a quinolonas. Pero aunque la función bioquímica esté explicada, la función fisiológica no está clara. Podría ser mantener la condensación de los cromosomas en los períodos de latencia del microorganismo.

McbG, proteína que regula la acción de microcina B17 en las bacterias que producen esta sustancia, la cual introduce brechas de doble hebra de DNA en los cromosomas. McbG evita la unión de

microcina B17 con la subunidad GyrB de girasa y también confiere resistencia a algunas quinolonas.

OxrA confiere resistencia a oxetanocina A de forma similar a la que hemos visto para microcina B17.

Hg1K fue la primera proteína de los pentapéptidos repetidos descubierta. Tiene funciones en el transporte de glicolípidos.

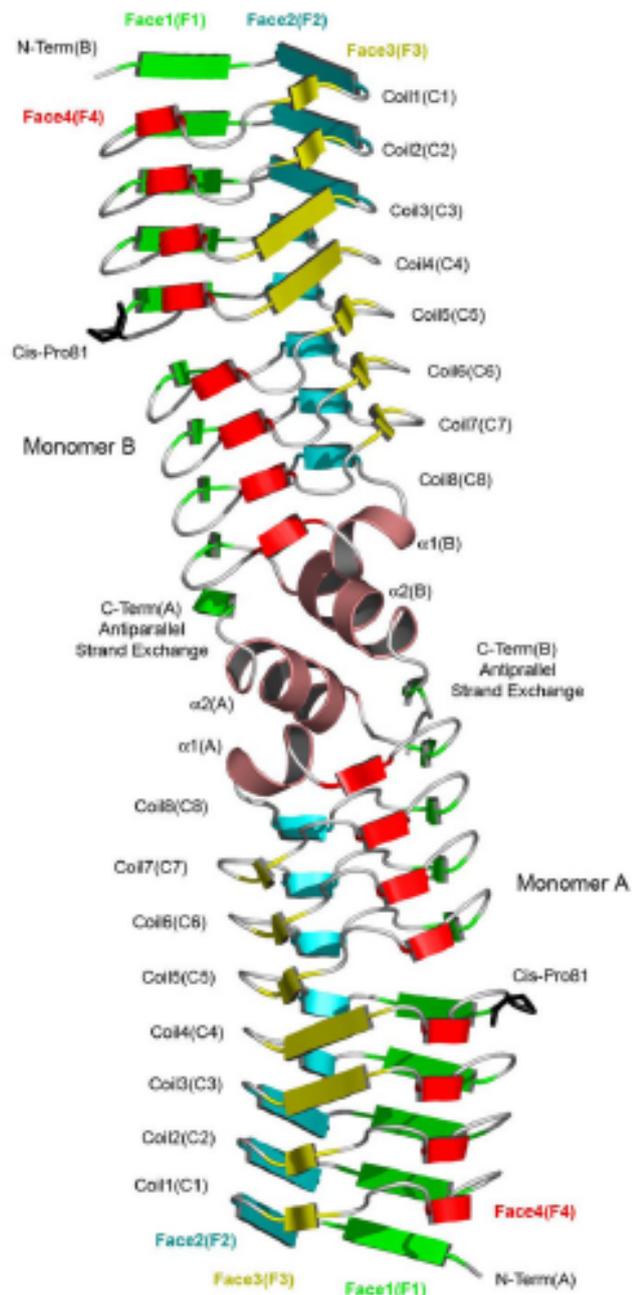
RfrA implicada en la regulación del transporte de manganeso

Protéínas con varios dominios, algunos similares a los dominios catalíticos (Vetting et al. 2006).

La primera estructura tridimensional descrita de un miembro de esta familia corresponde a la proteína que produce resistencia a quinolonas MfpA, presente en *Mycobacterium tuberculosis*. Dicha estructura revela un dímero que se dispone en forma de una beta hélice positiva en cuadrilátero. El tamaño, forma y similitud electrostática de MfpA con el DNA es notable.(Figura 23). Se cree que inhibe a la girasa compitiendo con el DNA por la unión con esta enzima, de manera que la girasa unida a MfpA no formaría parte del complejo quinolona-girasa-DNA. Como se sabe, este complejo ternario es clave para la acción de estos antibióticos (Vetting et al., 2006) (Strahilevitz 2009) (Rodríguez-Martínez et al., 2011).

Figura 23

Diagrama del dímero *MtMfpA*. Las cuatro caras del cuadrilátero están coloreadas en verde (cara 1), azul (cara 2), amarillo (cara 3) y rojo (cara 4). Tomada de Vetting et al. 2006.



Actualmente han sido descritas otras 42 estructuras tridimensionales de esta familia de proteínas, además de la de *MtMfpA*, que pueden consultarse libremente en la base de datos Pfam www.pfam.xfam.org , además de otros muchos datos sobre la familia de los pentapéptidos (número de acceso CL0505). En diciembre de 2014, en el denominado clan de los pentapéptidos se describían tres familias y 18.381 miembros, de los que la mayoría son procariotas. La secuencia tipo original es diferente, pero también repetida, en las otras dos familias de pentapéptidos.

FAMILIA Qnr

Estas proteínas se encuentran constituidas por dos dominios de pentapéptidos repetidos separados por un único aminoácido, que suele ser glicina (G) y cuya función se desconoce (Figura 24). En la proteína *MtMfpA* no existe este aminoácido, sólo aparece una curvatura en mitad de la molécula (Strahilevitz et al., 2009).

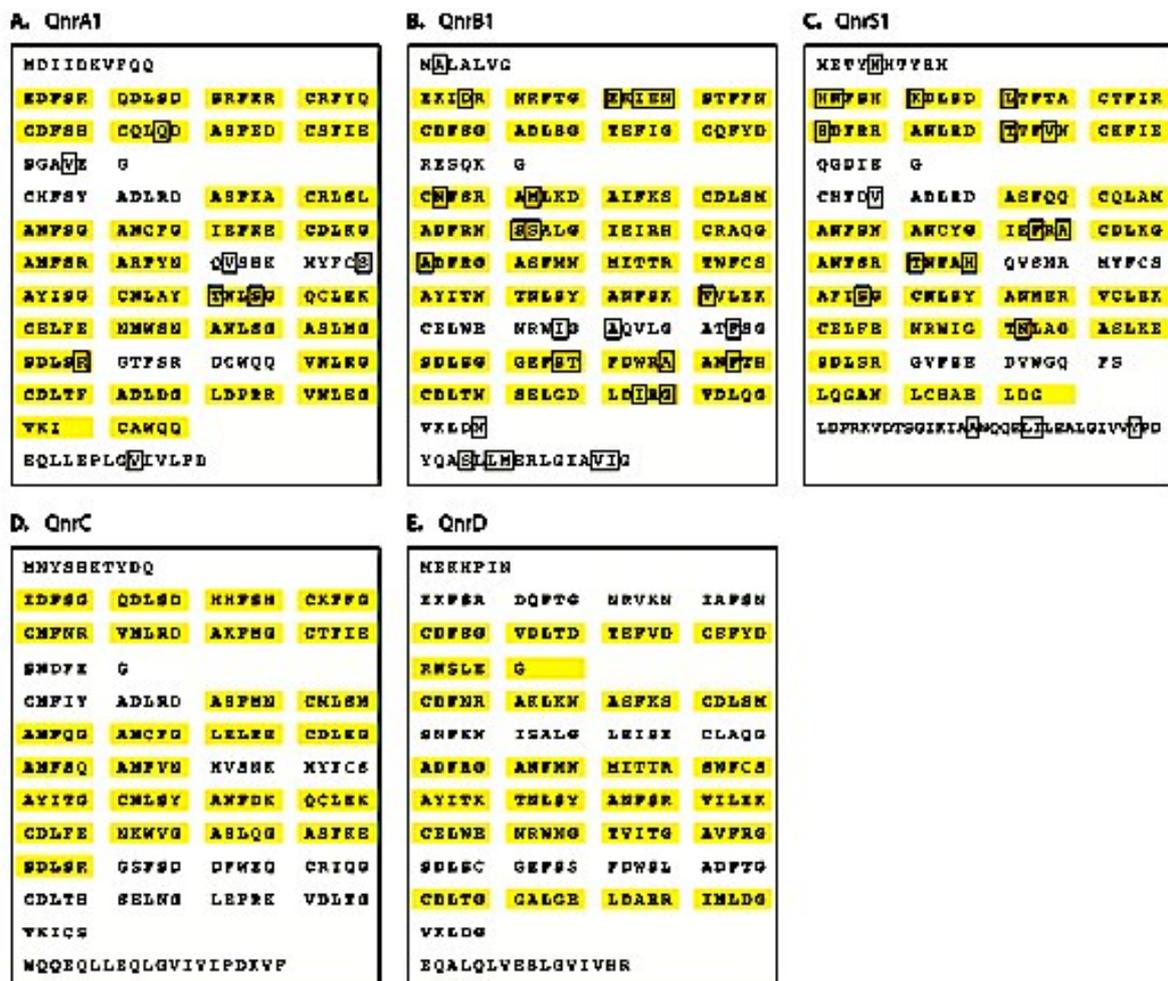
Como se ha dicho la función de estas proteínas es desconocida. Se ha formulado la hipótesis de que son protectoras de la girasa y de la topoisomerasa frente a toxinas naturales, las cuales permanecen aún en el anonimato. Los plásmidos que portan *qnrB* albergan también sitios de unión a LexA, implicados en la respuesta SOS, por lo que se ha sugerido el papel de QnrB como protector de la célula frente a agentes naturales que dañan el DNA. No obstante esto no sucede en *S. maltophilia*, que

tiene genes *qnr* y un lugar de unión para LexA (Rodríguez- Martínez et al. 2011).

Figura 24.

Secuencias de aminoácidos de diversas proteínas Qnr, en amarillo se resalta la unidad de repetición de pentapéptidos con la secuencia patrón S/T/A/V/C-D/N-L/F-S/T/R-G. Los cuadros muestran aminoácidos que cambian en algunas variantes de Qnr.

Tomada de Strahilevitz et al. 2009.



qnrA

Ya se ha dicho que fue el primer gen *qnr* descubierto, en el plásmido PMG252 de una cepa de *Klebsiella pneumoniae* multirresistente. Fue un hallazgo fortuito mientras se estudiaban genes que codificaban resistencia a betalactámicos. Se constató un aumento de la CIM a quinolonas entre 8 y 64 veces, primero en cepas que no expresaban porinas y después en cepas de *E. coli* con las porinas inalteradas, aunque sin alcanzar el punto de corte clínico. Su descubrimiento, en 1998, revolucionó el concepto de adquisición de resistencia en fluorquinolonas (Strahilevitz et al., 2009).

Los progenitores de los genes *qnrA* fueron encontrados en el cromosoma de *Shewanella algae* y otro alelo, *qnrA2*, en *Shewanella putrefaciens*. Sólo esta última especie ha sido relacionada con infecciones en humanos. *S. algae* rara vez se ha visto implicada y siempre tras exposiciones a agua marina, aunque se sospecha que ha podido haber confusión en la identificación de ambas bacterias (Poirel et al. 2005). Actualmente constan siete alelos en la base datos Lahey (www.lahey.org/qnrStudies).

Los genes *qnrA* se han encontrado en plásmidos conjugativos formando parte de integrones *sull-type* que contienen la presunta recombinasa *ISCR1*. (integrones tipo 1), pero con elementos atípicos (Wang et al. 2009) (Rodríguez- Martínez et al 2011).

qnrB

El mayor número de alelos descubiertos hasta ahora en genes *qnr* corresponde a *qnrB* (tabla 14). El primero de ellos fue encontrado por Jacoby y su grupo mientras trabajaban con cepas de *K. pneumoniae* procedentes del sur de La India con el fin de conocer las bases de su fenotipo BLEE. Su homología con *qnrA* o *qnrS* es de aproximadamente un 40% . El hallazgo fue publicado en 2006 (Jacoby et al. 2006).

Tabla 14.

Mecanismos transferibles de resistencia a quinolonas.
 Modificada de Ruiz et al. 2012 con datos de www.lahey.org/qnrStudies.

Mecanismos de resistencia mediados por plásmidos			
Mecanismo genérico	Mecanismo específico	Alelos/genes	Año de descripción
Protección diana	QnrA	7	1998
	QnrS	9	2005
	QnrB	80	2006
	QnrC	1	2009
	QnrD	2	2009
	QnrVC	7	2008
Inactivación enzimática	AAC(6')-Ib-cr		2006
Bombas de expulsión	QepA	2	2007
	OqxAB	1	203
	QacBIII	1	2010
	Otras	1	2004

Dos tercios de los alelos de *qnrB* han sido descritos en *Citrobacter* spp. y varios localizados en el cromosoma, por lo que se dedujo que esta bacteria podía ser el origen de los genes *qnrB*. Jacoby y su grupo diseñaron un estudio para confirmarlo y concluyeron que existe una alta probabilidad de que sea cierto. Aunque no todos los aislados de *Citrobacter* contienen *qnrB*, por lo que no se sabe si los que lo tienen pertenecen a un subgrupo taxonómico o si este gen proporciona ventaja en determinadas condiciones ambientales (Jacoby et al., 2011).

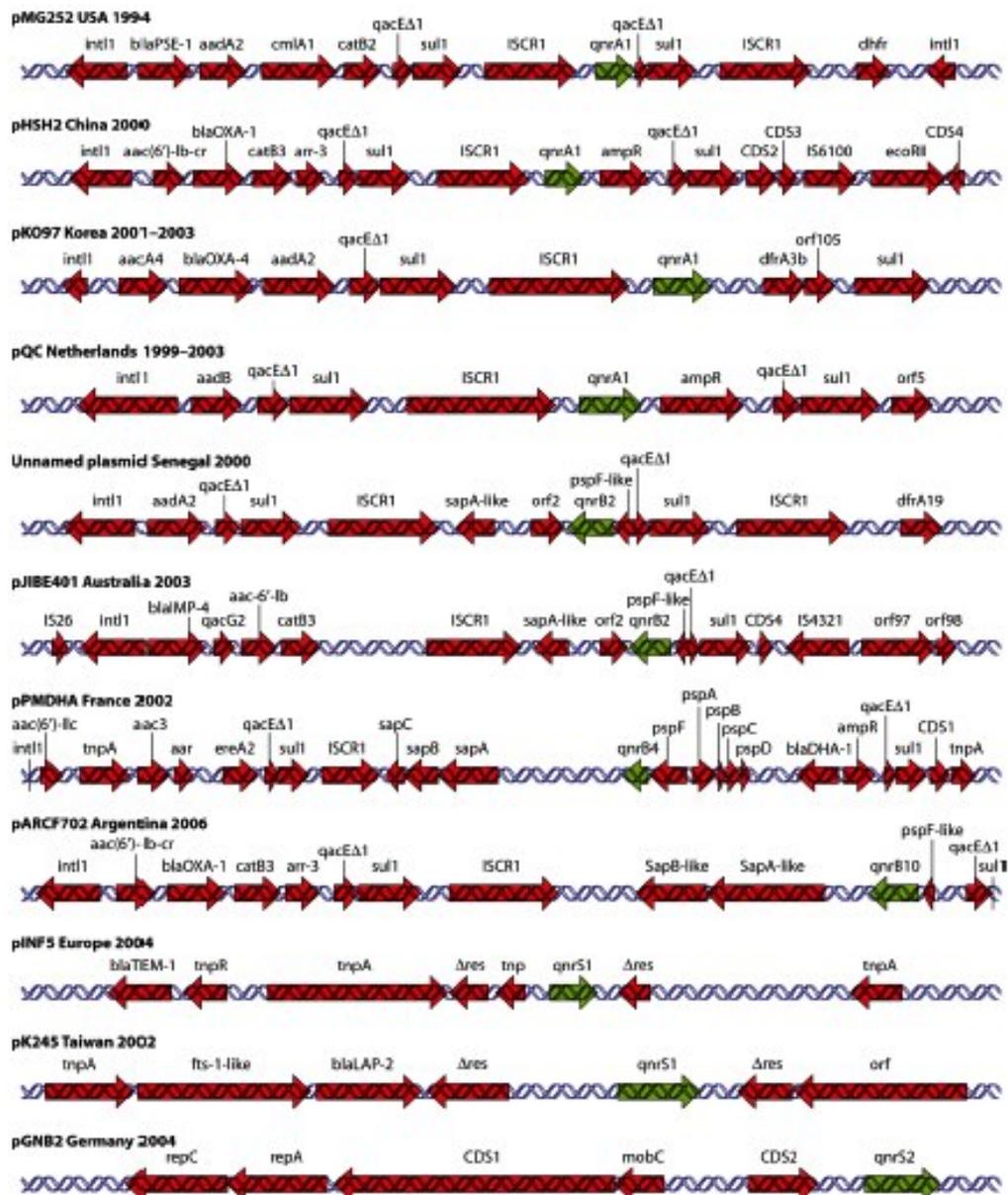
qnrS

Fue descubierto en una cepa de *Shigella flexneri*, una de las ocho que constituían el clon responsable de un brote de enterocolitis ocurrido en Japón en el año 2003. El gen estaba albergado en un plásmido conjugativo, que fue denominado pAH0376, y la proteína expresada compartía un 59% de aminoácidos con QnrA1 (Hata et al., 2005).

Diversas variantes fueron detectadas en una cepa de *Salmonella enterica* serovar Anatum en Estados Unidos, en aislados de *E. coli* de origen veterinario en China, en Alemania, etc. (Strahilevitz et al., 2009). Actualmente están descritos siete alelos de *qnrS*.

En el genoma de *Vibrio splendidus* se encontró un gen que codificaba una proteína idéntica en un 84% y un 88% a QnrS1 y QnrS2, respectivamente. Este microorganismo ha sido propuesto como posible progenitor de QnrS (Cattoir et al., 2007).

Figura 25.
Entorno genético de diversos alelos de *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*.
Tomada de Strahilevitz et al. 2009.



qnrS no se encuentra en integrones y ha sido asociado a nuevos elementos de inserción, pertenecientes a la familia IS3, como IS26, IS2, etc. A esta familia pertenece también *ISPmi1*, vinculado con *qnrC* (Wang et al 2009).

qnrC

En 2009 se publicó el hallazgo de un nuevo componente de la familia *qnrB*, alojado en el plásmido pHS10. Provenía de un aislado clínico perteneciente a un paciente ambulatorio con infección urinaria, en Shangai, China. El agente patógeno era *Proteus mirabilis*.

qnrC difiere marcadamente de otros miembros de la familia (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrD*) en cuanto a la secuencia de nucleótidos, desde un 68% en el caso de *qnrD* a un 40% en el de *qnrA*. Al igual que los otros *qnr* confiere un bajo nivel de resistencia a quinolonas. Su prevalencia es baja, siendo negativo en 2020 cepas de enterobacterias de origen clínico.

Se cree que su origen es también acuático, en la familia *Vibrionaceae* (Wang et al., 2009).

qnrD

Fue encontrado en cuatro muestras clínicas de *Salmonella enterica* procedentes de China. Mostraban sensibilidad a ácido nalidíxico y resistencia moderada a ciprofloxacino. Fueron negativas para *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6')-Ib-cr* y mutaciones en *gyrA* y *parC*. El nuevo gen presentaba entre un 61% de similitud con *qnrB1* y un 41% con *qnrS1*. Posteriores análisis filogenéticos mostraron su fuerte relación con *qnrB* (Cavaco et al., 2009)

qnrD no se halla dentro de un integrón. El plásmido es de menor tamaño que los que albergan otros genes *qnr* y no tiene otros determinantes de resistencia (Cavaco et al., 2009).

qnrVC

En 2008 se publicó el hallazgo de un nuevo *qnr* localizado en un aislamiento de *Vibrio cholerae* O1 proveniente de la región amazónica de Brasil, que fue recolectado durante una epidemia de cólera en Brasil (1991-2000). Las similitudes con otros miembros de esta familia oscilaban entre un 44% y un 69%. El resto de los genes *qnr* se asocian a integrones atípicos *sul*, pero *qnrVC* aparece alojado en forma de casete en un integrón clase 1 típico, caracterizado por la presencia de lugares *attC*. Se estima que el origen de este gen está, una vez más, en la familia *Vibrionaceae* (Fonseca et al. 2008).

Actualmente hay descritos siete alelos de *qnrVC*, pero también la nomenclatura de estos alelos ha planteado confusión y solapamiento de secuencias (figura 26) (Fonseca et al., 2011) (Pons et al., 2013).

El gen casete *qnrVC* se ha localizado no sólo en integrones clase 1, sino también en un elemento integrado conjugativo, insertado en un cromosoma de *Vibrio cholerae*. Esta gran movilidad aumenta las probabilidades de que el gen se expanda en cepas de *V. cholerae* y de otras especies bacterianas (Fonseca et al., 2011).

