



**VNiVERSIDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

Programa de Doctorado: *Salud y Desarrollo en los
Trópicos*

**Evaluación de Mecanismos Moleculares de Resistencia a
Fluoroquinolonas en Cepas de *E. coli* Uropatógenas en
Población Nativa Amerindia Kichwa del Ecuador.**

TESIS DOCTORAL

William Guamán Gualpa

2020

Certificación:

Dr. Juan Luis Muñoz Bellido, Catedrático de Microbiología y Jefe del servicio de Microbiología del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca, Dra. María Nieves Gutiérrez Zufiaurre, Licenciada Especialista en Microbiología y Parasitología, del servicio de Microbiología del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca y el Dr. Rodrigo Marcelo Grijalva Silva, Profesor Principal de Genética Molecular del Departamento de Ciencias de la Vida y Jefe de Laboratorio de Biotecnología Humana de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE-Quito.

Certifican:

Que el trabajo **“Evaluación de Mecanismos Moleculares de Resistencia a Fluoroquinolonas en Cepas de *E. coli* Uropatógenas en Población Nativa Amerindia Kichwa del Ecuador.”** Que presenta William Milian Guamán Gualpa para optar por el grado de Doctor por la Universidad de Salamanca ha sido realizado bajo nuestra dirección en la Escuela de Doctorado de la Universidad de Salamanca y reúne, a nuestro juicio, originalidad y contenidos suficientes para optar por el grado de Doctor por la Universidad de Salamanca. Por lo que autorizamos su presentación para ser evaluada.

Y para que así conste, a efectos legales, expide el presente certificado en Salamanca a 16 de Septiembre del 2020.

Fdo. Dr. Juan Luis Muñoz Bellido

Fdo. Dra. María Nieves Gutiérrez Zufiaurre



Fdo. Dr. Rodrigo Marcelo Grijalva Silva

DEDICATORIA

A mis hijos, William Daniel y Anton David, que son la razón de mi existencia, y motivo por el que inicié este sueño.

A mi abuela Rosario, quien con el inmenso amor que nos dio a mis hermanos y a mí, dio transparencia a nuestras vidas.

A mi padre Moisés por su ejemplo de abnegación al trabajo, de superar las dificultades, quien además sembró en mí el hábito de la lectura, y me enseñó que “Hay que poner el corazón por delante” en cualquier proyecto de mi vida que emprenda, refiriéndose con ello a que primero está lo humano en toda actividad que inicie el hombre.

A mi madre Rosario, por su amor incondicional y por su apoyo desde mi infancia a todos mis proyectos académicos.

A mis hermanos Rosmary, Erwin, Alicia, que a lo largo de su vida me han demostrado un permanente espíritu de superación y que han hecho de cada día una oportunidad más para mejorar sus vidas.

A mi familia.

AGRADECIMIENTOS

A los directores del presente trabajo doctoral, doctores Juan Luis Muñoz Bellido y M^a Nieves Gutierrez Zufiaurre, de la Universidad de Salamanca y del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca-España, por su permanente apoyo y paciencia, permitiéndome plasmar el deseo de que los docentes de la Universidad Central del Ecuador realicemos investigación de laboratorio, para abrirles nuevos horizontes a nuestros estudiantes. Al doctor Marcelo Grijalva Silva de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE-Ecuador, director de esta tesis, que depositó su confianza en mí, entrenándome en las técnicas de biología molecular, quien me permitió trabajar en su laboratorio de Nanomedicina y Nanobiología con sus grupos de investigación.

Al doctor Edgar Samaniego Rojas, apreciado y dialecto amigo, ex rector de la Universidad Central del Ecuador, quien fue el suscitador de los programas de doctorado.

Al doctor Fernando Sempértegui Ontaneda, rector actual de las Universidad Central del Ecuador, por continuar con el camino trazado en beneficio de los docentes y estudiantes, teniendo como meta la superación permanente de nuestra universidad.

Al doctor Ramiro López Pulles, decano de la facultad de ciencias médicas de la Universidad Central del Ecuador y al doctor Guillermo Fuenmayor Flor, director de la carrera de medicina de la facultad de ciencias médicas de la Universidad Central del Ecuador, por su crucial y oportuno apoyo en momentos difíciles que atravesé para continuar con mi trabajo de investigación.

A la Universidad de las Fuerzas Armadas del Ecuador ESPE y, como parte de ésta, al General Roque Moreira Cedeño, rector de esta universidad. Al CPNV. CSM. Nelson Noboa Flores, vicerrector de investigación, innovación y transferencia de tecnología y al doctor Freddy Proaño Pérez, director del departamento de ciencias de la vida y agricultura, que me brindaron todo su desinteresado apoyo, a pesar de ser una persona ajena a esta universidad, para poder utilizar los laboratorios de Nanomedicina y Nanobiología, lugar donde transcurrieron los momentos más importantes de mi estudio y compartí muchas horas de esfuerzo y trabajo.

A la Universidad de Salamanca, por dar la oportunidad en sus diferentes áreas a profesionales del mundo para que puedan realizar investigaciones originales, de utilidad primariamente en sus países, cumpliendo con el objetivo más importante de la academia, cual es el que la ciencia y los conocimientos tengan prioritariamente un fin social.

A los doctores Jorge Reyes, Eduardo Villacís, ingeniero en biotecnología Xavier Villavicencio y al bioquímico Rafael Tamayo encargados de los laboratorios de microbiología del Instituto Nacional de Investigaciones en Salud Pública INSPI, por su jovial, entusiasta, permanente y comprometido apoyo a mi proyecto de investigación, en beneficio de las poblaciones vulnerables de nuestro país.

A las doctoras Iliana Alcocer y Fernanda Yauri, directora y encargada del laboratorio de microbiología de la Escuela de Ciencias Biológicas, perteneciente a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador y al tesista Francisco Quelal de esta facultad, por su desinteresada colaboración con mi proyecto.

A la ingeniera en biotecnología Evelyn Calderón, que me transmitió los conocimientos iniciales de biotecnología, sin los que me hubiera sido imposible iniciar esta investigación.

A las ingenieras en biotecnología Gabriela Echeverría, Lizeth Salazar y MSc. María José Vallejo, que me dieron el entrenamiento teórico-práctico en biología molecular y supervisaron diariamente la parte experimental de mi proyecto.

A mis compañeras de trabajo diario en el laboratorio de biotecnología, Valentina Arévalo, Nayara Gómez, Marianela Mariño,

Valeria Bautista y Bryan Zamora, quienes fueron mi apoyo permanente en mi desenvolvimiento diario en el desarrollo de mi tesis.

A mi compañera de promoción de doctorado de la Universidad de Salamanca, Judith Torres, por su apoyo y comprensión.

Al doctor Washington Paz, dialecto compañero y amigo, por su asesoría metodológica para esta tesis.

En este apartado, quiero hacer especial mención y plasmar en este texto mi gratitud a la doctora Anita Villafuerte, Directora del Hospital Claudio Benati de Zumbahua, al tecnólogo médico José Álvarez y a la licenciada Maricela Guanotuña, laboratoristas de este hospital, al doctor Franklin Agualongo, y a la doctora Karina Ganchala directores del Centro de Salud Tipo B de Zumbahua, a la licenciada Mayra Lara, laboratorista de este centro, a la doctora Gladys Mera, y al doctor Héctor Lazo, directores del Hospital de Colta, y al licenciado Paúl Velásquez, laboratorista de este hospital, a la doctora Erika Sánchez, directora del hospital de Guamote y al MSc. licenciado Rodolfo Chicaiza, laboratorista de este hospital. No puedo dejar de mencionar la colaboración brindada por los profesionales de la salud de estas unidades médicas, la misma que fue la base para esta tesis.

Doy las gracias a los pacientes de estas comunidades, en primer lugar, por haberme permitido conocer estos bellos parajes de mi patria y

visualizar la situación socioeconómica actual de la población nativa amerindia Kichwa ecuatoriana.

Por último, a todas las personas que silenciosamente contribuyeron y enriquecieron la realización de esta tesis, que me dio la posibilidad de aprender y descubrir lo que en algunos momentos pude ver como algo imposible y convertirlo en algo realizable.

Gracias amigos.

“La ciencia es el alma de la prosperidad de las naciones y la fuente de vida de todo progreso.”

Louis Pasteur

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

A	Alanina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AEMPS	Agencia española de medicamentos y productos sanitarios
AINES	Antinflamatorios no esteroideos
AMC	Amoxicilina/acido clavulánico
AMP	Ampicilina
ARN	Ácido ribonucleico
AUC	Área bajo la curva de tiempo de concentración sérica
AUCI	Área bajo la curva inhibitoria
BGN	Bacilos gram negativos
BHI	Brain Heart Infusion
BLEE	Beta-lactamasa de espectro extendido
Bps	pares de bases
CAZ	Ceftazidima
CIM	Concentración inhibitoria mínima
CIP	Ciprofloxacina

CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
C_{max}	Concentración sérica máxima
CNRAM-INSPI	Centro de referencia nacional de resistencia antimicrobiana- Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública
CRO	Ceftriaxona
CYP	Citocromo P450
CYP1A2	Citocromo P450 1A2
CYP3A4	Citocromo P450 3A4
CZ	Cefazolina
D	Ácido aspártico
E	Ácido glutámico
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECUP	<i>E.coli</i> uropatógena
EMO	Elemental y microscópico de orina
EPA	Efecto postantibiótico
ETP	Ertapenem
FEP	Cefepime
FOS	Fosfomicina

FOX	Cefoxitina
FQ	Fluoroquinolonas
G	Glicina
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GN	Gentamicina
<i>gyrA</i> y <i>gyrB</i>	Genes que codifican topoisomerasa II
IMP	Imipenem
INEC	Instituto Nacional de Estadística y Censos. Ecuador
ITU	Infección del tracto Urinario
L	Leucina
LEV	Levofloxacin
Lk	Propiedad topológica de las moléculas
MDR	Moderadamente resistente
MRSA	<i>S. aureus</i> resistente a meticilina
MR/VP	Metilo/Voges Proskauer
MSSA	<i>S. aureus</i> sensible a meticilina
N	Aspargina

NA	Ácido Nalidíxico
NIT	Nitrofurantoina
OAT	Transporte orgánico de Aniones
OCT	Transporte orgánico de Cationes
OmpA	Proteína de membrana externa A
OmpC	Proteína de membrana externa C
OmpD	Proteína de membrana externa D
OmpF	Proteína de membrana externa F
OMS	Organización mundial de la salud
OPS	Organización panamericana de la salud
<i>parC</i> y <i>parE</i>	Genes que codifican topoisomerasa IV
pb	pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDR	Panresistente
Qnr	Gen plasmídico de resistencia a quinolonas
RAM	Resistencia antimicrobiana
RDRQ	Región determinante de resistencia a las quinolonas

ReLAVRA Red Latinoamericana de Vigilancia de Resistencia a los Antimicrobianos

RIM	Razón internacional normatizada
RND	Resistencia-nodulación-división
RQMP	Resistencia a quinolonas mediadas por plásmidos
S	Serina
SAM	Ampicilina/sulbactam
SIM	Sulfuro indol para motilidad
SNC	Sistema nervioso central
SOS	Sistema de reparación de emergencia del ADN
SXT	Trimetoprim/sulfametoxazol
TOB	Tobramicina
TZP	Piperacilina/tazobactam
$t_{1/2}$	Vida media de eliminación
UCI	Unidad de cuidados intensivos
UFC	Unidades formadoras de colonias
V	Valina
XDR	Extremadamente resistente

Contenido

DEDICATORIA.....	I
AGRADECIMIENTOS.....	II
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.....	VII
Contenido.....	XII
Índice de figuras.....	XVI
Índice de tablas.....	XVIII
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1. Situación actual de la resistencia antimicrobiana.....	3
1.2. Uso de antimicrobianos en veterinaria.....	3
1.3. <i>E. coli</i>	4
1.4. Condición Socioeconómica y de Salud de las poblaciones estudiadas.....	7
2. OBJETIVOS.....	10
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	13
3.1. <i>E. coli</i> uropatógena.....	13
3.1.1. Resistencia antimicrobiana en <i>E. coli</i>	14
3.1.2. Mecanismos de resistencia en <i>E. coli</i>	17
3.2. Fluoroquinolonas.....	20
3.2.1. Síntesis de quinolonas.....	24
3.2.2. Estructura química de las quinolonas.....	25
3.2.3. Nuevas quinolonas.....	344
3.2.4. Mecanismo de acción.....	355
3.2.4.1. Topoisomerasa II o ADN girasa.....	411
3.2.4.2. Topoisomerasa IV.....	44
3.2.4.3. Unión quinolonas-topoisomerasas.....	47
3.2.5. Actividad antimicrobiana de fluoroquinolonas.....	500
3.2.5.1. Microorganismos gram negativos.....	511
3.2.5.2. Microorganismos gram positivos.....	53

3.2.5.3.	Microorganismos anaerobios.....	55
3.2.5.4.	Micobacterias	556
3.2.5.5.	Patógenos atípicos.....	556
3.2.6.	Farmacocinética y farmacodinámica	577
3.2.6.1.	Farmacocinética	57
3.2.6.2.	Farmacodinámica.....	61
3.2.6.3.	Interacciones con otros fármacos.....	64
3.2.6.3.1.	Farmacodinámicas	65
3.2.6.3.2.	A nivel del huésped	66
3.2.6.3.3.	Farmacocinéticas	68
3.2.6.3.4.	A nivel del metabolismo de drogas	69
3.2.6.3.5.	A nivel de la excreción renal de drogas	70
3.2.6.4.	Precauciones y advertencias para su uso	71
3.2.7.	Uso clínico de fluoroquinolonas	73
3.2.7.1.	Infecciones de transmisión sexual:	74
3.2.7.2.	Infecciones gastrointestinales:.....	75
3.2.7.3.	Infecciones intraabdominales:	75
3.2.7.4.	Infecciones óseas y prótesis osteoarticulares:.....	76
3.2.7.5.	Infecciones de piel y tejidos blandos:	76
3.2.7.6.	Infecciones del tracto respiratorio:.....	76
3.2.7.7.	Infecciones por micobacterias:	77
3.2.7.8.	Infecciones de tracto urinario:.....	78
3.2.8.	Efectos adversos.....	82
3.2.8.1.	Efectos gastrointestinales.....	82
3.2.8.2.	Sistema nervioso central	83
3.2.8.3.	Reacciones dérmicas	83
3.2.8.4.	Alteraciones analíticas.....	84
3.2.8.5.	Alargamiento del intervalo QT en el electrocardiograma	84
3.2.8.6.	Tendinitis y rotura de tendones	85
3.2.9.	Mecanismos de resistencia a fluoroquinolonas.....	85

3.2.9.1.	Impermeabilidad de membrana	85
3.2.9.2.	Bombas de expulsión	86
3.2.9.3.	Resistencia a quinolonas mediada por plásmidos	86
3.2.9.3.1.	Proteínas <i>Qnr</i>	87
3.2.9.3.2.	Enzimas acetilasas tipo AAC (6') - <i>Ib-cr</i>	87
3.2.9.3.3.	Bombas de expulsión codificadas por plásmidos....	88
3.2.9.4.	Resistencia a fluoroquinolonas por mutaciones en genes de la ADN girasa y topoisomerasa IV	89
3.2.9.4.1.	Mutaciones en la ADN girasa	91
3.2.9.4.1.1.	Resistencia generada por mutaciones en el gen <i>gyrA</i>	91
3.2.9.4.1.2.	Resistencia generada por mutaciones en el gen <i>gyrB</i>	94
3.2.9.4.2.	Mutaciones en topoisomerasa IV.....	94
3.2.9.4.2.1.	Resistencia generada por mutación en el gen <i>parC</i>	95
3.2.9.4.2.2.	Resistencia generada por mutación en el gen <i>parE</i>	95
3.2.9.5.	Corresistencias en <i>E. coli</i>	98
4.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	101
4.1.	Selección de las muestras de orina	101
4.2.	Siembra de las muestras de orina	103
4.3.	Identificación bacteriana	103
4.4.	Pruebas de sensibilidad antibiótica	104
4.5.	Extracción de ADN	106
4.5.1.	Lisis	106
4.5.2.	Unión, lavado y elución	107
4.5.3.	Evaluación cuantitativa y cualitativa de ácidos nucleicos.....	108
4.6.	Diseño de Primers.....	109
4.6.1.	Preparación de primers	110

4.6.1.1.	GyrA Forward.....	110
4.6.1.2.	GyrA Reverse.....	110
4.6.1.3.	GyrB Forward.....	111
4.6.1.4.	GyrB Reverse.....	111
4.6.1.5.	ParC Forward.....	111
4.6.1.6.	ParC Reverse.....	112
4.6.1.7.	ParE Forward.....	112
4.6.1.8.	ParE Reverse.....	112
4.7.	Amplificación e identificación de genes.....	113
4.8.	Verificación de resultados.....	119
4.9.	Purificación de productos de PCR.....	120
4.10.	Interpretación de las secuencias.....	122
5.	RESULTADOS.....	126
5.1.	ITU en la población estudiada.....	126
5.2.	Perfiles de sensibilidad antibiótica.....	129
5.3.	Amplificación de los genes <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> , <i>parC</i> y <i>parE</i>	133
5.4.	Mutaciones en RDRQ.....	136
6.	DISCUSIÓN.....	139
7.	CONCLUSIONES.....	155
	BIBLIOGRAFIA.....	157
	ADENDUM.....	1844
	ARTICULO CIENTIFICO.....	185
	DIVULGACIÓN CIENTÍFICA EN CONGRESOS.....	197
	ANEXO.....	201
	Anexo 1. Perfiles de resistencia por CIM encontrados en las 59 cepas de <i>E. coli</i> analizadas.....	202
	Anexo 2. Características de laboratorio de las 59 cepas de <i>E. coli</i> analizadas.....	205

Índice de figuras

Figura 1. Estructura química y fórmula de cloroquina	26
Figura 2. Estructura química de las quinolonas	29
Figura 3. Ejemplos de derivados mono, tri y tetracíclicos de quinolonas...	31
Figura 4. Relación estructura-actividad antibacteriana de las quinolonas	344
Figura 5. Pared externa de las bacterias gram negativas	366
Figura 6. Horquilla de replicación del ADN bacteriano	377
Figura 7. Esquema de la ADN girasa cuando está inhibida	38
Figura 8. Modelo propuesto de la unión cooperativa entre la ADN girasa y la quinolona en la inhibición de la ADN girasa	39
Figura 9. Sitio de acción de las quinolonas.....	422
Figura 10. Relajación por la topoisomerasa II	422
Figura 11. Secuencia de eventos que conducen al efecto final de las quinolonas en función de la velocidad de disociación de los aductos (k_3)	50
Figura 12. Relaciones farmacocinéticas	64
Figura 13. Interacciones farmacológicas con las fluoroquinolonas.....	70
Figura 14. Patógenos asociados a ITU	78
Figura 15. Mecanismos de resistencia a quinolonas.....	89
Figura 16. Electroforesis de los productos de PCR de los genes <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> , <i>parC</i> y <i>parE</i>	116
Figura 17. Electroforesis del gen <i>gyrA</i> con las nuevas condiciones de termociclado	117
Figura 18. Microorganismos identificados en este estudio (n=74).....	126
Figura 19. Rango de edad en años, ITU por <i>E. coli</i> en la población estudiada.....	127
Figura 20. Frecuencia de ITU por <i>E. coli</i> en las comunidades estudiadas	128
Figura 21. Perfiles de sensibilidad antibiótica	130
Figura 22. Corrida electroforética del gen <i>gyrA</i>	134
Figura 23. Corrida electroforética del gen <i>gyrB</i>	134

Figura 24. Corrida electroforética del gen <i>parC</i>	135
Figura 25. Corrida electroforética del gen <i>parE</i>	135

Índice de tablas

Tabla 1. <i>Escherichia coli</i> : Tasas de resistencia a fluoroquinolonas en varias regiones del mundo.....	2
Tabla 2. Generación y espectro de actividad de las quinolonas.....	23
Tabla 3. Quinolonas existentes en Ecuador y su presentación. 2020	24
Tabla 4. Propiedades Farmacocinéticas de las Quinolonas.....	58
Tabla 5. Interacciones más importantes de las quinolonas	65
Tabla 6. Interacciones medicamentosas de ciertas quinolonas por inhibición CYP	69
Tabla 7. Tratamiento antibiótico de cistitis no complicada en el adulto	79
Tabla 8. Tratamiento antibiótico en cistitis no complicada en mujeres	80
Tabla 9. Tratamiento empírico de la pielonefritis aguda no complicada en mujeres.....	80
Tabla 10. Tratamiento alternativo con quinolonas en situaciones clínicas especiales	81
Tabla 11. Mutaciones en las subunidades <i>gyrA</i> y <i>gyrB</i> de cepas resistentes a quinolonas en <i>E. coli</i>	92
Tabla 12. Cambios aminoácidos por las mutaciones en <i>gyrA</i> y su relación con los niveles de resistencia a fluoroquinolonas	93
Tabla 13. Mutaciones descritas en las subunidades <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> , <i>parC</i> y <i>parE</i> en cepas resistentes a las quinolonas.....	97
Tabla 14. Distribución de los patrones de resistencia asociados con la presencia de BLEEs en cepas de <i>E. coli</i> uropatógena.....	99
Tabla 15. Oligonucleótidos usados para la detección de genes cromosómicos (Invitrogen).....	109
Tabla 16. Máster Mix para la PCR de los genes <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> , <i>parC</i> y <i>parE</i>	115
Tabla 17. Condiciones de termociclado usados en el laboratorio para la identificación de los genes <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> , <i>parC</i> y <i>parE</i>	118

Tabla 18. Distribución de ITU por Comunidad, sexo y rangos de edad en años	129
Tabla 19. Características de los fenotipos de resistencia encontrados en las 59 cepas de <i>E. coli</i> analizadas	132
Tabla 20. Mutaciones en <i>gyrA</i> , <i>parC</i> , <i>parE</i> y sensibilidad antibiótica en las 25 cepas de <i>E. coli</i>	137

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

La Organización Panamericana de la Salud, que actúa como Oficina Regional de la OMS para América Latina y el resto del mundo, coordina la recopilación de datos sobre la resistencia a los antimicrobianos en los hospitales y laboratorios de referencia de los países integrantes. En 2014, este organismo publicó un informe que muestra una elevada resistencia a fluoroquinolonas en *E. coli* en todas las regiones del mundo (Tabla 1) (OMS, 2014).

Tabla 1. *Escherichia coli*: Tasas de resistencia a fluoroquinolonas en varias regiones del mundo

Modificada de OMS 2014

Región (número de países que son parte de la red)	Rango de proporción de resistencia (%)	Rango de proporción de resistencia en muestras invasivas*
Región de América Latina (n=16 países)	8-58 %	n/d
Región de África (n=14 países)	14-71 %	34-53 %
Región de Europa (n=35 países)	8-48 %	8-47 %
Región del Pacífico Occidental (n=16 países)	3-96 %	7 %

*: Infecciones de torrente sanguíneo y meningitis principalmente; n/d: no definido

En este informe, la OMS reporta un rango de resistencia del 8 al 58% a fluoroquinolonas en cepas de *E. coli*, en 16 países que conforman la

Red Latinoamericana de Vigilancia de Resistencia a los Antimicrobianos (Red ReLAVRA) (OMS, 2014).

1.1. Situación actual de la resistencia antimicrobiana

En 2017 la Organización Mundial de la Salud lanzó un informe del Sistema Mundial de Vigilancia de Resistencia a los Antimicrobianos GLobal Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS report) donde se reportaron altos niveles de resistencia antimicrobiana en los diferentes países del mundo, y las acciones a implementar para evitar el incremento de este problema de salud pública (OMS, 2017).

En Ecuador los reportes de resistencia antimicrobiana realizados por el Centro de Referencia Nacional de Resistencia Antimicrobiana del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (CRNRAM-INSPI), mostraron niveles de resistencia a fluoroquinolonas superiores al 40% en cepas de *E. coli* aisladas de ITU comunitarias y mayor al 50% en cepas hospitalarias (CRNRAM-INSPI, 2018).

1.2. Uso de antimicrobianos en veterinaria

Uno de los principales usos de antimicrobianos se da en veterinaria, donde estos fármacos son empleados como suplemento alimenticio para engorde. El uso de estos fármacos se ve reflejado con el aumento de resistencia antimicrobiana y la presencia de estos fármacos en residuos

(Gouvêa et al., 2015). La OMS, en su informe de resistencia antimicrobiana de 2014, pone de manifiesto que el uso de estos fármacos en veterinaria está relacionado con el desarrollo de resistencia por la presión selectiva que supone (OMS, 2014). De igual manera, el último reporte de la OMS del sistema GLASS report pone las directrices necesarias para el control en el uso de antimicrobianos en veterinaria (OMS, 2017).

En Ecuador, el uso de antimicrobianos en el campo agrícola ha reportado altos niveles de resistencia a varios antibióticos de uso clínico, entre las que se destaca un 30% de resistencia a ciprofloxacino en muestras obtenidas de los excrementos de aves de corral (Braykov et al., 2016).

1.3. *E. coli*

E. coli es parte de la flora normal del intestino en seres humanos y animales. Sin embargo, es:

- La causa más frecuente de infecciones del tracto urinario altas y bajas adquiridas en la comunidad y en el hospital;
- La causa más frecuente de bacteremia en todas las edades;
- Causa de infecciones intraabdominales como peritonitis, infecciones de piel y de tejidos blandos junto con otros microorganismos;
- Una causa de meningitis en neonatos;

- Uno de los principales agentes causantes de las infecciones transmitidas por alimentos a nivel mundial (OMS, 2014)

Esta bacteria presenta resistencia a las cefalosporinas de tercera generación, la cual es debida principalmente a enzimas conocidas como beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE), las cuales hidrolizan estos antibióticos. Un problema con estas enzimas es su facilidad para transmitirse entre bacterias e incluso entre especies bacterianas por medio de elementos genéticos móviles (plásmidos). *E. coli* productora de BLEE generalmente se presenta con perfil de multirresistencia, de modo que la opción de tratamiento en infecciones por estos microorganismos son frecuentemente los carbapenémicos. El incremento del uso de esta familia de antimicrobianos ha dado lugar a una nueva amenaza emergente, como es la resistencia a carbapenémicos en enterobacterias mediada por la producción de carbapenemasas, que confieren resistencia a prácticamente todos los beta-lactámicos disponibles y que, al igual que las BLEE, pueden ser transferibles por plásmidos. (OMS, 2014).

Las guías internacionales, como la de la Asociación Americana de Urología, recomiendan el uso de trimetoprim-sulfametoxazol (SXT) en Infecciones de Tracto Urinario (ITU) no complicadas. Sin embargo, SXT no debe utilizarse como antibiótico de primera elección en poblaciones que presenten una tasa de resistencia superior al 20% en *E. coli*, por lo que se hace necesario conocer las tasas de resistencia a antimicrobianos para la

implementación de tratamientos empíricos eficaces (Grabe et al., 2010). En Quito-Ecuador, según datos del año 2016 generados por el CRNRAM-INSPI, la resistencia a SXT en *E. coli* fue superior al 60% en aislados comunitarios y hospitalarios.