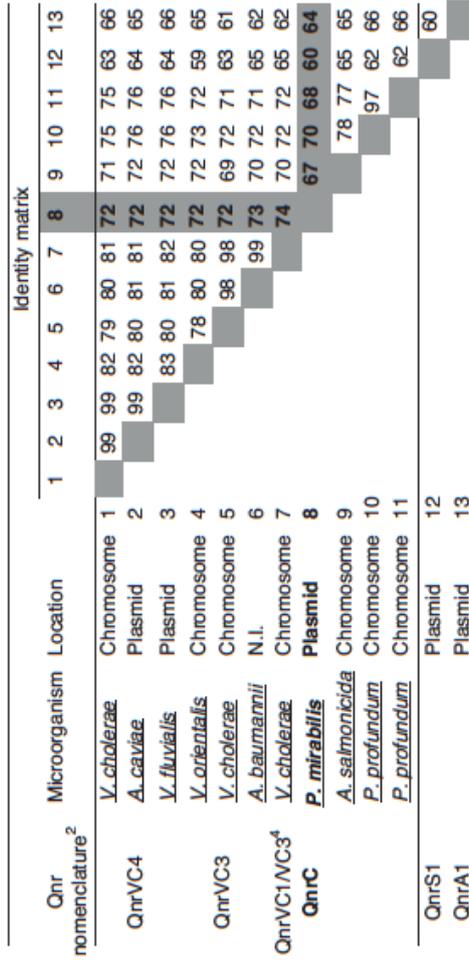


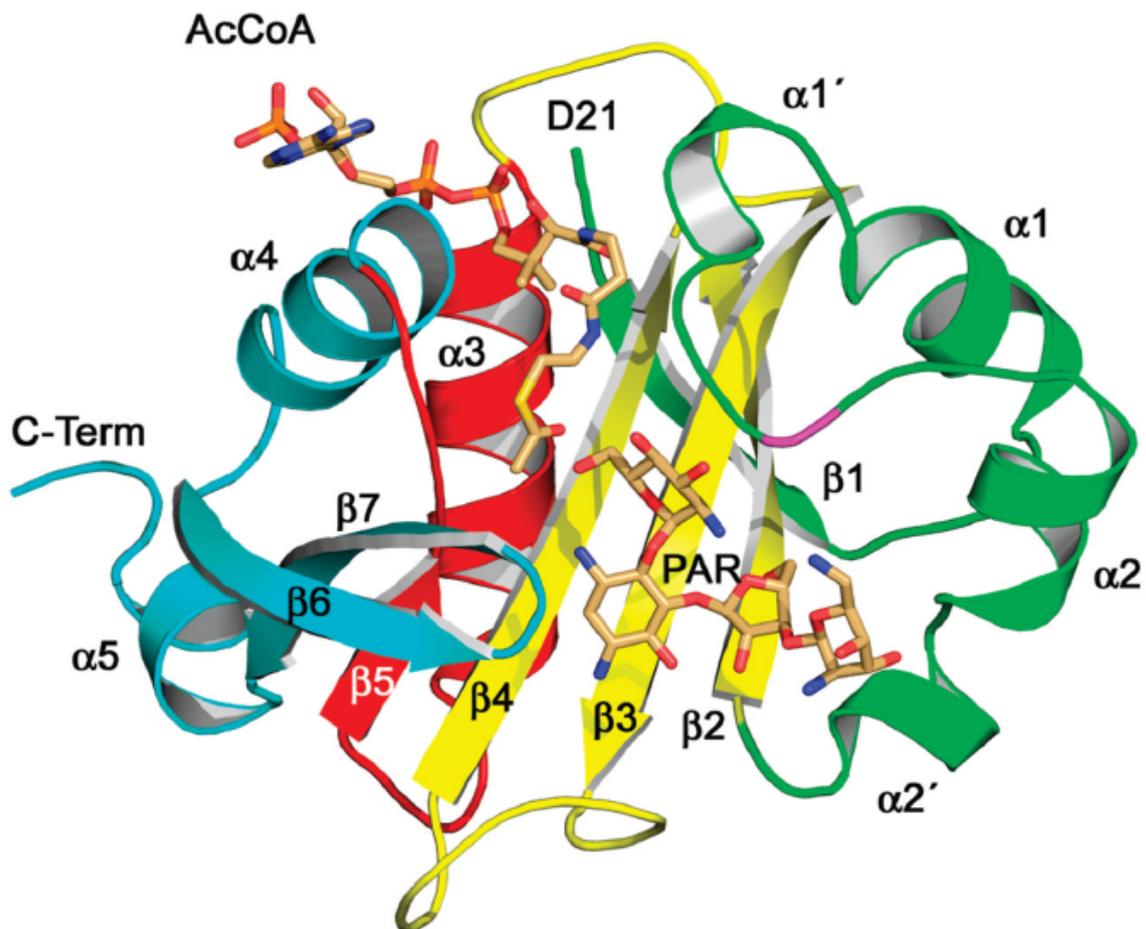
Figura 26.
 Relaciones filogenéticas entre genes *qnrVc*
 Tomada de Pons et al., 2013.

3.9.2.2 AAC(6')-Ib-cr.

En 2006 se publicó el hallazgo de un enzima bifuncional, capaz de acetilar tanto aminoglucósidos como fluorquinolonas. Se alojaba en un plásmido que portaban cepas de *E. coli* originarias de Shanghai. Era una variante de AAC(6')Ib (figura 27), la AAC(6') Ib-cr. Ambas familias de antibióticos no guardan semejanza en su estructura química ni en su forma de acción. Los aminoglucósidos inhiben la síntesis de proteínas bacterianas, mediante su unión al lugar A del rRNA 16S, ocasionando una lectura errónea o interrumpiendo ésta durante la translocación del ribosoma. Ya se ha detallado el mecanismo de acción de las quinolonas, fruto de su unión a las topoisomerasas II (Vetting et al., 2008).

El mecanismo de resistencia más común en la práctica clínica respecto a los aminoglucósidos es la modificación enzimática. Las enzimas catalizan la alteración en diversos grupos -OH o -NH₂ y dichas enzimas pueden ser nucleotidiltransferasas (ANTs), fosfotransferasas (APHs) y acetiltransferasas (AACs) (Ramírez et al. 2010).

Figura 27.
Estructura de Aac(6')-Ib-wt, diagrama del complejo formado con AcCoA y
paromomicina (PAR)
Tomada de Vetting et al., 2008.



Las *N*-acetiltransferasas transfieren un grupo acetilo del acetyl coenzima A (Ac-CoA) a una de las varias aminas de las que constan los aminoglucósidos. Según el lugar donde se produce la acetilación, se contemplan cuatro grupos de AAC: AAC(1), AAC(3), AAC(2') y AAC(6'), siendo el último el más común en la naturaleza. AAC(6') ha sido descrita

en bacterias Gram negativas y Gram positivas, en plásmidos y en cromosomas. A menudo forman parte de elementos genéticos móviles, algunos de ellos con estructuras atípicas (Ramírez et al. 2010).

Existen dos subclases de AAC(6'), que difieren en su perfil de actividad frente a amikacina y gentamicina: AAC(6')-I, otorga resistencia a amikacina y no a gentamicina y AAC(6')-II que confiere resistencia a ambas moléculas. Ambas clases acetilan también a kanamicina, neomicina, sisomicina, tobramicina y netilmicina. (Maurice et al., 2008) (Ramírez et al., 2010). Hay descritos un enorme número de genes pertenecientes a *aac(6')*, pero desafortunadamente no hay un consenso en la nomenclatura, por lo que ha habido y hay duplicaciones y falta de claridad a la hora de nombrar estas enzimas. Se han encontrado proteínas AAC(6')-I ligadas a APH, ANT u otras AAC (Ramírez et al., 2010).

AAC(6')-Ib es la acetilasa (figura 28) más relevante en clínica, responsable de resistencia a aminoglucósidos en *Acinetobacter*, *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae* y *Vibrionaceae*. Los aminoglucósidos afectados son: tobramicina, kanamicina y amikacina. Ya se ha mencionado que una de sus variantes ocasiona también resistencia a fluorquinolonas. Habitualmente aparece como un casete en diferentes integrones y asociada a otros genes de resistencia a quinolonas como *qnrA1*, *qnrS*, distintos *qnrB*, *qepA* y también a genes de resistencia a betalactámicos (Vetting et al., 2008) (Ramírez et al. 2010).

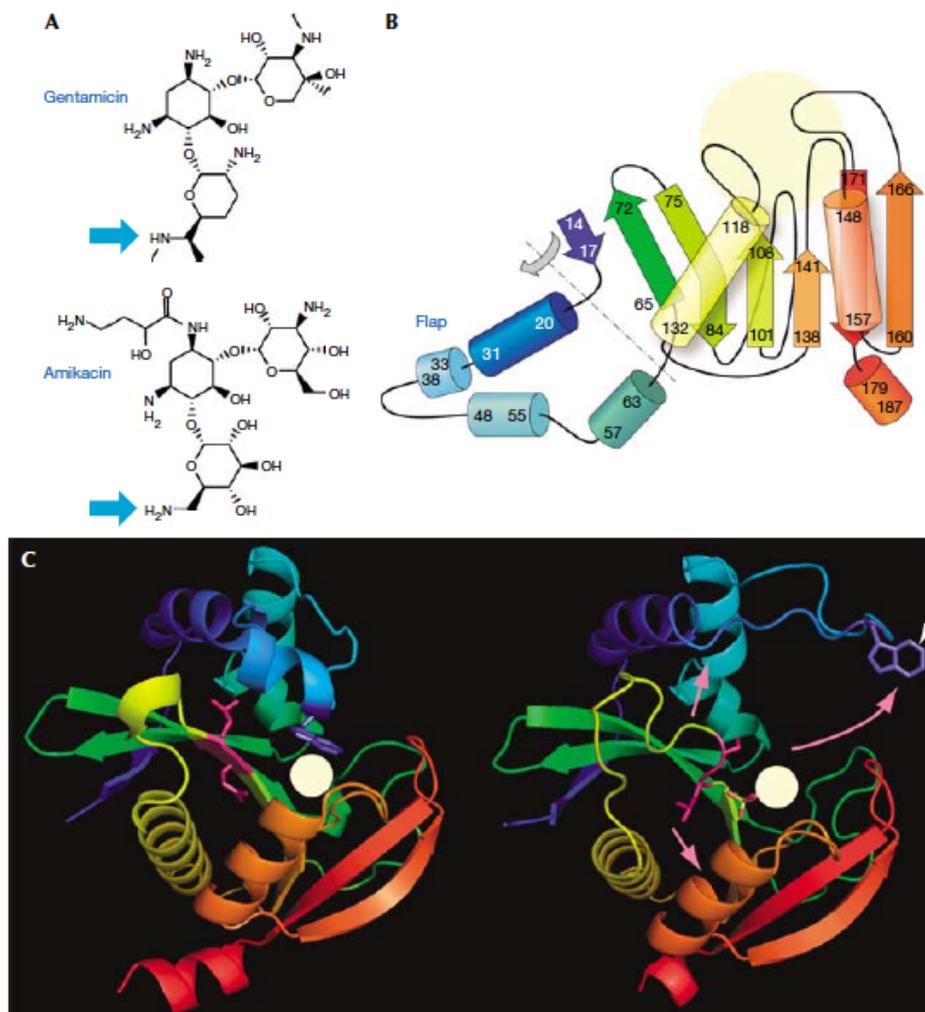
Figura 28.
Estructura de AAC(6')-Ib

A: estructura de gentamicina y amikacina, las flechas indican los aminogrupos que son acetilados.

B: topología de AAC(6'). el color amarillo indica el lugar de unión, en forma de bolsillo, a aminoglucósidos, cuya parte superior de este lugar está cerrada por una α hélice en faldón, que se dobla hacia atrás a lo largo del eje en línea punteada, por encima de la hoja β central

C: estructura de AAC(6')-Ib a la izquierda y a la derecha su variante de amplio espectro AAC(6')-Ib-11. Los residuos sustituidos están en color púrpura. Las flechas rosas indican el movimiento del faldón y de Trp38.

Tomada de Maurice et al. 2008.



AAC(6')-Ib-cr tiene dos cambios: Trp102Arg y Asp179Tyr que son los que le confieren la resistencia a ciprofloxacino. El aumento en la CIM es menor que la producida por Qnr y es selectivo para norfloxacino y ciprofloxacino, por tener ambas moléculas un grupo piperacínico, no viéndose afectadas otras quinolonas que carecen de dicho grupo. Aunque el incremento de la CIM sea modesto, no lo es el efecto que se produce en la concentración de prevención de mutantes (Strahilevitz et al. 2009).

Se han descrito dos modelos para AAC(6')-Ib-cr. En el primero, Vetting et al. consideran que el lugar de unión entre la enzima y los aminoglucósidos y las fluorquinolonas no puede ser el mismo, ya que la actividad frente a los primeros no desaparece en esta variante de AAC(6'). Consideran que la mutación principal en cuanto a la acción sobre fluorquinolonas es Asp179Tyr, sirviendo Trp102Arg para proporcionar estabilidad (Vetting et al., 2008).

En el modelo de Maurice et al., de gran plasticidad, el sitio de unión sería idéntico para ambas familias antibióticas, la función de la mutación en el aminoácido 179 sería similar a la del primer modelo, pero la mutación Trp102Arg interaccionaría con la fluorquinolona (Maurice et al., 2008).

Se han constatado diferencias para la actividad de AAC(6')-Ib-cr en cuanto al pH. Así el pH óptimo para que se produzca la acetilación de los aminoglucósidos con esta enzima es 6,1, mientras que para que actúe en fluorquinolonas es de 7,7 (Vetting et al., 2008).

3.9.2.3 BOMBAS DE EXPULSIÓN

Estos mecanismos de defensa bacteriana han sido descritos en el apartado 2.9.1.3. La mayor parte de ellos están codificados en los cromosomas, pero algunos se localizan también en plásmidos. Estos últimos están muy extendidos en los animales de granja y también en los trabajadores en estas explotaciones; lo cual conduce a sospechar de la muy probable asociación entre el gran uso veterinario de estos antibióticos y la emergencia de resistencia a los mismos (Ruiz et al., 2012).

Se mencionan a continuación sistemas descritos en plásmidos y que conciernen a quinolonas.

OqxAB

Olaquinox es una molécula sintética, un derivado de quinoxalina, utilizada profusamente como promotor de crecimiento en cerdos. Es activo frente a enterobacterias, en las que inhibe la síntesis de DNA. Se introdujo en el mercado en 1980 y se había observado aumento de la resistencia frente a este producto. Fue en 2003 cuando se descubrió un plásmido conjugativo, pOLA52, portador de resistencia a olaquinox. El estudio se realizó analizando cepas de *E. coli* provenientes del estiércol de una granja de cerdos en Dinamarca, cuyos animales tomaban este producto como complemento de la alimentación. El

plásmido albergaba también resistencia a ampicilina y, en algún grado, a cloranfenicol y nitrofurantoína (Sørensen et al., 2003).

Posteriormente el mecanismo de resistencia fue identificado como una bomba expulsiva, OqxAB, miembro de la familia RND. (Hansen et al., 2004). Es capaz de expulsar ácido nalidíxico, flumequina, ciprofloxacino y norfloxacino (Hansen et al., 2007).

En estudios posteriores se localizó OqxAB en muestras clínicas en Corea, aunque con baja prevalencia en *E. coli* y *Enterobacter cloacae*. Sin embargo era alta en las cepas de *K. pneumoniae*, estando los genes dentro de los cromosomas. Los autores proponen esta especie bacteriana como el reservorio y origen de *oqxAB* (Kim HB et al., 2009).

Otros trabajos contemplan una prevalencia de OqxAB mayor en *E. coli*, de un 39%, provenientes de animales, medio ambiente y trabajadores de granjas, sin tratamiento previo con antibióticos o estancia hospitalaria. La comparación de patrones sugiere la transmisión horizontal de los genes *oqxAB* entre animales y humanos.

El nivel de resistencia que confiere este mecanismo es bajo. Sin embargo, la frecuencia relativamente alta de mutaciones en las topoisomerasas de estas cepas, respecto a las que albergan Qnr, parece indicar que esta bomba expulsiva favorece la selección de mutantes con alto nivel de resistencia a quinolonas (Zhao et al., 2010).

En muestras clínicas recogidas en el año 2010 en Shanghai, China, *OqxAB* aparece en todas las cepas de *K. pneumoniae*, pero sólo en el 6,6% de las de *E. coli*, lo que refuerza la teoría de que esta especie bacteriana es el reservorio de *oqxAB* (Yuan 2012).

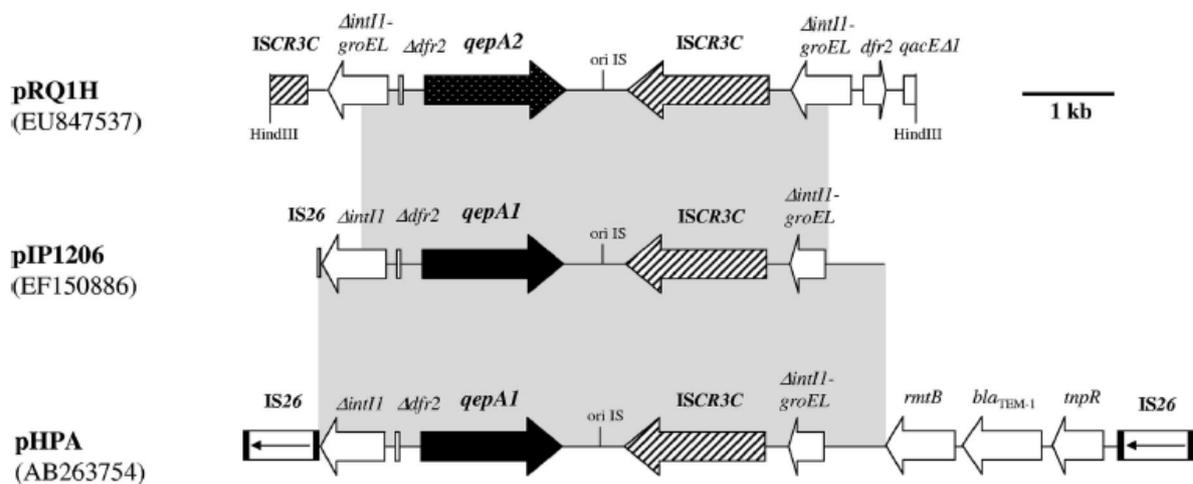
QepA

En el año 2007 se descubrió en cepas de *E. coli* un plásmido que albergaba una bomba expulsiva de las familia MFS, a la que se denominó Qep (por quinolone efflux pump). El hallazgo tuvo lugar casi a la vez en Francia y Japón. Este sistema expulsivo afectaba a norfloxacin y ciprofloxacino, pero tenía poco o ningún efecto en otras quinolonas menos hidrofílicas (ácido nalidíxico, levofloxacino, moxifloxacino), así como en otros antibióticos (cloranfenicol, ampicilina, kanamicina, tetraciclina) y en tintes (cristal violeta, rodamina, etc), que suelen ser sustratos de estos mecanismos expulsivos (Périchon et al., 2007) (Yamane et al., 2007).

Aunque QepA presenta homología con otras bombas de expulsión de bacterias del orden de los actinomicetales, el origen no se ha determinado, puesto que las fluorquinolonas son compuestos sintéticos y no parece probable que en la naturaleza hubiese sistemas defensivos contra ellas. Pero otros autores opinan que dichos sistemas pudieran estar destinados a moléculas similares (Périchon et al., 2007) (Yamane et al., 2007).

Figura 29.

Entorno genético de *qepA2* comparado con *qepA1* situado en dos plásmidos distintos.
Los marcos de lectura abiertos se indican con flechas. El sombreado señala la
identidad entre secuencias.
Tomada de Cattoir et al., 2008.



Como sucede con otros mecanismos de resistencia a quinolonas de transmisión horizontal, el efecto de QepA sobre la CIM es pequeño, no llegando a alcanzar el punto de corte (Ruiz et al. 2012).

En el año 2008, durante un estudio para determinar la prevalencia de QepA en muestras clínicas europeas, se encontró un alelo de esta bomba expulsiva al que se denominó QepA2. Tan sólo difería de QepA, ahora denominado QepA1, en dos aminoácidos, y generaba un fenotipo de resistencia similar. Lo que llamaba la atención es que este

nuevo alelo tenía un entorno genético distinto al primero: mientras *qepA1* está asociado al gen *rmtB*, que codifica una metilasa ribosómica que actúa sobre aminoglucósidos, esto no sucede con *qepA2*, que ha sido identificado entre dos copias de un elemento similar a ISCR, pero no ha sido vinculado con elementos IS26, como sucede con los plásmidos que albergan QepA1. El elemento que flanquea *qepA2* ha sido denominado ISCR3C (Figura 29). Los sustratos expulsados por el nuevo alelo son similares a los que expulsa *qepA1* (quinolonas hidrofílicas) (Cattoir et al., 2008).

Hasta ahora la prevalencia de este sistema de resistencia ha sido baja o moderada tanto para QepA1 como para QepA2 (figura 29) En un estudio retrospectivo llevado a cabo en China se analizaron muestras provenientes de distintos animales destinados al consumo humano que enfermaron, recolectadas entre 2004 y 2008. QepA1 fue positivo en el 4% de ellas (Deng et al., 2013).

La prevalencia de QepA en aislados humanos es menor, no llega al 1%, aunque no es totalmente conocida (Ruiz et al., 2012). En 2014 se ha descrito en Argentina.