Para Quito, el antibiótico de primera elección en infecciones urinarias no complicadas es nitrofurantoína, por su efectividad, bajo costo y seguridad. Según datos del hospital Voz Andes (Quito), la resistencia de *E. coli* a nitrofurantoína es de 6% (Zurita, 2017). En Ecuador disponemos actualmente de nitrofurantoína en macrocristales de liberación retardada (Uvamin retard o Nyfuryl). En su presentación de liberación retardada la dosis es 100 mg por vía oral cada 12 horas. El costo promedio en el mercado de cada captula es de 24 centavos de dólar por lo que el costo del tratamiento oscila entre 2,4 y 3,36 dólares (datos actualizados al 2020). Nitrofurantoína además puede considerarse como el antibiótico de elección durante el embarazo (clase B) y lactancia, ya que la resistencia a cefalosporinas de tercera generación en Quito supera el 30% (CRNRAM-INSPI, 2018); aun así, hay que tener en cuenta que el uso de nitrofurantoína está contraindicado en personas con insuficiencia renal (Grabe et al., 2010).

No se justifica el uso de aminoglucósidos (amikacina, gentamicina) como antibióticos de primera línea porque conllevan el riesgo de nefro y ototoxicidad, además de requerir administración parenteral (Grabe et al.,

2010). Otros antibióticos más costosos como las quinolonas, cefuroxima o fosfomicina deben reservarse para los casos complicados o si el urocultivo justifica su uso (Grabe et al., 2010). El abuso en la prescripción de fluoroquinolonas como ciprofloxacino o norfloxacino para el tratamiento de ITU no complicadas se traduce en un aumento de las tasas de resistencia, ya que, en Quito en el año 2016, las cepas de *E. coli* aisladas de pacientes hospitalizados y comunitarios presentaron más del 50% de resistencia a ciprofloxacino (CRNRAN-INSPI, 2016).

Entre las terapias no farmacológicas, se recomienda el consumo regular de jugo de arándano para la profilaxis de ITU recurrentes, especialmente en adultos mayores. La evidencia es insuficiente para recomendar su uso en el tratamiento de ITU y además se ha reportado un aumento de alteraciones gastrointestinales como diarrea. No existe evidencia suficiente para recomendar el aumento de la ingesta de líquidos. (Jepson et al., 2003).

1.4. Condición Socioeconómica y de Salud de las poblaciones estudiadas

Las comunidades estudiadas pertenecen a la población nativa amerindia Kichwa, vulnerable por los altos niveles de pobreza que según datos de INEC 2011 (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos del Ecuador) son: Comunidad de Guamote: 95,5%, Comunidad Colta: 93,3% y

en la Comunidad de Zumbahua: 98,1%; mientras que el nivel de analfabetismo en las mismas comunidades es del 21,7%, 29,02% y 40,6% respectivamente.

Se destaca la comunidad de Zumbahua, donde el 98,8% de la población se autoidentificó como indígena, con un 50.66 % de analfabetismo en la población femenina y 17,04% de embarazo adolescente.

No se disponen de indicadores de salud ni sanitarios en la población estudiada.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

El manejo clínico de las ITU no complicadas se basa generalmente en la implementación de tratamiento empírico, el cual se sustenta en el conocimiento de las tasas de resistencia antimicrobiana local. En Ecuador, son muy escasos los estudios y reportes de resistencia antibiótica en zonas rurales, ya que los centros de salud de estas zonas no cuentan con laboratorios de bacteriología. En estas circunstancias, no se pueden conocer los niveles de resistencia antimicrobiana en las zonas rurales del Ecuador, para recomendar un tratamiento empírico eficaz. Con los resultados de este estudio se puede prevenir la propagación de microorganismos multirresistentes y mantener bajas tasas de resistencia, por medio de la implementación de protocolos de uso racional de antimicrobianos.

En los últimos años han aumentado los reportes de resistencia a fluoroquinolonas, que son uno de los antibióticos más usados en el tratamiento de ITU, por lo que objetivo principal de este estudio ha sido identificar la prevalencia y los mecanismos moleculares de resistencia a fluoroquinolonas en cepas de *E. coli* uropatógenas aisladas de población nativa amerindia Kichwa del Ecuador.

Para lograr este objetivo principal, se propuso identificar el agente etiológico de ITU en las poblaciones investigadas, así como también determinar los perfiles de sensibilidad antimicrobiana en los aislados

identificados como *E. coli*. Una vez obtenidos los perfiles de sensibilidad antimicrobiana se plantea investigar las mutaciones en las Regiones Determinantes de Resistencia a Quinolonas (RDRQ) de los genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE* de las cepas de *E. coli* que presenten cualquier fenotipo de resistencia a fluoroquinolonas. Con los resultados obtenidos se pretende comparar la resistencia encontrada en las poblaciones estudiadas con la de los reportes de poblaciones rurales de Latinoamérica.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1. *E. coli* uropatógena

E. coli es uno de los microorganismos comensales más abundantes del tracto gastrointestinal de los seres humanos, así como una de las causas más frecuentes de varias infecciones, incluyendo enteritis, infecciones del tracto urinario, septicemia y otras infecciones, tales como meningitis neonatal (Korona-Glowniak et al., 2016).

E. coli es la causa más frecuente de ITU, y contribuye a casi el 90% de las infecciones primarias en mujeres jóvenes. La infección del sistema urinario puede ocasionar septicemia. La mayor parte de las ITU en pacientes sanos son causadas por un pequeño número de tipos antigénicos O, que han elaborado específicamente factores de virulencia que facilitan la colonización y las infecciones clínicas subsecuentes. Estos microorganismos se designan como *E. coli* uropatógena (ECUP) (Ferjani, 2011).

Las ITU son una de las infecciones bacterianas más comunes y ECUP es el agente etiológico en el 75% a 95% de las ITU en individuos previamente sanos. Basándose en la presencia o ausencia de anomalías anatómicas y la historia reciente de manipulación del tracto urinario, las ITU se dividen en casos complicados o no complicados (Millán et al., 2014).

El criterio de ITU desde el punto de vista microbiológico se considera significativo por la presencia de 10^5 UFC/ml, si bien en la actualidad los criterios de diagnóstico se han modificado según las recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Estos nuevos criterios de diagnóstico incluyen tener en cuenta la edad, sexo del paciente, la técnica de recogida y el microorganismo identificado. Por ejemplo, un recuento de 10^2 UFC/ml puede ser considerado significativo cuando hay presencia de síntomas de ITU. En varones, un recuento de 10^3 UFC/ml se considera significativo y en caso de muestras tomadas a través de catéteres se consideran significativos los recuentos de 10^2 a 10^4 UFC/ml. También en los casos de toma de muestra de orina por punción suprapúbica, cualquier recuento se debe considerar como significativo (Cueto, 2013).

3.1.1. Resistencia antimicrobiana en *E. coli*

La resistencia antimicrobiana es un problema emergente a nivel mundial presente en diversas bacterias, en especial en *E. coli*, miembro predominante de la flora intestinal normal aeróbica, que tiene altos porcentajes de resistencia a quinolonas (ácido nalidíxico), y fluoroquinolonas (ciprofloxacino), lo que supone grandes complicaciones en el tratamiento antibiótico cuando este es requerido (Ferjani et al., 2014).

La resistencia bacteriana a los antimicrobianos hace que su tratamiento sea más complicado y difícil, lo cual se presenta cada vez con

mayor frecuencia convirtiéndose en una crisis de salud a nivel mundial. Esta resistencia a los antimicrobianos está codificada por muy diversos genes, que eventualmente pueden transferirse de una bacteria a otra (Blair et al., 2014).

La evolución dentro de los clones y la transferencia horizontal de genes entre ellos conducen posteriormente a la diversificación, de modo que los organismos de origen clonal no siempre pueden ser fácilmente discernibles, y la expansión clonal podría ser difícil de distinguir de la convergencia evolutiva (Blair et al., 2014).

Entre los factores que producen un aumento de ITU están las infecciones intestinales, por su cercanía sobre todo con el aparato genitourinario femenino. Estas infecciones intestinales se dan por la falta de saneamiento, la higiene, la seguridad alimentaria y el acceso al agua potable. La falta de esta infraestructura básica contribuye a la endemidad en entornos con pocos recursos y amplifica la prevalencia de cepas resistentes en los seres humanos, así como en animales y los reservorios ambientales. Las oportunidades para que las bacterias se trasladen de un individuo colonizado a otro mejoran la difusión de los clones resistentes. En África, las ciudades atestadas y un número significativo de personas inmunocomprometidas son factores potenciales que podrían aumentar la difusión de los clones (Chattaway et al., 2016).

Las bacterias pueden tener una resistencia intrínseca a ciertos antimicrobianos, adquirir esta resistencia a los antibióticos a través de mutaciones en genes cromosómicos, o adquirirla por transferencia de material genético de un organismo donador a un receptor no descendiente (transferencia de genes horizontal) (Blair et al., 2014).

En el caso de las fluoroquinolonas, la resistencia se debe fundamentalmente a la aparición de mutaciones en localizaciones específicas dentro de áreas denominadas Regiones Determinantes de Resistencia a Quinolonas (RDRQs), localizadas en los genes *gyrA* y *parC*. En segundo lugar, ha de tenerse en cuenta la resistencia a quinolonas mediada por plásmidos (RQMP), donde se destacan los genes *qnr* y *aac(6)-IB-cr*. La resistencia a quinolonas también puede ser atribuible a otros genes (*qepA* y *oqxAB*) que van a promover el flujo de salida de la quinolona (Chattaway et al., 2016).

La carga de la resistencia a múltiples fármacos en bacilos gram negativos (BGN) representa en la actualidad un problema de todos los días de la administración de la terapia antimicrobiana en la unidad de cuidados intensivos (UCI). En enterobacterias, el aumento espectacular de las tasas de resistencia a cefalosporinas de tercera generación se debe principalmente a la propagación de plásmidos portadores de una beta-lactamasa de espectro extendido (BLEE), especialmente los que pertenecen a la familia CTX-M (Ruppé et al., 2015).

3.1.2. Mecanismos de resistencia en *E. coli*

La resistencia bacteriana puede ser tratada desde el punto de vista molecular y bioquímico de tal forma que se pueden clasificar en tres mecanismos: 1) inactivación del antibiótico, 2) alteración de la diana del antibiótico y 3) alteración de barreras de permeabilidad. Se podría mencionar que los tres mecanismos pueden ocurrir simultáneamente (Pérez et al., 2013).

La resistencia antimicrobiana por inactivación del antibiótico es un proceso molecular caracterizado por la producción de enzimas que van a destruir la estructura química del medicamento. Ocurre así con enzimas presentes muy frecuentemente en aislados clínicos, como las betalactamasas, que se caracterizan por hidrolizar el núcleo betalactámico rompiendo el enlace amida, la eritromicina esterasa, que cataliza la hidrólisis del anillo de lactona del antibiótico, el cloranfenicol acetiltransferasa y las diferentes enzimas que modifican a los aminoglucósidos, lincosamidas y estreptograminas (acetilasas, adenilasas y fosfatasas) (Giedraitienė et al., 2011) (Fuchs et al., 1994).

En cambio, la resistencia bacteriana que se produce por la alteración del sitio en donde actúa el antibiótico, consiste en la modificación de algunos sitios específicos de la célula bacteriana, como la pared celular, la membrana celular, las subunidades 50S o 30S ribosomales, entre otras. Dentro de este grupo se encuentra el mecanismo

principal de resistencia a fluoroquinolonas, la modificación por mutación de los genes *gyrA* y *parC*, que codifican las subunidades A de las topoisomerasas II y IV respectivamente. Se trata del mecanismo de resistencia a quinolonas más habitual en géneros tan distantes taxonómicamente como enterobacterias, estafilococos, pseudomonas, micobacterias (De la Fuente et al., 2007) (Fuchs et al., 1994) (Mosquito et al, 2011).

Finalmente, el mecanismo de alteración de barrera de permeabilidad se puede deber a dos causas:

- En gram negativos, se puede asociar a alteraciones en las porinas, que bien disminuyen en número, habitualmente por alteraciones en los genes que controlan su síntesis, o bien sufren alteraciones en su morfología debidas a mutaciones en los propios genes estructurales de la porina. En el primer caso, la reducción, en ocasiones drástica, del número de porinas, supone una reducción significativa en la penetración de sustancias hidrofílicas, entre las que se encuentran la mayor parte de los antimicrobianos, de modo que no alcanzan la concentración necesaria para ejercer su acción. Se trata de mecanismos que son habitualmente de amplio espectro (afectan a diferentes familias de antimicrobianos no emparentadas, y a otras moléculas con

funcionalidades diversas), tienen una repercusión sólo moderada en las concentraciones inhibitorias mínimas (CIMs) de los antimicrobianos, y suelen repercutir de forma importante en el *fitness* bacteriano. En el segundo caso, las alteraciones morfológicas del canal de entrada en la célula que supone la porina, pueden dificultar la penetración tanto de antimicrobianos como de otras moléculas. Como en el caso anterior, se trata de mecanismos habitualmente de amplio espectro, y que tienen una repercusión moderada en las CIMs de los antimicrobianos,

- Tanto en gram positivos como en gram negativos se puede dar otro mecanismo de interferencia de la penetración de los antimicrobianos en la célula bacteriana, que es la sobreexpresión de bombas de expulsión. Las bombas de expulsión son mecanismos que, mediante consumo de energía, expulsan solutos presentes en el citoplasma bacteriano en contra de gradiente. Estas bombas existen en condiciones basales, pero pueden sobreexpresarse, eliminando mayores cantidades de antimicrobiano, de modo que pueden llegar a repercutir en sus CIMs. Es un mecanismo de impermeabilización posible en gram negativos, y prácticamente el único factible en gram positivos, en los que no existen porinas propiamente dichas.

Su espectro es más variable, aunque tienden a tener un espectro más bien amplio, y es infrecuente que, por sí sólo, pueda condicionar resistencia, de modo que habitualmente se comportan como mecanismos de resistencia complementarios a otros más eficaces (Pérez et al., 2013).

3.2. Fluoroquinolonas

Las fluoroquinolonas son antimicrobianos de amplio espectro con actividad frente a microorganismos gram negativos y gram positivos, empleados para el tratamiento de numerosas enfermedades infecciosas (Azanza et al., 1998) (Deck et al., 2010).

Las fluoroquinolonas actúan inhibiendo la replicación del ADN por inhibición de la ADN girasa y la topoisomerasa IV, enzimas esenciales para la replicación y transcripción del ADN. Son empleadas tanto a nivel extra como intrahospitalario. La forma de administración es tanto parenteral como enteral (Deck et al., 2010) (Azanza et al., 1998).

Las quinolonas presentan una estructura bicíclica heteroaromática constituida por un núcleo piridona- β ácido carboxílico y un anillo aromático (Campos et al., 2008).

La primera quinolona utilizada de manera amplia en clínica fue el ácido nalidíxico, obtenido en el proceso de síntesis de la cloroquina. Ha

sido utilizado fundamentalmente para el tratamiento de infecciones urinarias. Posteriormente, se descubrió la primera quinolona con un átomo de flúor, la flumequina, con lo que se inició la era de las quinolonas fluoradas, con un mejor perfil farmacológico (Petri, 2006) (Azanza et al., 1998).

Estructuralmente, hay dos grandes grupos de quinolonas: 4 quinolonas y 6 fluoroquinolonas.

Las 4 quinolonas (naftiridina, cinolina, quinoleína y piridopirimidina) se caracterizan por la sustitución de nitrógeno en las posiciones 1 y 8 (naftiridina), 1 y 2 (cinolinas), 1 (quinoleína) y 1, 6, 8 (piridopirimidina). A este grupo pertenecen el ácido nalidíxico, ácido oxolónico, ácido pipemídico, ácido piromídico, cinoxacina y acrosoxacina (Azanza et al., 1998) (Campos et al., 2008).

Las 6 fluoroquinolonas presentan un grupo flúor en la posición 6. La diferencia estructural entre las fluoroquinolonas depende de la sustitución en la posición 1, 5, 7 y 8. En la posición 1 la presencia del grupo ciclopropil proporciona mayor actividad frente a bacilos gram negativos. En la posición 2 no hay apenas posibilidades de modificación, mientras las posiciones 3 y 4 modifican la afinidad por la topoisomerasa. Los cambios en la posición 5, como la presencia de un grupo amino o metilo, modifican las propiedades farmacocinéticas. En la posición 7, la presencia de un grupo piperacínico (norfloxacino, ciprofloxacino) o de un grupo

metilpiperacina (ofloxacino, levofloxacino, gatifloxacino), influyen en la potencia frente a gram negativos, mientras que presencia de halógenos (moxifloxacino, gatifloxacino) en la posición 8 aumenta la actividad contra anaerobios (Campos et al., 2008).

La introducción de las fluoroquinolonas en clínica supuso un avance terapéutico, debido a su baja toxicidad, aunque los conceptos a este respecto se han modificado considerablemente en los últimos tiempos, mayor espectro de actividad y mejora en las propiedades farmacocinéticas (Petri, 2006).

Las fluoroquinolonas son consideradas como fármacos de categoría C en el embarazo, atraviesan la placenta y se concentran en el líquido amniótico. En estudios previos con animales se evidenció daño fetal; además se sugiere la asociación con toxicidad renal, del sistema nervioso central y alteraciones cardíacas. Se eliminan por la leche por lo que deben evitarse en la lactancia. Por ello su uso está contraindicado en embarazo, lactancia, pacientes con insuficiencia renal y se debe usar solo en casos cuando no existe otra alternativa (Brandon et al., 2015) (Azanza et al., 1998).

Las características estructurales más las diferencias en el espectro antibacteriano permiten clasificar las fluoroquinolonas en 4 generaciones (Tabla 2) (Álvarez et al., 2015).

Tabla 2. Generación y espectro de actividad de las quinolonas

Modificada de Álvarez et al., 2015

G	Representante	Espectro de actividad
1 ^a	Ácido nalidíxico*, Ácido oxolínico, Ácido piromídico, Ácido pipemídico*, Rosoxacino, Cinoxacino.	Principalmente enterobacterias Bacilos gramnegativos: <i>E. coli</i> , <i>Proteus</i> spp., <i>Klebsiella</i> spp., <i>Enterobacter</i> spp., <i>Serratia</i> spp., <i>Citrobacter</i> spp., <i>Salmonella</i> spp., <i>Shigella</i> spp.
2 ^a	Ciprofloxacino*, Enoxacino, Fleroxacino, Lomefloxacino, Nadifloxacino, Norfloxacino*, Ofloxacino*, Pefloxacino, Rulfloxacino.	Bacilos gramnegativos: <i>P. aeruginosa</i> , <i>M. catarrhalis</i> , <i>Acinetobacter</i> spp., <i>S. maltophilia</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>V. cholerae</i> , <i>Campylobacter</i> spp. Cocos Gram positivos: <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> Patógenos atípicos: <i>C. trachomatis</i> , <i>Mycoplasma</i> spp.
3 ^a	Levofloxacino*, Esparfloxacino, Tosufloxacino, Temafloxacino, Grepafloxacino.	Bacilos gramnegativos: Mismos que en 1 ^a y 2 ^a generación Gram positivas: <i>S. pneumoniae</i> y <i>S. pyogenes</i> Patógenos atípicos: <i>C. pneumoniae</i> y <i>M. pneumoniae</i>
4 ^a	Balofloxacino, Clinafloxacino, Gatifloxacino, Gemifloxacino, Moxifloxacino*, Pazufloxacino, Arenfloxacino, Sitafloxacino, Rovafloxacino, Trovafloxacino.	Mismas que la 3 ^a generación. Bacilos Gram positivos, espectro extendido en anaerobios y "atípicos". Gram positivas: <i>S. pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i> (resistente a meticilina). Anaerobios: <i>Bacteroides</i> spp., <i>Clostridium</i> spp. Patógenos atípicos: <i>L. pneumophila</i> , <i>C. pneumoniae</i> , <i>M. pneumoniae</i> , <i>Ureaplasma</i> spp.
5 ^a	Garenoxacino DX-619, WCK-771, WCK-1153, DW-286 Ev-035, DS-8587, KPI-10 (ICAAC, 2012) Delafoxacino, Nemonoxacino, JNJ-Q2	Algunas como la 4 ^a generación y otras con diseño específico contra bacterias multirresistentes.

*Quinolonas disponibles en el Ecuador

En el Ecuador se dispone de varias quinolonas de todas las generaciones (Tabla 3).

Tabla 3. Quinolonas existentes en Ecuador y su presentación. 2020

Generación	Representante	Presentación
1 ^a	Ácido nalidíxico Ácido pipemídico	Suspensión 250 mg/5 ml Tableta 500 mg Tableta 400mg
2a	Ciprofloxacino Norfloxacino Ofloxacino	Tableta 250 - 500 -750 mg Solución inyectable 200mg/100ml Suspensión ótica 7.5 ml (cada 100 ml contiene: Ciprofloxacino 0.3 g y Dexametazona 0.1 g) Tableta 400 mg Tableta 400 mg
3 ^a	Levofloxacino	Tableta 500 mg Tableta 750 mg
4a	Moxifloxacino	Tableta 400 mg Solución inyectable 400mg/250ml Solución oftálmica 5mg/ml

Elaboración: Autor

3.2.1. Síntesis de quinolonas

Las primeras síntesis de quinolonas se realizaron usando la reacción de Gould-Jacobs, utilizando como materia prima una anilina clorada. Más adelante, se reportó la aplicación de esta reacción a la síntesis de fluoroquinolonas partiendo de anilinas fluoradas. En esta síntesis se hace reaccionar una anilina sustituida con etoximetilenmalonato de dietilo, y esto resulta en una secuencia de adición y eliminación para generar un acrilato que, al calentarse a elevadas temperaturas, produce una hidroxiquinolona cíclica. Este compuesto se hace reaccionar con un agente alquilante y posteriormente se hidroliza fácilmente para producir el

ácido correspondiente. Existen en la literatura una gran cantidad de reportes en donde se utiliza esta secuencia para preparar fluoroquinolonas con diferentes sustituyentes. En la metodología descrita por Grohe y Zeiler se parte de un ácido benzoico sustituido, que se transforma fácilmente al benzoilacetato de etilo y se hace reaccionar con ortoformiato de trietilo para producir el etoxialqueno correspondiente, donde es posible sustituir el grupo etoxi por un grupo amino para producir el intermediario, que puede ser ciclado con una base fuerte generando el anillo de quinolona. Este procedimiento fue originalmente propuesto por investigadores de industrias Bayer, y permite la construcción de una gran variedad de fluoroquinolonas con N-sustituyentes de tipo arilo, alquilo y cicloalquilo. Por esto, continúa siendo vigente y ampliamente utilizado aún en nuestros días (Leyva et al., 2008).

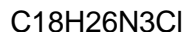
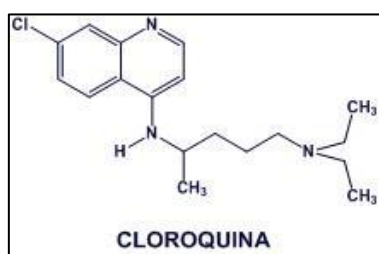
3.2.2. Estructura química de las quinolonas

Desde la aparición del primer miembro de este grupo en 1962, el ácido nalidíxico, obtenido por síntesis a partir de la cloroquina (Figura 1), su importancia ha ido aumentando de forma paralela al descubrimiento o síntesis de nuevos compuestos: ácido oxolínico, ácido piromídico, cinoxacino y ácido pipemídico. Todos ellos tienen un espectro dirigido hacia bacilos gram negativos y se han utilizado preferentemente como antisépticos urinarios, intestinales y biliares. En 1973 apareció la primera quinolona con un átomo de flúor: la flumequina, pero es en 1978 cuando se

inicia la era de las quinolonas fluoradas con la síntesis del norfloxacin y otros numerosos compuestos (López et al., 2010).

Figura 1. Estructura química y fórmula de cloroquina

Modificada de: <http://www.info-farmacia.com/actualidad/desarrollo-y-conciencia-social/planta-china-para-el-tratamiento-de-la-malaria-resistente>



La estructura química está basada en el anillo 4-oxo-1,4-dihidroquinoleína, del que derivan 4 grupos (naftiridina, cinolina, quinoleína y piridopirimidina) según las distintas sustituciones por nitrógeno en los diferentes átomos: posiciones 1 y 8 para naftiridina, 1 y 2 para las quinoleínas y 1, 6 y 8 para piridopirimidina. Las mayores ventajas conseguidas en cuanto a la actividad y el espectro de la molécula se deben a la incorporación de un átomo de flúor en posición 6 y el grupo piperacínico heterocíclico en el 7, que aumentan la actividad antibacteriana y su espectro frente a bacterias gram positivas, *Pseudomona*, enterobacterias, etc. (López et al., 2010).

La potencia y el espectro aumentan de manera significativa cuando llevan un átomo de flúor en la posición 6, posiblemente porque mejora la penetración en tejidos y la unión a las topoisomerasas bacterianas. Frente a bacterias gram negativas también aumenta la potencia si en la posición 7 hay un grupo piperacínico (norfloxacino, ciprofloxacino) o un grupo metilpiperacínico (ofloxacino, levofloxacino, gatifloxacino). Además, sustituyentes metilo en el grupo piperacínico mejoran la biodisponibilidad oral. Un grupo metoxi en la posición 8 mejora la actividad frente a anaerobios (moxifloxacino, gatifloxacino) (Alós, 2009).

Las quinolonas pueden clasificarse por su espectro de actividad en generaciones. Las de primera generación (ácido nalidíxico, ácido pipemídico), tienen actividad frente a enterobacterias y algún otro gram negativo y son prácticamente inactivas frente a gram positivos, patógenos atípicos y anaerobios. A partir de aquí ya incorporan un átomo de flúor en la posición 6 y se llaman fluoroquinolonas. Las de segunda generación (ciprofloxacino, norfloxacino) presentan una actividad mucho mayor frente a gram negativos, incluida *Pseudomonas aeruginosa*, son activas frente a algunos patógenos atípicos, pero tienen actividad moderada frente a gram positivos y prácticamente nula frente a anaerobios. Las de tercera generación (levofloxacino) mantienen las características de las de segunda pero además tienen una mejor absorción por vía oral y mejor actividad frente a *P. aeruginosa*, gram positivos y patógenos atípicos. Las de cuarta

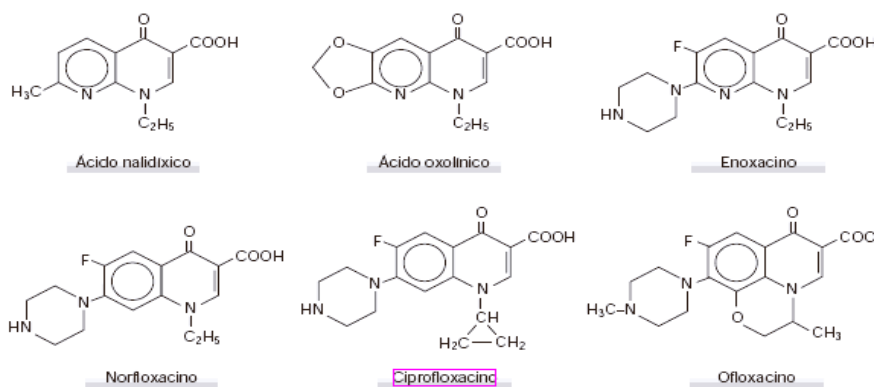
generación (moxifloxacino) aportan una mejora en la actividad frente a gram positivos y además una actividad buena frente a anaerobios, aunque disminuye su actividad frente a *P. aeruginosa* (Alós, 2009), y las de quinta generación con diseño específico frente a bacterias multirresistentes (ICAAC, 2012).

Dado que el ácido nalidíxico presentaba una baja penetración intracelular, reducido espectro de actividad y que su farmacocinética sólo producía una adecuada concentración en las vías urinarias, su uso se reservó fundamentalmente para el tratamiento de infecciones urinarias no complicadas. El gran descubrimiento correspondió a la síntesis de compuestos que presentaban los sustituyentes 6- fluoro, 7-piperazinil (norfloxacino, ciprofloxacino y pefloxacino); éstos dieron origen al grupo que genéricamente se ha denominado quinolonas, 4- quinolonas o fluoroquinolonas (Maguiña et al., 2002).

Debido a que es posible nombrar a las moléculas derivadas del ácido nalidíxico como derivados de la quinolina, ya que el esqueleto común es la 4-oxo-1,4-dihidroquinolina, su sistematización a partir de esta denominación resulta engorrosa, particularmente por el elevado número de nuevos compuestos, haciéndose útil la clasificación y nomenclatura desarrollada por JT Smith quien consideró que la forma más sencilla y equivalente de nombrar a la quinolina sustituida era la de 4- quinolona (Figura 2) (Mella et al., 2000).

Figura 2. Estructura química de las quinolonas

Modificada de: http://bvs.sld.cu/revistas/act/vol8_1_98/act08198.htm



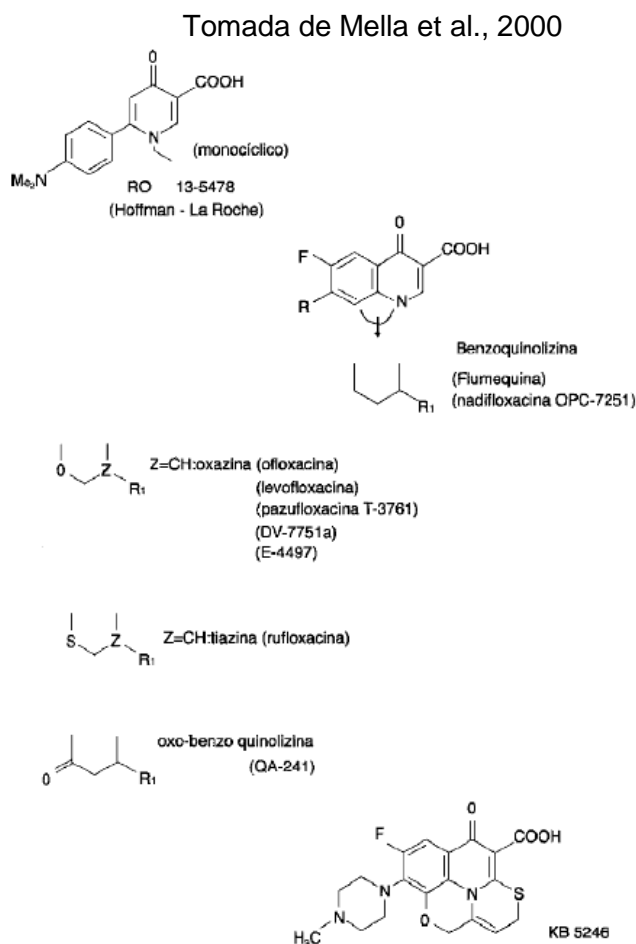
De hecho, con esta nomenclatura, es posible obtener una descripción de los enlaces existentes en la piridina. Según este sistema, ácido nalidíxico, enoxacino, tosufloxacino, trovafloxacino y gemifloxacino son 8-aza-4 quinolonas; cinoxacino es una 2-aza-4- quinolona y los ácidos pipemídico y piromídico corresponderían a 6,8-diaza-4-quinolonas. El resto de los compuestos corresponderían a 4-quinolonas o simplemente quinolonas (Mella et al., 2000).

Los estudios indican que la potencia antibacteriana está fuertemente influenciada por el tamaño, propiedades electrónicas y espaciales del sustituyente de la posición 1 de la fluoroquinolona. Estudios de relaciones estructura-actividad realizados con un grupo de derivados alquílicos en N-1 sugieren que una longitud óptima para el sustituyente alquílico es de 4.2 Å, siendo para el grupo etilo de 4.1 Å. Sin embargo,

existen otros factores como donación electrónica o habilidad de conjugación que también influyen en la actividad biológica de las quinolonas (Leyva et al., 2008).

Otra característica que influye en la actividad de las quinolonas es su estructura, ya que se ha determinado una fuerte relación entre las sustituciones en las diferentes posiciones del anillo básico de la 4-quinolona (bicíclica) y las propiedades antimicrobianas, microbiológicas y farmacocinéticas que desarrollan, y de la cual derivan moléculas de estructura bicíclica, tricíclica o tetracíclica. Ya que se ha determinado que las moléculas monocíclicas (Ro 13-5478) no presentan mayor actividad antimicrobiana (Figura 3) (Mella et al., 2000).

Figura 3. Ejemplos de derivados mono, tri y tetracíclicos de quinolonas



Los cambios que pueden darse en el anillo básico de las quinolonas son un cambio en:

La posición 1, el sustituyente de mayor importancia es el grupo ciclopropil presente en muchas moléculas: ciprofloxacino, esparfloxacino, clinafloxacino (Wise et al., 1983). El grupo ciclopropil combina favorables propiedades estéricas, espaciales y de interacción electrónica; así, la

quinolona de mayor uso clínico, ciprofloxacino, presenta un grupo ciclopropil a nivel N1, exhibiendo una potente actividad sobre enterobacterias y *P. aeruginosa* (Crumplin, 1988)(Mella et al., 2000).

En la posición 2 se han realizado pocas modificaciones, fundamentalmente por la cercanía a los grupos carboxilo y ceto presentes en los carbonos 3 y 4, que son fundamentales para la unión a las topoisomerasas bacterianas. (Chu et al., 1989)(Domagala, 1994)

En las posiciones 3 y 4, son analizadas conjuntamente por su importancia mencionada anteriormente. Esto, por la presencia de ácido carboxílico en C3 y un grupo ceto en C4, que son fundamentales para la actividad de estos compuestos ya que permiten la unión a las topoisomerasas bacterianas (Chu et al., 1989)(Domagala 1994)(Mella et al., 2000).

En la posición 5, un grupo amino en esta posición puede incrementar la absorción, distribución y actividad sobre especies gram positivas de la quinolona (esparfloxacino). Otro cambio a este nivel es la presencia de un grupo metilo presente en grepafloxacino, molécula que se caracterizaba por favorables propiedades farmacocinéticas sobre *Streptococcus pneumoniae* (Mella et al., 2000)(Wagstaff et al., 1997).

En la posición 6, la presencia de un átomo de flúor en esta posición resultó en un aumento significativo de la actividad antibacteriana tanto en

bacterias gram negativas como gram positivas, por lo que todas las modernas quinolonas de uso clínico son seis fluoroquinolonas, la presencia de este sustituyente en esta posición aumentó la unión al complemento topoisomerasa-ADN, así como la penetración intracelular en relación a otros derivados no fluorados (Chu et al., 1989).

En la posición 7, los grupos más frecuentemente usados en esta posición son piperazina presente en enoxacina, norfloxacin, ciprofloxacina. Metilpiperacina presente en ofloxacina, levofloxacina, rufloxacina, gepafloxacina. Pirrolidina, aminopirrolidinas y moléculas derivadas. Anillos bicíclicos como: azabicyclo presente en travofloxacina. En general la presencia de un metilo en el C-4 del grupo piperazina incrementa la actividad sobre especies Gram positivas produciendo una leve disminución en la actividad sobre bacilos gram negativos, en particular *P. aeruginosa*. (Chu et al., 1989)(Domagala, 1994).

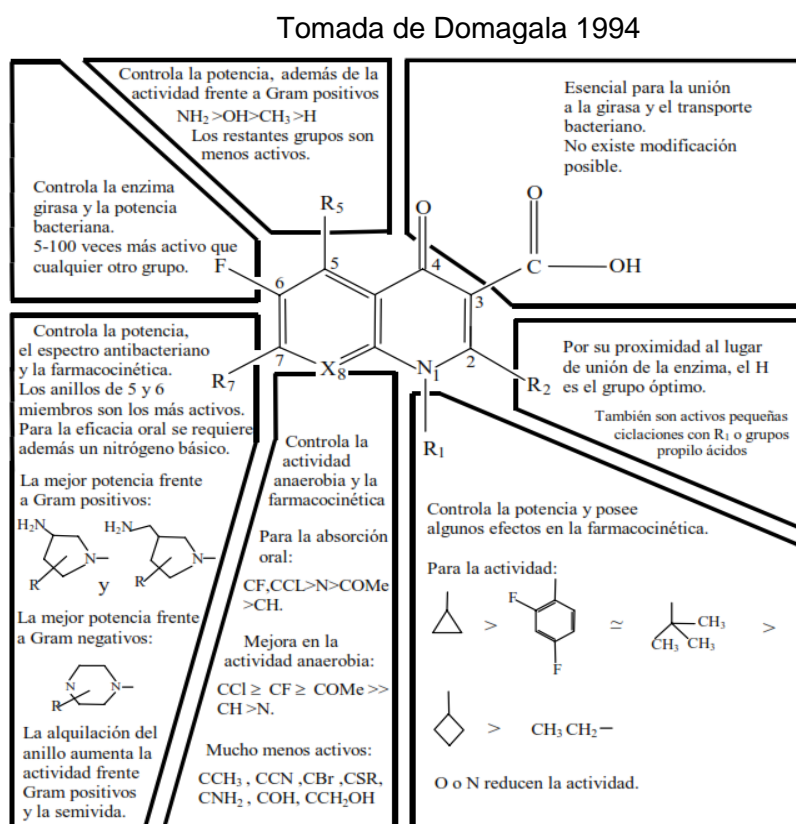
En la posición 8, la presencia de halógenos aumenta la actividad antianaerobia, en partículas C1 y F. Por otra parte, para una mejor absorción por vía oral, F y C1 son los sustituyentes de mayor actividad. Sin embargo, la presencia de estos halógenos (F y C1) se ha asociado a fenómenos de fototoxicidad, por lo que se ha incentivado a la síntesis de compuestos sin halógenos en el sustituyente 8 (Domagala, 1994).

En la (figura 4) se encuentra complementariamente la relación estructura-actividad antibacteriana de las quinolonas.

3.2.3 Nuevas quinolonas

Con nuevas modificaciones se logró obtener una serie de nuevas quinolonas, con características muy mejoradas, ejemplo: trovafloxacin, pero buena parte de ellas tuvieron que ser retiradas por problemas de toxicidad y efectos secundarios, en algunos casos graves, incluso con muerte de pacientes. Así temofloxacin tuvo que ser retirada del mercado por toxicidad renal y hematológica, trovafloxacin por hepatotoxicidad y grepafloxacin por toxicidad cardiaca (Maguiña et al., 2002).

Figura 4. Relación estructura-actividad antibacteriana de las quinolonas



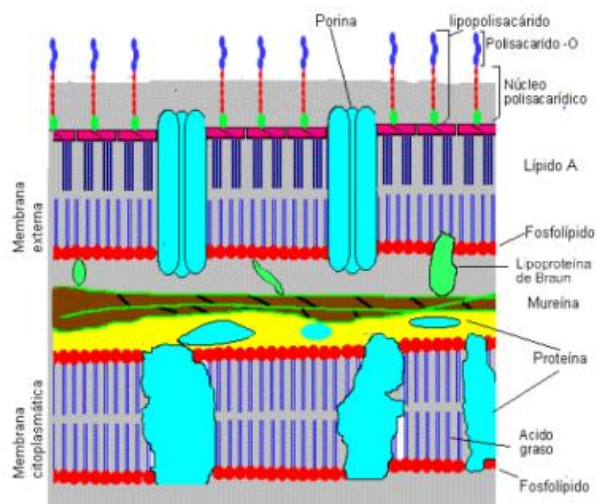
La actividad sobre *S. pneumoniae* ha sido un gran logro en el grupo de nuevas quinolonas, reemplazando la escasa o moderada actividad bactericida de sus predecesores. Sobre patógenos respiratorios como *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Legionella pneumophila* y *Mycoplasma pneumoniae*, demostraron buena actividad *in vitro*. Los estudios de CIM90 que comparan su actividad frente a ciprofloxacino, demuestran en las primeras un aumento de hasta diez veces en su actividad antineumocócica, siendo trovafloxacino la de mejor actividad. Estos valores son independientes de la CIM de este patógeno para penicilina, resultando igualmente activas frente a cepas sensibles o resistentes (sea ésta intermedia o elevada resistencia) (Maguiña et al., 2002).

3.2.4. Mecanismo de acción

Esencialmente, estos antimicrobianos producen un efecto bactericida. Las quinolonas penetran en la bacteria a través de las porinas, unas proteínas integrales de la membrana que ejercen la función de canal de paso para sustancias hidrosolubles (Figura 5), de modo que no se verán afectadas ni modificadas al momento del paso al interior de la bacteria (Azanza et al., 1998).

Figura 5. Pared externa de las bacterias gram negativas

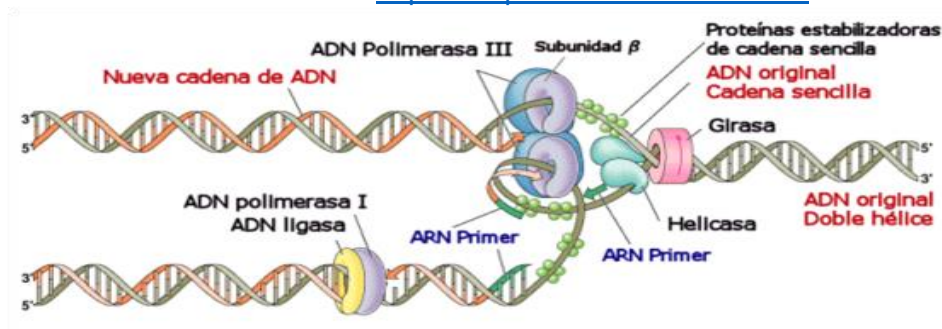
Tomada: <https://estructurayfuncioncelularbacteriana.wikispaces.com/Pared+celular+gram+negativas>



Una vez dentro de la célula actúan inhibiendo una serie de enzimas que ejercen diferentes funciones sobre el ADN bacteriano, esencialmente su preparación para la transcripción, y que se denominan, de forma global, topoisomerasas de tipo II. Las dos principales enzimas de este tipo presentes en las bacterias son la topoisomerasa IV y, esencialmente, la topoisomerasa II o ADN-girasa (por ello se las denomina también «inhibidores de la girasa»). Esta enzima está compuesta por cuatro subunidades (dos subunidades A y dos B) y es la responsable del enrollamiento de las bandas de ADN (Figura 6) (Azanza et al., 1998).

Figura 6. Horquilla de replicación del ADN bacteriano

Tomada: <http://compostimes.com/2015/12/>

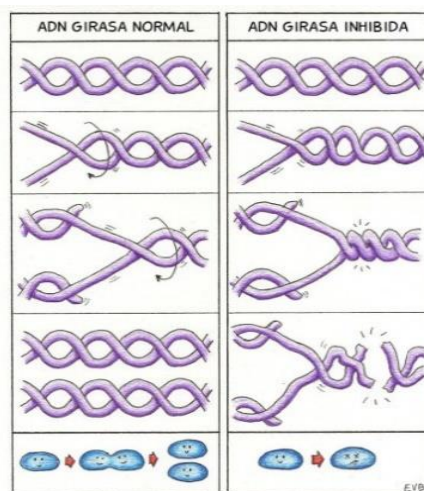


Una vez en el núcleo es necesario separar cada cadena del ADN bicatenario para permitir su multiplicación o transcripción. Sin embargo, lo que separa a las cadenas provoca el “enrollamiento” excesivo del ADN frente al punto de separación. Para combatir este obstáculo mecánico, la enzima bacteriana ADN girasa (Figura 7) permite la introducción continua de superhélices negativas en el ADN por medio de una reacción que es alimentada energéticamente a través de la hidrólisis del ATP que implica la separación de ambas cadenas de ADN para permitir el paso de un segmento de ADN a través de la rotura; posteriormente esta rotura se sella de nuevo (Petri, 2006).

Figura 7. Esquema de la ADN girasa cuando está inhibida

Tomada de:

<https://biomedvinetas.wordpress.com/2014/09/30/antibioticos-i-el-arma-definitiva-contras-las-infecciones-o-eso-pensabamos/>

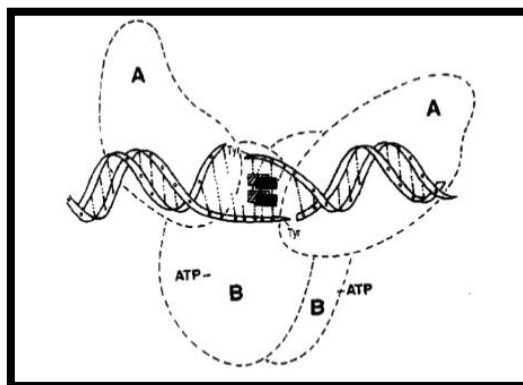


Las quinolonas actúan interfiriendo en la síntesis del ADN al bloquear la reacción de superenrollamiento dependiente del ATP y catalizada por la girasa; esta enzima es también responsable de otras actividades necesarias para la integridad del ADN, como son la unión y separación de las bandas que lo componen y la hidrólisis del ATP, que por lo tanto también serán alteradas (Azanza et al., 1998).

Como norma general, la ADN girasa constituye la principal diana de las quinolonas (Figura 8) en la mayor parte de los microorganismos gram negativos (ej., *E. coli*), mientras en bacterias gram positivas (ej., *S. aureus*), esa diana la constituye frecuentemente la topoisomerasa IV (Leyva et al., 2008).

Figura 8. Modelo propuesto de la unión cooperativa entre la ADN girasa y la quinolona en la inhibición de la ADN girasa

Tomada de Leyva et al (2008).



Es probable que las concentraciones de quinolonas mayores que las necesarias para inhibir la ADN girasa, puedan inhibir la topoisomerasa IV, enzima cuya secuencia de aminoácidos presenta homología con la girasa y cuyo papel es también de gran importancia en la reacción de superenrollamiento del ADN. Recientemente se ha comprobado la acción de ácido oxolínico y norfloxacin sobre la topoisomerasa IV de *E. coli*. La acción inhibitoria sobre la topoisomerasa II de las células eucariotas, relacionada sobre todo con nuevos derivados, podría asociarse con una potencial actividad antitumoral (Azanza et al., 1998).

La acción bactericida característica de las fluoroquinolonas se suele comportar de manera bifásica: para cada quinolona existe una concentración bactericida máxima por encima de la cual la actividad

disminuye, pero vuelve a aumentar si se continúa incrementando la concentración. Esta característica podría explicarse por el hecho de que, a ciertas concentraciones, la acción bacteriostática impide la síntesis de proteínas que participan en la acción bactericida (Azanza et al., 1998).

También disminuye la actividad bactericida si previamente se ha inhibido la síntesis de proteínas bacterianas; por ello, no es recomendable su utilización conjunta con sustancias que inhiban la síntesis proteica o el ARN bacteriano (rifampicina, macrólidos, cloranfenicol), ya que puede reducirse de forma significativa la actividad bactericida (Azanza et al., 1998).

Estos fármacos inhiben la regulación del enrollamiento del ADN catalizada por la girasa a una concentración que se correlaciona con la necesaria para inhibir el crecimiento bacteriano (0.1 a 10 µg/ml) (Petri, 2006).

Las células eucariotas no contienen ADN girasa, sino una topoisomerasa de ADN tipo II similar desde el punto de vista conceptual y mecánico al que elimina las superhélices positivas. Sin embargo, las quinolonas inhiben a la topoisomerasa tipo II eucariota únicamente a una concentración mucho mayor (100 a 1.000 µg/ml) que la que se necesita para inhibir a la ADN girasa bacteriana (Petri, 2006).

3.2.4.1. Topoisomerasa II o ADN girasa

Se descubrió en 1976, la ADN girasa es un tetrámero A₂B₂ con la subunidad A (*gyrA*, 97kDa) como responsable del enrollamiento del ADN, ruptura y reunión de ADN; y la subunidad B (*gyrB*, 90kDa) como la encargada de la hidrólisis de ATP y de la interacción con *gyrA* y ATP. Esta enzima cataliza cambios en la topología (rama matemática que estudia las propiedades estructurales de los objetos que no cambian cuando estos sufren distorsiones) del ADN durante los procesos de replicación, transcripción, recombinación y reparación del genoma. En primer lugar, pueden cortar y empalmar repetidamente los enlaces fosfodiéster del esqueleto de polifosfodesoxiribosa que alberga en su interior a las bases nitrogenadas codificadoras del mensaje genético. En segundo lugar, permiten que otras cadenas de ADN pasen entre los dos cabos transitoriamente escindidos. En el desempeño de esa tarea, las topoisomerasas utilizan la energía del enlace internucleotídico para unirse covalentemente al extremo 3' o 5' del ADN. Para evitar que los cabos de ADN escindido vayan a la deriva, las topoisomerasas lo sujetan con firmeza, mientras otras cadenas de ADN los atraviesan (Roca, 2003). Cuando empalman nuevamente las cadenas de ADN, revierten esa unión covalente, restableciendo el enlace internucleotídico inicial como se observa en la (figura 9) (Reguera et al., 2007).

Figura 9. Sitio de acción de las quinolonas

Tomada de Petri, 2006



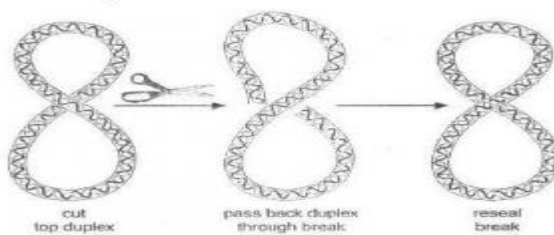
Modelo de la formación de superhélices negativas de DNA por medio de la DNA girasa. Esta enzima se une a dos fragmentos de DNA (1), creando un nodo de superhélice positiva (+). A continuación la enzima introduce un fragmento bicatenario en el DNA y pasa al segmento delantero a través de la rotura (2). Luego la rotura se sella de nuevo (3), creando una superhélice negativa (-). Las quinolonas inhiben las actividades de fragmentación y cierre de la girasa y, a una mayor concentración, bloquean la actividad desconcatenadora de la topoisomerasa IV. Tomada de Cozzarelli NR. DNA gyrase and the supercoiling of DNA. *Science*, 1980, 207:953-960. Reimpresa con autorización de la AAAS.

Las topoisomerasas II son enzimas homodiméricas que generan cambios topológicos complejos del ADN: relajación, desanudado, desencadenado mediante la ruptura transitoria de las dos cadenas de la doble hélice y gasto energético en forma de ATP. Durante el proceso de ruptura y empalme, se produce un intermediario covalente entre los extremos 5' de cada una de las hebras del ADN y cada una de las subunidades enzimáticas (Figura 10) (Reguera, et al., 2007).

Figura 10. Relajación por la topoisomerasa II

Tomada de www.biologia.laquia2000.com

Topoisomerasa II o GIRASA



Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Las topoisomerasas de tipo II cortan de forma transitoria ambas cadenas de la doble hélice del ADN y transportan otra doble hélice a través del hueco interrumpido para finalmente volver a unir los extremos de la molécula. De esta manera alteran la Propiedad topológica de las moléculas (Lk) en valores de +/- 2 (Monturus de Carandin, 2013).

La ADN girasa es la única capaz de convertir la energía de la hidrólisis del ATP en superenrollamiento negativo, siendo altamente eficiente también en la relajación del superenrollamiento positivo generado por delante de las horquillas de replicación debido a la acción de las helicasas. La topoisomerasa IV, por otra parte, posee una estructura tetramérica homóloga a la de la girasa, aunque al igual que sus homólogas eucariotas no es capaz de actuar sobre el superenrollamiento. Su principal papel *in vivo* consiste en separar las cromátides hermanas recién replicadas durante la segregación celular.

Se han identificado una gran variedad de fármacos capaces de actuar frente a las topoisomerasas, muchos de los cuales provocan lesiones citotóxicas atrapando a las enzimas en complejos covalentes con el ADN. Estos venenos de topoisomerasas incluyen tanto a antimicrobianos como quimioterápicos antitumorales, algunos de los cuales ya se utilizan ampliamente en clínica (Monturus de Carandin, 2013).

Para ejercer su efecto, las quinolonas deben llegar al sitio diana, atravesando la membrana externa de las bacterias gram negativas a través

de canales en la membrana llamados porinas. Una vez dentro de las bacterias, las quinolonas ejercen su efecto bactericida impidiendo la síntesis de ADN al inhibir la acción de las enzimas ADN girasa y topoisomerasa IV. Las moléculas de ADN están formadas por una doble cadena de nucleótidos, enrolladas una alrededor de la otra en forma helicoidal. En la naturaleza las moléculas de ADN son circulares y para formar estos círculos la doble hélice tiene que enrollarse en una nueva espiral (super hélice), de sentido contrario a las hélices primarias. Las cadenas de las moléculas de ADN deben separarse para poder replicarse o transcribirse. Para que las dos cadenas se puedan separar, deben desenrollarse y la super hélice debe enrollarse en sentido contrario. Para efectuar estos cambios es necesario efectuar cortes en las cadenas de nucleótidos y luego unirlos nuevamente. La ADN girasa es una enzima bacteriana dependiente de ATP, que cataliza la fractura y sellado de las cadenas de ADN. La ADN girasa de *Escherichia coli* consta de 4 subunidades, dos A (que catalizan las reacciones de fractura y sellado) y dos B con actividad de ATPasa. La inhibición del ADN cromosómico conduce a un efecto bactericida (Monturus de Carandin, 2013).

3.2.4.2. Topoisomerasa IV

Se descubrió en 1990, 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 parC superponible a la de gyrA y la de parC a las de gyrB. (Levine et al., 1998).

Inicialmente se creyó que todos los organismos presentaban un solo tipo de topoisomerasa de cada familia para cumplir indistintamente con todas las funciones descritas. Sin embargo, existe una especialización que otorga cierta exclusividad; por ejemplo, la ADN girasa introduce únicamente supergiros negativos, especialmente delante de la horquilla replicativa, mientras que la topoisomerasa I provoca sólo giros positivos, antagonizándose mutuamente. A su vez, la decatenación corre a cargo de la topoisomerasa IV por detrás de la horquilla replicativa. (Leo E. et al., 2005)(Hsu YH et al., 2006).

Todas las quinolonas actúan sobre la ADN girasa, pero las fluoroquinolonas actúan además sobre la topoisomerasa IV, ya que accionan un mecanismo lento vía topoisomerasa IV; al impedir la separación de las hebras hijas, producen réplicas incompletas y fragmentadas del cromosoma sin aumento del total de ADN, indicio de una paulatina disminución de la síntesis de ADN a lo largo de las generaciones sucesivas que determina la muerte bacteriana; como regla general, la actividad sobre los microorganismos gram negativos dependería de la inhibición de la girasa, mientras que la acción sobre los gram positivos se relacionaría con la inhibición de la topoisomerasa IV (Serra, 2008).