QacBIII

A principios de los años ochenta del pasado siglo, se identificó un gen que codificaba resistencia a varios antisépticos en el plásmido pSK1 que estaba en un aislado clínico de *S. aureus*. El gen fue posteriormente denominado *qacA* y codifica la bomba expulsiva QacA, miembro de la familia MFS. *qacA* ha sido descrito también en plásmidos albergados en estafilococos coagulasa negativos y confiere resistencia frente a un amplio grupo de compuestos: antibióticos, colorantes, antisépticos (Costa et al., 2013).

Otro determinante de resistencia, QacB, difiere sólo en siete aminoácidos de QacA, pero sus sustratos son distintos a los de éste. Así, QacA actúa sobre cationes orgánicos mono y divalentes, mientras que QacB confiere poca o ninguna resistencia a los cationes orgánicos divalentes, como clorhexidina, pero sí actúa sobre los monovalentes, como benzalconio (Paulsen et al., 1996). Plásmidos portadores de los genes *qacA* y *qacB* están ampliamente distribuidos en SAMR. (Nakaminami et al., 2010).

Un alelo de *qacB*, *qacBIII*, actúa sobre las fluorquinolonas, dando lugar a una reducción de la sensibilidad a norfloxacino y ciprofloxacino, mientras que su efecto no es significativo en el caso de levofloxacino. Se ha descrito el aminoácido en posición 320 como responsable de este efecto,

Como ya se ha visto con otros mecanismos, el nivel de resistencia conferido por QacBIII es bajo, pero puede facilitar la emergencia de mutantes en GrlA, debido al incremento de la concentración preventiva de mutantes (Nakaminami et al. 2010).

MATERIAL Y MÉTODOS

4.MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 SELECCIÓN DE LAS CEPAS

Se utilizaron 93 aislamientos clínicos de enterobacterias obtenidos entre el año 2012 y el 2014 en el Hospital Universitario de Salamanca, procedentes todos ellos de muestras de orina. El criterio de selección fue CIM de ácido nalidíxico ≥ 32 mg/L y una CIM de ciprofloxacino ≤ 1 mg/L. También se incluyeron aquellas cepas BLEE que eran sensibles a quinolonas.

Se excluyeron los aislamientos repetidos procedentes del mismo paciente, cuando pertenecían a idéntico proceso infeccioso. De las 116 muestras iniciales, se desecharon en total 23, por diferentes motivos. Uno de ellos fue homogeneizar la muestra total, por lo que fueron apartados los microorganismos que no eran *E. coli*, cuyo número en conjunto era inferior a diez, repartido en diferentes especies bacterianas.

Los aislamientos primarios se obtuvieron de las placas de agar Mac Conkey utilizadas habitualmente como control de pureza. Posteriormente, las cepas fueron congeladas a -80°C en tubos que contenían caldo común o caldo glicerol.

La identificación y sensibilidad antibiótica de las muestras se hizo con los sistemas automatizados Vitek $\text{\textcircled{R}}$ 2 (bioMérieux), Wider (Soria-

Melguizo) o con el MicroScan Walk-Away (Siemens) y mediante e-test, cuando fue necesario.

4.2 AMPLIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE GENES

La extracción de DNA se realizó mediante los extractores automatizados NucliSENS® easyMag® (bioMérieux) y VERSANT® kPCR (Siemens). Los tubos de eluido fueron conservados a -80°C.

Se efectuó la amplificación mediante técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con primers previamente descritos, para los genes *gyrA*, *gyrB*, *parC*, y *parE*, (tabla 15) con objeto de detectar mutaciones cromosómicas, tanto en el primero como en el segundo nivel. También se buscaron los genes asociados a resistencia plasmídica (PMQR) *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrS*, *aac (6')* *lb cr* y *qepA*.

Los amplificados obtenidos fueron posteriormente secuenciados mediante el método de Sanger en un laboratorio externo (Servicio de Secuenciación DNA, Genómica y Proteómica de la Universidad de Salamanca).

Tabla 15.
 Oligonucleótidos usados para la detección de genes cromosómicos y plasmídicos.

Gen	Oligonucleótido (secuencia 5'→ 3')	Tamaño (pb)
<i>gyrA</i>	<i>gyrA</i> -F GAACTCACCTTCCAGATCCA <i>gyrA</i> -R GAGCGCGGATATACACCTT	500
<i>parC</i>	<i>parC</i> -F AAACCTGTTCAGCGCCGCATT <i>parC</i> -R GTGGTGCCGTTAAGCAA	395
<i>gyrB</i>	<i>gyrB</i> -F GGACAAAGAAGGCTACAGCA <i>gyrB</i> -R CGTCGCGTTGTACTCAGATA	850
<i>parE</i>	<i>parE</i> -F GACCGAAAGCTACGTCAACC <i>parE</i> -R GTTCGGATCAAGCGTGGTTT	932
<i>qnrA</i>	<i>qnrA</i> -F ATTTCTCACGCCAGGCTTTG <i>qnrA</i> -R GATCGGCAAAGGTTAGGTCA	516
<i>qnrB</i>	<i>qnrB</i> -F CCTGAGCGGCACTGAATTTAT <i>qnrB</i> -R GTTTGCTGCTCGCCAGTCGA	476
<i>qnrS</i>	<i>qnrS</i> -F GCAAGTTCATTGAACAGGGT <i>qnrS</i> -R TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG	428
<i>qnrC</i>	<i>qnrC</i> -F GGGTTGTACATTTATTGAATCG <i>qnrC</i> -R CACCTACCCATTTATTTCA	307
<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i> -F TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA <i>aac(6')-Ib-cr</i> -R CTCGAATGCCTGGCGTGT	482
<i>qepA</i>	<i>qepA</i> -F AACTGCTTGAGCCCGTAGAT <i>qepA</i> -R GTCTACGCCATGGACCTCAC	596

Las secuencias obtenidas se estudiaron en Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), recurso de uso libre, perteneciente a la Biblioteca Nacional de EEUU.

4.2.1 EXTRACCIÓN DEL DNA

Se hizo una resiembra de las cepas seleccionadas en placas de agar sangre, que fueron incubadas a 37°C durante 24 horas. De ellas tomamos entre dos y cuatro colonias, que suspendimos en tubos con 400ml de tampón NucliSENS® easyMag® extraction Buffer 3 (bioMérieux)

El DNA fue extraído siguiendo el protocolo de los diferentes extractores: NucliSENS® easyMag® (bioMérieux) y VERSANT® kPCR (Siemens), usando siempre controles de extracción. La cantidad de DNA presente en el eluido es considerablemente mayor cuando la extracción se realiza con VERSANT® kPCR, respecto a la de easyMag®, por lo que hubo que diluir los eluidos obtenidos con el primer extractor, para que las PCR que teníamos que realizar no fuesen inhibidas por un exceso de DNA.

4.2.2 DETECCIÓN DE GENES

Cada una de las cepas seleccionadas fue sometida a distintas PCRs, (tabla 16) con objeto de amplificar y detectar los diferentes genes que eran de nuestro interés, a partir del DNA total. Utilizamos siempre

control negativo de la PCR, con agua libre de nucleasas y, siempre que fue posible, se añadieron controles positivos, de muestras en las que conocíamos la presencia del gen en cuestión.

En una primera búsqueda se amplificaron conjuntamente los genes *qnrA*, *qnrB* y *qnrS*. Se revelaron en un gel de agarosa y las muestras que fueron positivas, fueron sometidas a nuevas PCRs, amplificando un solo gen cada vez. En total se practicaron ocho PCRs a cada aislamiento y tres más, en los casos en los que *qnr* fue positivo.

Los oligonucleótidos utilizados se detallan en la tabla 15 y las condiciones de las PCRs en la tabla 16.

Tabla 16.

Detalle de la programación del termociclador en tiempo y temperatura para las

PCR	PARÁMETROS DEL TERMOCICLADOR
PCR1: <i>qnrA, qnrB, qnrS</i>	Desnaturalización: 95° 5 minutos Ciclos: 30 ciclos 95° 30 segundos, 51° 30 segundos y 72° 30 segundos Extensión final: 72° 5 minutos
PCR2: <i>gyrA</i>	Desnaturalización: 95° 5 minutos Ciclos: 35 ciclos 95° 30 segundos, 48° 30 segundos y 72° 5 minutos Extensión final: 72° 5 minutos
PCR3: <i>parC</i>	Desnaturalización: 95° 5 minutos Ciclos: 30 ciclos 95° 30 segundos, 46° 30 segundos y 72° 30 segundos Extensión final: 72° 5 minutos
PCR4: <i>gyrB</i>	Desnaturalización: 95° 5 minutos Ciclos: 30 ciclos 95° 30 segundos, 49° 30 segundos y 72° un minuto Extensión final: 72° 5 minutos
PCR5: <i>parE</i>	Desnaturalización: 95° 5 minutos Ciclos: 30 ciclos 95° 30 segundos, 49° 30 segundos y 72° un minuto Extensión final: 72° 5 minutos
PCR6: <i>qnrC</i>	Desnaturalización: 95° 5 minutos Ciclos: 30 ciclos 95° 30 segundos, 46° 30 segundos y 72° 30 segundos Extensión final: 72° 5 minutos
PCR7: <i>aac(6')-Ib-cr</i>	Desnaturalización: 95° 5 minutos Ciclos: 30 ciclos 95° 30 segundos, 56° 30 segundos y 72° 30 segundos Extensión final: 72° 5 minutos
PCR8: <i>qepA</i>	Desnaturalización: 95° 5 minutos Ciclos: 30 ciclos 95° 30 segundos, 54° 30 segundos y 72° 30 segundos Extensión final: 72° 5 minutos
PCR9: <i>qnrA</i>	Desnaturalización: 95° 5 minutos Ciclos: 30 ciclos 95° 30 segundos, 51° 30 segundos y 72° 30 segundos Extensión final: 72° 5 minutos
PCR10: <i>qnrB</i>	Desnaturalización: 95° 5 minutos Ciclos: 30 ciclos 95° 30 segundos, 51° 30 segundos y 72° 30 segundos Extensión final: 72° 5 minutos
PCR11: <i>qnrS</i>	Desnaturalización: 95° 5 minutos Ciclos: 30 ciclos 95° 30 segundos, 51° 30 segundos y 72° 30 segundos Extensión final: 72° 5 minutos

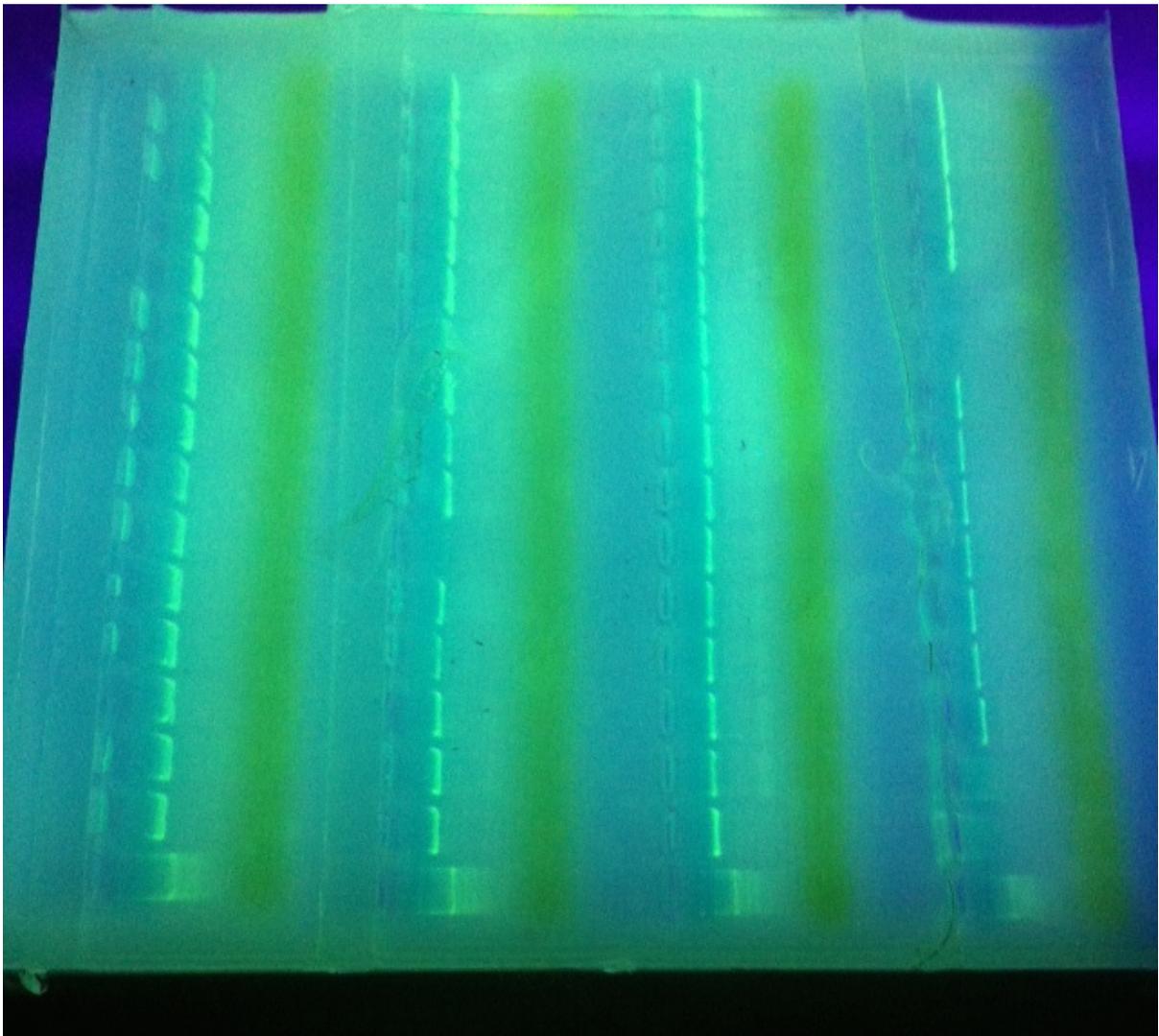
4.2.3 VERIFICACIÓN DE RESULTADOS

Todos los productos amplificados mediante las PCRs realizadas, se revelaron en gel de agarosa al 2%, sumergidos en tampón TBE al 1x (tris, borato y EDTA). Utilizamos electroforesis convencional a 53 voltios (V) durante 35 o 45 minutos, según el tamaño del gel.

Como agente fluorescente intercalante entre las dos cadenas de DNA, se usó RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution (iNtRON Biotechnology), añadido a la mezcla de agarosa en polvo y TBE, inmediatamente tras el calentamiento de la misma, lo cual favorece la disolución de la agarosa en el TBE. Utilizamos 2,5 µl de RedSafe™ para 50 ml de gel.

Los pocillos se cargaron con 5 µl de los amplificados, siendo el tampón de carga Blue/Orange Loading Dye 6X® (Promega) o Green GoTaq Flexi Buffer® (Promega). Se utilizó 100 bp DNA ladder (Promega) como patrón de peso molecular, que contiene controles entre 100 y 1500 pares de bases (bps), expresados de 100 en 100 bps. La visualización de los resultados se hizo en un transiluminador de luz ultravioleta (figura 30).

Figura 30.
Gel de agarosa en el transiluminador de luz ultravioleta.



4.2.4 PURIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE LOS AMPLIFICADOS

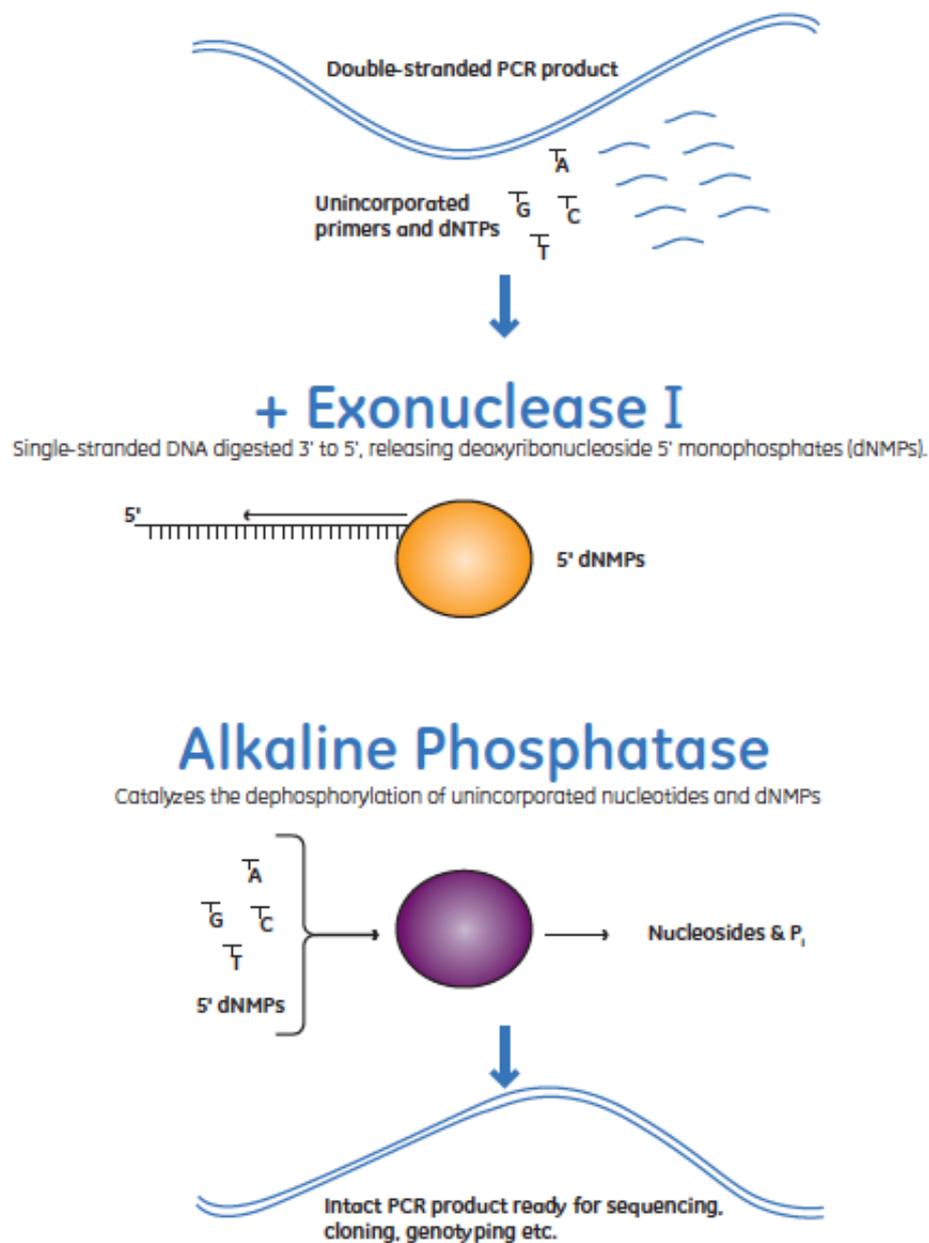
Los amplificados fueron purificados con el fin de eliminar los desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP) y primers no consumidos en la reacción de PCR, para que estos restos no interfiriesen con el proceso de secuenciación. Se utilizó ExoProStar 1-step® (General Electric Healthcare UK), un preparado comercial que hidroliza estos residuos indeseados mediante dos enzimas hidrolíticas: exonucleasa y fosfatasa alcalina (Figura 31).

Ambas enzimas no dañan la doble hebra de DNA. Están en un único tubo y el protocolo consiste en una incubación del amplificado más ExoProStar a 37°C durante 15 minutos, seguida de otros 15 minutos a 80°C para inactivar las enzimas, ya que éstas, a su vez, también afectan negativamente el proceso de secuenciación. Los dos pasos se realizan en un termociclador (ExoProStar www.gelifesciences.com/illustraExoProStar).

Las muestras positivas se secuenciaron por el método Sanger y las negativas fueron repetidas para subsanar posibles errores manuales.

La secuenciación de los amplificados fue realizada en un laboratorio externo, Servicio de Secuenciación DNA, perteneciente a la Universidad de Salamanca, que utilizó el Secuenciador Automático Capilar 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) con terminadores fluorescentes.