El mecanismo de orientación de la topoisomerasa IV parecía ser diferente al de la girasa. Sin embargo, se muestra que los eventos moleculares detrás de la inhibición de topoisomerasa IV son similares a la orientación de ADN girasa: norfloxacin convierte el complejo topoisomerasa IV- ADN en un complejo estable, lo cual acaba lesionando el ADN. La acción de norfloxacin sobre la topoisomerasa IV, a concentraciones letales, no bloquea la segregación cromosómica, sino que provoca una disminución de la síntesis de ADN. Por lo tanto, interpretar las diferencias aparentes entre la orientación de la girasa y Topoisomeras IV en términos de sus funciones distintivas en la replicación del ADN (Khodursky et al., 1998).

Actualmente se encuentran en desarrollo un nuevo grupo de 6-desfluoroquinolonas, moléculas que carecen del átomo de flúor en posición 6, con posibilidad de lograr una mejor actividad intrínseca como lo demuestra garenoxacin. Esta quinolona muestra una elevada actividad inhibitoria de la ADN girasa y la topoisomerasa IV, lo cual se asocia con un aumento de la actividad in vitro, un amplio espectro antimicrobiano y un reducido potencial de inducir el desarrollo de resistencia. (Campos et al., 2008). Es recomendada para infecciones respiratorias (Tillotson CJ, 2008) (Blasi F et al., 2007), no obstante, las cuestiones de seguridad han cobrado una especial importancia en últimos años. Algunas de las denominadas “quinolonas respiratorias” pueden producir efectos

secundarios tales como hiperglucemia o hipoglucemia (Park-Wyllie LY et al., 2006).

3.2.4.3. Unión quinolonas-topoisomerasas

Los mecanismos mediante los cuales las quinolonas ejercen su acción aún son motivo de discusión. Se demostró recientemente que la unión quinolona-topoisomerasa se produce a través de un puente de iones metal-agua, donde un ión Mg^{2+} no catalítico, coordinado con cuatro moléculas de agua, forma un puente para la unión de hidrógeno entre la quinolona y la serina y los residuos ácidos, que actúan como puntos de anclaje para la enzima, aumentando así la concentración en estado estacionario de complejos de escisión, bloqueando físicamente la ligadura de la hebra de ADN (Correia et al., 2017) (Aldred KJ et al., 2014) (Fàbrega A et al., 2009) (Hooper DC et al., 2016) (Kohanski MA et al., 2010).

La formación de complejos ternarios quinolona-topoisomerasa-ADN hace que la maquinaria de replicación del ADN se detenga al bloquearse las horquillas de replicación, dando como resultado una inhibición de la síntesis de ADN, lo que conduce inmediatamente a bacteriostasis (a bajas concentraciones de quinolonas) y eventualmente a la muerte celular. Debido a la situación de ADN girasa por delante del complejo de replicación de ADN y de la topoisomerasa IV detrás de él, parece que la interacción de quinolonas con ADN girasa da lugar a una inhibición más rápida de la replicación del ADN que la interacción con la

topoisomerasa IV. Además, cuando los sistemas de seguimiento de ADN (horquillas de replicación, complejos de transcripción, etc.) chocan con estos complejos ternarios estabilizados, se generan roturas cromosómicas permanentes. Estas rupturas de ADN de doble cadena desencadenan una situación de *stress* en la bacteria, a la que responde incrementando la síntesis de proteína RecA, se activa por daño del ADN y promueve la inactivación del represor LexA, desreprimiendo así la expresión de los genes de respuesta SOS como las enzimas de reparación del ADN. La actividad bactericida de la quinolona, por lo tanto, resulta de la acción de estos procesos y de la medida en que la reparación del ADN sea incompleta. En efecto, se ha demostrado que la actividad bactericida de las fluoroquinolonas mejora cuando la inducción de la respuesta SOS se previene. Por lo tanto, los efectos primarios de la formación de complejos quinolona-topoisomerasa- ADN y la respuesta bacteriana siguiente a través de la expresión de la proteína inducida por el stress parecen tener una asociación clara en la determinación de la actividad bactericida de la quinolona. Es probable que, además de la inhibición de la replicación del ADN, otros eventos que pueden afectar al ADN o producir otro tipo de daño celular también puedan contribuir a la actividad bactericida de las quinolonas. Sin embargo, los mecanismos moleculares subyacentes todavía no se entienden completamente (Correia et al., 2017) (Aldred KJ et al., 2014) (Fàbrega A et al., 2009) (Hooper DC et al., 2016) (Kohanski MA et al., 2010) (Redgrave et al., 2014).

Es interesante destacar la actividad bactericida de las quinolonas más recientes. Todas las quinolonas son capaces de inhibir el superenrollamiento del ADN, pero parece que sólo las fluoroquinolonas producen la fragmentación de éste. Si bien ambos procesos son dependientes de la concentración, se trataría de fenómenos independientes. La inhibición del superenrollamiento es el elemento farmacodinámico mejor caracterizado pues como se dijo, se correlaciona con su efecto antibiótico *in vitro*, pero probablemente no sea el responsable único del efecto antibiótico (Serra, 2008).

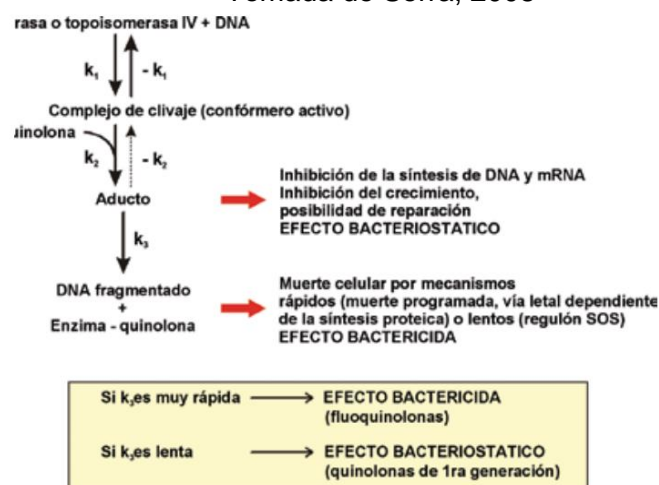
En cambio, la fragmentación, un poco menos estudiada, daría una explicación posible a la bacteriólisis. Según la (Figura 11), las quinolonas modifican la actividad de las topoisomerasas convirtiéndolas en nucleasas en función de la velocidad de disociación del aducto (complejo de clivaje-quinolona). Si el aducto permanece intacto el efecto resultante es bacteriostático, tal como se ve con las quinolonas de primera generación. Por el contrario, si el aducto se disocia se produce un efecto bactericida, tanto mayor cuanto más rápido es el fenómeno, puesto que la topoisomerasa queda libre para cortar otras regiones del ADN sustrato (Serra, 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

cuantos mecanismos pueden estar implicados en este deterioro de la membrana (Cheng et al., 2013)

Figura 11. Secuencia de eventos que conducen al efecto final de las quinolonas en función de la velocidad de disociación de los aductos (k_3)

Tomada de Serra, 2008



3.2.5. Actividad antimicrobiana de fluoroquinolonas

Las quinolonas son consideradas agentes bactericidas. Poseen una excelente actividad contra miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, microorganismos gram negativos, gram positivos, anaerobios, micobacterias y patógenos atípicos (Davis et al., 2014).

Agentes más recientes como gatifloxacino, moxifloxacino y gemifloxacino demuestran mayor actividad frente a microorganismos gram

positivos y atípicos en comparación con levofloxacin (Davis et al., 2014) (Sharma et al., 2009).

Las quinolonas tienen actividad *in vitro* 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)

3.2.5.1. Microorganismos gram negativos

Ciprofloxacino, levofloxacino, gatifloxacino, moxifloxacino y gemifloxacino tienen excelente actividad frente a la familia *Enterobacteriaceae*, y otros gram negativos como *Haemophilus influenzae* y otras especies de *Haemophilus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis* y *Moraxella catarrhalis*. Las tasas de sensibilidad a estos fármacos son bastante homogéneas. Así, por ejemplo, ciprofloxacino tiene una tasa del 90,5%, mientras que gatifloxacino y levofloxacino la tienen del 91,7%. También se han observado altas tasas de sensibilidad (99,8 a 100%) con varias fluoroquinolonas (ciprofloxacino, levofloxacino, gatifloxacino, moxifloxacino, gemifloxacino) frente a *H. influenzae* y *M. catarrhalis*. Del mismo modo, estos agentes demuestran una potente actividad frente a *N. meningitidis*, con CIM90 que oscila de 0,004 hasta 0,008 µg/ml (Davis et al., 2014) (Sharma et al., 2009).

La actividad de ciprofloxacino y levofloxacino es más potente contra *P. aeruginosa* comparada con nuevos agentes como gatifloxacino, moxifloxacino y gemifloxacino. Por lo tanto, estos nuevos agentes no se utilizan en el tratamiento de infecciones causadas por *P. aeruginosa*. Estudios de vigilancia han demostrado una reducción significativa en la sensibilidad a fluoroquinolonas (aproximadamente 20-25%) en *P. aeruginosa*, asociada al mayor uso de fluoroquinolonas. La tasa de sensibilidad de ciprofloxacino puede variar dependiendo de la demografía geográfica y hospitalaria (Davis et al., 2014) (Sharma et al., 2009).

Las fluoroquinolonas también poseen actividad frente a bacilos no fermentadores gram negativos como *Stenotrophomonas maltophilia*. Las nuevas fluoroquinolonas como levofloxacino, gatifloxacino y moxifloxacino han mejorado la actividad frente a *S. maltophilia* en comparación con ciprofloxacino. Las fluoroquinolonas tienen tasas globales de sensibilidad de aproximadamente 50% contra *Acinetobacter spp.* Sin embargo, el aumento de la tasa de resistencia sigue siendo un problema en este microorganismo resistente a múltiples fármacos (Davis et al., 2014) (Sharma et al., 2009).

Las fluoroquinolonas demuestran en cambio una escasa actividad frente a *Burkholderia cepacia*, con rangos de CIM 90 de 16-32 µg/ml, y tasas de sensibilidad de aproximadamente 10 a 25% (Davis et al., 2014) (Sharma et al., 2009).

3.2.5.2. Microorganismos gram positivos

Generaciones antiguas de fluoroquinolonas como ciprofloxacino tienen una actividad moderada frente a microorganismos gram positivos; sin embargo, la utilización clínica de estos agentes en monoterapia se evita para el tratamiento de infecciones por gram positivos debido al rápido desarrollo de resistencia. En comparación, las fluoroquinolonas más recientes han demostrado una actividad mejorada contra organismos gram positivos y, a menudo se utilizan para tratar una amplia gama de infecciones causadas por estos microorganismos (Davis et al., 2014) (Sharma et al., 2009).

Exhiben actividad frente a *S. aureus* y *Staphylococcus epidermidis* sensible a meticilina. Las quinolonas más antiguas como norfloxacino, ofloxacino, ciprofloxacino tienen actividad reducida o nula sobre especies de estreptococos (*Streptococcus pyogenes*, *S. pneumoniae* y estreptococos grupo *viridans*) y bacterias anaerobias. Frente a *Enterococcus* spp., su actividad es muy reducida. Levofloxacino posee una potente actividad frente a microorganismos gram positivos y atípicos en comparación con ciprofloxacino (Davis et al., 2014).

Las tasas de sensibilidad a los nuevos agentes son aproximadamente del 90-95% para *S. aureus* sensible a meticilina (MSSA). Se ha determinado el orden de potencia de fluoroquinolonas frente a MSSA de la siguiente manera gemifloxacino> moxifloxacino>

levofloxacino> ciprofloxacino. Los nuevos agentes pueden mostrar CIMs elevadas frente a cepas de *S. aureus* resistentes a ciprofloxacino, siendo también inactivos frente a la mayoría de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) y estafilococos coagulasa negativo resistentes a meticilina. Aunque algunos estafilococos resistentes a meticilina pueden mostrar sensibilidad a las fluoroquinolonas, el uso clínico de estos agentes se evita debido al rápido desarrollo de resistencia y las altas tasas de fracaso terapéutico (Davis et al., 2014) (Sharma et al., 2009).

Las nuevas fluoroquinolonas tienen una actividad favorable frente a un gran número de estreptococos. Estos agentes permanecen activos contra *S. pneumoniae* (sensibilidad a fluoroquinolonas aproximadamente del 98-99%) independiente de la sensibilidad a penicilina y/o macrólidos. Del mismo modo, las fluoroquinolonas poseen excelente actividad frente a estreptococos beta-hemolíticos (CIM 50/CIM 90: 0,12-0,25/0,25 µg/ml para gatifloxacino; 0,25-0,5/0,5-1 µg/ml para levofloxacino) (Davis et al., 2014) (Sharma et al., 2009).

La actividad de las fluoroquinolonas frente a *Enterococcus* spp. es variable, y con frecuencia escasa. A pesar de que algunas cepas de *E. faecalis* son inhibidas a concentraciones plasmáticas, las fluoroquinolonas no se utilizan normalmente en la clínica para el tratamiento de infecciones por enterococos, con la posible excepción de las infecciones del tracto urinario (Davis et al., 2014).

Las nuevas fluoroquinolonas presentan mayor actividad frente a *Listeria monocytogenes* que ciprofloxacino (Davis et al., 2014) (Sharma et al., 2009).

3.2.5.3. Microorganismos anaerobios

Fluoroquinolonas como ciprofloxacino y levofloxacino tienen muy escasa actividad frente a anaerobios. Tanto trovafloxacino como clinafloxacino presentan actividad anti-anaeróbica mejorada en comparación con los compuestos antiguos. De hecho, trovafloxacino recibió indicaciones de la FDA para diversas infecciones anaerobias, incluyendo infecciones intraabdominales, ginecológicas, pélvicas, de la piel y sus estructuras (incluyendo infecciones del pie diabético). Sin embargo, la toxicidad asociada con estos agentes ha interrumpido su uso clínico. Gatifloxacino, moxifloxacino y gemifloxacino exhiben actividad variable contra anaerobios, particularmente frente a bacterias gram negativas anaerobias. Del mismo modo, moxifloxacino muestra marcada mejoría de la actividad en comparación con ciprofloxacino frente a bacterias gram negativas anaerobias (CIM 50/CIM 90: 0,25/1 µg/ml para moxifloxacino vs. 4/32 µg/ml para ciprofloxacino) (Davis et al., 2014) (Sharma et al., 2009).

En general, las nuevas fluoroquinolonas tienen una mayor actividad frente a bacterias anaerobias gram positivas en comparación con las gram negativas (Davis et al., 2014) (Sharma et al., 2009).

3.2.5.4. Micobacterias

Las fluoroquinolonas tienen actividad variable frente a micobacterias tuberculosas y no tuberculosas. En general, son más activas frente a *Mycobacterium tuberculosis* que frente a otras micobacterias. Las C-8 metoxi-fluoroquinolonas, moxifloxacino y gatifloxacino, muestran una actividad mucho más potente que ciprofloxacino y levofloxacino frente a *M. tuberculosis*. En contraste, las naftiridinas gemifloxacino y trovafloxacino son menos activas frente a cepas de *M. tuberculosis* (Davis et al., 2014) (Sharma et al., 2009).

En cuanto a las micobacterias de crecimiento rápido, moxifloxacino y gatifloxacino demuestran ser más potentes contra *Mycobacterium fortuitum* (CIM 90: 0,5 µg/ml) que levofloxacino (CIM 90: 1 µg/ml), teniendo en cambio todas ellas una actividad muy limitada frente a *Mycobacterium chelonae* (CIM 90: 16 µg/ml tanto para moxifloxacino y gatifloxacino; CIM 90: 32 µg/ml para levofloxacino). Frente a micobacterias de crecimiento lento, moxifloxacino posee una mayor actividad frente a *Mycobacterium kansasii* >*Mycobacterium intracellulare*>*Mycobacterium avium* que gatifloxacino y levofloxacino (Davis et al., 2014)(Sharma et al., 2009).

3.2.5.5. Patógenos atípicos

Las fluoroquinolonas muestran actividad contra *Legionella pneumophila*, *Chlamydia pneumoniae* y *Mycoplasma Pneumoniae*. Se ha

observado potencia similar entre las nuevas y antiguas fluoroquinolonas frente a *L. pneumophila* (Davis et al., 2014) (Sharma et al., 2009).

Gatifloxacino, moxifloxacino y gemifloxacino tienen rangos de CIMs más bajos que levofloxacino y ciprofloxacino frente a organismos como *C. pneumoniae* y *M. pneumoniae* (Davis et al., 2014) (Sharma et al., 2009).

3.2.6. Farmacocinética y farmacodinámica

Las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de los diferentes compuestos antimicrobianos dependen de factores como concentración y dosis de fármaco requerida para inhibir la viabilidad de patógenos. Así, por ejemplo, las quinolonas, incluidos los derivados fluorados, son fármacos que dependen de la concentración para la erradicación bacteriana (Flórez et al., 2014).

En consecuencia, es importante su concentración máxima, más que otros factores, como el área bajo la curva inhibitoria, para conseguir el mayor grado de eficacia (Flórez et al., 2014).

3.2.6.1. Farmacocinética

Estos compuestos se absorben fácilmente después de su administración oral con una biodisponibilidad que oscila entre el 50 y más del 90%. La variabilidad está determinada por el agente, alcanzando su concentración sérica máxima entre 1-3 h. Su absorción oral no se ve afectada de forma significativa en presencia de alimentos, pero el tiempo

necesario para alcanzar la concentración plasmática máxima puede retrasarse. Sin embargo, la ingesta simultánea con antiácidos que contengan magnesio (Mg^{++}), aluminio (Al^{++}), calcio (Ca^{++}) y/o sucralfato, así como fármacos que contengan hierro (Fe^{++}) y/o zinc (Zn^{++}), puede afectar su biodisponibilidad. La absorción oral de levofloxacino es prácticamente completa, por lo que las concentraciones plasmáticas que se alcanzan tras la administración oral son similares a las logradas tras la administración intravenosa (Tabla 4) (Flórez et al., 2014) (Sharma et al., 2009) (Álvarez et al., 2015).

Tabla 4. Propiedades Farmacocinéticas de las Quinolonas

Tomada de Flórez et al., 2014

	Fracción de absorción (%)	Semivida (h)	Unión a proteínas (%)	V_d (L/kg)	Eliminación	
					Orina (%)	Heces (%)
Ácido nalidíxico	80	1,5	80-90	0,3-0,4	80	5
Ciprofloxacino	60-85	3,5-4,5	19-43	2-3	40-60	15-20
Enoxacino	75-80	5	40-50	1,7-2	65-72	18
Sparfloxacino	90	15-20	40	3,6	40	50-55
Fleroxacino	>90	10	32	>1	85	3
Levofloxacino	100	6-8	24-38	1,1	80	—
Norfloxacino	35-45	4	14	1,7-2	30-50	30
Ofloxacino	85-95	7	8-30	1,3-1,8	70-90	4
Pefloxacino	95	12	25	1,2-1,9	50-70	8-20

* V_d : Volumen de distribución: Volumen aparente en el que el fármaco se diluye en el organismo

El perfil farmacocinético de los análogos nuevos de fluoroquinolonas mejora considerablemente respecto a los agentes antiguos de esta clase. Su vida media plasmática prolongada permite la dosificación diaria y una mayor concentración plasmática máxima (Flórez et al., 2014) (Sharma et al., 2009).

Las bajas concentraciones alcanzadas en plasma y tejidos por las quinolonas antiguas, es una característica que hace poco eficaces a estos agentes para el manejo de infecciones sistémicas; solo en riñón y orina alcanzan niveles útiles, por lo que su uso se limita a infecciones urinarias (Flórez et al., 2014) (Sharma et al., 2009).

El escaso porcentaje de unión a proteínas (20-50%, principalmente a albúmina), bajo grado de ionización y elevada solubilidad en agua favorecen el transporte de la mayoría de fluoroquinolonas al territorio extravascular, alcanzando concentraciones incluso superiores a las plasmáticas en muchos tejidos (mucosa bronquial y gástrica, orina, riñón, pulmón, líquido sinovial, bilis, heces fecales, tejido prostático, neutrófilos y macrófagos); la concentración que logran en el esputo, piel, músculo, útero o saliva es superior al 50% de la plasmática, y pueden encontrarse concentraciones inferiores en el sistema nervioso central, líquido cefalorraquídeo (excepto cuando las meninges están inflamadas), grasa y ojo (Sharma et al., 2009) (Alós, 2009).

Se ha planteado la hipótesis de que la p-glicoproteína en la barrera hematoencefálica puede desempeñar un papel en este hecho. Las fluoroquinolonas atraviesan la placenta y se concentran en el líquido amniótico. Se eliminan por la leche, por lo que deben evitarse durante la lactancia (Flórez et al., 2014) (Sharma et al., 2009) (Alós, 2009) (Petri, 2012).

Las fluoroquinolonas pueden eliminarse a través de mecanismos hepáticos o renales. En el riñón por filtración glomerular y secreción tubular activa, en el hígado por reacciones de oxidación (enzimas del sistema CYP450) o conjugación. El anillo de piperazina se metaboliza fácilmente dando como resultado una actividad antimicrobiana disminuida, de tal forma que tanto los metabolitos como el fármaco sin modificar pueden encontrarse en la orina y en la bilis; algunos sufren circulación enterohepática, y en las heces se detectan concentraciones elevadas (Flórez et al., 2014) (Sharma et al., 2009).

Ofloxacino, levofloxacino y gatifloxacino son eliminados prácticamente sin metabolizar en la orina. El metabolismo hepático de pefloxacino y esparfloxacino origina metabolitos con actividad antibacteriana conservada. La excreción de ciprofloxacino, enoxacino, fleroxacino, lomefloxacino y norfloxacino es mixta (Flórez et al., 2014).

La vida media de eliminación ($t_{1/2}$) es muy variable, pero, en la mayoría de los casos, suficiente para permitir un intervalo de

administración de 24 h. Las fluoroquinolonas son poco dializables (es decir, hay una deficiente eliminación a través de diálisis peritoneal o hemodiálisis) (Flórez et al., 2014) (Sharma et al., 2009).

La insuficiencia renal prolonga el $t_{1/2}$ de eliminación y, en ocasiones, es necesario reducir la dosis o ampliar el intervalo de administración, así por ejemplo, cuando el filtrado glomerular se encuentra por debajo de 50 se recomienda reducir la dosis de ofloxacino y levofloxacino, y cuando está por debajo de 30, de norfloxacino y ciprofloxacino (Flórez et al., 2014) (Alós, 2009).

Se aprecian cambios en la farmacocinética en estados patológicos o edad avanzada. Por ejemplo, el metabolismo de ciprofloxacino u oxociprofloxacino se reduce en la cirrosis hepática. Sin embargo, la diarrea o infecciones cutáneas no alteran la absorción oral de fluoroquinolonas (Tabla 4) (Flórez et al., 2014) (Sharma et al., 2009).

3.2.6.2. Farmacodinámica

La farmacodinámica define la relación entre la exposición a un fármaco y el efecto resultante, sea éste terapéutico o tóxico. A través de esta relación exposición-respuesta se puede optimizar la terapia para el paciente, reduciendo la toxicidad e incrementando la respuesta terapéutica (Drusano et al., 1998).

El objetivo primario de un antibiótico es reducir el número de patógenos localizados en el sitio de infección, de ahí que la concentración de fármaco en el sitio de infección sea importante para medir su eficacia (Drusano et al., 1998).

En el caso de los agentes bactericidas, la tasa de eliminación puede considerarse como una variable farmacodinámica relacionada con la muerte del organismo en el lugar de la infección primaria (Drusano et al., 1998).

Dos elementos son importantes para tener una idea de la dinámica de muerte bacteriana; exposición al fármaco y potencia de este (Drusano et al., 1998).

La exposición a fármacos puede valorarse a través de la concentración del agente en el lugar de infección o puede medirse en plasma. (Drusano et al., 1998) En la mayoría de los casos, la farmacocinética es lineal. Por lo tanto, las constantes de velocidad de primer orden permitirán la transferencia de fármacos del plasma al foco de infección (Drusano et al., 1998).

Cuando la farmacocinética es lineal y se establece una situación de estado estacionario, la concentración en el foco de infección es directamente proporcional a la concentración sérica. Esto refleja la exposición de los patógenos al fármaco y, por lo tanto, es un buen

marcador de eficacia. Es importante estandarizar un modelo que permita evaluar la exposición del fármaco y su potencia frente a patógenos (en la mayoría de los casos, será la CIM) (Drusano et al., 1998).

Esto da como resultado tres variables farmacodinámicas en la forma de la curva tiempo-concentración: $C_{m\acute{a}x}/CIM$, AUC/CIM (AUCI) y $Tiempo > CIM$. Si $C_{m\acute{a}x}/CIM$ se relacionan, esto indica que los intervalos de dosificación menos frecuentes conducen a mejores resultados. La relación AUC/CIM indica que el resultado terapéutico es independiente de la forma de la curva, y el $Tiempo > CIM$ significa que la forma de la curva que mantiene altos niveles deriva en mejores resultados (Figura 12) (Drusano et al., 1998).

Las fluoroquinolonas son activas frente a patógenos extracelulares e intracelulares (*Mycoplasma*, *Chlamydia*, entre otros). Su capacidad para penetrar en las células probablemente explique su actividad contra estos patógenos (Drusano et al., 1998).

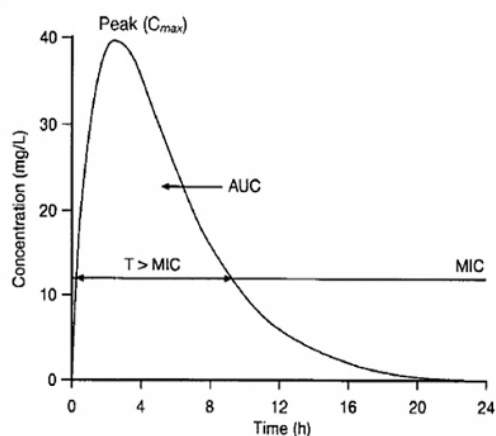
Para aquellos agentes farmacológicos cuya tasa de mortalidad bacteriana es dependiente de la concentración (fluoroquinolonas y aminoglucósidos), es posible apreciar que la tasa de mortalidad varía dependiendo de la concentración del agente (Drusano et al., 1998).

El efecto postantibiótico (EPA) de las fluoroquinolonas sobre microorganismos como estafilococos, *Enterobacteriaceae* y *P. aeruginosa*

varía entre 3-6 h. En cambio, aquellos microorganismos que son eliminados rápidamente, como *Haemophilus* spp. o *E. coli*, prácticamente no tienen EPA (Alós, 2009) (Davis et al., 2014).

Figura 12. Relaciones farmacocinéticas

Tomada de Drusano et al., 1998



AUC= área bajo la curva de tiempo de concentración sérica; C_{max}= concentración sérica máxima; MIC= concentración mínima inhibitoria; T>MIC= tiempo que la concentración sérica supera el MIC. Las quinolonas tienen una actividad bactericida rápida que depende de la concentración.

3.2.6.3. Interacciones con otros fármacos

Las quinolonas presentan numerosas interacciones con otros fármacos (Tabla 5). Estas interacciones producen un aumento o disminución de metabolitos en sangre, que se ven reflejados en los análisis bioquímicos. Los fármacos con los que hay interacción son los antiinflamatorios, anticoagulantes, compuestos con sales de aluminio,

magnesio, calcio, suplementos vitamínicos, fármacos con sucralfato e incluso con otros antimicrobianos (Mediavilla et al., 2014) (Cabrera, 2007).

Tabla 5. Interacciones más importantes de las quinolonas

Modificada de Flórez et al., 2014

Fármaco asociado	Fluoroquinolonas	Efecto asociado
Teofilina	Ciprofloxacino	Aumento niveles de teofilina
Antiarrítmicos: procainamida, amiodarona	Levo-, moxi-, gatifloxacino	Aumento QT: arritmias
Insulina, hipoglucemiantes orales	Oflo-, cipro-, evo-, moxi-, gatifloxacino	Disminución glucosa en sangre: hipoglucemia
Ciclosporina	Oflo-, ciprofloxacino	Aumento concentración de ciclosporina: nefrotoxicidad
Antiácidos y cationes (Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Zn ⁺⁺)	Oflo-, cipro-, levo-, moxi-, gati-, gemifloxacino	Disminución absorción oral de quinolonas
AINES	Oflo-, cipro-, levofloxacino	Aumento riesgo de estimulación de SNC: convulsiones
Fenitoína	Ciprofloxacino	Alteración de los niveles plasmáticos (+/-)
Rifampicina	Levofloxacino	Aumento metabolismo de moxifloxacino
Warfarina	Oflo-, cipro-, levo-, moxifloxacino	Aumento del tiempo de protrombina: riesgo de hemorragias

Las interacciones son muy variables y pueden ser:

3.2.6.3.1. Farmacodinámicas

A nivel del efecto antibiótico, por actuar durante la fase de crecimiento bacteriano, las quinolonas no deben administrarse juntamente con antibióticos bacteriostáticos como clindamicina, cloranfenicol, tetraciclinas, nitrofuranos. Asimismo, los inhibidores de la síntesis proteica y rifampicina inhiben la vía letal dependiente de la síntesis proteica que activan las quinolonas, por lo que en teoría no se considera indicado

asociarlos, aunque la combinación levofloxacino + rifampicina ha demostrado buenos resultados en algunos tipos de infección como las infecciones osteoarticulares. Los antibióticos bactericidas como los β -lactámicos, glicopéptidos y aminoglucósidos, potencian el efecto antibiótico de las quinolonas, lo que es especialmente útil en bacterias multirresistentes o en el tratamiento de infecciones por micobacterias (Serra, 2008).

Si se administran junto con insulina o antidiabéticos orales, pueden producir hipo o hiperglucemia (Alos, 2009). Sin embargo, estas alteraciones del metabolismo glicídico son infrecuentes y no están totalmente explicadas (Mandell et al., 2010)

3.2.6.3.2. A nivel del huésped

Se ha visto una relación entre ciertos grupos situados en la posición 7, como piperacina o pirrolidina y el potencial epileptógeno, siendo esto mejor si en la citada posición se encuentra por ejemplo un grupo metilo, como son ciprofloxacino, enoxacino, ofloxacino y norfloxacino. Presentan también una baja conducción convulsivante moxifloxacino que tiene un segundo anillo fusionado a la pirrolidina en posición 7 (Gutierrez, 2004) (Owens et al., 2005)

Ciprofloxacino y norfloxacino, administrados con teofilina o fosfocarmet incrementan su potencial convulsivante.

Puede haber efectos adversos neurológicos inducidos por las quinolonas se ven relacionados con el uso concomitante de AINES. Algunos derivados del ácido propiónico como zaltoprofeno o losoprofeno tienen una acción débil en este sentido, pero otros derivados del mismo ácido, como fenbufeno, flurbipofeno y ketoprofeno son potentes activadores de este efecto (Kim J et al., 2009).

El mecanismo por el cual actúan se relaciona con su interacción con los neurotransmisores y, con su similitud estructural con los agonistas gabaérgicos. Estas sustancias pueden desplazar el Ácido γ -aminobutírico (GABA) de sus receptores y disminuir la inhibición gabaérgica, lo que lleva a la estimulación del sistema nervioso central (SNC) y a las convulsiones. Los datos de estudios *in vitro* demostraron que trovafloxacino tiene la mayor actividad epileptogénica, mientras que pefloxacino se asoció con menor frecuencia de efectos adversos neurológicos, a pesar de su mayor penetración en el SNC. Levofloxacino, tiene menor penetración en SNC y, por lo tanto, es la que se asocia con menor neurotoxicidad. Además, pueden provocar hipoglucemia o hiperglucemia al usarse con antidiabéticos orales o con insulina (Tomé et al., 2011) (Alós, 2009).

El uso concomitante con glucocorticoides sistémicos durante períodos prolongados puede ser causa de ruptura tendinosa. Debe evitarse el uso conjunto de quinolonas con fármacos que prolonguen el intervalo QT; antipsicóticos como pimozida, antidepresivos tricíclicos,

cisapride, macrólidos y antiarrítmicos de clase Ia (quinidina) o III (amiodarona). La furosemida puede inducir hipomagnesemia. Por ello, se deberán extremar las precauciones cuando se usen conjuntamente, pues muchos de los efectos adversos de las quinolonas son atribuidos a hipomagnesemia relativa (Serra, 2008).

3.2.6.3.3. Farmacocinéticas

Hay fármacos que reducen la absorción de las quinolonas y viceversa, cuando entre las 2-4 h de su administración oral se ingieren productos que contienen cationes del tipo de calcio, aluminio, magnesio, hierro o zinc, como pueden ser antiácidos, suplementos nutricionales, suplementos minerales, multivitamínicos o sucralfato, disminuyen su biodisponibilidad y, recíprocamente, la de las quinolonas, por quelación en la luz intestinal. La biodisponibilidad de las quinolonas puede disminuir hasta un 90%. Para evitar este fenómeno se deben administrar separados por al menos 2 h. Los antagonistas H₂ (cimetidina, ranitidina, famotidina) y los anticolinérgicos (propinoxato, butilescopolamina) pueden retrasar la absorción de algunas quinolonas, hecho que carece de importancia clínica (Wolfson et al., 1989) (Alós, 2009) (Serra, 2008) (Mandell et al., 2010). Ni la comida ni la aclorhidria afectan significativamente a su absorción, aunque en algunos casos pueden retrasar el alcance de C_{max} , que sería parcialmente el reflejo de las diferencias de la absorción intestinal (Hooper et al., 1985) (Mandell et al., 2010)

3.2.6.3.4. A nivel del metabolismo de drogas

Ciertas quinolonas inhiben la función de los Citocromo P450 1A2 (CYP1A2) y Citocromo P450 3A4 (CYP3A4) (Tabla 6) y por ello incrementan las concentraciones plasmáticas de muchos fármacos, incluso hasta alcanzar niveles tóxicos. La inhibición es competitiva y se produce, por lo menos sobre el CYP1A2, por derivados oxidados del anillo piperazina (4'oxo-quinolona). Este hecho es independiente del grado de metabolismo que sufre una quinolona determinada, pues enoxacino, que se metaboliza menos que ciprofloxacino mediante las mismas reacciones, inhibe mucho más a los Citocromo P450 (CYP) (Figura 13) (Serra, 2008).

Tabla 6. Interacciones medicamentosas de ciertas quinolonas por inhibición CYP

Tomada de Serra, 2008

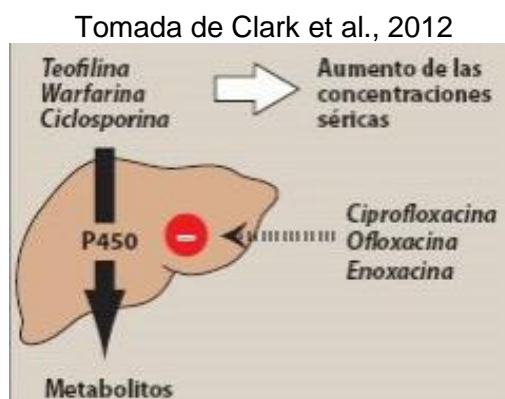
Isoforma CYP	Quinolona	Fármacos que pueden aumentar sus niveles plasmáticos y/o su toxicidad por la interacción
CYP1A2*	Ciprofloxacino Norfloxacino Acido pipemídico Enoxacino	<i>Aminofilina, amitriptilina, cafeína, clorpromazina, diazepam, imipramina, levomepromazina, metoclopramida, ondansetrón, paracetamol, propafenona, ritonavir, tamoxifeno, teofilina, verapamil, R-warfarina, zopiclona**</i>
CYP3A4	Enoxacino Norfloxacino	Alfentanilo, alprazolam, <i>amiodarona, amitriptilina</i> , amlodipina, atorvastatina, budesonida, bromazepam, cafeína, carbamazepina, <i>clorpromazina</i> , cimetidina, <i>cisapride, claritromicina</i> , clindamicina, clonazepam, clozapina, ciclosporina, dapsona, dexametasona, diazepam, <i>digoxina</i> , diltiazem, doxorubicina, enalapril, <i>eritromicina</i> , felodipina, fentanilo, fluoxetina, hidrocortisona, imipramina, indinavir, itraconazol, ketoconazol, lidocaína, lorazepam, losartán, lovastatina, midazolam, nifedipina, nimodipina, omeprazol, ondansetrón, pravastatina, prednisona, progesterona, <i>propafenona, quinidina, quinina</i> , rifampicina, ritonavir, saquinavir, sildenafil, simvastatina, verapamil, vinblastina, vincristina, zolpidem**

* CYP inhibido por 4'oxo-quinolona. Enoxacino fue retirada de la comercialización por esta interacción. ** En cursiva, fármacos que ocasionan QT prolongado; las metilxantinas además pueden producir convulsiones; el tamoxifeno se activa por el CYP1A2 por lo que la inhibición de esta isoforma, por el contrario, resta actividad.

Las dos interacciones más relevantes por su frecuencia son:

- Disminución de la eliminación de metilxantinas (teofilina y cafeína), por lo que se aconseja monitorizar los niveles séricos de teofilina. Los aumentos de teofilinemia con enoxacino, ciprofloxacino y ofloxacino son del 111%, 23% y 12%, respectivamente (Serra, 2008).
- Aumento de la $t_{1/2}$ de la warfarina, ya que su isómero R se metaboliza por el CYP1A2 (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 (Álos, 2009).

Figura 13. Interacciones farmacológicas con las fluoroquinolonas



3.2.6.3.5. A nivel de la excreción renal de drogas

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 norfloxacin, ciprofloxacino y ofloxacino, cuyo metabolismo es prioritariamente renal (ofloxacino) o mixto (norfloxacino, ciprofloxacino) (Wolfson et al., 1989) (Álos, 209) (Mandell et al., 2010). Las quinolonas usan los sistemas de Transporte orgánico de Aniones (OAT) y Transporte orgánico de Cationes (OCT) presentes en el túbulo contorneado proximal para su excreción. Por consiguiente, tanto los ácidos como el probenecid, los AINES, los diuréticos de asa y tiazidas, el metotrexato, los antibióticos β -lactámicos o las bases como la cimetidina pueden reducir los niveles urinarios de estas drogas, pero aumentan los plasmáticos. La administración conjunta debe hacerse con precaución, pues según el efecto deseado puede perderse actividad antiinfecciosa urinaria o aumentar la actividad farmacológica sistémica de las quinolonas con o sin consecuencias; en el caso de los diuréticos podría haber una merma transitoria de su efectividad y en el caso del metotrexato podría incrementarse su toxicidad (Serra, 2008).

3.2.6.4. Precauciones y advertencias para su uso

Las quinolonas son fármacos relativamente seguros; no obstante, deben seguirse ciertas precauciones durante su uso: debido a que son irritantes locales, las quinolonas no deben aplicarse por vía IM. Las formas

IV se deben perfundir en un lapso no menor de 60 minutos y lavar el equipo de venoclisis. Se debe usar siempre solución glucosada isotónica, pues soluciones salinas aumentan la toxicidad local (Serra, 2008).

Los efectos cutáneos indeseables más comunes son exantema y prurito. La fotosensibilidad es aun más rara y esta altamente ligada a la estructura química. Las llamadas quinolonas bihalogenadas, con un radical de cloro o de fluor en posición ocho y a la vez uno de fluor en posición seis, han demostrado un significativo potencial fototóxico (Saravolatz et al., 2003) (Owens et al., 2005).

La posibilidad de distintas fluoroquinolonas de producir alargamiento del intervalo QT a sido clasificada por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) en tres grupos: Fluoroquinolonas con riesgo potencial de inducir prolongación de QT (gemifloxacino y moxifloxacino), fluoroquinolonas con bajo riesgo de alargar el intervalo QT (levofloxacino, norfloxacino y ofloxacino) y fluoroquinolonas muy bajo de producir mayor duración del intervalo QT (enoxacino, pefloxacino, prulifloxacino y Rufloxacino) (AEMPS, 2010).

De la misma forma, se recomienda realizar controles más frecuentes del tiempo de sangría y de su razón internacional normatizada (RIN) si estos fármacos han de administrarse en pacientes tratados con warfarina. Debe siempre pensarse en una posible ruptura de tendón si los pacientes que reciben quinolonas tienen antecedentes de factores

concomitantes y presentan dolor y edema (de afectación bilateral en el caso del tendón de Aquiles). El riesgo de artropatía puede limitar o contraindicar el uso de quinolonas en niños y adolescentes, salvo que el beneficio supere al riesgo. Además, este riesgo de tendinitis o ruptura tendinosa aumenta en pacientes de más de 60 años, que reciben tratamiento simultáneo con corticoesteroides, y receptores de trasplantes renales, cardíacos o pulmonares (Loebstein et al., 1998) (Clark et al., 2012).

A pesar de que ciertos sustituyentes del anillo quinolónico han sido relacionados con daños del material genético de animales, el riesgo de mutagenicidad o carcinogénesis en el ser humano por el uso de quinolonas es casi nulo. Los estudios en animales sobre el uso de quinolonas durante el embarazo contraindican su uso; no obstante, los pocos datos provenientes de estudios en el ser humano indican que no son teratogénicas, por lo cual se les ha establecido categoría C (Serra, 2008).

3.2.7. Uso clínico de fluoroquinolonas

Por su espectro de actividad y potencia, las fluoroquinolonas se usan para el tratamiento de una gran variedad de infecciones, tanto dentro como fuera del ambiente hospitalario (Alós, 2009).

La terapia por vía intravenosa se prefiere para pacientes con infecciones graves o malabsorción intestinal. Fuera de estos casos, se

prefiere la vía oral por la facilidad de administración, el menor riesgo de efectos adversos y el menor costo (Alós, 2009).

El uso de fluoroquinolonas es muy claro y hace hincapié en tomar en cuenta los halos de resistencia bacteriana o CIM reportados por el laboratorio de bacteriología (Alós, 2009).

Esta familia antibiótica es muy frecuentemente utilizada, en el ámbito hospitalario, extrahospitalario y el veterinario, debido a su espectro de acción, biodisponibilidad, eficacia, baja toxicidad y prescripción oral y parenteral, esto ha hecho 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. (Viñuela 2015)

Los usos clínicos son:

3.2.7.1. Infecciones de transmisión sexual:

El espectro de acción que comprende son: *Neisseria gonorrhoeae* (gonorrea), *Chlamydia trachomatis* (linfogranuloma venéreo), *Haemophilus ducreyi* (chancroide), *Klebsiella granulomatis* (granuloma inguinal), *Mycoplasma* y *Ureaplasma* genital.

Para la gonorrea se recomienda ciprofloxacino oral 500 mg en una sola dosis u ofloxacino oral 400 mg también en dosis única, si el caso que se está tratando es sensible a quinolonas, dado el alto nivel de resistencia a fluoroquinolonas que *N. gonorrhoeae* ha alcanzado en un breve lapso de

tiempo. (Bignell et al., 2013). Para el chancroide se considera a ciprofloxacino como segunda línea de tratamiento en algunas guías europeas (Kemp et al., 2011)(STI-Treatment Pocket Guide 2014/2015). Para el granuloma inguinal también se considera el ciprofloxacino como terapia de segunda línea (O'Farrell et al., 2010). Para *mycoplasma* y *ureaplasma* se recomienda ofloxacino y levofloxacino. (Kong et al., 2015)

3.2.7.2. Infecciones gastrointestinales:

En los últimos años se ha observado un incremento en el porcentaje de resistencia en microorganismos como *Campylobacter* o *Salmonella sp.*, debido al uso excesivo de las fluoroquinolonas, por lo que no se recomienda su uso, al menos de manera empírica. El uso de fluoroquinolonas para profilaxis de diarrea del viajero actualmente no se recomienda (Alós, 2009).

3.2.7.3. Infecciones intraabdominales:

La sociedad americana de infecciones actualmente recomienda la aplicación de un esquema secuencial de ciprofloxacino, levofloxacino y moxifloxacino en combinación con metronidazol en el tratamiento de infecciones de intensidad leve a moderada; para las infecciones graves la indicación se limita a ciprofloxacino más metronidazol parenterales (Alós, 2009).

3.2.7.4. Infecciones óseas y prótesis osteoarticulares:

Dadas las características farmacocinéticas y espectro de acción que las fluoroquinolonas poseen, son una opción válida en este tipo de infecciones, por la facilidad de realizar tratamientos extrahospitalarios que influyen en la reducción de costos y calidad de vida frente a los pacientes. Un ejemplo de indicación es la osteomielitis aguda y crónica (Alós, 2009).

Se utiliza sobre todo ciprofloxacino, siendo fármaco de segunda elección en el caso de que la etiología sea *P. aeruginosa* o *Staphylococcus aureus* y hay que estar atentos a la aparición de resistencias en el curso del tratamiento, también mencionadas en el caso de *Serratia marcescens* (Alós, 2009)(Mandell et al., 2010).

3.2.7.5. Infecciones de piel y tejidos blandos:

Está indicado en la infección del pie diabético, como fármaco de segunda elección donde se las puede utilizar tanto en monoterapia como en combinación con otros antibióticos (García Rodríguez et al., 2006)(Alós, 2009).

3.2.7.6. Infecciones del tracto respiratorio:

Si bien las quinolonas no son de primera elección en el tratamiento empírico de las neumopatías de la comunidad, la emergencia de nuevos

patógenos atípicos y resistentes al tratamiento clásico tiende a generalizar el uso de quinolonas (File et al., 2004)

Por su actividad antipseudomónica, ciprofloxacino ha sido utilizada con bastante frecuencia en dosis altas y asociada a otros antibióticos, en casos de neumonía nosocomial producida por *P. aeruginosa*. También se usa como antibiótico de primera línea contra *L. pneumophila* (Alós, 2009).

Se utilizan además 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)

Algunas fluoroquinolonas han demostrado mayor efectividad y mejor espectro frente a los patógenos más comunes en el árbol respiratorio y se han dado en denominar “quinolonas respiratorias”. Algunas son: levofloxacino, moxifloxacino, gemifloxacino (García Rodríguez et al., 2006).

3.2.7.7. Infecciones por micobacterias:

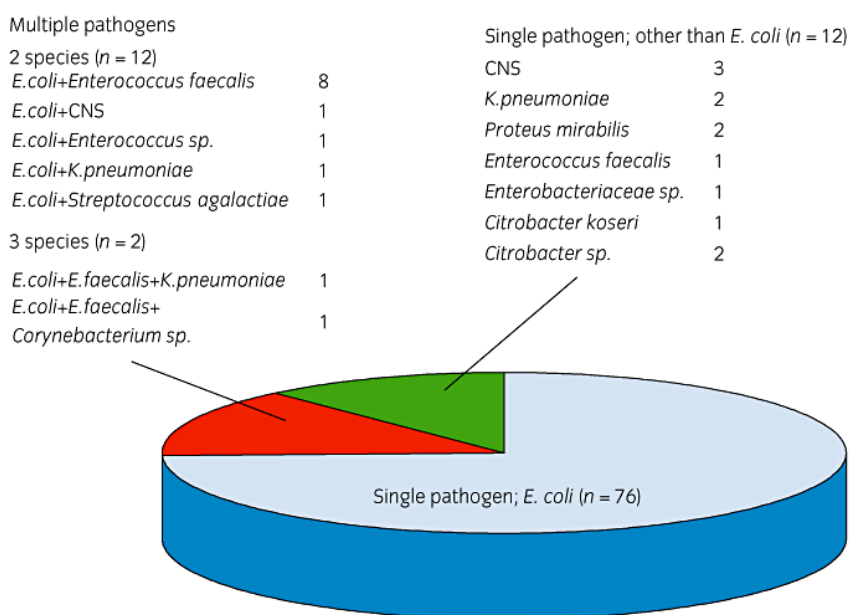
Se deben tener muy en cuenta los patrones de resistencia para el tratamiento de *M. tuberculosis* en nuestra área para determinar en qué categoría de elección ubicarla, ya que los datos de resistencia han dado indicios de fallos terapéuticos con el uso de fluoroquinolonas. Por estos motivos se las considera fármacos de segunda línea y en situaciones especiales, como pacientes con hepatopatía crónica (González-Martín et al., 2010) (Sánchez et al., 2010).

3.2.7.8. Infecciones de tracto urinario:

Las fluoroquinolonas han sido durante mucho tiempo el tratamiento de elección en ITU provocada por bacterias gram negativas, especialmente por enterobacterias. (*E. coli*). Las fluoroquinolonas tienen un espectro satisfactorio, abarcando a la mayor parte de los patógenos habitualmente implicados (Figura 14) en este tipo de infecciones, lo que sumado a los beneficios farmacocinéticos que estas presentan (levofloxacino, ciprofloxacino, norfloxacino, ofloxacino), facilita su acción en el tracto urinario bajo. (Sánchez et al., 2010)(Mandell et al., 2010)(Gupta et al., 2011). Por ello, las quinolonas han sido ampliamente empleadas en ITU inferior no complicada (cistitis) (Tabla 7).

Figura 14. Patógenos asociados a ITU

Tomada de Yamamoto et al., 2010



A continuación, se presentan el esquema de tratamiento duración y costos de estos. Utilizados por protocolos terapéuticos del Ministerio de Salud Pública del Ecuador (Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2012).

Tabla 7. Tratamiento antibiótico de cistitis no complicada en el adulto

Tomada de Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2012

Antibiótico	Dosis diaria	Duración del tratamiento	Costo Actual/Unidad	Total del tratamiento Ecuador
Ciprofloxacino	Tableta 250 mg 2 v/d	3 días	0.30 centavos	\$ 1.80
Ciprofloxacino	Tableta 250 mg 2 v/d	7-10 días en recidivas	0.30 centavos	\$ 4.20 (7 días) \$ 6.00 (10 días)

Las guías de práctica clínica de las infecciones del tracto urinario bajo y alto mencionan que las quinolonas como tratamiento empírico están guiadas por espectros y patrones de sensibilidad microbiana, eficacia, tolerabilidad, efectos adversos, costo y disponibilidad, aunque se ha observado resistencia, especialmente en presencia de factores como edad, sexo, historial de ITU o la toma previa de antibióticos (Alós, 2009).

Se podría considerar en el tratamiento de mujeres jóvenes que no hayan recibido previamente tratamiento con quinolonas y sin factores de resistencia. En general, se recomienda evitar su uso como fármaco de primera línea y dejarlo reservado para infecciones más graves (Grabe et al., 2010).

A continuación, se detallan las pautas terapéuticas, duración y costo del tratamiento establecido por las guías de práctica clínica: cistitis no complicada en mujeres (Tabla 8) (Asociación Española de Urología, 2006) (Grabe et al., 2010), pielonefritis aguda no complicada en mujeres (Tabla 9) (Grabe et al., 2010).

Tabla 8. Tratamiento antibiótico en cistitis no complicada en mujeres

Modificada de Asociación Española de Urología, 2006

Antibiótico	Dosis diaria	Duración del tratamiento	Costo actual/Unidad	Total del tratamiento Ecuador
Ciprofloxacino	Tableta 250 mg 12 h	3 días	0.30 centavos	\$ 1.80
Levofloxacino*	Tableta 250 mg dosis única diaria	3 días	0.94 centavos	\$ 1.88
Norfloxacino	Tableta 400 mg 12 h	3 días	0.21 centavos	\$1.26
Ofloxacino	Tableta 200 mg 12 h	3 días	\$ 1.20	\$ 3.60

*Presentación en el Ecuador: Levofloxacino tableta de 500 mg.

Tabla 9. Tratamiento empírico de la pielonefritis aguda no complicada en mujeres

Modificada Grabe et al., 2010

Antibiótico	Dosis diaria	Duración del tratamiento	Costo Actual/Unidad	Total del tratamiento Ecuador
Ciprofloxacino	Tableta 750 mg 2 v/d	7-10 días	\$0.80	\$ 11.20 (7 días) \$ 16.00 (10 días)
Levofloxacino	Tableta 500 mg 1 v/d	7-10 días	\$0.94	\$ 6.58 (7 días) \$ 9.40 (10 días)
	Tableta 750 mg 1 v/d	5 días	\$ 2.15	\$10.75

Adicionalmente, el tratamiento con quinolonas es una buena alternativa en situaciones como: ITU recurrente en mujeres jóvenes, ITU en varones adultos y pacientes con ITU con sonda. Se detalla el esquema de tratamiento (Tabla 10) (González, 2012).

Tabla 10. Tratamiento alternativo con quinolonas en situaciones clínicas especiales

Modificada de González, 2012

Situación	Antibiótico	Dosis diaria	Duración del tratamiento	Costo Actual/ Unidad	Total del tratamiento Ecuador
Profilaxis ITU recurrente en mujer joven	Norfloxacino*	Tableta 200 mg diaria nocturna	Hasta 6 - 12 meses	0.21 centavos Caja de 20 tabs. \$ 5.00	\$ 22.52 (6 meses) \$ 45.63 (12 meses)
ITU en varones Adulto	Ciprofloxacino	Tableta 200 mg 12 h	4-6 semanas	0.70 centavos	\$ 9.80 (7 días) \$ 19.60 (14 días)
ITU con sonda	Ciprofloxacino	Tableta 500 mg 12 h	7 días	0.70 centavos	\$ 9.80

*Presentación en el Ecuador: Norfloxacino tableta de 400 mg.

Sin embargo, actualmente no sería adecuado considerarlos fármacos de primera línea en el tratamiento de ITU no complicada, ya que su uso y abuso han causado un aumento significativo de su resistencia, lo cual es demostrado por un estudio realizado por el CNRAM-INSPI de la ciudad de Quito, donde se observa una alta tasa de resistencia a las fluoroquinolonas que, en pacientes de la comunidad, es mayor del 40%, y en pacientes hospitalizados mayor del 50% en cepas de *E. coli* (CNRAM-INSPI, 2018). Esto conlleva que hoy en día no se utilicen las

fluoroquinolonas como tratamiento empírico en ITU. Por lo tanto, la indicación sería reservarlas para casos donde no exista otra opción disponible o en casos graves producidos por *P. aeruginosa* (Yamamoto et al., 2010).

3.2.8. Efectos adversos

La reacción adversa más importante y limitante para su uso, es que afectan el desarrollo del cartílago y por ello están contraindicadas en los niños, adolescentes, embarazadas y mujeres en lactancia. La artropatía en las especies animales juveniles, es una forma de toxicidad que se ha observado (Cué et al., 2005).

En cuanto a otras reacciones adversas, tanto en la incidencia como en el tipo de reacciones de los fármacos, existen pequeñas diferencias. En su mayoría, las manifestaciones son leves y desaparecen al suspender el medicamento. Solo el 1-3 % de los pacientes tratados deben suspender el tratamiento por efectos adversos (Cué et al., 2005). Las más frecuentes son:

3.2.8.1. Efectos gastrointestinales

Afectan al tracto gastrointestinal Principalmente anorexia náuseas, dolor abdominal, dispepsia, emesis, pérdida de apetito y diarrea con menor frecuencia (Cué et al., 2005)(Owens et al., 2005)(Mandell et a., 2010).