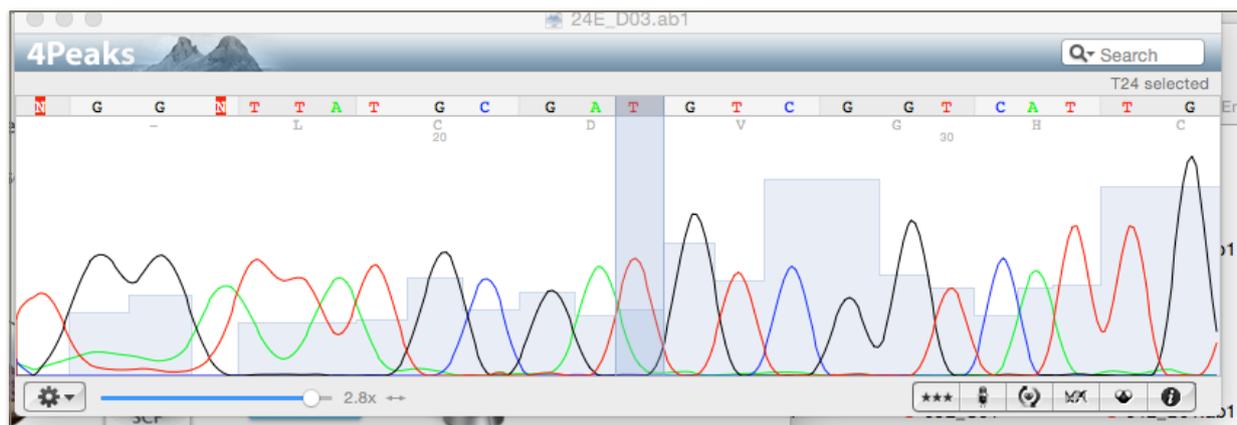
Figura 31
Esquema del proceso de limpieza del amplificado, realizado por ilustra
ExoProStar.
Tomada de www.gelifesciences.com/illustra ExoProStar.



4.2.5 INTERPRETACIÓN DE LAS SECUENCIAS

La visualización de las secuencias se llevó a cabo con el software Four Peaks 1.7.1 (figura 32). Se analizaron en las bases de datos **Nucleotide collection** y **Non redundant protein sequences**, ambas pertenecientes a GenBank, mediante la herramienta de libre acceso Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), disponible en <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>.

Figura 32.
Secuencia en el FourPeaks



Tanto BLAST como GenBank pertenecen al National Center for Biotechnology Information (NCBI), creado en noviembre de 1988 como una división de la Biblioteca Nacional de Medicina (National Library of Medicine, NLM) de los EEUU.

El estudio de las mutaciones de la girasa y de la topoisomerasa IV se hizo comparando en **blastx** (búsqueda en la base de proteínas a partir de una secuencia de nucleótidos, la cual ha sido transcrita a letras) las secuencias obtenidas con una cepa wild type (WT), que fue la siguiente:

***Escherichia coli* 042 complete genome** GenBank: FN554766.1

"[CBG35304.1](#)" número proteína **gyr A**

"[CBG36880.1](#)" número proteína **gyr B**

"[CBG36135.1](#)" número de proteína **par C**

"[CBG36149.1](#)" número proteína **par E**.

El *qnrS* encontrado se comparó con:

**Escherichia coli strain P/12/00399 plasmid quinolone
resistance protein gene, partial cds**

GenBank: KJ136492.1

[gi|601125726|KJ136492.1](#)

RESULTADOS

5.RESULTADOS

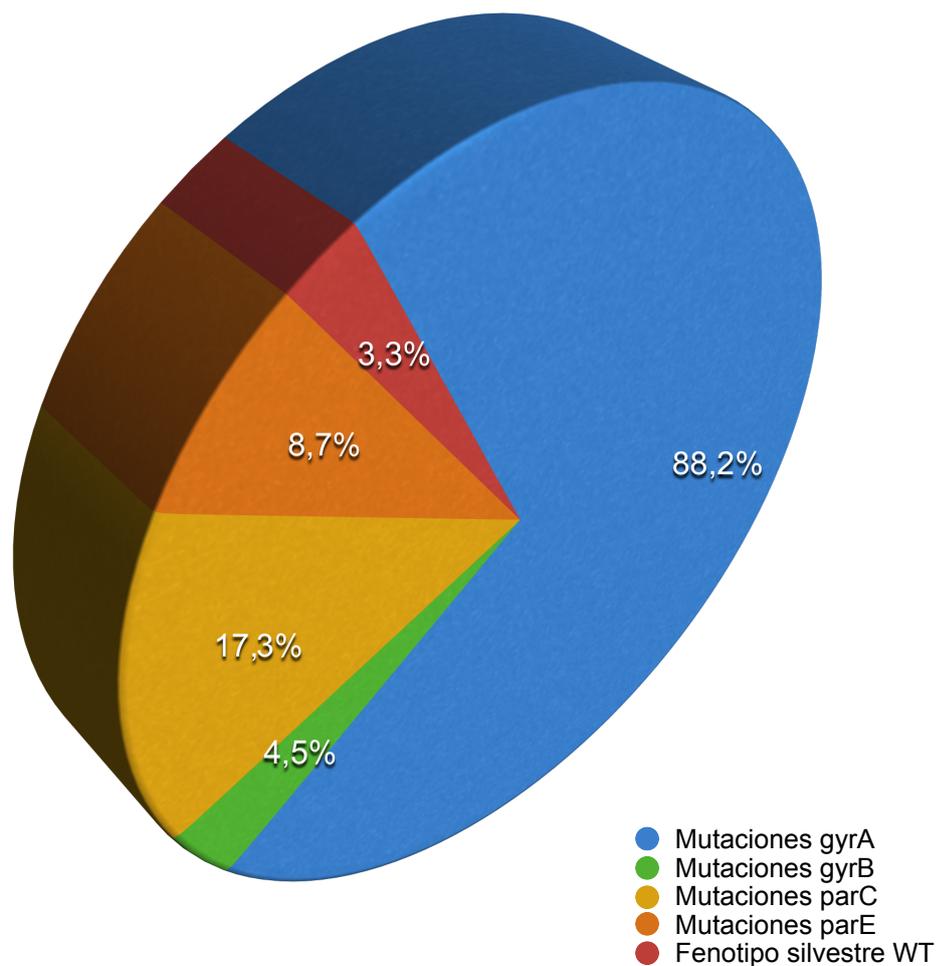
Las cepas fueron recogidas, entre 2012 y 2014 en el Hospital Universitario de Salamanca. El criterio de selección fue el de aislamientos clínicos de *Escherichia coli* con CIM de ácido nalidíxico ≥ 32 mg/L y CIM de ciprofloxacino ≤ 1 mg/L. Con arreglo a este criterio, se incluyeron en el estudio 116 aislamientos clínicos de *Escherichia coli*, y otras enterobacterias de origen urinario. Se excluyeron aquellos aislamientos procedentes del mismo paciente, cuando se consideró que ambos procedían de idéntico proceso infeccioso. Finalmente, se desecharon los patógenos que no eran *E. coli*, por ser muy pocos en número, además de heterogéneos. Otras cepas fueron excluidas por diversos motivos. 93 muestras aparecen en los resultados definitivos (tabla 17).

La prevalencia de mecanismos de resistencia plasmídicos en este grupo fue muy baja. No se detectó la presencia de *qnrA*, *qnrB*, *aac(6')* *Ib cr* ni *qepA*. Solamente una cepa fue portadora de *qnrS*. Se trata de un aislamiento en el que no se detectó ningún otro mecanismo de resistencia ni mutaciones en las topoisomerasas, por lo que se puede afirmar que su nivel de sensibilidad (CIM de ácido nalidíxico: ≥ 32 mg/L, CIM de ciprofloxacino $\leq 0,25$ mg/L) está asociado a la presencia de este mecanismo plasmídico.

De forma global, los datos obtenidos demuestran que, en nuestro medio, el fenotipo de *resistencia a ácido nalidíxico/sensibilidad a ciprofloxacino*, sigue asociado fundamentalmente a la presencia de

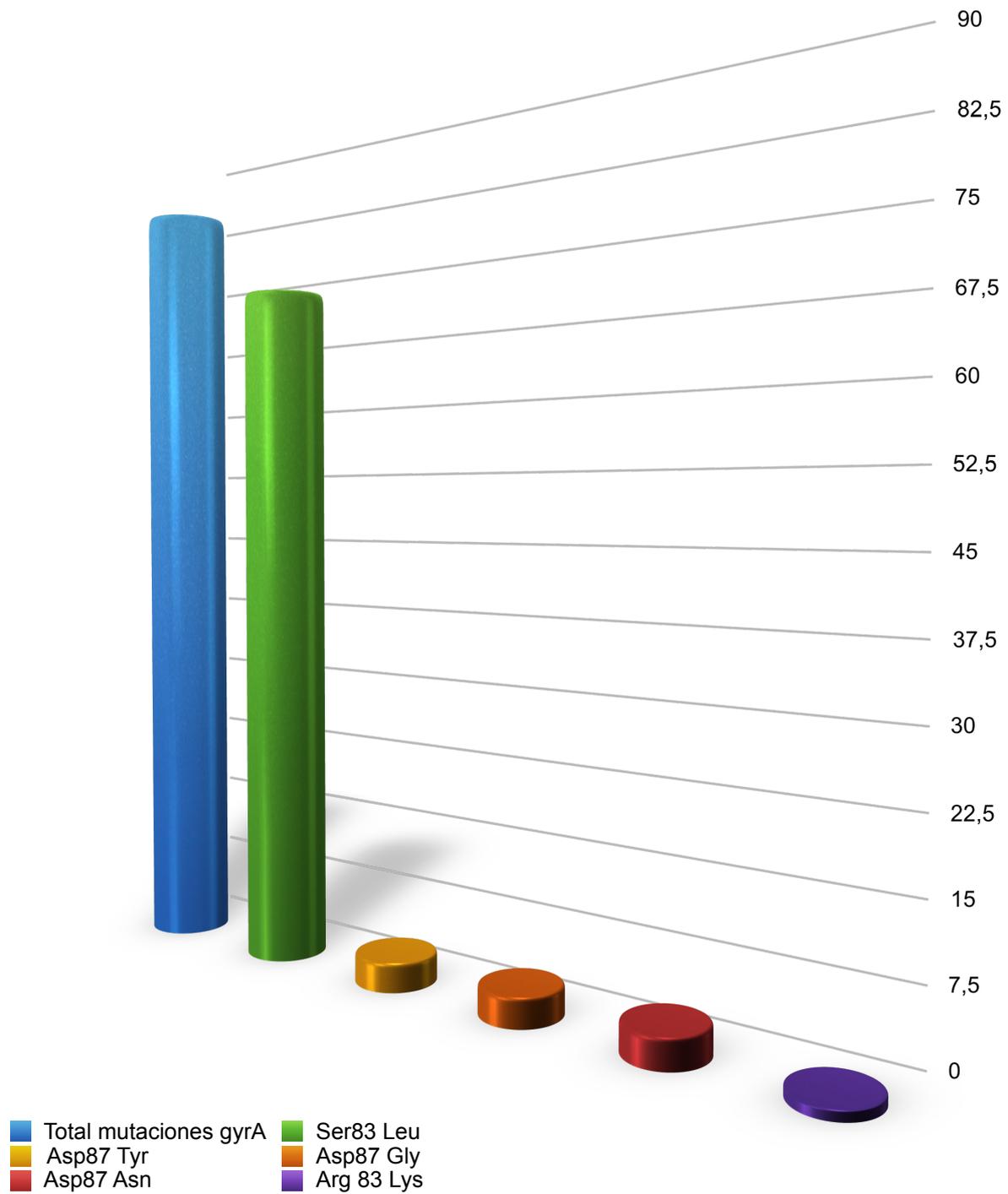
mutaciones en las topoisomerasas (figura 33). Como era previsible, la mayor parte de los aislamientos mostraron mutaciones en el gen *gyrA*. La secuenciación completa de dicho gen mostró que el 88,2% de los aislamientos (82 aislamientos) mostraban alguna mutación en este gen. Sin embargo, sí se observa una mayor heterogeneidad de lo que se venía describiendo clásicamente.

Figura 33. Porcentaje de mutaciones en las topoisomerasas



La mayor parte de las cepas que mostraban mutaciones en *gyrA* (figura 34), mostraban el cambio previsible en Serina (Ser) 83 (72 aislamientos, 77,5%), que fue a Leucina (Leu), seguido del otro cambio más frecuentemente descrito, Ácido aspártico (Asp) en 87 (9 aislamientos, 9,7%), más variable en sus modificaciones (Glicina (Gly), Asparragina (Asn) y Tirosina (Tyr), cada una de ellas en una tercera parte de los casos). Sin embargo, una parte importante de estos aislamientos incorporaban mutaciones adicionales en otras localizaciones. De acuerdo a los esquemas clásicos, lo esperable hubiera sido que en este tipo de aislamientos, en los que la ausencia de elementos de resistencia plasmídicos permite achacar su perfil de resistencia únicamente a cambios en las topoisomerasas, hubiéramos observado una mutación en *gyrA* (previsiblemente en Ser83 o Asp87), sin cambios adicionales en ninguna otra localización.

Figura 34. Distintas mutaciones en gyrA

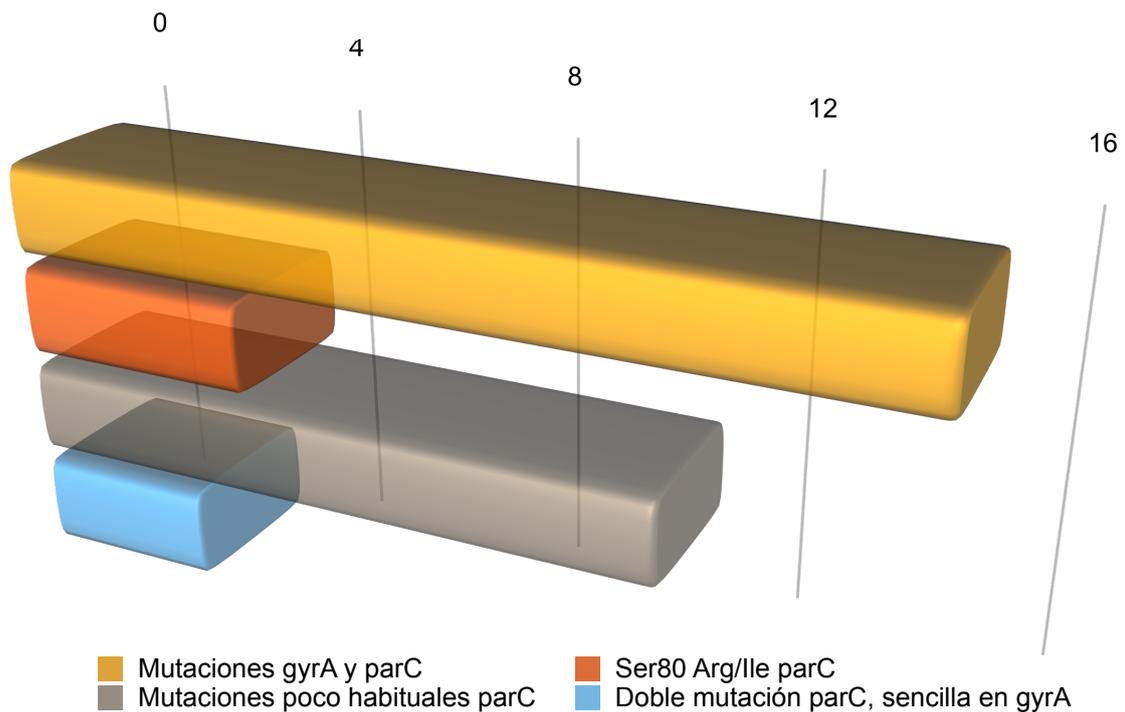


No obstante, este perfil sólo se observa en la mitad de las cepas (46 aislamientos). El resto de los aislamientos, bien presentaban mutaciones en más localizaciones, bien veían alterado el algoritmo habitual de aparición de cambios en Gram negativos (*gyrA/parC/gyrA...*). Así, 15 aislamientos (16,2%) presentan una doble mutación en *gyrA/parC* (figura 35). Mientras las mutaciones en *gyrA* son notablemente homogéneas (Ser83 Leu o Asp87 Gly), las de *parC* son heterogéneas cualitativa y cuantitativamente. Así, las alteraciones de segundo escalón en *parC* descritas más frecuentemente como asociadas a resistencia a fluoroquinolonas de alto nivel (Ser80 y Asp84) aparecen infrecuentemente. De manera aislada, Ser80 aparece mutada a Ile (Isoleucina) o Arg (Arginina) en 4 cepas (4,4%). Llama la atención que, en tres de los aislamientos, se mantenga una CIM de ciprofloxacino $\leq 0,25$ mg/L, cuando esta doble mutación es la que se describe de manera catacterística en los mutantes *gyrA/parC* de segundo escalón, con CIMs de ciprofloxacino habitualmente por encima de 1 mg/L. El cuarto de estos dobles mutantes *gyrA/parC* tiene una CIM de ciprofloxacino de 1, pero presenta también una alteración en *parE*.

En otros once aislamientos(16,2%), aparecen mutaciones en lugares poco habituales o alteraciones acumulativas en *parC*. Así, cuatro aislamientos presentan una mutación Asp142 Ácido glutámico (Glu). Se trata de una mutación no descrita previamente en asociación a resistencia a topoisomerasas, y relativamente alejada de la QRDR, por lo que podría tener poca repercusión en los niveles de resistencia. Lo mismo se puede afirmar de las mutaciones Val (Valina)144 Met

(Metionina), Ala (Alanina)192 Val y Met 241 Ile. Sin embargo, cuando dos de estos cambios atípicos, Val144 Met y Ala 192 Val, aparecen asociados a otra mutación en *parC*, esta vez sí plenamente localizada en la *QRDR* y se añaden, como es el caso, a un cambio Ser83 Leu en *gyrA*, entonces la CIM de ciprofloxacino es 1 mg/L, lo que se correlaciona más con las CIMs previsibles en acumulaciones de este tipo, en contraste con el caso de los dobles mutantes *gyrA/parC* mencionados anteriormente.

Figura 35. Mutaciones *gyrA* más *parC*



Llama poderosamente la atención que, en tres de los quince aislamientos con cambios en *parC*, no se respete la secuencia habitual de mutaciones alternativas *gyrA/parC*, sino que aparezcan dos mutaciones en *parC* cuando todavía sólo hay una en *gyrA*. Además *parC* aparece alterado, a veces con cambios también en *gyrB* y/o *parE*, en cuatro cepas en las que *gyrA* aparece sin mutaciones.

La mutación más frecuentemente hallada en *gyrB* es un cambio Ser492 Asn (4/5 aislamientos). En los cuatro aparece asociada a un cambio atípico en *parC* (Met241 Ile), que probablemente contribuye muy escasamente a incrementar la resistencia. Esta doble mutación se asocia en dos casos a un cambio Ser83 Leu en *gyrA*, en un caso a un cambio Asp87 Tyr en *gyrA*, y en el cuarto aislamiento a un también muy atípico cambio Leu416 Phe en *parE*. El quinto microorganismo acumula hasta 5 mutaciones en *gyrB*, sumadas a un cambio Arg154 Lys en *gyrA* y un cambio Asp208 Glu. Lo atípico de los cambios en *gyrA* y en *parC* justifica la baja CIM de ciprofloxacino a pesar de las numerosas mutaciones.

Otro hallazgo que llama la atención es que encontramos una mayor frecuencia en las mutaciones en *parE*, (figura 36) que durante tiempo se habían venido considerando las más raras. El cambio que más aparece es la Ile529 Leu, que aparece en 21 de las 82 cepas portadoras de mutaciones en *gyrA* (25,6%). El perfil más frecuentemente observado fue el perfil Ser83 Leu en *gyrA*, Ile529 Leu en *parE*, que aparece en 18 aislamientos, todos ellos resistentes a ácido nalidíxico y con CIMs de ciprofloxacino de $\leq 0,25-0,5$ mg/L. En una sola cepa aparece asociada a

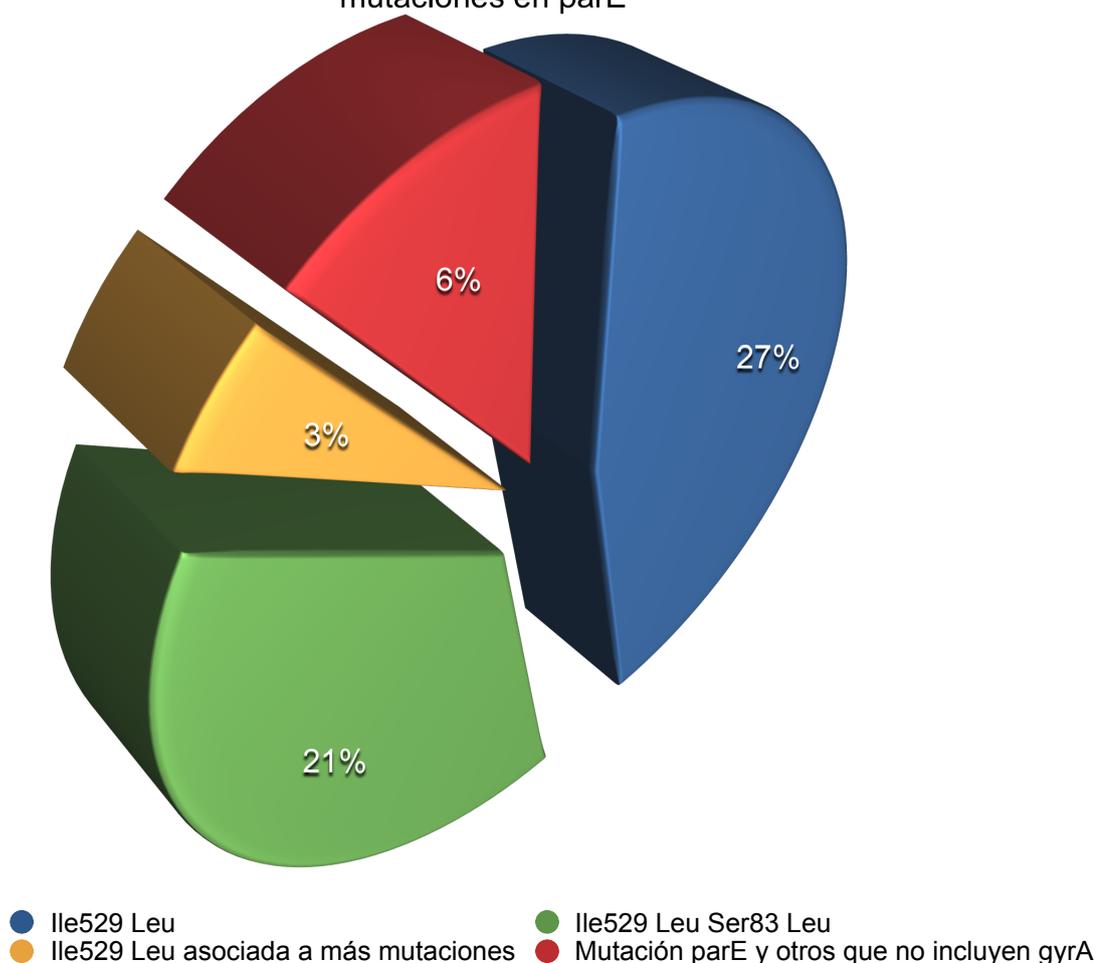
una doble mutación *gyrA* Ser83 Leu/*parC* Ser80 Arg, con una CIM de ciprofloxacino de 1 mg/L.