3.2.8.2. Sistema nervioso central

Los efectos son mareos, cefalea, inquietud, depresión, insomnio, somnolencia, confusión, fatiga, agitación y temblores, raramente pueden presentarse reacciones psicóticas, alucinaciones, convulsiones y alteraciones del estado de ánimo. Normalmente estas reacciones comienzan después de pocos días de iniciado el tratamiento y desaparecen al suspender la medicación. Los pacientes de edad avanzada y aquellos con enfermedades del sistema nervioso central son los más susceptibles a estas complicaciones, por lo que se recomienda administrar el fármaco en estos casos bajo estrecha vigilancia y no usar dosis extremadamente altas (Cué et al., 2005)(Owens et al., 2005)(Mandell et a., 2010).

3.2.8.3. Reacciones dérmicas

Pueden observarse reacciones cutáneas de hipersensibilidad que incluyen eritema, prurito y urticaria, las cuales son bastante infrecuentes, aunque, en general, son leves o moderadas y desaparecen al suspender el tratamiento. Se han descrito reacciones de fotosensibilidad con esparfloxacino, lomefloxacino y enoxacino, por lo que se debe evitar la exposición al sol hasta 5 días después de suspender el tratamiento. Son raras con norfloxacino y ciprofloxacino, pero clinafloxacino, fleroxacino y lomefloxacino fueron retirados del mercado por esta causa (Cué et al., 2005)(Serra 2008).

3.2.8.4. Alteraciones analíticas

Pueden producir leucopenia leve, neutropenia, eosinofilia, trombocitosis y aumento de las transaminasas reversibles al suspender la medicación, cristaluria (Cué et al., 2005)(Serra 2008)(Mensa et al., 2014).

3.2.8.5. Alargamiento del intervalo QT en el electrocardiograma

Pueden ocasionar arritmias ventriculares fatales (síncope y muerte súbita). Este efecto adverso ha sido descrito con las FQ más modernas (levofloxacino, moxifloxacino, fleroxifloxacino, trovafloxacino), y provocó la salida del mercado de grepafloxacino. Por tal motivo no deben ser aplicadas en pacientes que estén en tratamiento con antiarrítmicos o que tengan antecedentes de arritmias graves (Cué et al., 2005).

La mayor parte de los pacientes que reciben una medicación que alargue el intervalo QT no desarrollan arritmias. Parece que estas 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).

3.2.8.6. Tendinitis y rotura de tendones

Se ha descrito tendinitis y ruptura de tendones con tensiones mecánicas mínimas, en pacientes bajo tratamientos con FQ, por lo que se ha sugerido el aumento de la sensibilidad a este tipo de fenómeno asociado con estas (Cué et al., 2005).

3.2.9. Mecanismos de resistencia a fluoroquinolonas

La adquisición de resistencia a las quinolonas puede estar asociada a varios mecanismos que son: mutaciones puntuales en las dianas de los antibióticos, impermeabilidad de membrana, bombas de expulsión activa y resistencia mediada por plásmidos (Correia et al., 2017).

3.2.9.1. Impermeabilidad de membrana

Alteraciones en la membrana externa bacteriana que dan como resultado una reducción de la concentración intracelular de los fármacos ya sea por disminución de la absorción (Figura 15), aumento del flujo de salida (Figura 15) o una combinación de ambos, pueden conferir resistencia a quinolonas (Correia et al, 2017). Estas mutaciones o bien la pérdida de porina, una regulación baja de porina, una modificación del tamaño o de la conductancia del canal de porina darán como resultado una limitada difusión y en consecuencia conducen a la resistencia bacteriana a los antibióticos (Figura 15). La reducción o pérdida de expresión de porinas

como OmpF, OmpC, OmpD y OmpA se ha implicado en un aumento de resistencia a las quinolonas y otros medicamentos (Correia et al, 2017).

3.2.9.2. Bombas de expulsión

El aumento del flujo de salida (Figura 15) en las bacterias gram negativas, puede estar implicado en la resistencia a quinolonas. En general, está producido por bombas de expulsión que son miembros de la familia RND, que son complejos tripartitos formados por una proteína de bomba de membrana interna, una proteína de canal de membrana externa y una proteína de fusión de membrana periplásmica (Correia et al, 2017).

3.2.9.3. Resistencia a quinolonas mediada por plásmidos

Desde hace 3 décadas que comenzaron a usarse las quinolonas en la práctica clínica, se pensaba que las mutaciones de resistencia a estos fármacos se producían en los cromosomas de la bacteria y eran hereditarias, siendo los plásmidos innecesarios para la supervivencia y la diseminación de estas cepas, así mismo que al ser de origen sintético, las bacterias no podrían desarrollar sistemas de defensa contra ellos. (Courvalin, 1990). En 1998 por primera vez se demostró la intervención de un plásmido en la adquisición de resistencia ante esta familia de antibióticos (Martínez-Martínez et al., 1998).

La Resistencia a quinolonas mediada por plásmidos (RQMP), está dada por varios mecanismos.

3.2.9.3.1. Proteínas Qnr

Las proteínas Qnr pertenecen a la familia de proteínas repetidas de los pentapéptidos, y confieren resistencia a quinolonas protegiendo físicamente la ADN girasa y la topoisomerasa IV de la inhibición de quinolona. Se han descrito cinco tipos de determinantes Qnr, codificados por los genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrC* y *qnrD* en *Enterobacteriaceae* (Strahilevitz et al., 2009) (Robicsek et al., 2006) (Briales et al., 2012).

3.2.9.3.2. Enzimas acetilasas tipo AAC (6') - Ib-cr

Un segundo mecanismo es a través de una variante funcional de una acetiltransferasa modificadora de aminoglucósidos, AAC (6') - Ib-cr, que alberga dos sustituciones de aminoácidos específicos; esta variante es capaz de acetilar el nitrógeno no sustituido en C7 del anillo de piperazina que se encuentra en quinolonas tales como ciprofloxacino, confiriendo de este modo resistencia a quinolonas por la disminución de la actividad del fármaco (Correia et al., 2017).

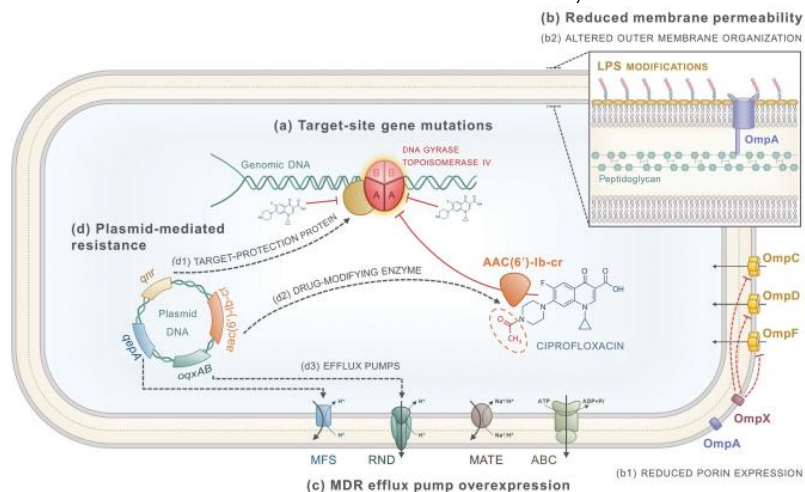
3.2.9.3.3. Bombas de expulsión codificadas por plásmidos

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 de estas explotaciones (Ruiz et al., 2012)

Dentro de este mecanismo tenemos el gen *qepA*, el cual pertenece a la familia MFS y confiere disminución de la sensibilidad a las fluoroquinolonas hidrofílicas, especialmente ciprofloxacino, norfloxacino y enrofloxacino. Otro gen en este grupo es *oqxAB*, que pertenece a la familia RND (Resistencia-nodulación-división) y tiene una amplia especificidad de sustrato más allá de las quinolonas ciprofloxacino, norfloxacino, ácido nalidíxico, olaquinox y flumequina, afectando también a tetraciclinas, cloranfenicol y trimetoprim, y a biocidas como cloruro de benzalconio o triclosan, entre muchos otros compuestos (Figura 15) (Correia et al., 2017).

Figura 15. Mecanismos de resistencia a quinolonas

Tomada de Correia et al., 2017



(a) las mutaciones cromosómicas dentro de las RDRQs de los genes que codifican las subunidades A y B de la ADN girasa y la topoisomerasa IV estructuralmente cambia la proteína diana, reduciendo su afinidad de unión del fármaco. (b) mutaciones cromosómicas que conducen a la reducción de la permeabilidad de la membrana externa, ya sea por expresión reducida porinas (b1) o modificaciones en la organización de la membrana externa (b2), y también mutaciones que conducen a un aumento de la expresión de bombas de expulsión (c), contribuyen aditivamente a la resistencia por la disminución de la acumulación de quinolona citoplasmática. Genes de resistencia a quinolona de codificación plasmídica (d) pueden producir proteínas Qnr de protección de destino (D1), AAC (6') - acetiltransferasa Ib-cr variantes capaces de modificar ciertas quinolonas (d2) o bombas de expulsión QepA y OqxAB que expulsan activamente a las quinolonas. LPS, lipopolisacárido; MFS, superfamilia importante facilitador; RND, resistencia-nodulación por división; MATE, extrusión antibiótica y la toxina múltiple; ABC, casete de unión a ATP; MDR, resistencia a múltiples fármacos.

3.2.9.4. Resistencia a fluoroquinolonas por mutaciones en genes de la ADN girasa y topoisomerasa IV

Estudios iniciales centrados en *E. coli*, demostraron que la resistencia a las quinolonas se produce normalmente por mutaciones en la

ADN girasa en regiones específicas de los genes *gyrA* o *gyrB*. Las mutaciones a nivel de la topoisomerasa IV en las regiones equivalentes a los genes *parC* o *parE* tienen lugar tras las acontecidas en la girasa, y producen, en general, altos grados de resistencia a fluoroquinolonas. Por ello se identificó la girasa como principal diana de las fluoroquinolonas (Taléns-Visconti et al., 2002).

Estas mutaciones de tipo cromosómico dan lugar a alteraciones en segmentos definidos de los genes que codifican la ADN girasa (especialmente en la subunidad A) y la topoisomerasa IV, en los segmentos conocidos como Regiones Determinantes de Resistencia a Quinolonas (RDRQ). Las mutaciones en las RDRQs de estos genes dan como resultado sustituciones de aminoácidos que estructuralmente cambian la proteína diana y, posteriormente la afinidad de unión entre el fármaco y la enzima (Correia et al., 2017) (Taléns-Visconti et al., 2002).

Una única mutación en la RDRQ de *gyrA* parece ser suficiente para generar una resistencia de bajo nivel a quinolonas, y una doble mutación genera un alto nivel fenotípico de resistencia a las fluoroquinolonas. Se supone que estas mutaciones se producen de forma escalonada. El efecto de estas mutaciones puede alterar la formación de enlaces de hidrógeno, y la carga negativa de los aminoácidos parece ser importante para las interacciones de la quinolona con el complejo ADN-girasa-ADN. En los aislados clínicos de *E. coli*, la resistencia a las quinolonas se asocia

principalmente con mutaciones en *gyrA*, mientras que las mutaciones en los genes de la topoisomerasa IV, *parC* y *parE*, juegan un papel secundario. Hasta la fecha, en gram negativos, las mutaciones dentro de *parC* y *parE* están habitualmente supeditadas a mutaciones previas en *gyrA*, de modo que las mutaciones dentro de estos genes sólo se producen si la cepa ya posee una sensibilidad reducida a fluoroquinolonas por mutaciones en ADN girasa. Por lo tanto, las mutaciones adicionales en *parC* y, en menor medida, en *parE*, se supone que juegan un papel importante en la formación de cepas altamente resistentes (Zurfluh et al., 2014) (Hopkins et al., 2005) (Vila et al., 1994) (Sáenz et al., 2003) (Heisig, 1996).

3.2.9.4.1. Mutaciones en la ADN girasa

3.2.9.4.1.1. Resistencia generada por mutaciones en el gen *gyrA*

Las mutaciones en la ADN girasa en *gyrA* se localizan entre los aminoácidos Ala67-Gln106, mientras que en *gyrB* lo hacen habitualmente entre Asp 426-Lis 447 (Ruiz, 2003) (Yoshida et al., 1991); las mutaciones que condicionan resistencia a *E. coli* se pueden ver en la (Tabla 11).

Tabla 11. Mutaciones en las subunidades *gyrA* y *gyrB* de cepas resistentes a quinolonas en *E. coli*

Tomada de Ruiz, 2003

Codón ^a	Aminoácido salvaje	Mutaciones descritas
<i>gyrA</i>		
51^b	Ala	Val
67^b	Ala	Ser
81	Gly	Cys, Asp
82^b	Asp	Gly
83	Ser	Leu, Trp, Ala, Val
84	Ala	Pro, Val
87	Asp	Asn, Gly, Val, Tyr, His
106^b	Gln	Arg, His
<i>gyrB</i>		
426	Asp	Asn
447	Lys	Glu

^a: Mutaciones en otros codones, como el codón 93, han sido descritas, pero su papel en el desarrollo de resistencia a quinolonas continúa siendo incierto: ^b: Solo descritas en mutantes obtenidos *in vitro*.

Aunque se han descrito numerosas mutaciones en *gyrA* y *gyrB* con diferente repercusión en la disminución de la sensibilidad a las quinolonas, hay dos mutaciones básicas en *gyrA* implicadas en la resistencia: serina 83 por triptófano y ácido aspártico 87 por asparagina en *E. coli*, o en las posiciones equivalentes en otros microorganismos.

El mecanismo mayormente descrito es el primero, donde mediante una mutación puntual, hay un cambio en el codón 83 y se codifica otro aminoácido de manera que se modifica la enzima diana, con lo que se logra una alta resistencia a quinolonas como el ácido nalidíxico. La alta resistencia a fluoroquinolonas como ciprofloxacino, se relaciona con más

de una mutación a nivel de *gyrA* (normalmente además de la posición 83 se afecta la posición 87) o con mutaciones además *en gyrA* a nivel de otros genes como *parC* (codones 80 o 84 de manera usual) (Mosquito et al., 2011).

El mecanismo de resistencia determinado por mutaciones en el gen *gyrA* ha sido descrito de forma prácticamente sistemática en todos los gram negativos en que se ha descrito resistencia a fluoroquinolonas (Deguchi et al., 1997) (Vila et al., 1995) (Higgins et al., 2003).

Los fenotipos de resistencia que se asocian con mutaciones en la RDRQ de *gyrA* se caracterizaron por mayores CIMs a ácido nalidíxico (incremento en 8 - 400 veces) comparada con las correspondientes a fluoroquinolonas tales como ciprofloxacina (Hopkins et al., 2005).

Tabla 12. Cambios aminoácidos por las mutaciones en *gyrA* y su relación con los niveles de resistencia a fluoroquinolonas

Tomada De La Fuente et al., 2007

Especies	Cepa	CIM (ug/ml) de:			Codón 83	Codón 87
		CIP	LEV	MOX		
<i>E. coli</i>	ECR17	32	32	32	Ser(TCG)→Leu(TTG)	Asp(GAC)→Asn(AAC)
	EC-145	≤0.03	≤0.03	≤0.03	(-)	(-)
<i>K. pneumoniae</i>	K-49	256	1	1	Ser(TCC)→Tyr(TAC)	(-)
	K-218	0.25	≤0.03	0.06	(-)	(-)
<i>A. baumannii</i>	90-38	2	0.5	0.5	(-)	(-)
	90-39	256	16	32	Ser(TCA)→Leu(TTA)	(-)
<i>P. aeruginosa</i>	P-15	1	1	2	(-)	(-)
	P-103	128	64	>64	Thr(AAC)→Ile(ATC)	(-)

Resultado: cepas resistentes; CIP: ciprofloxacino, LEV: levofloxacino; MOX: moxifloxacino; (-): ausencia de mutación

En la (Tabla 12) se analiza el codón y gen mutado junto con sus respectivos aminoácidos, descritos en las subunidades *gyrA* en cepas de *E. coli* resistentes a quinolonas (De la Fuente et al., 2007).

3.2.9.4.1.2. Resistencia generada por mutaciones en el gen *gyrB*

En *gyrB* se identificaron dos sitios que determinan la resistencia a quinolonas en los codones Asp 426 y Lis 447 (Yamagishi et al., 1986). Las dos mutaciones en *gyrB* causaron un cambio de aminoácidos en una pequeña región en el centro de la subunidad B y cerca del extremo N-terminal de la subunidad B procesada. Así, la mutación del ácido aspártico 426 por asparagina le confiere resistencia tanto a quinolonas ácidas como anfotéricas, y la mutación de lisina 447 por ácido glutámico le confiere resistencia a quinolonas ácidas y una ligera hipersensibilidad a quinolonas anfotéricas (Yoshida et al., 1991).

3.2.9.4.2. Mutaciones en topoisomerasa IV

En *parC*, la región RDRQ está comprendida entre los codones 67 y 107, y las posiciones que más frecuentemente se encuentran mutadas son los codones 80 y 84. Para *parE* generan cambios conformacionales que pueden interferir en la unión de las quinolonas a la ADN girasa. Estas mutaciones no son frecuentes en aislamientos clínicos y suelen producir niveles de baja resistencia a quinolonas lo mismo que para *gyrB*. La alta

homología entre *gyrA* y *parC*, y *gyrB* y *parE*, se ve reflejada en que las mutaciones se localizan en puntos homólogos, en los que las posiciones 81, 83 y 87 de *gyrA* equivaldrían a las 78, 80 y 84 de *parC* (Hafizah et al., 2006).

3.2.9.4.2.1. Resistencia generada por mutación en el gen *parC*

Del mismo modo que en la ADN girasa, las mutaciones que confieren resistencia se concentran en la RDRQ del gen *parC*. Esta región está comprendida también entre los aminoácidos 67 y 107. Igual que en el caso anterior la mayor parte de las mutaciones en esta región se concentran en dos aminoácidos, Ser-80 y Glu-84 en *S. aureus*, y posiciones homólogas en otros microorganismos (Sierra 2005).

3.2.9.4.2.2. Resistencia generada por mutación en el gen *parE*

Se ha informado de que la mutación *nfxD* de *E. coli*, que causa resistencia a norfloxacino, es una mutación en el gen *parE*. La mutación *nfxD*, que induce un cambio del aminoácido leucina 445 a histidina, provoca un aumento mínimo de la CIM en una cepa *gyrA* mutante pero no en una cepa *gyrA* + (Nakamura, 1997) (Breines et al., 1997).

El papel de las sustituciones de aminoácidos en *parE*, que resulta en el desarrollo de resistencia a quinolonas en aislados clínicos de

microorganismos gram negativos parece ser irrelevante de hecho, ya que sólo se ha descrito una sola sustitución (Leu-445 a His) en *parE* en un mutante *in vitro* de *E. coli* resistente a quinolonas (Tabla 14). Por otra parte, esta mutación sólo parece afectar a la CIM de quinolonas en presencia de una mutación concomitante en *gyrA* (Ruiz, 2003) (Everett et al., 1996) (Ruiz et al., 1997) (Breines et al., 1997).

La secuencia de ADN de *parE* es muy similar a la de *gyrB*. Se ha demostrado que una cepa de *E. coli* resistente a quinolonas que portaba una mutación no identificada en la región de *parE*, todavía necesitaba una mutación adicional en *gyrA* para expresar resistencia a quinolonas (Hopkins et al., 2005) (Soussy et al., 1993).

Del análisis de secuencias de nucleótidos de *parE* no revelo cambios en el RDQR, mientras tanto, se detecto una única mutacion fuera de esta región en el codón 458 (serina TCG → alanina GCG) en la cepa de *E. coli* O125 (Gharib et al., 2013)

Para las subunidades *gyrB* y *parE* de bacterias resistentes, los cambios de aminoácidos, cuando están presentes (las mutaciones en estas subunidades son mucho menos comunes que los de *gyrA* o *parC*), suelen localizarse en la porción media de la subunidad en un dominio involucrado en interacciones con sus subunidades complementarias *gyrA* y *parC*, respectivamente (Tabla 13) (Hooper, 1998).

Tabla 13. Mutaciones descritas en las subunidades *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE* en cepas resistentes a las quinolonas

Tomada de Rodríguez et al., 2006

Codón	Aminoácido silvestre	Cambios descritos
<i>gyrA</i>		
51	Ala	Val
67	Ala	Ser
81	Gly	Cys, Asp
82	Asp	Gly
83	Ser	Leu, Trp, Ala, Val
84	Ala	Pro, Val
87	Asp	Asn, Gly, Val, Tyr, His
106	Gln	Arg, His
<i>gyrB</i>		
426	Asp	Asn
447	Lys	Glu
<i>parC</i>		
78	Gly	Asp
80	Ser	Ile, Arg
84	Glu	Lys, Val, Gly
<i>parE</i>		
445	Leu	His

En un estudio realizado en Corea del Norte se encontraron mutaciones diversas en seis codones del gen *parE* en cepas de *E. coli* resistentes a fluoroquinolonas. La mutación en el codón 416 (Leu → Phe) fue la mutación más común. Sin embargo, su frecuencia disminuía a medida que aumentaba la CIM. Por el contrario, la distribución de la prevalencia de mutaciones en el codón 529 (Ile → Leu) se incrementó con el aumento de CIM (Nam et al., 2013).

Se suelen encontrar mutaciones al menos dobles, en *gyrA* y *parC*, en aislados de *E. coli* con alto nivel de resistencia a fluoroquinolonas. No es infrecuente que aislados de *E. coli* resistentes a fluoroquinolonas

contengan otras combinaciones de mutaciones no sinónimas en *gyrA* (normalmente dos) y *parC* (por lo general sólo una) (Tabla 13).

La contribución de las sustituciones de aminoácidos en *gyrA* y *parC* a la resistencia a quinolonas puede ser variable entre diferentes bacilos gram negativos. En *P. aeruginosa*, la resistencia a las fluoroquinolonas se debe principalmente a mutaciones en *gyrA*, teniendo menos importancia las mutaciones en *parC*. Se requieren tres o cuatro mutaciones en los genes *gyrA* y *parC* para obtener resistencia a ciprofloxacino de alto nivel en *E. coli*, pero pueden ser suficientes mutaciones dobles en *gyrA* y *parC* para obtener una resistencia a quinolonas de alto nivel en *Acinetobacter Baumannii* (Vakili et al., 2014) (Higgins et al., 2003) (Thomas et al., 2001).

3.2.9.5. Corresistencias en *E. coli*

En un estudio realizado por Hernández y colaboradores se realizó la caracterización genotípica, que determinó que todas las cepas ECUP albergaban genes *blaBLEE*. En el 76,2% de las cepas se observó la presencia de un único gen productor de BLEE, representado por *blaCTX-M-15*, mientras que el 23,8% estuvo conformado por ECUP con diversas combinaciones de genes *bla* (*blaCTX-M-15* + *blaTEM-1*, *blaCTX-M-15* + *blaSHV* y *blaSHV* + *blaTEM-1*). El 61,9% de los aislados se ubicó en el filogrupo A y el resto de las cepas en el grupo B2 (38,1%). No se evidenció la diseminación de una clona de ECUP particular, solo 7 cepas demostraron pertenecer a un grupo clonal con un índice de similitud de

más de 85%, en la (Tabla 14) se muestran los resultados de los patrones de resistencia (Hernández et al., 2014).

Tabla 14. Distribución de los patrones de resistencia asociados con la presencia de BLEEs en cepas de *E. coli* uropatógena

Tomada de Hernández et al., 2014

Patrón de resistencia	Marcadores de resistencia	N.º: 21 (nº/%)
I	BLEE+, TOB	1/4.76
II	BLEE+, CIP, TOB	5/23.81
III	BLEE+, CIP, TOB, AMK	2/9.25
IV	BLEE+, CIP, TOB, GTM	11/52.38
V	BLEE+, CIP, TOB, AMK, GTM	2/9.52

MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Selección de las muestras de orina

Se analizaron 319 muestras de orina, procedentes de las siguientes comunidades andinas rurales del Ecuador: 1) Zumbahua, ubicada a 162 km de Quito, 12.643 habitantes (INEC, 2015), con un 85% de población nativa amerindia Kichwa, es parroquia del cantón Saquisilí de la provincia de Cotopaxi, 2) Colta, ubicada a 206 km de Quito, 46.392 habitantes (INEC, 2015), tiene un 70% de población nativa amerindia Kichwa, y es cantón de la provincia de Chimborazo y 3) Guamote, ubicada a 238 km de Quito que tiene 52,392 habitantes (INEC, 2015), con un 94.5% de población nativa amerindia Kichwa, y es cantón de la provincia de Chimborazo. Se incluyó en el estudio a todas aquellas pacientes que asistieron a la consulta externa de los servicios de salud de las poblaciones antes indicadas entre los meses de febrero a mayo de 2016, con sintomatología sugestiva de ITU. A dichas pacientes se les solicitó una muestra de orina y se les indicó la forma de recoger dicha muestra. Todas las muestras fueron cultivadas, y las muestras con recuento significativo ($\geq 10^5$ UFC/ml) fueron procesadas. Se excluyeron aquellas pacientes con infecciones del tracto urinario complicadas, muestras repetidas y pacientes que no pertenecían a las comunidades nativas amerindias Kichwa. Teniendo en cuenta que las muestras para urocultivo se procesarían el mismo día de la toma o al día siguiente de la recogida, se procedió a

utilizar un conservante (ácido bórico), el cual permite mantener la muestra de orina hasta 24 horas y ayuda a inhibir la multiplicación bacteriana. Para ello, se preparó una solución de ácido bórico al 2% de la siguiente manera: se pesó 2 gramos de Boric Acid *ultrapure*TM (GIBCO BRL 15583-024) y se diluyó en 100 ml de agua destilada estéril precalentada a 50°C. Posteriormente, en una cabina de bioseguridad (AirClean 600 PCR Workstation) se dispensaron 500 µl de la solución de ácido bórico en tubos Falcon de 15 ml estériles. Se añadió un mínimo de 6 ml de la muestra de orina. Los tubos Falcon fueron almacenados y transportados en una hielera a temperatura constante entre 2 a 8°C, hasta el laboratorio de microbiología del CRNRAM del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública "Dr. Leopoldo Izquieta Pérez", Coordinación Zonal 9 (INSPI-QLIP CZ9), Quito. Una vez en el laboratorio, las muestras fueron recibidas teniendo en cuenta lo siguiente: adecuada cadena de frío durante el transporte (2 a 8 °C), correcta identificación de cada muestra (nombre, cédula de identidad, edad, sexo, unidad de salud), y comprobando que cada muestra tenga el reporte del examen elemental y microscópico de orina (EMO). A cada muestra se le asignó un código de laboratorio, registrándose estos datos en hojas de trabajo juntamente con los datos clínicos de la muestra.