En otros dos aislamientos, esta mutación Ile529 Leu aparece asociada a una segunda mutación en *parE* (Ser458 Ala) en cepas portadoras de mutaciones Ser83 Leu en *gyrA*. En ambas, se da lugar a resistencia a ácido nalidíxico, junto con una CIM de ciprofloxacino de 1 mg/L. Esta posibilidad de combinación de varias mutaciones en *parE* aparece en otros dos aislamientos, portadores de mutaciones Ser83 Leu en *gyrA*. En ambos casos se trata de mutaciones relativamente próximas a la más frecuente Ile529 Leu. En una de ellas aparecen dos mutaciones consecutivas Gly565 Val, Leu566 Trp, en la otra tres mutaciones consecutivas, Lys552 Asn, Arg553 Ala, Lys554 Arg. En ambos casos, parece que la aparición de estas mutaciones contribuye escasamente al nivel de resistencia, ya que la CIM de ciprofloxacino se mantiene en cifras similares a las observadas en microorganismos portadores sólo de una mutación *gyrA* Ser83 Leu.

Otra circunstancia que se asumía como excepcional, pero que se va observando con frecuencia creciente es la existencia de mutaciones en *parC*, *gyrB* y *parE* en ausencia de mutaciones previas en *gyrA*. De las 93 cepas estudiadas con el perfil de resistencia a ácido nalidíxico y sensibilidad a ciprofloxacino, 7 aislamientos (7,5%) presentaban este comportamiento. Es cierto que, las que presentaban mutaciones en *parC*, eran en todos los casos mutaciones externas a la QRDR. En dos casos, los aislamientos presentaban sólo el mencionado cambio en *parC*

(Asp142 Glu y Ala192 Val), en un aislamiento se combinaban un cambio en *parC* (Val41 Ala) y otro en *parE* (Ala426 Val), y en un tercer caso se mostraba un cambio en *parC* (Met241 Ile), otro en *gyrB* (Ser492 Asn) y otro en *parE* (Leu416 Phe) Por último dos aislamientos presentaban como único cambio una mutación Ile529 Leu en *parE*. Estos mutantes carentes de cambios en *gyrA* se mostraban resistentes a ácido nalidíxico y sensibles a ciprofloxacino con CIMs $\leq 0,5$ mg/L en todos los casos.

Figura 36. Porcentaje de los aislamientos con mutaciones en *parE*



Finalmente, tres aislamientos presentan un perfil de CIMs $\leq 0,25$ mg/L pese a presentar topoisomerasas completamente silvestres, sin mutación en ninguna de las subunidades. Una última cepa, ya mencionada, tiene idéntica CIM, tampoco se observan cambios en las topoisomerasas, pero es portadora de un plásmido con *qnrS*.

Tabla 17. Cepas agrupadas según su perfil

Número asignado	Bacteria	CIM	gyrA	parC	gyrB	parE	Plásmidos	Número cepas
57	<i>E. coli</i>	A NALI >=32 CIPRO <= 0,25	Asp87 Tyr	WT	WT	WT	NO	2
50	<i>E. coli</i>	A NALI >=32 CIPRO <= 0,25	Asp87 Gly	WT	WT	WT	NO	2
13	<i>E. coli</i>	A NALI >=32 CIPRO <= 0,25-1	Asp87 Asn	WT	WT	WT	NO	3
16	<i>E. coli</i>	A NALI >=32 CIPRO <= 0,25	Asp87 Gly	Asp 142 Glu	WT	WT	NO	1
112	<i>E. coli</i>	A NALI >=32 CIPRO <= 0,25	Asp87 Tyr	Met 241 Ile	Ser492 Asn	WT	NO	1
12	<i>E. Coli</i>	A NALI >=32 CIPRO <= 0,5	Arg 154 Lys	Asp 208 Glu	Ser358 Ala, Ser366 Thr, Lys 387 Arg, Ala558 Ser, Ala568 Thr	WT	NO	1
56	<i>E. coli</i>	A NALI >=32 CIPRO 1	Ser83 Leu	Ala81 Leu, Ala192 Val	WT	WT	NO	1
126	<i>E. coli</i>	A NALI >=32 CIPRO <= 0,5	Ser83 Leu	Asp 142 Glu	WT	WT	NO	2
71	<i>E. coli</i>	A NALI >=32 CIPRO 1	Ser83 Leu	Glu 84 Gly, Val 144 Met	WT	WT	NO	2
75	<i>E. coli</i>	A NALI >=32 CIPRO <= 0,25	Ser83 Leu	Met 241 Ile	Ser492 Asn	WT	NO	2
76	<i>E. coli</i>	A NALI >=32 CIPRO <= 0,25	Ser83 Leu	Met 241 Ile	WT	WT	NO	1
27	<i>E. coli</i>	A NALI >=32 CIPRO 1	Ser83 Leu	Ser80 Arg	WT	Ile 529 Leu	NO	1
39	<i>E. coli</i>	A NALI >=32 CIPRO <= 0,25	Ser83 Leu	Ser80 Ile	WT	WT	NO	2

Número asignado	Bacteria	CIM	gyrA	parC	gyrB	parE	Plásmidos	Número cepas
89	<i>E. coli</i>	A NALI >=32 CIPRO <= 0,25	Ser83 Leu	Ser80 Arg	WT	WT	NO	1
11	<i>E. coli</i>	A NALI >=32 CIPRO <= 0,25-0,5	Ser83 Leu	WT	WT	Ile 529 Leu	NO	18
123	<i>E. coli</i>	A NALI >=32 CIPRO <= 0,5	Ser83 Leu	WT	WT	Lys 552 Asn, Arg 553 Ala, Lys 554 Arg	NO	1
37	<i>E. coli</i>	A NALI >=32 CIPRO <= 0,25	Ser83 Leu	WT	WT	Gly565 Val, Leu566 Trp	NO	1
10	<i>E. Coli</i>	A NALI >=32 CIPRO 1	Ser83 Leu	WT	WT	Ser458 Ala, Ile529 Leu	NO	2
7	<i>E. coli</i>	A NALI >=32 CIPRO <= 0,25-1	Ser83 Leu	WT	WT	WT	NO	39
52	<i>E. coli</i>	A NALI >=32 CIPRO <= 0,5	WT	Ala192 Val	WT	WT	NO	1
125	<i>E. coli</i>	A NALI >=32 CIPRO <= 0,5	WT	Asp 142 Glu	WT	WT	NO	1
68	<i>E. coli</i>	A NALI >=32 CIPRO <= 0,25	WT	Met 241 Ile	Ser492 Asn	Leu 416 Phe,	NO	1
41	<i>E. coli</i>	A NALI >=32 CIPRO <= 0,25	WT	Val 41 Ala	WT	Ala426 Val	NO	1
34	<i>E. coli</i>	A NALI >=32 CIPRO <= 0,25	WT	WT	WT	Ile 529 Leu	NO	2
33	<i>E. coli</i>	A NALI >=32 CIPRO <= 0,25	WT	WT	WT	WT	NO	3
51	<i>E. coli</i>	A NALI >=32 CIPRO <= 0,25	WT	WT	WT	WT	SI	1
								TOTAL 93

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

Desde la aparición de las primeras fluoroquinolonas de uso urinario, y en especial desde que surgieron las de uso sistémico y sus sucesivas generaciones, este grupo de fármacos ha tenido un desarrollo peculiar. Inicialmente, sus características de espectro, actividad y farmacocinética los colocaron rápidamente como uno de los grupos más utilizados, incluso a menudo en circunstancias y cuadros para los que no eran los más indicados. Estas buenas perspectivas estimularon asimismo la implicación en su desarrollo de buena parte de la industria farmacéutica, con la síntesis de gran número de nuevas moléculas.

Posteriormente, la observación de que muchas de estas moléculas iban teniendo que ser retiradas por diferentes problemas de toxicidad, y el rápido ascenso de resistencia, enfriaron el interés en seguir desarrollando esta familia de modo que, en los últimos 10 años, la aparición de nuevas fluoroquinolonas ha sido escasa. Hay que apuntar, no obstante, que esta no ha sido una circunstancia privativa de las fluoroquinolonas, sino que el escaso interés de la industria en el desarrollo de nuevos antimicrobianos es un problema multifactorial, que afecta a prácticamente todas las familias. Frente a este conflicto, algunas administraciones están adoptando ya medidas decididas, puesto que el desarrollo de nuevas moléculas es uno de los factores fundamentales para enfrentar uno de los grandes retos de la medicina actual, como es la emergencia y difusión de microorganismos multirresistentes.

La resistencia de difusión rápida a los antimicrobianos se había venido asociando clásicamente a los mecanismos de transmisión plasmídica. Se asumía que los mecanismos cromosómicos, y en especial los asociados a mutaciones en la diana del antimicrobiano, eran típicamente mecanismos de instauración lenta, si bien cabía la posibilidad de que, una vez instaurados, sufrieran una diseminación clonal que podía ser más rápida, tal como ocurrió, por ejemplo, con la resistencia a meticilina en *S. aureus*. Sin embargo, en el caso de las fluoroquinolonas, las cifras de resistencia progresaron velozmente, sobre todo en algunas especies como *E. coli*, sin necesidad de sufrir esta difusión clonal. Jugaron a favor de ello una serie de circunstancias como la necesidad de un número relativamente pequeño de mutaciones para generar resistencia clínica, su amplísimo uso, a dosis con frecuencia inadecuadas, y la utilización de fármacos de esta familia en otros ámbitos (veterinaria, nutrición animal...), que probablemente generaron una bolsa importante de microorganismos ambientales con algún nivel de resistencia, que facilitaban la rápida emergencia de resistencia clínica cuando llegaban al hombre.

La descripción de los primeros mecanismos de resistencia a fluoroquinolonas de transmisión plasmídica (Martínez- Martínez et al., 1998) supuso un impacto importante, ya que demostraba la posibilidad de transmisión horizontal de factores de resistencia que afectaban a esta familia. Diversos estudios mostraron que se trataba de mecanismos con prevalencia relativamente altas, en torno al 10%, en algunas áreas fundamentalmente de Extremo Oriente (Strahilevitz et al., 2009) Sin embargo, rápidamente se demostró también que estos mecanismos tenían una escasa repercusión en la generación y difusión de resistencia de

manera directa, ya que la práctica totalidad de los aislamientos con resistencia clínica seguían siendo portadores de las mutaciones ya conocidas en los genes codificadores de las topoisomerasas. Eran excepcionales los microorganismos en que se pudiera demostrar la presencia de resistencia clínica a fluoroquinolonas asociada solamente a mecanismos plasmídicos.

Posteriormente se ha demostrado que, si bien es infrecuente que la presencia de un solo mecanismo plasmídico genere resistencia clínica a fluoroquinolonas, la combinación de dos de ellos sí que puede condicionarla (Albert et al, 2014). No obstante, ésta sigue siendo una circunstancia rara, que sería responsable de un porcentaje muy bajo de las resistencias.

Sin embargo, se ha sugerido que la presencia de estos mecanismos plasmídicos podía actuar facilitando la selección de mutantes cromosómicos, de modo que la aparición de resistencia clínica a través de los mecanismos convencionales sería más frecuente en cepas portadoras de mecanismos plasmídicos de resistencia que en cepas que no lo fueran (Kim et al., 2014).

Estos mecanismos generarían unas CIMs de fluoroquinolonas “basales”, es decir, en ausencia de mutaciones en las topoisomerasas, superiores a la de las cepas silvestres, aunque incluidas todavía en el intervalo de sensibilidad. Ello generaría una ventana de selección de resistencias que les permitiría, en las condiciones originadas cuando el fármaco se usa a concentraciones subterapéuticas, en infecciones localizadas en lugares con mala penetración del antimicrobiano o cuando se

usan estos como complemento alimentario en animales, producir resistencia de mayor nivel con relativa facilidad.

No obstante, desde el punto de vista teórico, cabe la posibilidad de que el efecto sea el contrario. Puesto que la presencia de mecanismos de resistencia plasmídicos originaría un fenotipo de resistencia, similar al producido por una primera mutación convencional (habitualmente en *gyrA*, en el caso de Gram negativos), la consecuencia podría ser que, mientras en poblaciones silvestres la presencia de una primera mutación en las topoisomerasas confiere una ventaja selectiva con respecto al resto de la población, siempre que se dan las condiciones de concentración de antibiótico adecuadas, en poblaciones portadoras de mecanismos plasmídicos esta ventaja podría no existir. La presencia de una primera mutación cromosómica no conferiría ventajas, ya que no incrementaría la CIM con respecto al conjunto de la población, y por tanto no se seleccionaría, con lo que sería mucho más complicado que actuase como base para la selección de un mutante de segundo escalón.

En estas circunstancias, probablemente se esté produciendo un proceso de diversificación de las cepas a partir de las que se genera la resistencia clínica. Inicialmente, esta surgía de dos formas:

- a lo largo del tratamiento, como consecuencia primero de la selección de mutantes de primer nivel (habitualmente mutantes *gyrA* en Gram negativos y *parC* en Gram positivos) resistentes a quinolonas antiguas pero todavía sensibles a fluorquinolonas, y a partir de aquí de mutantes de segundo nivel, ya con resistencia clínica a fluorquinolonas.

- en fases precoces del tratamiento, por la existencia inicial de aislamientos resistentes a quinolonas antiguas (ácido nalidíxico habitualmente) y sensibles a fluoroquinolonas, portadores casi siempre de mutaciones de primer nivel, que rápidamente generaban mutantes de segundo nivel con resistencia clínica a fluoroquinolonas.

Actualmente, es probable que haya que añadir a estas posibilidades la presencia de mecanismos plasmídicos de resistencia, que a efectos de sensibilidad se comportarían como las cepas portadoras de mutaciones de primer nivel, desarrollándose sin problemas a concentraciones bajas de antimicrobiano.

Pero, la mayor parte de los estudios realizados hasta el momento sobre la prevalencia de mecanismos plasmídicos de resistencia a fluoroquinolonas pueden estar sesgados debido a varios factores:

- por una parte, muchos de estos trabajos se han realizado en cepas ya resistentes a fluoroquinolonas. Si bien éste es un dato de interés, ya que en cierto modo refleja en qué medida estos mecanismos pueden estar implicados en la generación de resistencia de alto nivel, no se ha estudiado su prevalencia en esa población de cepas resistentes a ácido nalidíxico, sensibles a ciprofloxacino, que sería el punto crítico para el posterior desarrollo de resistencia clínica.
- en segundo lugar, muchos de estos estudios se han realizado en cepas productoras de BLEEs. Se sabe que estos mecanismos plasmídicos de resistencia a fluoroquinolonas a menudo van dentro de

elementos genéticos comunes para los genes codificadores de BLEEs, por lo que es previsible que la frecuencia en cepas productoras de BLEEs sea más alta que en el resto de las poblaciones.

Además, puesto que la mayor parte de las investigaciones se han realizado en cepas ya resistentes a fluorquinolonas, tampoco existen muchos datos sobre cómo y con qué grado de facilidad evolucionan estas cepas hacia la resistencia de alto nivel en comparación con la evolución de base exclusivamente cromosómica.

El primer dato de interés de nuestros resultados es que la prevalencia de mecanismos plasmídicos de resistencia a fluorquinolonas como responsables del fenotipo crítico en la selección de resistencias de alto nivel, resistencia a ácido nalidíxico/sensibilidad a ciprofloxacino, es muy baja, apenas superior al 1%. Estudios previos en nuestra área sitúan la presencia de mecanismos plasmídicos de resistencia en aproximadamente un 30% de las enterobacterias resistentes a fluorquinolonas y portadoras de BLEEs (Lavilla et al., 2008) (Cano et al., 2009) y en un 3-5% en no portadoras (Albert 2014). Por tanto, parecen corroborarse los trabajos anteriores que sugieren que la presencia de estos mecanismos plasmídicos sería un factor favorecedor en la selección de resistencia de alto nivel, incluso en ausencia del factor de sesgo de su asociación a producción de BLEEs antes citado, ya en que ninguna de las cepas incluidas en este estudio se daba esa circunstancia.

La presencia de un gen *qnrS* en la única cepa detectada portadora de factores plasmídicos de resistencia no permite extraer conclusiones en

lo relativo a frecuencia. En otros estudios realizados en España se refiere como gen más frecuente asociado a resistencia plasmídica a fluoroquinolonas a *aac(6')-Ib-cr*, (Albert et al, 2014), *qnrA* (Lavilla et al., 2008) y *qnrS* (Cano et al., 2009).

El hecho de que no presente mutación alguna en ninguna de las cuatro subunidades de las topoisomerasas permite asociar este nivel de resistencia al gen plasmídico detectado, ya que por otra parte el nivel de CIMs es similar al que otros estudios asocian a la presencia de este gen (Albert et al., 2014).

Como era de esperar, la mayor parte de las cepas con este perfil de sensibilidad y mutaciones en las topoisomerasas presentan una mutación en la QRDR de *gyrA*. Éste ha sido el perfil genético que clásicamente se ha venido asociando al fenotipo de sensibilidad a ciprofloxacino/resistencia a ácido nalidíxico (Willmott et al., 1993) (Vila et al., 1994) (Heisig et al., 1994). De hecho, la presencia previsible de estas características genéticas como fundamento de dicho fenotipo, es lo que se ha aducido habitualmente para desaconsejar el uso de fluoroquinolonas en estos aislamientos, ya que facilitarían la selección de mutantes de segundo nivel.

Como también se ha venido describiendo habitualmente, estas mutaciones en la QRDR de *gyrA* están sujetas, en general, a escasas variaciones. La QRDR de *gyrA* se considera el fragmento comprendido entre los aminoácidos 67 y 106, dentro del núcleo catalítico del enzima, situado en el extremo N-terminal, entre los aminoácidos 1 y 502. En casi todos los estudios se refleja que, en la gran mayoría de los casos, las

posiciones mutadas son Ser83, con un cambio prácticamente sistemático a Leu (lo que implica un cambio de un aminoácido pequeño y polar a uno de mayor tamaño e hidrofóbico), y Asp87, en el que el cambio es más variable, aunque siempre a aminoácidos con polaridad o tamaño distintos, que es lo que explica la reducción de afinidad por la topoisomerasa y el incremento de las CIMs (Yoshida et al., 1990) (Nam et al., 2013). Se sabe que las mutaciones en estas dos localizaciones son mucho más frecuentes en aislamientos clínicos, probablemente porque generan niveles de resistencia mayores que otras mutaciones (Yoshida et al., 1990). No obstante, incluso dentro de estas dos localizaciones las diferentes mutaciones generan diferencias moderadas en las CIMs. Así, algunos autores afirman que las mutaciones en Ser83, y la mutación Asp87 Asn, que implica el cambio de un aminoácido cargado a uno no cargado, de las que no aparece ninguna en este estudio, generan CIMs de ciprofloxacino de 0,2-0,5 mg/L, mientras las mutaciones Asp87T yr y Asp87 Gly se asocian a CIMs de ciprofloxacino más bajas (0.06 mg/L). (Sáenz et al., 2003). Incluso dentro de las cepas portadoras de alteraciones en Ser83 en *gyrA*, también se ha descrito que las mutaciones Ser83 Leu, que aparecen en todos nuestros aislamientos en los que hay cambios en Ser83, generan niveles de CIM discretamente superiores a los generados por las mutaciones Ser83 Ala (Tavio et al., 1999). Solamente un trabajo reciente (Nawaz et al., 2015) muestra una amplia heterogeneidad de mutaciones en *gyrA* en *Escherichia coli* con alto nivel de resistencia a fluoroquinolonas, con un cúmulo de numerosos cambios en *gyrA*, incluso en ausencia de mutaciones en *parC*. Este estudio describe cepas con hasta cinco mutaciones en *gyrA* en ausencia de mutaciones en *parC*, la mayor parte de ellas externas además a la QRDR (Ser83 Ile, Ile112 Val, Leu127 Met, Ala128 Ser, Lys154 Arg).

En nuestro estudio, las cepas con el perfil clásico (mutación simple en *gyrA* en ausencia de mutaciones en otras localizaciones) apenas suponen un 50% del total. El resto son, en su mayor parte, aislamientos que acumulan un mayor número de alteraciones, algunas de ellas incluso sin seguir la cadencia de mutaciones que se consideraba prácticamente obligada. Este hecho contrasta con los resultados de otras investigaciones. El estudio publicado en 2003 por Sáenz et al. muestra cómo, entre 59 aislamientos de *E. coli* con CIM de ácido nalidíxico ≥ 32 mg/L y CIM de ciprofloxacino ≤ 1 mg/L, el 89,8% mostraba mutaciones sólo en *gyrA*, frente al 50% observado en nuestro estudio. Sin embargo, las mutaciones descritas son similares. En nuestros aislamientos aparecen cambios Ser83 Leu (mayoritario), Asp87 Tyr, Asp87 Gly y Asp87 Asn, al igual que en el estudio de Sáenz, mientras en ese trabajo aparece un cambio Ser83 Ala en una sola cepa, que no aparece en las muestras. Sin embargo, el 10% restante de los aislamientos muestra una doble mutación *gyrA/parC*, situada en las localizaciones más habituales (Ser83 Leu en *gyrA*, Ser80 Arg o Ser80 Ile en *parC*). Hay que tener en cuenta que, en el trabajo de Saézn et al., 2003, no se determinan mutaciones en las subunidades B, con lo que no se puede valorar la posible heterogeneidad genética existente en *gyrB* y *parE*.

En torno al 15% de nuestros aislamientos presentan también mutaciones en *gyrA* y *parC*. Este sería el tipo de perfil de mutaciones que se podría esperar encontrar en aislamientos con resistencia de alto nivel a ácido nalidíxico, y CIMs ya en torno a 1-2 mg/L de ciprofloxacino. De hecho, en el estudio ya mencionado de Sáenz, los aislamientos con una doble mutación *gyrA/parC* se sitúan en un intervalo de CIMs de 0,5-4 mg/L, y en

general se acepta que sólo los aislamientos con CIMs de ciprofloxacino a partir de 0,5 mg/L son portadores de mutaciones en *parC* (Hopkins et al., 2005). Es cierto que en el estudio de Sáenz, como en la mayor parte de los trabajos publicados (Nam et al., 2013) los aislamientos con doble mutación *gyrA/parC* y resistencia a ciprofloxacino tienen un perfil de mutaciones bastante uniforme, con mutaciones en Ser83 o Asp87 en *gyrA* y en Ser80 (excepcionalmente en Glu84) en *parC* mientras que, en los aislamientos observados en nuestro trabajo las mutaciones aparecen con frecuencia en otras localizaciones, en las que probablemente la repercusión sobre la afinidad entre las fluoroquinolonas y la topoisomerasa sea menor. (Vila et al. 1996) (Giraud et al. 2001).

En nuestro caso, las mutaciones en *gyrA* de estos aislamientos sí se suelen corresponder con las habitualmente asociadas a resistencia a fluoroquinolonas, mientras que son las de *parC* las que suelen aparecer en posiciones atípicas. En el caso de *parC*, la QRDR se sitúa entre las posiciones 64 y 104, situadas asimismo en el extremo aminoterminal, dentro del núcleo activo del enzima que abarca desde la posición 1 a la 471. Así, mientras que las mutaciones en *gyrA* se ciñen siempre a Ser83 o Asp87, las mutaciones en *parC* aparecen con frecuencia en posiciones externas a la QRDR (Asp142, Val144, Ala192, Asp208, Met241). Incluso en los aislamientos en los que aparecen cambios en la QRDR, se trata de mutaciones que han sido asociadas a resistencia infrecuentemente (Glu84 Gly). Ha de tenerse en cuenta que en la generación de resistencia a fluoroquinolonas asociada a mutaciones, son determinantes tanto la localización como el tipo de mutación. La localización es crucial, en cuanto que tiene que afectar a un aminoácido clave en la interacción entre el

fármaco y el complejo DNA-topoisomerasa, pero ese cambio debe implicar además una diferencia importante en las características de tamaño y polaridad entre el aminoácido original y el derivado de la mutación (Vila et al. 1996) (Giraud et al. 2001).

Sin embargo, en dos casos sucede que aislamientos con una combinación de mutaciones asociada de manera característica a niveles de resistencia ya clínicamente significativos (Ser83 Leu en *gyrA* más Ser80 Ile ó Ser80 Arg en *parC*), mantienen CIMs de ciprofloxacino $\leq 0,25$ mg/L.

Se trata de un perfil de mutaciones insólito en trabajos previos para cepas con CIMs de ciprofloxacino $\leq 0,25$ mg/L. Debe de considerarse no obstante que, en los estudios de resistencia convencionales, en especial en los de selección *in vitro*, al seleccionarse las cepas potencialmente portadoras de mutaciones sobre la base de incrementos de la CIM de al menos 4 veces sobre la de la original, estos mutantes habrían fácilmente pasado desapercibidos, por lo que su frecuencia entre los aislamientos con CIMs de ciprofloxacino $\leq 0,25$ mg/L podría estar infravalorada.

En todo caso, esto plantea otra reflexión interesante sobre la heterogeneidad en los niveles de CIM de ciprofloxacino en aislamientos con este perfil, que según los resultados del nuestro y otros estudios puede oscilar entre $\leq 0,25$ mg/L y 4 mg/L, y que obliga a plantearse la implicación de otras circunstancias que influyan en los niveles de CIM.

También es llamativa la existencia de aislamientos que acumulan varias condiciones atípicas en relación con los genes *gyrA* y *parC*. Se

observan dos aislamientos que, pese a su baja CIM frente a ciprofloxacino, acumulan una de las mutaciones habituales en *gyrA* (Ser83 Leu), y dos mutaciones en *parC*, lo cual resulta extraño, por una parte, por el hecho de que cepas con mutaciones simultáneas en *gyrA* y *parC* se mantengan sensibles a ciprofloxacino, y por otra, porque estas cepas salten la dinámica habitual de selección alterna de mutaciones en las dos subunidades A.

Es cierto que, en los dos aislamientos, las mutaciones que aparecen en *parC* no están entre las habituales en cepas resistentes. En ambas cepas se acumula una mutación que, pese a encontrarse de lleno dentro de la QRDR, no se ha descrito asociada a resistencia (Ala81 Leu), o se ha descrito infrecuentemente (Glu84 Gly) y una mutación alejada de la QRDR (Val144 Met, Ala192 Val). En este caso, pese a tratarse de una circunstancia muy infrecuentemente descrita, siempre cabe la posibilidad de que se trate de mutaciones que bien por su situación, bien por el tipo de cambio de aminoácidos, o por ambos factores no condicionen reducción significativa de la afinidad de las subunidades A de la topoisomerasa IV por la fluoroquinolonas, en cuyo caso, a efectos de resistencia, se comportarían como un mutante *gyrA* convencional.

No obstante, hay otro dato observado que obliga a cuestionar esta hipótesis. En otros cuatro aislamientos, existen mutaciones en *parC*, en ausencia de cambios en *gyrA*, que condicionan un comportamiento semejante. En dos de estos aislamientos se podría achacar este comportamiento a la presencia de mutaciones adicionales en *gyrB* y en *parE*, pero en dos aislamientos se observa solamente la presencia de una mutación en *parC* en ausencia de otros cambios en otras subunidades de

las topoisomerasas II o IV. Se trata además de aislamientos con mutaciones en *parC* idénticas a las referidas anteriormente (Ala192 Val) o muy próximas a ellas (Asp142 Glu), y que se encuentran además entre las que se observan con mayor frecuencia en dobles mutantes *gyrA/parC* con comportamiento de sensibilidad atípico (Ala192 Val, Asp142 Glu, Met24 Ile).

Por tanto habría que admitir que, o bien la presencia de estas mutaciones está condicionando resistencia a ácido nalidíxico en ausencia de alteraciones en *gyrA*, o bien que el perfil de mutaciones es accesorio en estos casos y que posiblemente exista un tercer factor, probablemente relacionado con la concentración intracelular del antimicrobiano, que sería determinante para el nivel de sensibilidad. La primera premisa contraviene la teoría aceptada que postula que mientras no existan mutaciones significativas en *gyrA*, si hablamos de bacterias Gram negativas, la sensibilidad de dicha subunidad es la que determina el nivel de sensibilidad del microorganismo (Heisig, 1996) (Ouabdesselam et al., 1995).

En este sentido, publicaciones anteriores han incidido sobre esta posibilidad (Hopkins et al., 2005), pero existen pocos datos fehacientes sobre su papel real tanto en la emergencia de resistencia como en el condicionamiento o la influencia en resistencias de alto nivel.

En relación con este hallazgo, Nawaz et al., 2015) encuentran una serie de aislamientos con sensibilidad similar a los incluidos en el nuestro, (CIM de ácido nalidíxico 512 mg/L, CIM de ciprofloxacino 0,5 mg/L) que son portadoras de una doble mutación en *parC* (Ser80I le, Glu84 Gly) en ausencia de mutaciones en *gyrA*

Como ya se ha comentado anteriormente, la práctica totalidad de los estudios de selección de resistencia se han realizado clásicamente por siembra en concentraciones de antibiótico al menos 4 veces superiores a las de la cepa original. De este modo, mutaciones que no condicionasen este incremento de CIM no se seleccionarían y pasarían, por tanto, desapercibidas. En estas condiciones, es probable que las poblaciones sean relativamente heterogéneas de forma natural, y la idea consensuada de que las mutaciones aparecen en las cepas resistentes se halle sesgada por el método de selección utilizado.

También es cierto que en muchos trabajos se secuencian sólo las QRDR, y no el gen completo, con lo que la prevalencia de mutaciones externas a las QRDRs es poco conocida.

A favor de que elementos ajenos a la presencia de mutaciones y de mecanismos de resistencia plasmídicos estén asociados a la resistencia a fluoroquinolonas, sobre todo en estos primeros estadios, está el hecho de que, en tres aislamientos, no se observe mutación alguna en la diferentes subunidades de las topoisomerasas II y IV, pese a lo cual se observan CIMs de ácido nalidíxico superiores a 32 mg/L.

Otra aspecto peculiar es que mutaciones con aparente escasa repercusión en la resistencia tienden a aparecer de forma repetitiva. Lo vemos en cepas que acumulan una mutación de repercusión contrastada, como Ser83 Leu en *gyrA* y alguna de las referidas en *parC*, pero muestran CIMs poco elevadas. Así, Ala192 Val aparece en una cepa sin mutaciones en ninguna otra localización, y también combinada con otra mutación en

parC y *gyrA*, y otras dos mutaciones, Asp142 Glu y Met241 Ile, aparecen en cepas sin mutación alguna en *gyrA*, pero también en cepas con mutaciones en Ser83 en *gyrA*.

Se confirma con respecto a estudios previos (Nam et al., 2013) (Albert et al., 2014), incluso aunque se trate de investigaciones sobre cepas con alto nivel de resistencia, la baja prevalencia de mutaciones en la subunidad B de la topoisomerasa II (*gyrB*).

En *gyrB* se han identificado básicamente dos localizaciones asociadas a incremento de resistencia a fluoroquinolonas: Asp426 y Lys 447, y en general se considera que el área fundamental en cuanto a aparición de mutaciones asociadas a resistencias a fluoroquinolonas se sitúa entre las posiciones 423 y 449, inmediatamente por fuera del núcleo catalítico del enzima, que en este caso abarca de las posiciones 448 a la 804, en el extremo carboxi-terminal. (Yamagishi et al., 1986) (Yamagishi et al, 1981). La primera de ellas aumenta el nivel de resistencia a todas las fluoroquinolonas, mientras que la segunda da lugar a resistencia a ácido nalidíxico pero genera hipersensibilidad a quinolonas anfóteras como ciprofloxacino.

En nuestro estudio sólo se observaron mutaciones en *gyrB* en cuatro aislamientos, siempre superpuestas a mutaciones en subunidades A. La mutación más frecuente, Ser492 Asn, se sitúa externa a este área, y ya dentro del núcleo catalítico, y supone el cambio de un aminoácido polar y pequeño o otro también polar, pero de mayor tamaño. Aparece en tres aislamientos, en dos de ellos combinada con mutaciones en *gyrA* y *parC* y

en uno con mutaciones en *parC* y *parE*. En un aislamiento aparecen combinadas 5 mutaciones en *gyrB*. Se trata de un hecho completamente insólito, en cuanto que presenta mutaciones ajenas a la QRDR tanto en *gyrA* (Arg154Lys) como en *parC* (Asp 208Glu), y combina con ellas hasta cinco mutaciones entre la posición 358 y la 568 del gen *gyrB*, pero todas ellas externas a la zona de concentración de resistencias. La mutación Arg158 Lys en *gyrA* se ha descrito asociada a resistencia a fluoroquinolonas (Nawaz et al., 2015)), pero no así el resto.

Un reciente trabajo en *Salmonella* muestra que todas las cepas resistentes aisladas mostraban las mutaciones convencionales (Ser83, Asp87 en *gyrA*, Ser80 en *parC*). Todas presentaban una doble mutación en *gyrA* y *parC*, o triple (dos mutaciones en *gyrA*, una en *parC*), generando CIMs de ciprofloxacino de 2 y 4 mg/L respectivamente. Ninguna de ellas presentaba sin embargo mutaciones en *gyrB* ni *parE*. (Lu et al., 2015). Otro estudio publicado este año corrobora la infrecuencia de las mutaciones en *gyrB*, y describe, junto a las mutaciones convencionales, otros cambios en *gyrA* (no así en *parC*), tanto dentro como fuera de la QRDR (Ser83, Asp87, Arg68, Ile112, Leu127, Ala128, Lys154) (Nawaz et al., 2015). Sorprendentemente, esta última (Lys 154 Arg) es la única mutación atípica que se encuentra en *gyrA* en nuestros aislamientos, mientras la mayor parte de los cambios inusuales, en nuestras cepas, están en *parC*. Otro estudio realizado en nuestro medio y ya mencionado (Albert et al., 2014), muestra asimismo la baja frecuencia de las mutaciones en *gyrB*. El estudio de Nam (Nam et al., 2013) muestra también una baja frecuencia de mutaciones en *gyrB*. Ninguna de las mutaciones descritas en este estudio (Ser359 Ala,

Ser367 Thr, Glu466 Asp) se corresponde con las inicialmente descritas asociadas a resistencia, ni con las observadas en nuestra investigación.

La zona donde aparecen un mayor número de mutaciones asociadas a resistencia se concentra, en el caso de *parE*, entre las posiciones 417 y 443, en la zona del núcleo activo del enzima (posiciones 405 a 630) más próxima al extremo amino-terminal.

Sin embargo, en cerca de la mitad de las cepas secuenciadas por Nawaz aparece una mutación Asp476 Asn en *parE*, asociada a mutaciones en *gyrA* o en *gyrA* y *parC*. En nuestro estudio, las mutaciones en *parE* son algo menos frecuentes, ya que se observan en alrededor del 30% de las cepas, pero más heterogéneas. La mutación Asp476 Asn, que aparece en todas las cepas del estudio de Nawaz, no lo hace en las nuestras; por el contrario, en nuestro caso la mutación más frecuente en *parE* es Ile529 Leu, que se observa en 23 aislamientos, combinada con mutaciones en *gyrA*, *parC* o con otros cambios en *parE*. Solamente en dos casos aparecen aisladas, con CIMs de >32 mg/L frente a ácido nalidíxico y <0,25 mg/l frente a ciprofloxacino. Sí es cierto que aunque las alteraciones observadas en *parE* son bastante heterogéneas, la mayor parte de ellas afectan a dos zonas relativamente pequeñas de la secuencia, una situada ente los aminoácidos 416 y 458, y otra entre las posiciones 529 y 566.

De entre las mutaciones que hemos observado en *parE*, las mutaciones Leu416 Phe (Fendukly et al., 2003) Ser458 Ala y sobre todo Ile529 Leu (Komp et al., 2003) han sido previamente descritas asociadas a resistencia a fluoroquinolonas.

Hallazgos iniciales sugirieron que las mutaciones en *parE* requerían mutaciones adicionales en *gyrA* para generar resistencia a fluoroquinolonas (Soussy et al., 1993). Estudios dirigidos al equivalente en *parE* a las posiciones de *gyrB*, cuyas mutaciones estaban más claramente asociadas a resistencia a fluoroquinolonas (Asp420 y Lys441, posiciones homólogas a Asp426 y Lys447 en *gyrB*) no encontraron cambio alguno en ellas, por lo que dedujeron que la participación de *parE* en la resistencia a fluoroquinolonas era insignificante (Ruiz et al., 1997).

Otros trabajos tampoco encuentran mutaciones en *parE* asociadas a resistencia a fluoroquinolonas (Everett et al., 1996) (Giraud et al., 2001) (Bachoual et al., 1998).

Sin embargo, ya en 1997 se describe la primera mutación localizada en *parE* (nfxD) (Breines et al., 1997). La sustitución fue identificada como Leu445 His, y da lugar a un cambio de carga neutra a carga positiva, lo que puede condicionar resistencia al repeler grupos también cargados positivamente, como es por ejemplo el grupo 6-piperacina presente en numerosas fluoroquinolonas. Se trata de una mutación que no aparece en ninguna de las cepas del presente estudio, aunque sí aparecen varias mutaciones en la misma región (Leu416 Ala, Ala426 Val, Ser458 Ala), siempre asociadas a cambios en otras subunidades, pero en algunos casos asociadas a alteraciones de dudosa trascendencia como *parC* Val41 Ala.

Posteriormente se han ido describiendo nuevas mutaciones en *parE* potencialmente asociadas a resistencia a fluoroquinolonas (Leu416 Phe, Ile444P he, Ser458 Thr, Glu460 Asp, Ile464 Phe, Asp475 Glu, Ile529 Leu)

(Komp et al., 2003) (Fendukly et al., 2003). Como en una parte importante de los aislamientos de nuestro estudio, muchas de estas mutaciones se sitúan en el entorno de la posición 450.

El estudio de Nam (Nam et al., 2013) detecta asimismo mutaciones en más del 50% de los aislamientos de *E. coli* resistentes a fluoroquinolonas. Del mismo modo encuentra cambios en el entorno de la posición 450 (Leu416, Leu445, Ser458, Asp463, Ile464), entre las que predomina claramente la posición Leu416, ya que el 40% de los aislamientos mostraban un cambio Leu416 Phe el cual sin embargo sólo aparece en una de nuestras cepas. La segunda mutación en frecuencia en *parE*, en el trabajo de Nam, es el cambio Ile529 Leu, que es claramente predominante entre nuestros aislamientos.

Otra investigación realizada en nuestra área, aunque con cepas portadoras de resistencia plasmídica a fluoroquinolonas (Albert et al., 2014), no detecta mutaciones en *parE* en *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* ni *Salmonella enterica*, pero sí las detecta en cambio en más del 50% de los aislamientos de *E. coli*. Todos los cambios en *parE* coinciden con mutaciones observadas en el presente estudio (Leu416 Phe, Ser458 Ala, Ile529 Leu), y también, como en nuestro caso, predominó la mutación Ile529 Leu.

Un factor que no ha sido estudiado en este trabajo, pero que también hay que considerar, es la posible influencia de la bombas de expulsión en la resistencia a fluoroquinolonas, que ha ido ganando interés con el tiempo. Ya se había descrito hace 20 años que la sobreexpresión del

locus *mar* podía condicionar resistencia a fluoroquinolonas con independencia de la presencia de mutaciones en las topoisomerasas (Goldman et al., 1996).

Ha de tenerse en cuenta que *mar* es uno de los mayores regulones conocidos en *E. coli*, ya que controla la expresión de más de 60 genes cromosómicos (Barbosa et al, 2000). Uno de los genes regulados por la expresión de *mar* es *acrAB*, una bomba de expulsión inducida por situaciones de *stress*. Un estudio publicado en 2000 demostraba que 9 de 10 aislamientos de *E. coli* con alto nivel de resistencia a fluoroquinolonas sobreexpresaban *marA* (Mazzariol et al., 2000).