4.2. Siembra de las muestras de orina

Se preparó el material necesario para la siembra: asas calibradas estériles de 0.01 ml y placas preparadas con medio de cultivo Eosin Methylene Blue (EMB) rotuladas con el código de laboratorio asignado a cada muestra. Las muestras fueron homogeneizadas por inversión y sembradas mediante asa calibrada en placas con Eosin Methylene Blue (EMB) de acuerdo con las recomendaciones para procesamiento de urocultivos. Tras la siembra, las placas se incubaron en aerobiosis a 37°C por 24 horas y 48 horas cuando no hubo un resultado positivo a las 24 horas. Se tomó en cuenta un recuento $>10^5$ UFC/ml como urocultivo positivo. Las cepas con recuento significativo fueron identificadas de manera preliminar como *E. coli* cuando se observaban colonias verdosas con brillo metálico en el agar EMB, por ser esta bacteria fermentadora fuerte de la lactosa contenida en el medio.

4.3. Identificación bacteriana

Para la confirmación de género y especie se utilizó una caracterización bioquímica de la siguiente manera: se preparó una suspensión bacteriana en solución salina 0.9%, luego se procedió a la siembra en agar citrato, medio SIM y en caldo Rojo de Metilo/Voges Proskauer (MR/VP), que se incubaron en aerobiosis por 24 horas a 37°C. Se identificó como *E. coli* cuando se observó un resultado negativo para el agar citrato, positivo para producción de indol, motilidad positiva en el

medio SIM, positivo para el caldo MR y negativo para VP. Estos resultados se confirmaron mediante el uso de tarjetas de identificación Vitek 2 GN Cards REF 21341. Las cepas identificadas como *E. coli* fueron almacenadas en criotubos en medio Brain Heart Infusion (BHI) en glicerol al 20% y conservadas a -80°C.

4.4. Pruebas de sensibilidad antibiótica

Para el estudio de sensibilidad antibiótica, se incluyeron todas las cepas de *E. coli* que cumplían los criterios de inclusión y de exclusión planteados. Se emplearon las quinolonas habitualmente usadas para el tratamiento de ITU, que incluían ácido nalidíxico, ciprofloxacino, levofloxacino y norfloxacino. Para la determinación de sensibilidad, se utilizaron colonias aisladas a partir de agar sangre al 5%. Las colonias fueron suspendidas en cloruro de sodio al 0.9% a concentración de 0.5 en la escala McFarland (Densichek plus-bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia). A partir de las suspensiones bacterianas obtenidas se siguieron dos procesos: El primero fue la Técnica de Kirby Bauer (difusión en discos) en el que se incluyeron los siguientes antimicrobianos: amoxicilina/ácido clavulánico, ácido nalidíxico, fosfomicina, ampicilina, cefazolina, cefuroxima, ceftazidima, cefotaxima, cefoxitina, meropenem, gentamicina, ciprofloxacina, levofloxacina, norfloxacina, trimetoprim/sulfametoxazol y nitrofurantoina. Para esto, se inoculó una placa de medio Mueller Hinton con la suspensión bacteriana de cada aislado y se colocaron los discos

anteriormente indicados de forma estratégica para detectar mecanismos de resistencia como: betalactamasas clásicas como TEM y SHV al observar resistencia a cefalosporinas de primera y segunda generación; betalactamasas de espectro extendido (método de doble disco) al observar sinergia entre un inhibidor de betalactamasas (Ac. clavulánico) y cefalosporinas de tercera generación; hiperproducción de AmpC al observar resistencia a cefoxitina y resistencia a cefalosporinas de tercera generación sin sinergia con Ac. Clavulánico. Las placas de Mueller Hinton inoculadas se incubaron durante 24 horas a 37°C. El segundo fue la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM), de los siguientes antimicrobianos: ampicilina, ampicilina/sulbactam, piperacilina/tazobactam, cefazolina, ceftazidima, ceftriaxona, cefepima, cefoxitina, ertapenem, imipenem, gentamicina, tobramicina, ciprofloxacino, levofloxacino, trimetoprim/sulfametoxazol y nitrofurantoina, de acuerdo a los parámetros indicados por el fabricante (Vitek®2 Compact, bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia). Para el análisis de la resistencia antimicrobiana, se tomaron en cuenta los resultados de sensibilidad obtenidos por difusión de disco de los siguientes antimicrobianos: amoxicilina/ácido clavulánico, ácido nalidíxico y fosfomicina, junto con todos los resultados de sensibilidad obtenidos por CIM (Anexo 1); además se tomó en cuenta los resultados de difusión de disco de los antimicrobianos ciprofloxacino, levofloxacino y norfloxacina de las cepas con fenotipos de resistencia a quinolonas (Tabla 20). La lectura de los datos se realizó de acuerdo a las

normas del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2016, y se definió como cepa multirresistente (MDR), cuando presentaba resistencia a 3 grupos de antibióticos, o cepa extremadamente resistente (XDR), cuando presentaba resistencia a varios antimicrobianos de más de tres grupos de antibióticos. El análisis estadístico se realizó utilizando el programa WhoNet 5.6 (Who Collaborating Centre for Surveillance of Antimicrobial Resistance Boston, Massachusetts, June 2006).

4.5. Extracción de ADN

Se realizó colocando 2 asas de los cultivos puros de cada cepa en 5ml de caldo BHI, incubados por 18 horas a 37°C en agitación constante (200 rpm). Previa la extracción de ADN, se realizó la siembra de 100 µl de la suspensión bacteriana activada en 5 ml de caldo BHI. Esta suspensión fue incubada por 18 horas a 37°C en agitación constante (200 rpm).

La extracción de ADN de las cepas de *E. coli* uropatógenas se realizó a partir de cultivos líquidos con modificaciones al protocolo recomendado por el fabricante del kit comercial *PureLink Genomic* ADN (Invitrogen). El protocolo de extracción empleado se indica a continuación.

4.5.1. Lisis

- Colocar 1 ml de cultivo en un tubo Eppendorf estéril de 1.5 ml.
- Centrifugar a 14000 rpm durante 10 minutos.
- Desechar el sobrenadante.

- Resuspender el pellet en 180 μ l de *PureLink Genomic Digestion Buffer*.
- Añadir 20 μ l de proteinasa K para lisar las células. Mezclar bien con ayuda de vortex.
- Incubar el tubo a 55°C con vortex ocasional para completar la lisis, durante 45 minutos.
- Añadir 20 μ l de RNasa A para lisar, mezclar mediante vortex e incubar por 2 minutos a temperatura ambiente.
- Añadir 200 μ l de *PureLink Genomic Lysis/Binding Buffer* y mezclar bien con vortex hasta obtener una solución homogénea.
- Añadir 200 μ l de etanol al 100% para lisar. Mezclar bien con vortex durante 5 segundos para obtener una solución homogénea.

4.5.2. Unión, lavado y elución

- Colocar la solución anterior en la columna con su tubo colector correspondiente.
- Centrifugar la columna a 14100 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente.
- Descartar el contenido del tubo, y colocar la columna en un nuevo tubo.

- Añadir 500 µl de Buffer de lavado I a la columna y centrifugar la columna a 14100 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente.
- Descartar el contenido del tubo, y colocar la columna en un nuevo tubo.
- Añadir 500 µl de Buffer de lavado II a la columna.
- Centrifugar la columna a la velocidad máxima por 3 minutos a temperatura ambiente. Descartar el contenido del tubo y el tubo.
- Colocar la columna en un tubo eppendorf nuevo de 1.5 ml.
- Añadir 50 µl de *PureLink Genomic Elution Buffer* a la columna.
- Incubar a temperatura ambiente por un minuto y centrifugar la columna a máxima velocidad por un minuto a temperatura ambiente.
- Almacenar el contenido del tubo a -80°C.

4.5.3. Evaluación cuantitativa y cualitativa de ácidos nucleicos

La evaluación cuantitativa se realizó utilizando el equipo nanodrop 2000. La evaluación cualitativa se realizó mediante electroforesis horizontal.

4.6. Diseño de Primers

Para la amplificación de las regiones determinantes de resistencia a quinolonas, se usaron cebadores descritos anteriormente (Liu et al., 2012; Bansal & Tandon, 2011), los cuales se detallan en la (tabla 15).

La secuencia blanco a utilizar para el diseño de los cebadores fue obtenida de *GenBank*. Posterior a esto se procedió al diseño mediante herramientas bioinformáticas como *Primer Express* y *Primer-BLAST*. Se corroboró que cada par de cebadores cumplían con las características deseadas para evitar la formación de estructuras secundarias o alineamientos indeseados. Se utilizó el programa mega 6.0 para Apple Macintosh.

Tabla 15. Oligonucleótidos usados para la detección de genes cromosómicos (Invitrogen)

Gen	Oligonucleótido (secuencia 5' → 3')	Tamaño (pb)
<i>GyrA</i> *	<i>gyrA-F</i> ACGTACTAGGCAATGACTGG <i>gyrA-R</i> AGAAGTCGCCGTCGATAGAA	189
<i>GyrB</i> **	<i>gyrB-F</i> CTCCTCCCAGACCAAAGACA <i>gyrB-R</i> TCACGACCGATACCACAGCC	447
<i>ParC</i> *	<i>parC-F</i> TGTATGCGATGTCTGAACTG <i>parC-R</i> CTCAATAGCAGCTCGGAATA	264
<i>ParE</i> **	<i>parE-F</i> TACCGAGCTGTTCTTGTGG <i>parE-R</i> GGCAATGTGCAGACCATCAG	267

Fuente: *Liu et al., 2012; **Bansal & Tandon, 2011
Elaboración: Autor

4.6.1. Preparación de primers

Se procedió a diluir los primers a un volumen de 100 µmol/µl, realizándose los cálculos que se describen a continuación según instrucciones del fabricante (Invitrogen).

Cada primer se diluyó con el volumen correspondiente antes indicado con agua grado molecular ultrapura libre de ADNasas (Invitrogen) y se refrigeró a 4°C por 24 horas.

4.6.1.1. *GyrA Forward*

$$304.00 \mu\text{g} \times \frac{1 \mu\text{Mol}}{6167 \mu\text{g}} \times \frac{1000 \text{ nMol}}{1 \mu\text{Mol}} = 49.29 \text{ nMol}$$

$$100 \text{ pmol} \quad 1 \mu\text{l}$$

$$49.29 \times 10^3 \text{ pmol} \quad X \quad = 493 \mu\text{l H}_2\text{O}$$

4.6.1.2. *GyrA Reverse*

$$256.33 \mu\text{g} \times \frac{1 \mu\text{Mol}}{6176.1 \mu\text{g}} \times \frac{1000 \text{ nMol}}{1 \mu\text{Mol}} = 41.5 \text{ nMol}$$

$$100 \text{ pmol} \quad 1 \mu\text{l}$$

$$41.5 \times 10^3 \text{ pmol} \quad X \quad = 415 \mu\text{l H}_2\text{O}$$

4.6.1.3. *GyrB* Forward

$$269.30 \mu\text{g} \times \frac{1 \mu\text{Mol}}{6000.9 \mu\text{g}} \times \frac{1000 \text{ nMol}}{1 \mu\text{Mol}} = 44.87 \text{ nMol}$$

$$100 \text{ pmol} \quad 1 \mu\text{l}$$

$$44.87 \times 10^3 \text{ pmol} \quad \text{X} \quad = 448.7 \mu\text{l H}_2\text{O}$$

4.6.1.4. *GyrB* Reverse

$$359.88 \mu\text{g} \times \frac{1 \mu\text{Mol}}{6016.9 \mu\text{g}} \times \frac{1000 \text{ nMol}}{1 \mu\text{Mol}} = 59.83 \text{ nMol}$$

$$100 \text{ pmol} \quad 1 \mu\text{l}$$

$$59.83 \times 10^3 \text{ pmol} \quad \text{X} \quad = 598.3 \mu\text{l H}_2\text{O}$$

4.6.1.5. *ParC* Forward

$$344.97 \mu\text{g} \times \frac{1 \mu\text{Mol}}{6164.0 \mu\text{g}} \times \frac{1000 \text{ nMol}}{1 \mu\text{Mol}} = 55.96 \text{ nMol}$$

$$100 \text{ pmol} \quad 1 \mu\text{l}$$

$$55.96 \times 10^3 \text{ pmol} \quad \text{X} \quad = 559.6 \mu\text{l H}_2\text{O}$$

4.6.1.6. *ParC* Reverse

$$273.35 \mu\text{g} \times \frac{1 \mu\text{Mol}}{6111.0 \mu\text{g}} \times \frac{1000 \text{ nMol}}{1 \mu\text{Mol}} = 44.77 \text{ nMol}$$

$$100 \text{ pmol} \quad 1 \mu\text{l}$$

$$44.77 \times 10^3 \text{ pmol} \quad \text{X} \quad = 447.7 \mu\text{l H}_2\text{O}$$

4.6.1.7. *ParE* Forward

$$312.68 \mu\text{g} \times \frac{1 \mu\text{Mol}}{6116.0 \mu\text{g}} \times \frac{1000 \text{ nMol}}{1 \mu\text{Mol}} = 51.12 \text{ nMol}$$

$$100 \text{ pmol} \quad 1 \mu\text{l}$$

$$51.12 \times 10^3 \text{ pmol} \quad \text{X} \quad = 511.2 \mu\text{l H}_2\text{O}$$

4.6.1.8. *ParE* Reverse

$$342.52 \mu\text{g} \times \frac{1 \mu\text{Mol}}{6152.0 \mu\text{g}} \times \frac{1000 \text{ nMol}}{1 \mu\text{Mol}} = 55.67 \text{ nMol}$$

$$100 \text{ pmol} \quad 1 \mu\text{l}$$

$$55.67 \times 10^3 \text{ pmol} \quad \text{X} \quad = 556.7 \mu\text{l H}_2\text{O}$$

4.7. Amplificación e identificación de genes

Se efectuó la amplificación mediante técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los primers descritos previamente, para los genes *gyrA*, *gyrB*, *parC*, y *parE*.

Para la preparación de la PCR, se utilizó un microlitro (aproximadamente 0,5 ng) de ADN a un volumen total de 50 µl de la mezcla de PCR que contiene 250 nM de cada uno de los cebadores, 0,2 mM de cada uno de los dNTPs, 3 mM Mg²⁺, y 1 U de Taq polimerasa utilizando el tampón de reacción suministrado (Boehringer). Los parámetros de termociclado fueron: una etapa de desnaturalización inicial a 94°C (5 min); seguido por 94°C (1 min), 55°C (1 min) y 72°C (1 min) durante 30 ciclos y una extensión final a 72°C (10 min) como se describió previamente. (Everett et al., 1996)

Para la preparación de la PCR de prueba 12X, en nuestro laboratorio, se prepararon 60 µl de buffer, 18 µl de MgCl₂ 6 µl de dNTPs y 441.6 µl agua grado molecular ultrapura, que nos dio un volumen de 528 µl. Este volumen se alicuotó en 4 tubos falcon de 0,6 cc colocándose en cada uno de ellos 132 µl de la solución, agregándose 1,5 µl de primer F y 1,5 µl de primer R de cada gen, lo que nos dio un volumen total de 125 µl, a continuación, este volumen se dividió en 3 tubos falcon de 0,3 cc colocándose en cada uno de ellos un volumen de 45 µl de la solución. En los tubos falcon de 0,3 cc se añadió 5 µl de ADN de la misma muestra,

catalogados como 1 y 2 y en el tubo 3 se adicionó 5 µl de agua grado molecular ultrapura. Este procedimiento se realizó para los 4 genes.

El ADN se preparó utilizando la siguiente fórmula $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$ que para ejemplo en el caso de una muestra de 198.6 µg/µl de ADN se calculó de la siguiente manera:

$$(198.6 \text{ µg/µl})(X) = (20 \text{ ng/µl})(100 \text{ µl})$$

$$X = \frac{(20 \text{ ng/µl})(100 \text{ µl})}{198.6 \text{ µg/µl}} \quad X = 10.07 \text{ µl}$$

A estos 10.07µl se adicionó 89.93 µl de agua grado molecular ultrapura para tener un volumen final de 100 µl, partiéndose de una concentración stock de 20 ng/µl y llevándose a una concentración de 2 ng/µl en la solución de trabajo.

Los primers también se llevaron a un volumen de 200 µl, partiéndose de una concentración stock de 20 µM y llevándose a una concentración de 0.2 µM en la solución de trabajo

$$(100 \text{ µM/µl})(V_1) = (20 \text{ µM})(200 \text{ µM})$$

$$X = \frac{(20 \text{ µM})(200 \text{ µM})}{100 \text{ µM/µl}} \quad X = 40 \text{ µl}$$

A los 40 µl de primers se adicionaron 160 µl de agua grado molecular ultrapura.

Se estandarizó la PCR, a un volumen de 50 µl de acuerdo con las condiciones de nuestro laboratorio como se observa en la (tabla 16):

Tabla 16. Máster Mix para la PCR de los genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE*

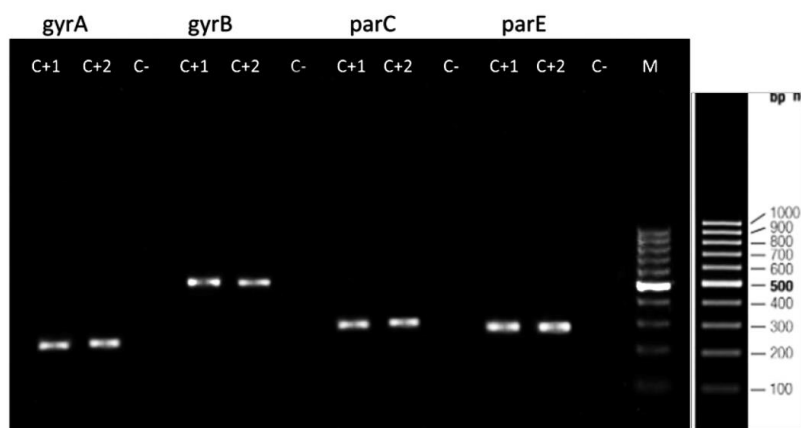
Cálculo de volumen para PCR				
Reactivo	C. Recomendada	C. Stock	C. Trabajo	Volumen (1X) 50µl
Primer F	0,2 - 0,6 µM	20µM	0,2µM	0,5µl
Primer R	0,2 - 0,6 µM	20µM	0,2µM	0,5µl
Buffer	1X	10X	1X	5µl
MgCl ₂	1,25 - 2 mM	50mM	1,5mM	1,5µl
Taq Polimerasa Platimun™ (Invitrogen)	1 -5 U/µl	5 U/µl	1 U/µl	0,2µl
dNTPs (Invitrogen)	0,2- 0,8mM	20mM	0,2mM	0,5µl
ADN muestra 41741	1-15 ng/µl	20ng/µl	2 ng/µl	5µl
H ₂ O ultrapura				36,8µl
Volumen total				50µl

Fuente: Resultados de laboratorio
Elaboración: Autor

A continuación, se procedió a colocar los 12 tubos de los 4 genes con su control negativo correspondiente en el termociclador Modelo FT-512 (Techne), con una temperatura de hibridación de 55°C, por 30 ciclos, luego se probaron estos amplicones, colocándolos en pocillos en gel de agarosa al 2% 5 µl de los mismos con 2 µl de blue juice como tampón de

carga, se usó además 3 µl de ladder de 1 Kb. Como intercalante se utilizó 4,2 µl de SYBR® Safe ADN Gel Stain para 120 ml de gel (Figura 16).

Figura 16. Electroforesis de los productos de PCR de los genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE*

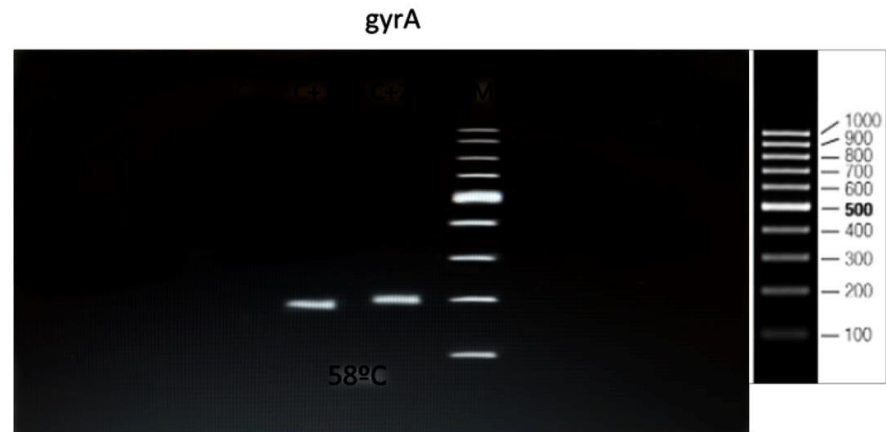


Agarosa 2% (Promega), voltaje: 100V, tiempo: 60 min

Fuente: Resultados de laboratorio
Elaboración: Autor

Con este resultado se decidió modificar la temperatura de hibridación a 58°C, por 35 ciclos para *gyrA* (Figura 17).

Figura 17. Electroforesis del gen *gyrA* con las nuevas condiciones de termociclado



Agarosa 2% (Promega), voltaje: 100V, tiempo: 60 min

Fuente: Resultados de laboratorio
Elaboración: Autor

Con lo que de acuerdo con los parámetros de nuestro laboratorio las condiciones de termociclado se observan en la (Tabla 17).

Tabla 17. Condiciones de termociclado usados en el laboratorio para la identificación de los genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE*

PCR1: <i>gyrA</i>	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Nº Ciclos
Desnaturación inicial	94	5	1
Desnaturación	94	1	35
Hibridación	58	1	
Elongación	72	1	
Elongación final	72	5	1
PCR2: <i>parC</i>	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Nº Ciclos
Desnaturación inicial	94	5	1
Desnaturación	94	1	30
Hibridación	55	1	
Elongación	72	1	
Elongación final	72	5	1
PCR3: <i>gyrB</i>	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Nº Ciclos
Desnaturación inicial	94	5	1
Desnaturación	94	1	30
Hibridación	55	1	
Elongación	72	1	
Elongación final	72	5	1
PCR4: <i>parE</i>	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Nº Ciclos
Desnaturación inicial	94	5	1
Desnaturación	94	1	30
Hibridación	55	1	
Elongación	72	1	
Elongación final	72	5	1

Fuente: Resultados de laboratorio
Elaboración: Autor

Como control negativo, se usó la cepa control *E. coli* ATCC 25922, cedida por el Instituto Nacional de Investigación de Salud Pública, "Dr. Leopoldo Izquieta Pérez" INSPI-QLIP CZ9, Quito, para usarla como control de ausencia de mutaciones de resistencia a fluoroquinolonas.

Como control positivo, se usó la cepa control *E. coli* 4166, cedida por el laboratorio de microbiología la Universidad Católica del Ecuador, que había sido obtenida del Hospital Voz Andes - Quito, y que presentaba mutaciones puntuales en los genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE*, con resistencia a fluoroquinolonas.

Para la electroforesis, de los 4 genes, se utilizó como tampón de carga el #R0611 (Thermo Scientific), que es la variante con respecto a la prueba de primers en la cual utilizamos blue juice.

4.8. Verificación de resultados

Todos los amplicones obtenidos mediante las PCRs realizadas para los 4 genes, se revelaron en gel de agarosa al 2%, sumergido en tampón TBE al 1X (tris, borato y EDTA). Utilizamos electroforesis convencional a 100 voltios (V), 300 mA, 300 W durante 60 minutos.

Como agente fluorescente intercalante entre las dos cadenas de ADN, se usó SYBR® Safe ADN Gel Stain (Invitrogen), añadido a la mezcla de agarosa en polvo y TBE, inmediatamente tras el calentamiento de esta, lo cual favorece la disolución de la agarosa en el TBE. Usé 4,2 µl de SYBR® Safe ADN Gel Stain para 120 ml de gel.

Los pocillos se cargaron con 5 µl de los amplicones, siendo el tampón de carga el #R0611 (Thermo Scientific). Se utilizó GeneRuler 100 bp ADN ladder (Thermo Scientific) como patrón de peso molecular, que

contiene controles entre 100 y 1000 pares de bases (bps), expresados de 100 en 100 bps. La visualización de los resultados se hizo en un transiluminador de luz ultravioleta UVP BioDoc -It™ System (WEALTEC).

4.9. Purificación de productos de PCR

Los amplicones obtenidos por PCR de los genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE*, fueron purificados mediante el Kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (PROMEGA), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Este kit usa la cromatografía de intercambio iónico como fundamento para la purificación de ADN. Para utilizar este kit, primero se preparó el reactivo *Membrane Wash Solution*, adicionando etanol al 95% (375 ml) de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

Para evitar contaminación, el procedimiento de purificación se realizó en una cabina de Bioseguridad con flujo laminar. Dentro de la cabina se preparó un microtubo de 0.6ml (Eppendorf) para cada gen, en el cual se colocó 22 µl del amplicón y 22 µl del reactivo *Membrane Binding Solution* (isotiocianato de guanidina) proveído por el Kit, la mezcla se homogenizó por pipeteo y se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto. Durante el periodo de incubación, se ensambló una *SV Minicolumn* en un *Collection Tube* proveídos por el Kit. Una vez finalizado el periodo de incubación, se colocó el volumen total de la mezcla (44 µl) dentro de la *SV Minicolumn* procurando no tocar la membrana y se incubó por 1 minuto a temperatura ambiente para que el ADN se una de forma reversible a la

membrana de sílica. Tras el periodo de incubación se centrifugó la *SV Minicolumn* por 1 minuto a 14.000 *rpm*. Después de esto se descartó el precipitado del *Collection Tube*, se añadió 750 µl del reactivo *Membrane Wash Solution* proveído por el Kit ya preparado y se centrifugó por 1 minuto a 14.000 *rpm* para el lavado #1 en donde se eliminan el resto de primers, dNTPs, Taq polimerasa y demás componentes de la PCR. Una vez terminado el periodo de centrifugación, de igual manera que en el paso anterior se descartó el precipitado y se añadió nuevamente 500 µl del reactivo *Membrane Wash Solution* y se centrifugó por 5 minutos a 14.000 *rpm* para el lavado #2. Después de este paso se descartó el precipitado y se centrifugó nuevamente por 1 minuto a 14.000 *rpm* sin adicionar ningún reactivo en la *SV Minicolumn* para eliminar el resto de etanol del reactivo *Membrane Wash Solution*. Por último, para la Elución del ADN se colocó 50 µl de *Nuclease-Free Water* del Kit en la *SV Minicolumn*, procurando no toca la membrana y se incubó por 1 minuto a temperatura ambiente. Se descartó el *Collection Tube* y se colocó la *SV Minicolumn* en un microtubo de 1.5 ml estéril y se centrifugó por 1 minuto a 14.000 *rpm*. El precipitado del microtubo de 1.5 ml se almacenó a -20°C y se rotuló en la tapa de cada microtubo de manera clara de acuerdo con el código asignado en la matriz Excel provista por Macrogen. Al mismo tiempo se realizó una alícuota de los primers de cada gen utilizados en la PCR, los cuales de igual manera fueron rotulados de acuerdo con la matriz Excel que se envía a la empresa Macrogen.

Las muestras fueron enviadas a secuenciar a la empresa Macrogen (Corea del Sur), para lo cual se preparó un archivo Excel con las especificaciones de la empresa, donde constan: 1) el código de cada muestra, el cual debe coincidir con la rotulación de los microtubos de 1.5 ml; 2) el nombre de los primers Forward y Reverse; 3) La secuencia de los primers Forward y Reverse y 4) la concentración de la alícuota de los primers (10 pmol).