También publicado en 2000, otro trabajo (Oethinger et al., 2000) mostraba cómo la presencia de mutaciones en las topoisomerasas no era suficiente para condicionar resistencia a fluoroquinolonas en cepas con delección del gen *acrAB*, y en un estudio más reciente, publicado en 2012, se expone que, ante un tratamiento con levofloxacino, lo primero que aparece en *E. coli*, en torno a las 24 horas, es una sobreexpresión de la bomba de expulsión *acrAB*, que genera una elevación de la CIM de 2-8 veces respecto a la CIM original. Posteriormente, en torno a las 120 horas aparecen mutaciones en las topoisomerasas que condicionan mayores elevaciones en la CIM, para finalmente desaparecer la sobreexpresión de la bomba de expulsión en torno a las 240 horas. Estos mismos autores demuestran que la delección del gen *acrAB* retrasa la aparición de mutaciones en las topoisomerasas con respecto a la cepa silvestre (Singh et al., 2012). No obstante, otro estudio reciente demuestra que la presencia de bombas de expulsión no sería tan trascendente como la presencia de mutaciones en las

topoisomerasas para el nivel de resistencia a fluoroquinolonas (Shigemura et al. 2012). Todos estos datos vienen a sugerir que, aunque la hiperexpresión de bombas de expulsión no es capaz, por sí misma, de condicionar resistencia de alto nivel a fluoroquinolonas, es un factor fundamental para que estas resistencias puedan emerger.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

1. En nuestro medio, la prevalencia de mecanismos plasmídicos de resistencia a fluoroquinolonas en aislamientos clínicos de *Escherichia coli* resistentes a ácido nalidíxico y sensibles a fluoroquinolonas es baja, en torno al 1%.

2. Aproximadamente un 50% de los microorganismos con estas características de sensibilidad, presentan una única mutación en la QRDR de *gyrA* (Ser83 Leu, Asp87 Tyr/Gly/Asn), con una CIM de ácido nalidíxico >32 mg/L y una CIM de ciprofloxacino entre $\leq 0,25$ mg/L y 1 mg/L, frente a cerca del 90% encontrado en otros estudios en cepas con fenotipos de sensibilidad similares.

3. La otra mitad de los aislamientos presentan perfiles atípicos como consecuencia de combinaciones de mutaciones inusuales, de la localización asimismo infrecuente de éstas o de la completa ausencia de cambios en los genes codificadores de las topoisomerasas y de mecanismos de resistencia de transmisión plasmídica.

4. Menos de un 10% presentan la doble mutación *gyrA/parC* característica de cepas de *E. coli* con CIMs de ciprofloxacino en torno a 1-2 mg/L. De ellas, menos de la tercera parte muestran una combinación de mutaciones típica (*gyrA* Ser83 Leu, *gyrA* Asp87 Tyr/

Gly/Asn, *parC* Ser80I le/Arg), y todas ellas muestran sin embargo CIMs de ciprofloxacino $\leq 0,25$ mg/L. El resto muestran mutaciones comunes en *gyrA* (Ser83 Leu, Asp87 Gly) pero infrecuentes en cuanto a su localización, algunas de ellas no descritas previamente, en *parC* (Asp142 Glu, Met241 Ile), con CIMs de ciprofloxacino, en todos los casos, $\leq 0,25$ mg/L.

5. En torno a un 5% de los aislamientos presentan mutaciones sólo en los genes codificadores de las subunidades A, pero con una distribución inusual por presentar cambios en *parC* en ausencia de alteraciones en *gyrA*, o por presentar mayor número de mutaciones en *parC* que en *gyrA*. En todas ellas se sigue el mismo patrón expuesto en el punto anterior en cuanto a que, cuando existen mutaciones en *gyrA*, son mutaciones de las más habituales (Ser83 Leu), mientras que las que aparecen en *parC* son siempre mutaciones de localización atípica, e infrecuentemente descritas o no descritas en absoluto en asociación con resistencia a quinolonas (Ala81 Leu, Glu84 Gly, Asp142 Glu, Val144 Met, Ala192 Val). Sin embargo, no parece que se trate de un hecho puramente aleatorio, ya que varias de estas mutaciones se repiten con relativa frecuencia en aislamientos con otros perfiles de mutación.

6. Una tercera parte de los aislamientos presentan mutaciones en las subunidades B.

7. Las mutaciones en *gyrB* son raras (5,4% de los aislamientos) y aparecen siempre en localizaciones atípicas y asociadas a cambios

en otras subunidades. La mutación predominante fue Ser492 Asn, no descrita previamente en *gyrB* en asociación con resistencia a las fluoroquinolonas.

8. Las mutaciones en *parE* aparecen con una frecuencia mucho mayor (29% de los aislamientos), y lo hacen preferentemente asociadas a alteraciones en otras subunidades. En la mayor parte de los casos se trata de mutaciones previamente descritas asociadas a resistencia a fluoroquinolonas, entre ellas destaca Ile529 Leu, presente en el 85,2% de los aislamientos portadores de mutaciones en *parE*.

9. Un 3,2% de las cepas no tenían mutación alguna en ninguna de la 4 subunidades de las topoisomerasas, lo que refuerza las teorías expuestas por otros autores de que problemas de permeabilidad o más probablemente bombas de expulsión tengan un papel en la generación de estos niveles iniciales de resistencia.

10. Se requieren estudios adicionales que establezcan por una parte el papel de la sobreexpresión de bombas de expulsión en el nivel de resistencia de estos aislamientos, y que determinen por otra el potencial de todo el grupo portador de mutaciones atípicas cualitativa o cuantitativamente para generar mutantes con alto nivel de resistencia a fluoroquinolonas.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- ✓ Adembri C, Novelli A. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Parameters of Antimicrobials. *Clin Pharmacokinet.* 2009; 48 (8): 517-528.
- ✓ Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Informes mensuales de la AEMPS. Diciembre 2010. www.aemps.gob.es/informa/boletinMensual/2010/diciembre/informe-medicamentos.htm.
- ✓ Ahmed A, Daneshtalab M. Nonclassical Biological Activities of Quinolone Derivatives. *J Pharm Pharmaceut Sci* 2012; 15 (1): 52-72 (www.cspsCanada.org).
- ✓ Albert M, Yagüe G, Fernández M, Viñuela L, Segovia M, Muñoz JL. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in extended-spectrum β -lactamase producing and non-producing enterobacteria in Spain. *Int J Antimicrob Agents* 2014; 43 (4): 390-1. doi: 10.1016/j.ijantimicag.
- ✓ Aldred Kj, MacPherson SA, Turnbough Jr CL, Kerns RJ, Osheroff N. Topoisomerase IV- quinolone interactions are mediated through a water-metal ion bridge: mechanistic basis of quinolone resistance. *Nucleic Acids Res.* 2013; 41 (8): 4628-4639. doi: 10.1093/nar/gkt124.
- ✓ Alós JI. Quinolonas. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2009; 27(5): 250-257.

- ✓ American Thoracic Society Documents. Guidelines for The Management of Adults with Hospital-acquired, Ventilator-associated, and Healthcare-associated Pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005; 171: 388-416.
- ✓ Anderson A C, Schiffer C, Pollastri M, Peet N P. The challenge of developing robust drugs to overcome resistance. *Drug Discov Today.* 2011; 16 (17-18): 755-761.
- ✓ Andriole VT. The Quinolones: Past, Present and Future. *Clin Infect Dis.* 2005; 41:S113-119.
- ✓ Appelbaum PC, Hunter PA. The fluorquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. *Int J Antimicrob Agents.* 2000; 16: 5-15.
- ✓ Bachoual R, Tankovic J, Sossy CJ. Analysis of the mutations involved in fluoroquinolone resistance of *in vivo* and *in vitro* mutants of *Escherichia coli*. *Micro Drug Resist.* 1998; 4 (4): 271-276
- ✓ Barberán J. Farmacodinamia como predictor de eficacia : la visión del clínico. *Rev Esp Quimioterap* 2005; 18 (1): 63-64.
- ✓ Barbosa TM, Levy SB. Differential expression of over 60 chromosomal genes in *Escherichia coli* by constitutive expression of MarA. *J Bacteriol.* 2000; 182 (12): 3467- 3474.
- ✓ Beteck RM, Smit FJ, Haynes RK, N'Da DD. Recent progress in the development of anti-malarial quinolones. *Malr J.* 2014; 13:339 doi: 10.1186/1475-2875-13-339

- ✓ Bignell C, Unemo M. 2012 European guideline on the diagnosis and treatment of gonorrhoea in adults. 2013; <http://std.sagepub.com/content/24/2/85>.

- ✓ <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>

- ✓ Bradley JS, Byington CL, Shah SS, Alverson B, Carter ER, Harrison C. et al. The Management of Community- Acquired Pneumonia in Infants and Children Older Than 3 Months of Age: Clinical Practice Guidelines by the Pediatric Infectious Diseases Society and the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis 2011; doi: 10.1093/cid/cir531.

- ✓ Bratzler DW, Dellinger EP, Olsen KM, Perl TM, Auwaerter PG, Bolon MK, et al. Clinical practice guidelines for antimicrobial profilaxis in surgery. Am J Health-Syst Pharm. 2013; 70: 195-283.

- ✓ Breines DM, Ouabdesselam S, Ng EY, Tankovic J, Shah S, Soousy CJ et al. Quinolone resistance locus *nfxD* of *Escherichia coli* is a mutant allele of the *parE* gene encoding a subunit of topoisomerase IV. Antimicrob Agents Chemother. 1997; 41 (1): 175-179.

- ✓ Cano ME, Rodríguez- Martínez JM, Agüero J, Pascual A, Calvo J, García-Lobo JM et al. Detection of plasmid-mediated quinolone resistance genes in clinical isolates of *enterobacter spp.* in Spain. J. Clin Microbiol 2009; 47 (7): 2033-2039. doi: 10.1128/JCM.02229-08.

- ✓ Cavaco LM, Hasman H, Xia S, Aarestrup FM. *qnrD*, a Novel Gene Conferring Transferable Quinolone Resistance in *Salmonella enterica*

- Serovar Kentucky and Bovismormificans Strains of Human Origin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53 (2): 603-608. doi: 10.1128/AAC.00997-08.
- ✓ Cattoir V, Poirel L. *Vibrio splendidus* as The source of Plasmid-Mediated QnrS-Like Quinolone Resistance Determinants. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51 (7): 2650-2651.
- ✓ Cattoir V, Poirel L, Nordmann P. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Pump QepA2 in an *Escherichia coli* Isolate from France. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52 (10): 3801-3804. doi: 10.1128/AAC.00638-08.
- ✓ Cesaro A, Bettoni RR, Lascols C, Merens A, Soussy CJ, Cambau E. Low selection of topoisomerase mutants from strains of *Escherichia coli* harbouring plasmid-borne qnr genes. *J Antimicrob Chemother.* 2008; 61 (5): 1007-1015. doi:10.1093/jac/dkn077.
- ✓ Cheng G, Hao H, Dai M, Liu Z, Yuan Z. antibacterial action of quinolones: From target to network. *Eur J Med Chem.* 2013; 66: 555-562.
- ✓ Chu TB, Fernades PB. Structure-Activity Relationships of the Fluroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989; 33 (2): 131-135.
- ✓ Costa SS, Viveiros M, Amaral L, Couto I. Multidrug Efflux Pumps in *Staphylococcus aureus*: an Update. *Open Microbiol J.* 2013; 7: 59-71. doi: 10.2174/1874285801307010059.

- ✓ Courvalin P. Plasmid-Mediated 4-Quinolone Resistance: a Real or Apparent Absence?. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990; 34 (5): 681-684.
- ✓ Deng Y, Zeng ZL, Tian W, Yang T, Liu JH. Prevalence and characteristics of *rmtB* and *qepA* in *Escherichia coli* isolated from diseased animals in China. *Front Microbiol.* 2013;15 (4):198. doi: 10.3389/fmicb.2013.00198.
- ✓ Domínguez- Herrera J, Velasco C, Docobo-Pérez F, Rodríguez-Martínez JM, López-Rojas R, Briales A, et al. Impact of *qnrA1*, *qnrB1* and *qnrS1* on the efficacy of ciprofloxacin and levofloxacin in an experimental pneumonia model caused by *Escherichia coli* with or without the GyrA mutation Ser83Leu. *J Antimicrob Chemother.* 2013; 68 (7):1609-1615. doi: 10.1093/jac/dkt063
- ✓ Drlica K, Malik M, Kerns R J, Zhao X. Quinolone- Mediated Bacterial Death. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52 (2): 385-392.
- ✓ Drlica K, Hiasa H, Kerns R, Malik M, Mustaev A, Zhao X. Quinolones: Action and Resistance Updated. *Curr Top Med Chem.* 2009; 9 :981-988.
- ✓ East S P, White C B, Barker O, Barker S, Bennett J, Brown D et al. DNA gyrase (Gyr B)/topoisomerase IV (ParE) inhibitors: Synthesis and antibacterial activity. *Bioorg Med Chem Lett.* 2009; 19 (1): 894-899.

- ✓ European Center for Disease Prevention and Control. Annual Epidemiological Report 2013. Reporting on 2011 surveillance data and 2012 epidemic intelligence data. Stockholm: ECDC; 2013. <http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/publications/annual-epidemiological-report-2013.pdf>
- ✓ Evans MC, Mendelsohn AB. Memorandum. department of Health and Human Services. Public Health Service. Food and Drug Administration. Centre for Drug Evaluation and Research. 2005; <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/05/briefing/2005>.
- ✓ Evans-Robert K M, Breuer C, Wall M K, Sugimoto- Shirasu K, Maxwell A. *Arabidopsis thaliana* GYRB3 does not encode a DNA gyrase subunit. PloS One. 2010; 5 (3) e9899. doi: 10.1371/journal.pone.0009899.
- ✓ Everett MJ, Jin YF, Ricci V, Piddock LJ. Contributions of individual mechanisms to fluoroquinolone resistance in 36 *Escherichia coli* strains isolated from humans and animals. Antimicrob Agents Chemother. 1996; 40 (10): 2380-2386.
- ✓ ExoProStar www.gelifesciences.com/illustraExoProStar.
- ✓ Fàbrega A, Madurga S, Giralt E, Vila J. Mechanism of action and resistance to quinolones. Microb Biotechnol. 2009; 2 (1): 40-61.
- ✓ Falagas ME, Rafailidis PI, Rosmarakis ES. Arrhythmias associated with fluoquinolone therapy. Int J Antimicrob Agents 2007; 29: 374-379.

- ✓ Fendukly F, Karisson I, Hanson HS, Kronvall G, Dombusch K. Patterns of mutations in target genes in septicemia isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* with resistance or reduced susceptibility to ciprofloxacin. *APMIS*. 2003; 11 (9): 857-866.
- ✓ Freifeld AG, Bow EJ, Sepkowitz KA, Boeckh MJ, Ito JI, Mullen CA, et al. Clinical Practice Guideline for the Use of Antimicrobial Agents in Neutropenic Patients with Cancer: 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2011; 52 (4): e56-e93.
- ✓ Fonseca EL, Dos Santos Freitas F, Viera VV, Vicente AC. New *qnr* Gene Cassettes Associated with superintegron Repeats in *Vibrio cholerae* O1. *Emerg Infect Dis* 2008; 14 (7): 1129-1131. doi:10.3201/eid1407.080132.
- ✓ Fonseca EL, Vicente AC. Spread of the *qnrVC* Quinolone Resistance Determinant in *Vibrio cholerae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55 (1): 457. doi: 10.1128/AAC.00998-10.
- ✓ Foroumadi A, Emami S, Rajabalian S, Badinloo M, Mohammadhosseini N, Shafiee A. *N*- Substituted piperazinyl quinolones as potential cytotoxic agents: Structure-activity relationships study. *Biomed Pharmacother*. 2009; 63:216-220.
- ✓ Forterre P, Gribaldo S, Gadelle D, Serre M C. Origin and evolution of DNA topoisomerases. *Biochimie*. 2007; 89: 427-446.
- ✓ Fuchs W, Brockmeyer NH. Sexually transmitted infections. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2014; 12 (6): 451-463. doi: 10.1111/ddg.12310.

- ✓ Fukuda H, Hiramatsu K. Primary targets of Fluorquinolones in *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 1999; 43 (2): 410-412.
- ✓ García Rodríguez JA, García Sánchez, JE, Gobernado M, Picazo JJ, editores. Antimicrobianos en Medicina. 2ª ed. Barcelona: Sociedad Española de Quimioterapia; 2006.
- ✓ www.gelifesciences.com/illustraExoProStar
- ✓ Giraud E, Leroy-Sétrin S, Flaujac G, Cloeckert A, Dho-Moulin M, Chaslus-Dancla E. Characterization of high-level fluorquinolone resistance in *Escherichia coli* O78:K80 isolated from turkeys. J Antimicrob Chemother. 2001; 47 (3): 341-343.
- ✓ Goldman JD, White DG, Levy SB. Multiple antibiotic resistance (*mar*) locus protects *Escherichia coli* from rapid cell killing by fluoroquinolones. Antimicrob Agents Chemother. 1996; 40 (5): 1266-1269.
- ✓ González-Martín J, García-García JM, Anibarro L, Vidal R, Esteban J, Blanquer R, et al. Documento de consenso sobre diagnóstico, tratamiento y prevención de la tuberculosis. Arch Bronconeumol. 2010; 46 (5): 255-274.
- ✓ Griffith DE, Aksamit E, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, et al. An Official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases. Am J Respir Crit Care Med. 2007; 175: 367-416.

- ✓ Gupta K, Hooton TM, Naber KJ, Wullt B, Colgan R, Miller LG et al. International Clinical Practice Guidelines for the Treatment of Acute Uncomplicated Cystitis and Pyelonephritis in Women: A 2010 Update by the Infectious Disease Society of America and The European Society for Microbiology and Infectious Disease. www.idsociety.org
- ✓ Gutiérrez Zufiaurre N. Relación entre estructura, actividad y efectos adversos de las quinolonas. Rev Esp Quimioterap. 2004; 17 (3): 232-243.
- ✓ Hansen LH, Johannesen E, Burmølle M, Sørensen AH, Sørensen SJ. Plasmid-encoded Multidrug Efflux Pump Conferring Resistance to Olaquinox in *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48 (9): 3332-3337. doi: 10.1128/AAC.48.9.3332-3337. 2004.
- ✓ Hansen LH, Jensen LB, Sørensen HI, Sørensen SJ. Substrate specificity of the OqxAB multidrug resistance pump in *Escherichia coli* and selected enteric bacteria. J Antimicrob Chemother. 2007; 60 (1): 145-147. doi: 10.1093/jac/dkm167.
- ✓ Hawkey P M. Mechanisms of quinolone action and microbial response. J Antimicrob Agents. 2003; 51 S1: 29-35.
- ✓ Heisig P, Tschorny R. Characterization of fluoroquinolone-resistant mutants of *Escherichia coli* selected *in vitro*. Antimicrob Agents Chemother. 1994; 38 (6): 1284-1291.

- ✓ Heisig P. Genetic evidence for a role of *parC* mutations in development of high-level fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996; 40 (4): 879-885.
- ✓ Hooper DC, Wolfson JS. The Fluorquinolones: Pharmacology, Clinical Uses and Toxicity in Humans. *Antimicrob Agents Chemother.* 1985; 716-721.
- ✓ Hooper DC. Mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Drug Resist Updat.* 1999; 2: 38-55.
- ✓ Hooper D. Mechanisms of Action and Resistance of Older and Newer Fluorquinolones. *Clin Infect Dis.* 2000; 31 (Suppl 2): S24-S28
- ✓ Hopkins KL, Davies RH, Therlfall EJ. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: Recent developments. *Int J Antimicrob Agents.* 2005; 25: 358-373.
- ✓ Ibrahim M, omar B. Case report. Ciprofloxacin-induced torsade des pointes. *Am J Emerg Med.* 2012; 30: 252e5-252e9.
- ✓ Jacoby GA, Walsh KE, Mills DM, Walker VJ, Oh H, Robicsek A. et al. *qnrB* Another Plasmid-Mediated Gene for Quinolone Resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50 (4): 1178-1182- doi: 10.1128/AAC.50.4.1178-1182.2006.
- ✓ Jacoby GA, Cattoir V, Hooper D, Martínez- Martínez L, Nordmann P, Pascual A. et al. *qnr* Gene Nomenclature. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52 (7): 2297-2299.

- ✓ Jacoby GA, Griffin CM, Hooper DC. *Citrobacter* spp. as a Source of *qnrB* Alleles. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55 (11): 4979-4984. doi: 10.1128/AAC.050187-11.

- ✓ Kemp M, Christensen JJ, Lautenschlager S, Vall-Mayans M, Moi H. European guideline for the management of chancroid, 2011; <http://std.sagepub.com/content/22/5/241>

- ✓ Kim ES, Hooper DC. Clinical importance and epidemiology of quinolone resistance. *Infect Chemother.* 2014; 46 (4): 226-238. doi: 10.3947/ic.2014.46.4.226.

- ✓ Kim HB, Wang M, Park CH, Kim EC, Jacoby GA, Hooper DC. *oqxAB* Encoding a Multidrug Efflux Pump in Human Clinical Isolates of *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53 (8): 3582-3584. doi: 10.1128/AAC.01574-08.

- ✓ Kim J, Ohtani H, Tsujimoto M, Sawada Y. Quantitative Comparison of the Convulsivity activity of Combinations of Twelve Fluorquinolones with Five Nonsteroidal Anti-inflammatory Agents. *Drug Metab Pharmacokinet* 2009; 24 (2): 167-174.

- ✓ Komp Lindgren P, Karlsson A, Hughes D. Mutation rate and evolution of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolates from patients with urinary tract infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47 (10): 3222-3232.

- ✓ <http://www.lahey.org/qnrStudies/>

- ✓ Lavilla S, González- López JJ, Sabaté M, García- Fernández A, Larrosa MN, Bartolomé RM et al. Prevalence of *qnr* genes among extended-spectrum beta-lactamase- producing enterobacterial isolates in Barcelona, Spain. *J. Antimicrob Chemother.* 2008; 61 (2): 291-295.
- ✓ Levine C, Hiasa H, Mariani K J. DNA gyrase and topoisomerase IV: biochemical activities, physiological roles during chromosome replication, and drug sensitivities. *Biochim Biophys Acta.* 1998; 1400 (1-3): 29-43.
- ✓ Li XZ. Quinolone resistance in bacteria: emphasis in plasmid-mediated mechanisms. *Int J Antimicrob Agents.* 2005; 25:453-463.
- ✓ Lu Y, Zhao H, Liu Y, Zhou X, Wang J, Liu T et al. Characterization of quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Indiana from chickens in China 1. *Poult Sci.* 2015; 94 (3): 454-460. doi: 10.3382/ps/peu133.
- ✓ Mandell LA, Wunderink RC, Anzueto A, Bartlett JG, Campbell GD, Dean NC et al. Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society Consensus Guidelines on the Management of Community-Acquired Pneumonia in Adults. *Clin Infect Dis* 2007; 44:S27-72.
- ✓ Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Mandell, Douglas and Bennett's Principles and practice of Infectious Diseases. Vol 1. 7th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier; 2010.
- ✓ Martínez- Martínez L, Pascual A, García I, Tran J, Jacoby GA. Interaction of plasmid and host quinolone resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2003; 51: 1037-1039.

- ✓ Martínez- Martínez L, Pascual A., Jacoby G A. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet*.1998; 351 (9105): 797-799.
- ✓ Martínez-Robles M L, Witz G, Hernández P, Schwartzman J B, Stasiak A, Krimer D B. Interplay of DNA supercoiling and catenation during the segregation of sister duplexes. *Nucleic Acids Res*. 2009; 37 (15): 5126-5137.
- ✓ Maurice F, Broutin I, Podglajen I, Benas P, Collatz E. Enzyme structural plasticity and the emergence of broad-spectrum antibiotic resistance. *EMBO rep*. 2008; 9 (4): 344-349.doi: 10.1038/embor.2008.9.
- ✓ Mazzariol A, Tokue Y, Kanegawa TM, Cornaglia G, Nikaido H. High- level fluoroquinolone resistant clinical isolates of *Escherichia coli* overproduce multidrug efflux protein AcrA. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000; 44 (12): 3441-3443.
- ✓ Menéndez R, Torres A, Aspa J, Capelastegui A, Prat C, Rodríguez de Castro F. Neumonía adquirida en la comunidad. Nueva normativa de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR). *Arch Bronconeumol*. 2010; 46 (10): 543-558.
- ✓ Mensa J, Gatell JM, García-Sánchez JE, Letang E, López- Suñé E, Marco F. Guía de terapéutica antimicrobiana. Barcelona: Editorial Antares; 2014.
- ✓ Morgan-Linnell SK, Becnel Boyd L, Steffen D, Zechiedrich L. Mechanisms Accounting for Fluoroquinolone Resistance in *Escherichia coli* Clinical Isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53 (1): 235-241.

- ✓ Mueller M, De la Peña A, Derendorf H. Issues in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Anti-Infective Agents: Kill curves versus MIC. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48 (2): 369-377.
- ✓ Murray BE. President of Infectious Diseases Society of America. 21st Century Cures: Examining Ways to Combat Antibiotic Resistance and Foster New Drug Development. Written Statement before the Energy and Commerce Committee, Health Subcommittee. U.S. House of Representatives. September 19, 2014. Disponible en www.idsociety.org
- ✓ Nakaminami H, Noguchi N, Sasatsu M. Fluoroquinolone Efflux by the Plasmid-Mediated Multidrug Efflux Pump QacB Variant QacBIII in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(10): 4107-11. doi: 10.1128/AAC.01065-09.
- ✓ Nam YS, Cho SY, Yang HY, Park KS, Jang JH, Kim YT. et al. Investigation of mutation distribution in DNA gyrase and topoisomerase IV genes in ciprofloxacin- non- susceptible Enterobacteriaceae isolated from blood cultures in a tertiary care university hospital in South Korea, 2005-2010. *Int J Antimicrob Agents.* 2013; 41 (2): 126-129. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2012.10.004.
- ✓ Nawaz M, Sung K, Kweon O, Khan S. Characterisation of novel mutations involved in quinolone resistance in *Escherichia coli* isolated from imported shrimp. *Int J Antimicrob Agents.* 2015; 45 (5): 471-6. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2014.11.010.

- ✓ Nöllmann M, Crisona M J, Arimondo P B. Thirty years of *Escherichia coli* DNA gyrase: From *in vivo* function to single-molecule mechanism. *Biochimie*. 2007; 89: 490-499.
- ✓ Oethinger M, Kem WV, Jellen-Ritter AS, McMurry LM, Levy SB. Ineffectiveness of topoisomerase mutations in mediating clinically significant fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* in the absence of the AcrAB efflux pump. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000; 44 (1): 10-13.
- ✓ O'Farrell N, Moi H. European guideline for the management of donovanosis, 2010. 2010; <http://std.sagepub.com/content/21/9/609>
- ✓ Osmon DR, Berbari EF, Berendt AR, Lew D, Zimmerli W, Steckelberg JM, et al. Diagnosis and Management of Prosthetic Joint Infection: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2012; 56 (1): 1-25. doi: 10.1093/cid/cis803.
- ✓ Oteo J, Campos J. Uso de quinolonas y resistencia. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2004; 22 (4): 201-203.
- ✓ Ouabdesselam S, Hooper DC, Tankovic J, Soussy CJ. Detection of *gyrA* and *gyrB* mutations in quinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* by single- strand conformational polymorphism analysis and determination of levels of resistance conferred by two different single *gyrA* mutations. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995; 39 (8): 1667-1670.
- ✓ Owens RC Jr, Ambrose PG. Antimicrobial Safety: Focus on Fluorquinolones. *Clin Infect Dis* 2005;41: S 144-157.

- ✓ Paulsen, IT, Brown MH, Littlejohn TG, Mitchell BA, Skurray RA. Multidrug resistance proteins QacA and QacB from *Staphylococcus aureus*: Membrane topology and identification of residues involved in substrate specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93(8):3630-5.
- ✓ Périchon B, Courvalin P, Galimand M. Transferable Resistance to Aminoglycosides by Methylation of G1405 in 16S rRNA and to Hydrophilic Fluoroquinolones by QepA-Mediated Efflux in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007; 51 (7): 2464-2469. doi: 10.1128/AAC.00143-07.
- ✓ Peterson LR. Quinolone molecular structure-activity: relationship what we have learned about improving antimicrobial activity. *Clin Infect Dis*. 2001; 33 Suppl 3: S 180- 186.
- ✓ www.pfam.xfam.org
- ✓ Piddock LJ. Multidrug- resistance efflux pumps- non just for resistance. *Nat Rev Microbiol*. 2006; 4 (8): 629-36.
- ✓ Poirel L, Rodríguez- Martínez JM, Mammeri H, Liard A, Nordmann P. Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrA. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49 (8): 3523-3525.
- ✓ Poirel L, Cattoir V, Nordmann P. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance: Interactions between Human, Animal and Environmental Ecologies. *Front Microbiol*. 2012; 3 (24). doi: 10.3389/fmicb.2012.00024.
- ✓ Pons MJ, Gomes C, Ruiz J. QnrVC, a new transferable Qnr-like family. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2013; 31 (3): 191-194.

- ✓ Ramirez MS, Tolmasky ME. Aminoglycoside Modifying Enzymes. Drug Resist Updat. 2010; 13 (6): 151-171. doi: 10.1016/j.drug.2010.08.003.

- ✓ Rodríguez- Martínez J M. Mecanismos de resistencia a quinolonas mediada por plásmidos. Enferm Infecc y Microbiol Clin. 2005; 23 (1): 25-31.

- ✓ Rodríguez- Martínez JM, Pichardo C, García I, Pachón- Ibáñez ME, Docobo- Pérez F, Pascual A, et al. Activity of ciprofloxacin and levofloxacin in experimental pneumonia caused by *Klebsiella pneumoniae* deficient in porins, expressing active efflux and producing QnrA1. Clin Microbiol Infect. 2008; 14 (7):691-697. doi: 10.1111/j.1469-0691.2008.02020.x

- ✓ Rodríguez- Martínez JM, Cano ME, Velasco C, Martínez- Martínez L, Pascual A. Plasmid- mediated quinolone resistance: an update. J Infect Chemother. 2011; 17: 149-182. doi: 10.1007/s10156-010-0120-2.

- ✓ Rosenfeld RM, Schwartz SR, Cannon CR, Roland PS, Simon GR, Kumar KA, et al. Clinical Practice Guideline: Acute Otitis Externa. Otolaryngol Head Neck Surg. 2014; doi: 10.1177/0194599813517803. http://oto.sagepub.com/content/150/1_suppl/S1.

- ✓ Ruiz J, Casellas S, Jiménez de Anta MT, Vila J. The region of the *parE* gene, homologous to the quinolone-resistant determining region of the *gyrB* gene, is not linked with the acquisition of quinolone resistance in *Escherichia coli* clinical isolates. J Antimicrob Chemother. 1997; 39 (6): 839-840.

- ✓ Ruiz J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. J Antimicrob Chemother. 2003; 51: 1109-1117.
- ✓ Ruiz J, Pons MJ, Gomes C. Transferable mechanisms of quinolone resistance. Int J Antimicrob Agents. 2012;40(3):196-203. doi:10.1016/j.ijantimicag.2012.02.011
- ✓ Rybak MJ. Pharmacodynamics: Relation to antimicrobial resistance. Am J Infect Control. 2006; 34 (5 S1): S38-S45.
- ✓ Sáenz Y, Zarazaga M, Briñas L, Ruiz- Larrea F, Torres C. Mutations in *gyrA* and *parC* genes in nalidixic acid-resistant *Escherichia coli* strains from food products, humans and animals. J Antimicrob Chemother. 2003; 51 (4): 1001-1005.
- ✓ Saiki AYC, Shen LL, Chen CM, Baranowski J, Lerner CG. DNA Cleavage Activities *Staphylococcus aureus* Gyrase and Topoisomerase Stimulated by Quinolones and 2-Pyridones. Antimicrob Agents Chemother.1999; 43 (7): 1574-1577.
- ✓ Saravolatz LD, Leggett J. Gatifloxacin, Gemifloxacin, and Moxifloxacin: The role of 3 Newer Fluoroquinolones. Clin Infect Dis. 2003; 37: 1210-1215.
- ✓ Schmidt S, Barbour A, Sahre M, Rand KH, Derendorf H. PK/PD: new insights for antibacterial and antiviral applications. Curr Opin Pharmacol. 2008; 8: 549-556.

- ✓ Serra HA. Quinolonas. Separatas Montpellier 2008.
www.montpellier.com.ar/separatas.
- ✓ Shea M E, Hiasa H. Distinct Effects of the UVrD Helicase on Topoisomerase- Quinolone- DNA Ternary Complexes. J Biol Chem. 2000; 275 (19): 14649-14658.
- ✓ Shigemura K, Tanaka K, Yamamichi F, Shirakawa T, Miyake H, Fujisawa M. Does mutation in *gyrA* and/or *parC* or efflux pump expression play the main role in fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* urinary tract infections?: A statistical analysis study. Int J Antimicrob Agents. 2012; 40 (6): 516-520. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2012.
- ✓ 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 (4): 1680-1685. doi: 10.1128/AAC.05693-11.
- ✓ Solomkin JS, Mazuski JE, Bradley JS, Rodvold KA, Goldstein EJC, Baron EJ, et al. Diagnosis and Management of Complicated Intra-abdominal Infection in Adults and Children: Guidelines by the Surgical Infection Society and the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis 2010; 50: 133-164. doi: 10.1086/649554.
- ✓ Soussy CJ, Wolfson JS, Ng EY, Hooper DC. Limitations of plasmid complementation test for determination of quinolone resistance due to changes in the gyrase A protein and identification of conditional quinolone resistance locus. Antimicrob Agents Chemother. 1993; 37 (12): 2588-2592.

- ✓ STI-Treatment Pocket Guide. Treatment recommendations for selected sexually-transmitted infections (STI) of the German STI-Society for the Promotion of Sexual Health. English edition 2014/2015.<http://www.dstig.de/images>.
- ✓ Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A. Plasmid -Mediated Quinolone Resistance: a Multifaceted Threat. Clin Microbiol Rev. 2009; 22 (4): 664-689. doi: 10.1128/CMR.00016-09.
- ✓ Sørensen AH, Lansen LH, Johannesen E, Sørensen SJ. Conjugative Plasmid Conferring Resistance to Olaquinox. Antimicrob Agents Chemother. 2003; 47 (2): 798-799. doi: 10.1128/AAC.47.2.798-799.2003.
- ✓ Takei M, Fukuda H, Kishii R, Hosaka M. Target Preference of 15 quinolones against *Staphylococcus aureus* Based on Antibacterial Activities and Target Inhibition. Antimicrob Agents Chemother. 2001; 45 (12): 3544-3547.
- ✓ Taléns-Visconti R, Garrigues TM, Cantón E. Mechanisms of bacterial resistance to quinolones. Rev Esp Quimioter. 2002; 15 (1): 25-31.
- ✓ Tavio MM, Vila J, Ruiz J, Ruiz J, Martín- Sánchez AM, Jiménez de Anta MT. Mechanisms involved in the development of resistance to fluorquinolones in *Escherichia coli* isolates. J Antimicrob Chemother. 1999; 44 (6): 735- 742.
- ✓ Tran JH, Jacoby GA. Mechanism of plasmid-mediated resistance quinolone. Proc Natl Acad Sci USA. 2002; 99 (8): 5638-5642.

- ✓ Tran JH, Jacoby GA, Hooper DC. Interaction of the Plasmid-Encoded Quinolone Resistance Protein Qnr with *Escherichia coli* DNA Gyrase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005a; 49 (1): 118-125.

- ✓ Tran JH, Jacoby GA, Hooper DC. Interaction of the Plasmid-Encoded Quinolone Resistance Protein QnrA with *Escherichia coli* DNA Topoisomerase IV. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005b; 49 (7): 3050-3052.

- ✓ Update to CDC's *Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, 2010*: Oral Cephalosporins No Longer A Recommended Treatment for Gonococcal Infections. *MMWR.* Centers for Disease Control and Prevention. 2012; 61 (31): 590-594. www.cdc.gov/mmwr

- ✓ Vetting MW, Hegde SS, Fajardo JE, Fiser A, Roderick SL, Takiff HE et al. The Pentapeptide Repeat Proteins. *Biochemistry.* 2006; 45 (1): 1-10. doi: 10.1021/bi052130w.

- ✓ Vetting MW, Park CH, Hegde SS, Jacoby GA, Hooper DC, Blanchard JS. Mechanistic and Structural Analysis of Aminoglycoside *N*-Acetyltransferase AAC (6')-Ib and Its Bifunctional Fluoroquinolone-Active AAC (6') -Ib-cr Variant. *Biochemistry.*2008; 47 (37): 9825-9835.doi: 10.1021/bi800664x.

- ✓ Vetting MW, Hegde SS, Wang M, Jacoby GA, Hooper DC, Blanchard JS. Structure of QnrB1, a Plasmid-mediated Fluoroquinolone Resistance Factor. *J Biol Chem* 2011; 286 (28): 25265-25273. doi:10.1074/jbc.M111.226936.

- ✓ Vila J, Ruiz J, Marco F, Barceló A, Goñi P, Giralt E. et al. Association between double mutation in *gyrA* gene of ciprofloxacin- resistant clinical isolates of *Escherichia coli* and MICs. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994; 38 (10): 2477-2479.

- ✓ Vila J, Ruiz J, Goñi P, De Anta MT. Detection of mutations in *parC* in quinolone- resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996; 40 (2): 491-493.

- ✓ Viñuela L, de Frutos-Serna M, Asensio ML, Muñoz -Bellido JL, García-Sanchez JE. ¿Podemos pautar tratamiento empírico para infecciones del tracto urinario en nuestra área siguiendo las recomendaciones de las recientes guías clínicas?. *Rev Esp Quimioter.* 2013; 26 (2): 159-161.

- ✓ Wade WG, Downes J, Dymock D, Hiom SJ, Weightman AJ, Dewhurst FE, et al. The family *Corobacteriaceae*: reclassification of *Eubacterium exiguum* (Poco et al 1996) and *Peptostreptococcus heliotrinireducens* gen. nov. comb. nov. and *Eubacterium lentum* (Prevot 1938) as *Eggerthella lenta* gen. nov. comb. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1999; 49: 595-600.

- ✓ Wall M K, Mitchellan L A, Maxwell A. *Arabidopsis thaliana* DNA gyrase is targeted to chloroplasts and mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101 (20): 7821-7826.

- ✓ Wang M, Guo Q, Xu X, Wang X, Ye X, Wu S. et al. New Plasmid- Mediated Quinolone Resistance Gene, *qnrC*, Found in a Clinical Isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53 (5): 1892-1897. doi: 10.1128/AAC. 01400-08.

- ✓ White J, O'Farrell N, Daniels D. 2013 UK National Guideline for the management of lymphogranuloma venereum: Clinical Effectiveness Group of the British Association for Sexual Health and HIV (CEG/BASHH) Guideline development group. 2013; <http://std.sagepub.com/content/24/8/593>
- ✓ WHO. Antimicrobial resistance global report on surveillance. 2014; <http://www.who.int/entity/drugresistance/documents/surveillancereport/en/index.html>
- ✓ Willmott CJ, Maxwell A. A single point mutation in the DNA gyros A protein greatly reduces binding of fluorquinolones to the gyrase-DNA complex. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993; 37 (1): 126-127.
- ✓ Wolfson J S, Hooper D C. The Fluorquinolones: Structures, Mechanisms of Action and Resistance, and Spectra of Activity *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1985; 581-586
- ✓ Wolfson J S, Hooper D C. Fluorquinolone antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev.* 1989; 2 (4): 378-424.
- ✓ Woodhead M, Blasi F, Ewig S, Garau J, Huchon G, Ieven M, et al. Guidelines for the management of adult lower respiratory tract infections. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17 (S6): E1-E59.
- ✓ Wohlkonig A, Chan PF, Fosberry AP, Homes P, Huang J, Kranz M, et al. Structural basis of quinolone inhibition of type IIA topoisomerases and target-mediated resistance. *Nat Struct Mol Biol.* 2010; 17 (9): 1152-1153.

- ✓ Workowsky KA, Berman S. Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, 2010. MMWR. Centers of Disease Control and Prevention. 2010; 59/RR12. www.cdc.gov/mmwr.
- ✓ Yamagishi J, Furutani Y, Inoue S, Ohue T, Nakamura S, Shimizu M. New nalidixic acid resistance mutations related to deoxyribonucleic acid gyrase activity. J Bacteriol. 1981; 148 (2): 450-458.
- ✓ Yamagishi J, Yoshida H, Yamayoshi M, Nakamura S. Nalidixic acid-resistant mutations of the *gyrB* gene of *Escherichia coli*. Mol Gen Genet. 1986; 204 (3): 367-373.
- ✓ Yamane K, Wachino JI, Suzuki S, Kimura K, Shibata N, Kato H, et al. New Plasmid-Mediated Fluoroquinolone Efflux Pump, QepA, Found in an *Escherichia coli* Clinical Isolate. Antimicrob Agents Chemother. 2007; 51 (9): 3354-3360. doi: 10.1128/AAC.00339-07.
- ✓ Yang S, Clayton SR, Zechiedrich EL. Relative contributions of the AcrAB, MdfA and NorE efflux pumps to quinolone resistance in *Escherichia coli*. J Antimicrob Chemother. 2003; 51: 545-556. doi: 10.1093/jac/dkg126
- ✓ Yan T, Zeng Z, Rao L, Chen X, He D, Lv L. et al. The association between occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance and ciprofloxacin resistance in *Escherichia coli* isolates of different origins. Vet Microbiol 2014; 170: 89-96. doi:10.1016/j.vetmic.2014.01.019.

- ✓ Yoshida H, Bogaki M, Nakamura M Nakamura S. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. Antimicrob agents Chemother. 1990; 34 (6): 1271-1272.

- ✓ Yuan J, Xu X, Guo Q, Zhao X, Ye X, Guo Y, et al. Prevalence of the *oqxAB* gene complex in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherihcia coli* clinical isolates. J Antimicrob Chemother. 2012; 67: 1655-1659. doi: 10.1093/jac/dks086.

- ✓ Zhao J, Chen Z, Chen S, Deng Y, Liu Y, Tian W. et al. Prevalence and Dissemination of *Escherichia coli* Isolates from Animals, Farmworkers, and the Environment. Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54 (10): 4219-4224. doi: 10.1128/AAC.00139-10.