4.10. Interpretación de las secuencias

Una vez recibidos los resultados de secuenciación de Macrogen, se procedió al análisis de los Electroferogramas mediante el uso del programa Geneious 9.0 y Mega 7 de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Para el uso del programa Geneious primero se importaron todas las secuencias en formato FASTA en una carpeta específica para el análisis, Una vez ingresadas las secuencias en el programa, se procedió señalar todas las secuencias Reverse de cada gen, para realizar el Reveso Complementario (R.C.). Una vez que se tiene el reverso complementario de las secuencias Reverse, se seleccionan las secuencias Forward y Reverse de cada gen y se procede al realizar un Alineamiento ClustalW, tipiendo las teclas Ctrl+Shift+A, utilizando los parámetros predefinidos por el programa

Luego de este paso obtenemos las secuencias consenso de cada gen (Consensus), las cuales deben ser “limpiadas” en los extremos 5’ y 3’ por poseer mucho ruido de fondo. Para hacer esto, se identifica la región desde donde la secuencia consenso presenta un color azul oscuro y se selecciona tanto la secuencia consenso, la secuencia Forward y la secuencia Reverse para borrar los extremos aplastando la tecla Delete.

Este procedimiento también se realiza tanto en el extremo 5’ como en el extremo 3’ de las secuencias Forward y Reverse respectivamente, para evitar la “no alineación” entre las secuencias.

Una vez que las secuencias estén “limpias”, se observa que no haya “gaps”, es decir espacios en blanco en la secuencia consenso, en cuyo caso se procede a eliminar el “gap” para que no se produzcan errores en el alineamiento. Luego de este procedimiento, se codifica el nuevo alineamiento realizado de acuerdo con el nombre de las secuencias Forward y Reverse para luego extraer la secuencia consenso del gen.

Todos estos pasos se realizaron individualmente por cada gen de cada muestra, hasta obtener las secuencias consenso de los genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE* de las 25 cepas de *E. coli* analizadas. Las secuencias consenso obtenidas, fueron colocadas en carpetas diferentes para cada gen, además en cada carpeta se importó el genoma completo de cada gen de la cepa de referencia *E. coli* K12, número de acceso en GenBank: AP012306.1

Una vez ordenados todos los genes por carpetas, se realizó un alineamiento ClustalW entre las secuencias consenso obtenidas y la secuencia de referencia para cada gen.

Tras el alineamiento se observaron los cambios de aminoácidos en las cepas analizadas, con respecto a la cepa de referencia EcoK12 para cada gen. Para realizar esto, se identificó la o las posiciones las RDRQ de los aminoácidos en los genes de referencia de la cepa EcoK12 (*gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*), donde se presentan las mutaciones de acuerdo con la literatura. Una vez identificada la posición de las RDRQ en cada gen de la cepa EcoK12, se comparó con las secuencias de las cepas del estudio y se identificó si hay o no presencia de cambios de los aminoácidos.

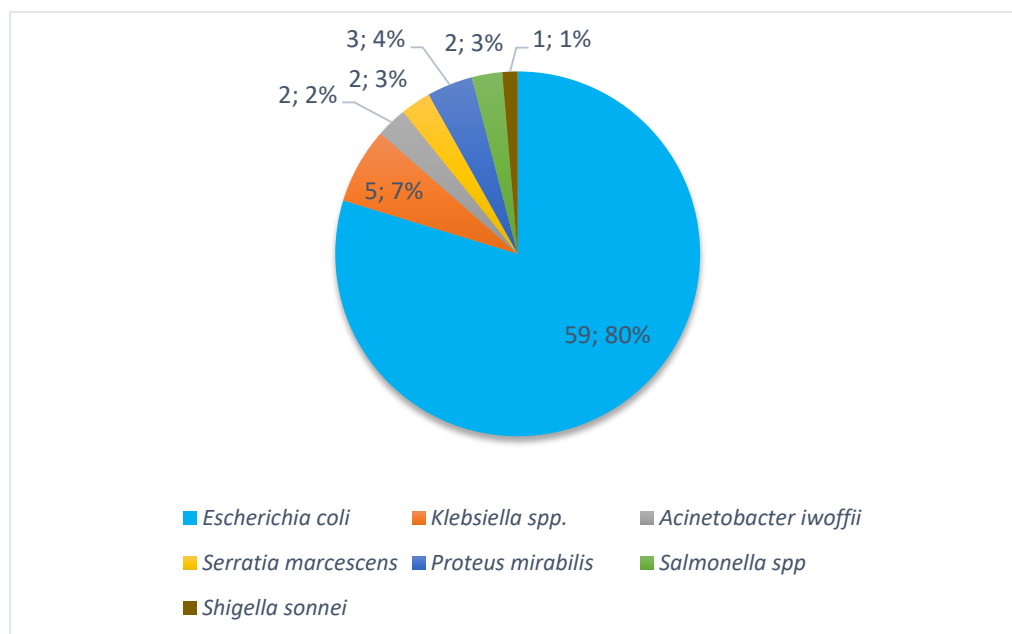
RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. ITU en la población estudiada

De las 319 muestras de orina, 74 (23.2%) tuvieron un recuento significativo ($>10^5$ UFC/ml) en el urocultivo. El microorganismo identificado mayoritariamente fue *E. coli* (59 aislados; 80%), seguido por *Klebsiella* spp. (5 cepas; 7%), *Proteus mirabilis* (3 cepas; 4%), *Acinetobacter* spp. (2 cepas; 3%), *Serratia marcescens* (2 cepas; 3%), *Salmonella* spp. (2 cepas; 3%) y *Shigella sonnei* (1 cepas; 1%) (Figura 18).

Figura 18. Microorganismos identificados en este estudio (n=74).

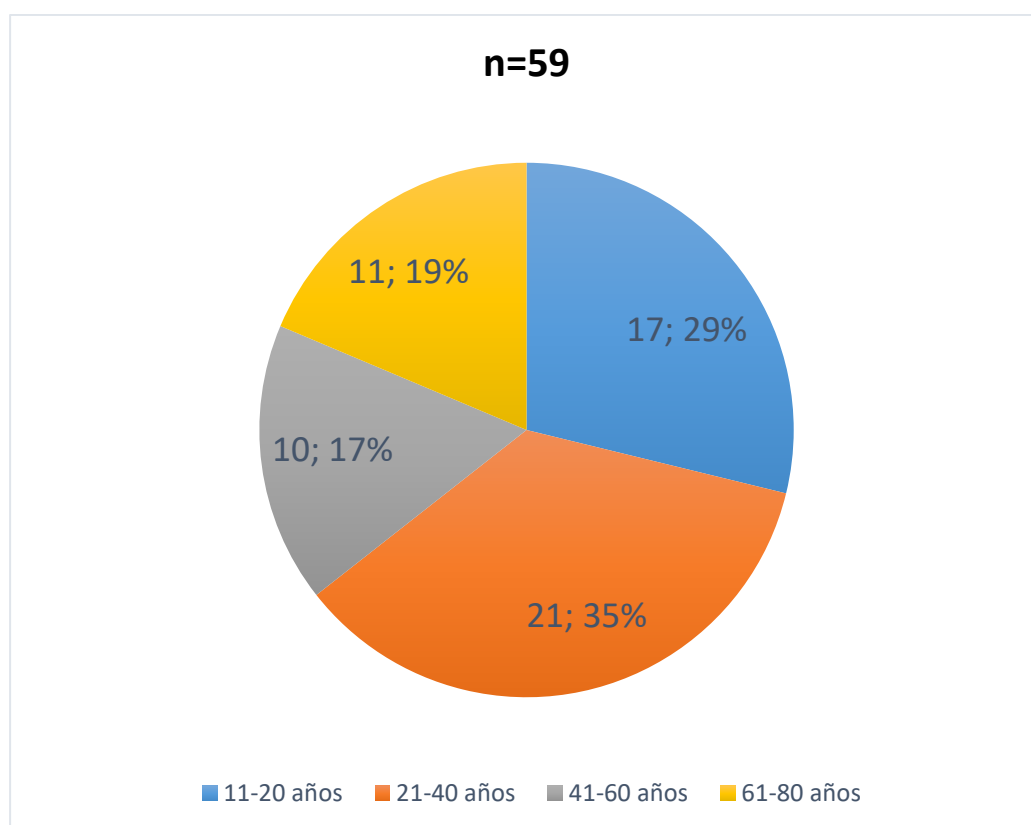


Fuente: Resultados de laboratorio

Elaboración: Autor

Un total de 59 cepas aisladas de urocultivos positivos e identificados como *E. coli*, fueron sometidas a ensayos de sensibilidad. La mayoría de las cepas fueron aisladas de muestras procedentes de pacientes femeninas (n=56, 96%), y el mayor número de casos estuvo en pacientes con rango de edad entre 21 a 40 años (n=21, 35%), seguido de los rangos de 11 a 20 años, 61 a 80 años y 41 a 60 años (n=17, 29%; n=11, 19%; n=10, 17% respectivamente) (Figura 19).

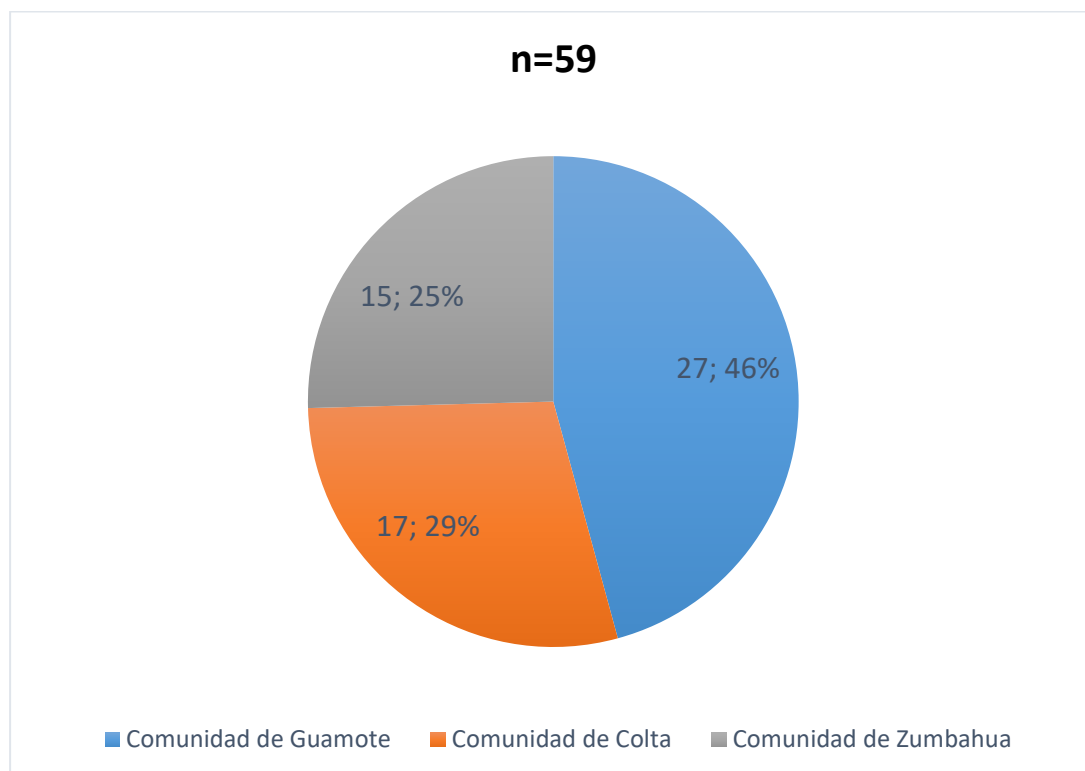
Figura 19. Rango de edad en años, ITU por *E. coli* en la población estudiada



Fuente: Historias clínicas
Elaboración: Autor

El mayor número de muestras de orina con recuentos significativos se detectó en la comunidad de Guamote (n=27, 46%), seguido de la Comunidad de Colta (n=17, 29 %) y por último la comunidad de Zumbahua (n=15, 25%) (Figura 20).

Figura 20. Frecuencia de ITU por *E. coli* en las comunidades estudiadas



Fuente: Historias clínicas
Elaboración: Autor

De todas las comunidades estudiadas, el mayor número de muestras positivas se detectó en mujeres en edad fértil (rango de edad: 11-50 años, n=46), mientras que los casos de ITU en pacientes mujeres

mayores a 50 años fue bajo (n=10). Se destaca un alto número de casos de ITU en mujeres del rango de edad de 11 a 20 años. También se detectaron 3 casos de ITU en hombres, de los cuales 2 casos están en la comunidad de Colta y uno en la comunidad de Guamote (Tabla 18).

Tabla 18. Distribución de ITU por Comunidad, sexo y rangos de edad en años

Comunidad	N°	Sexo (n°/%)	n° de pacientes por rango de edad en años						
			11-20 años	21-30 años	31-40 años	41-50 años	51-60 años	61-70 años	71-80 años
Colta	17	M (2/3)	-	-	-	-	-	1	1
		F (15/25)	3	4	-	1	-	4	2
Guamote	27	M (1/2)	-	1	-	-	-	-	-
		F (27/45)	10	4	7	4	1	-	1
Zumbahua	15	M (-/-)	-	-	-	-	-	-	-
		F (15/25)	4	3	2	4	-	1	1
Total	59	M (3/5)	-	1	-	-	-	1	1
		F (56/95)	17	11	9	9	1	5	4

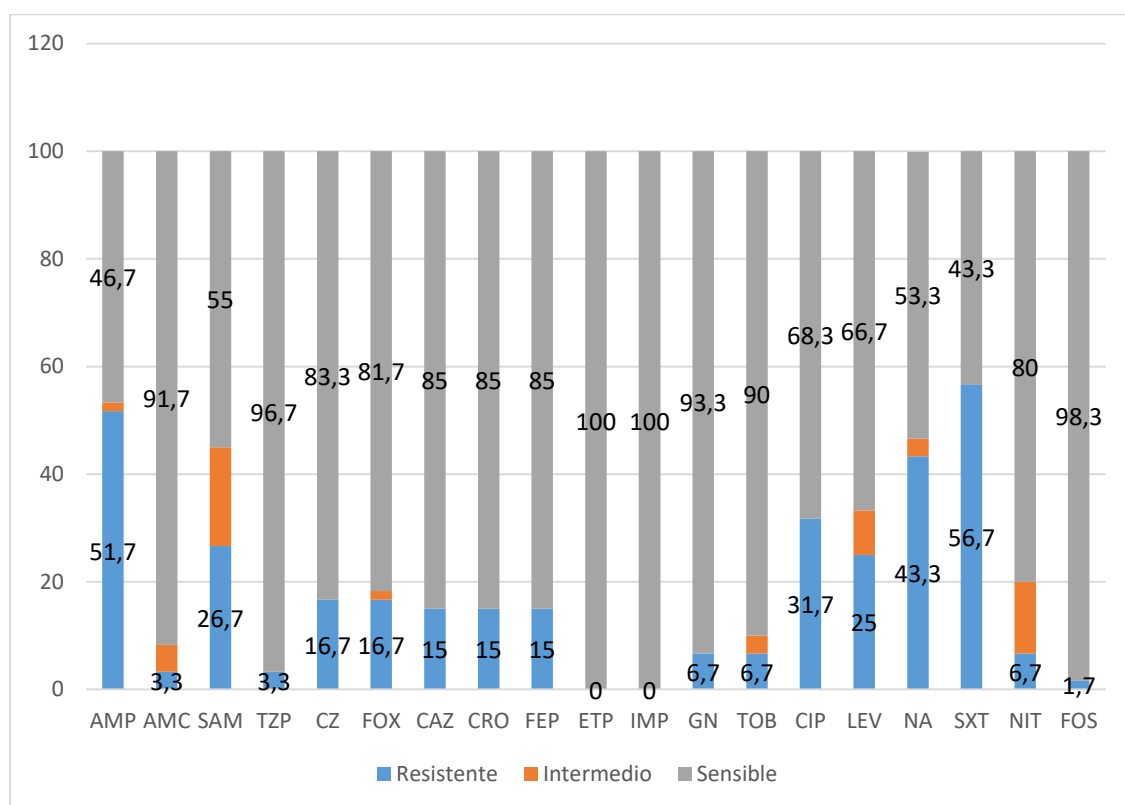
M: masculino; F: femenino
Fuente: Historias clínicas
Elaboración: Autor

5.2. Perfiles de sensibilidad antibiótica

En cuanto a la sensibilidad antibiótica de las 59 cepas de *E. coli*, se detectó resistencia del 51.7% a Ampicilina, 3.3% a Amoxicilina/Ácido clavulánico, 26.7% a Ampicilina/Sulbactam, 3.3% a Piperacilina/Tazobactam, 16.7% a Cefazolina y Cefoxitina, 15% de

resistencia a Ceftazidima, Ceftriaxona y Cefepime, 6.7% a Gentamicina y Tobramicina, 31.7% a Ciprofloxacina, 25% a Levofloxacina, 56.7% a Trimetoprim/Sulfametoxazol, 6.7% a Nitrofurantoina, 1.7% a Fosfomicina, mientras que no se detectó resistencia a los carbapenémicos (imipenem y ertapenem) (Figura 21).

Figura 21. Perfiles de sensibilidad antibiótica



AMP: Ampicilina; AMC: Amoxicilina/Ácido clavulánico; SAM: Ampicilina/Sulbactam; TZP: Piperacilina/Tazobactam; CZ: Cefazolina; FOX: Cefoxitina; CAZ: Ceftazidima; CRO: Ceftriaxona; FEP: Cefepime; ETP: Ertapenem; IMP: Imipenem; GN: Gentamicina; TOB: Tobramicina; CIP: Ciprofloxacina; NA: Ácido Nalidíxico; LEV: Levofloxacina; SXT: Trimetoprim/Sulfametoxazol; NIT: Nitrofurantoina; FOS: Fosfomicina.

Fuente: Resultados de laboratorio
Elaboración: Autor

En general, los perfiles de sensibilidad antimicrobiana mostraron 16 cepas (27.1%) que no tuvieron resistencia a ninguno de los antibióticos usados en este estudio, mientras que el resto de las cepas presentaron varios perfiles fenotípicos de resistencia antimicrobiana. 23 cepas (38.9%) presentaron resistencia a las aminopenicilinas (AMP) y combinaciones con inhibidores de betalactamasas (SAM, TZP). También se detectaron 6 cepas (10.1%) productoras de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE), las cuales presentaron resistencia a todas las cefalosporinas, pero mantuvieron susceptibilidad a los carbapenémicos. Por último, se detectaron 3 cepas (5.0%) que presentaron un perfil fenotípico compatible con hiperproducción de AmpC, ya que mostraron resistencia a cefoxitina, aunque solo dos de ellas (Eco004, Eco036) presentaron resistencia a cefalosporinas de tercera generación (Tabla 19 y Anexo 1).

Tabla 19. Características de los fenotipos de resistencia encontrados en las 59 cepas de *E. coli* analizadas

Características	ID cepas	N.º (%)
Cepas sin resistencia a los antimicrobianos probados en este estudio	Eco001, Eco002, Eco003, Eco013, Eco024, Eco025, Eco026, Eco028, Eco032, Eco037, Eco041, Eco042, Eco049, Eco055, Eco058, Eco060.	16 (27.1%)
Cepas con fenotipo de producción de penicilinasas	Eco006, Eco009, Eco010, Eco011, Eco012, Eco014, Eco015, Eco016, Eco017, Eco018, Eco021, Eco022, Eco023, Eco031, Eco034, Eco035, Eco039, Eco043, Eco045, Eco046, Eco051, Eco053, Eco056.	23 (38.9%)
Cepas con fenotipo de BLEE	Eco027, Eco030, Eco040, Eco050, Eco057, Eco059.	6 (10.1%)
Cepas con fenotipo de hiperproducción de <i>AmpC</i>	Eco004, Eco036, Eco048.	3 (5.0%)
Cepas con fenotipo de resistencia a quinolonas y fluoroquinolonas	Eco005, Eco007, Eco008, Eco009, Eco011, Eco014, Eco016, Eco017, Eco019, Eco020, Eco022, Eco027, Eco029, Eco030, Eco033, Eco038, Eco039, Eco040, Eco045, Eco050, Eco051, Eco052, Eco053, Eco057, Eco059.	25 (42.4%)
Cepas con posible fenotipo MDR	Eco004, Eco009, Eco011, Eco014, Eco016, Eco022, Eco027, Eco030, Eco033, Eco036, Eco039, Eco045, Eco050, Eco051, Eco057, Eco059.	16 (27.1%)
Cepas con posible fenotipo XDR	Eco040.	1 (1.7%)

MDR: Moderadamente resistente (Resistencia en al menos 3 familias de antimicrobianos); XDR: Extremadamente resistente (Resistencia en 5 o más familias de antimicrobianos)

Fuente: Resultados de Laboratorio
Elaboración: Autor

En base a los perfiles de resistencia se clasificaron a 16 cepas (27.1%), como MDR (moderadamente resistente) y un aislado (1.7%) como posible XDR (Tabla 19 y Anexo 1).

En cuanto a la resistencia a quinolonas y fluoroquinolonas, se detectaron 25 cepas de *E. coli* que presentaron diferentes rangos de sensibilidad a estos antimicrobianos, las cuales fueron seleccionadas para la amplificación de las RDRQ de los genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE* (Tabla 20).

5.3. Amplificación de los genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE*

Todas las cepas amplificaron los genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE* de acuerdo con el protocolo de preparación del máster mix empleado. No se observó amplificación inespecífica de cada gen por lo que el protocolo de termociclado empleado para cada gen funcionó correctamente. En las (figuras 22, 23, 24 y 25) se observan las bandas obtenidas de los genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE* respectivamente.

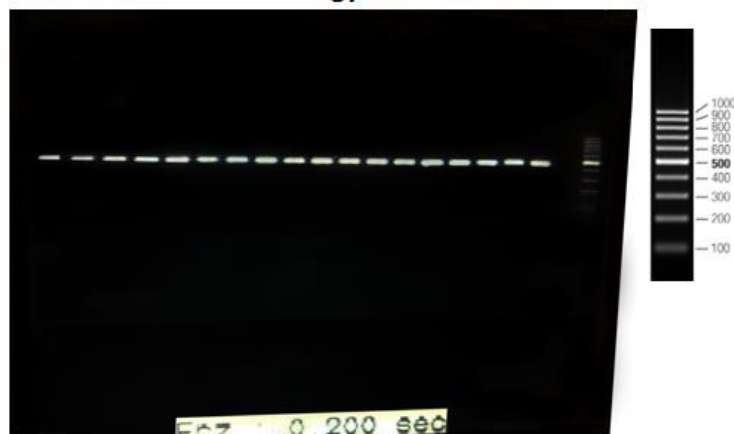
Figura 22. Corrida electroforética del gen *gyrA*



Agarosa 2% (Promega), voltaje: 100V, tiempo: 60 min

Fuente: Resultados de laboratorio
Elaboración: Autor

Figura 23. Corrida electroforética del gen *gyrB*



Agarosa 2% (Promega), voltaje: 100V, tiempo: 60 min

Fuente: Resultados de laboratorio
Elaboración: Autor

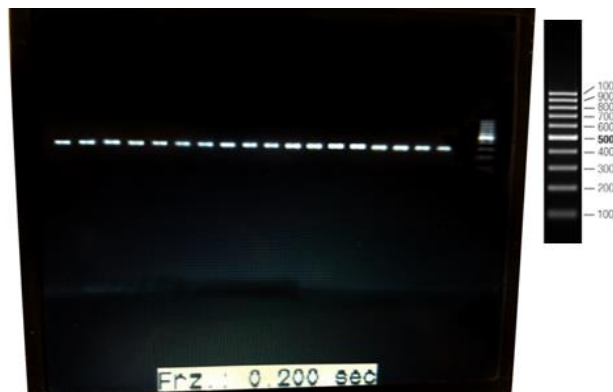
Figura 24. Corrida electroforética del gen *parC*



Agarosa 2% (Promega), voltaje: 100V, tiempo: 60 min

Fuente: Resultados de laboratorio
Elaboración: Autor

Figura 25. Corrida electroforética del gen *parE*



Agarosa 2% (Promega), voltaje: 100V, tiempo: 60 min

Fuente: Resultados de laboratorio
Elaboración: Autor

5.4. Mutaciones en RDRQ

Mediante secuenciación de las RDRQ, 4 cepas (Eco005, Eco009, Eco016, Eco052) no presentaron mutaciones en estas regiones, mientras que 4 cepas (Eco007, Eco011, Eco033, Eco038) solo presentaron una sola sustitución de serina por leucina en posición 83 (S83L) en el gen *gyrA*. Se detectaron cepas que presentaron varias combinaciones de sustituciones en las RDRQ, de las cuales: 4 cepas (Eco008, Eco030, Eco040, Eco050) presentaron dos sustituciones en *gyrA* (S83L más una sustitución de ácido aspártico por asparagina en posición 87 (D87N)) y dos sustituciones en *parC* (una sustitución de serina por isoleucina en posición 80 (S80I) más una sustitución de ácido glutámico por valina en posición 84 (E84V)). 8 cepas (Eco014, Eco020, Eco022, Eco029, Eco039, Eco045, Eco051, Eco053) presentaron dos sustituciones en *gyrA* (S83L y D87N) junto con una sustitución en *parC* (S80I). 4 cepas (Eco017, Eco027, Eco057, Eco059) presentaron dos sustituciones en *gyrA* (S83L y D87N), una sustitución en *parC* (S80I) más una sustitución de serina por alanina en posición 458 (S458A) en *parE*. Por último, una cepa (Eco019) presentó dos sustituciones en *gyrA* (S83L y D87N) y dos sustituciones en *parC* (S80I más una sustitución de ácido glutámico por glicina en posición 84 (E84G)). No se detectaron sustituciones aminoacídicas en la región del gen *gyrB*. Además, se pudo detectar que entre más sustituciones se presenten en las

RDRQ, las cepas también presentan mayor resistencia a las fluoroquinolonas (Tabla 20).

Tabla 20. Mutaciones en *gyrA*, *parC*, *parE* y sensibilidad antibiótica en las 25 cepas de *E. coli*

Cepa	RDRQ ¹			Susceptibilidad a Quinolonas y Fluoroquinolonas*						
	<i>gyrA</i>	<i>parC</i>	<i>parE</i>	Kirby Bauer (mm)				MIC ² (ug/ml)		BLEE ³
				NA	LVX	CIP	NOR	CIP	LEV	
				R: ≤13 I: 14-18	R: ≤13 I: 14-16	R: ≤15 I: 16-20	R: ≤12 I: 13-16	R: ≥4 I: 2	R: ≥8 I: 4	
Eco005	-	-	-	6	18	13	13	0,5	4	-
Eco007	S83L	-	-	6	25	29	28	0,5	0,5	-
Eco008	S83L D87N	S80I E84V	-	6	12	7	6	>=4	>=8	-
Eco009	-	-	-	12	18	19	20	1	1	-
Eco011	S83L	-	-	6	29	28	28	<=0,25	0,5	-
Eco014	S83L D87N	S80I	-	6	19	17	17	>=4	4	-
Eco016	-	-	-	6	13	12	6	>=4	>=8	-
Eco017	S83L D87N	S80I	S458A	6	9	6	6	>=4	>=8	-
Eco019	S83L D87N	S80I E84G	-	6	10	6	6	>=4	>=8	-
Eco020	S83L D87N	S80I	-	6	15	11	9	>=4	4	-
Eco022	S83L D87N	S80I	-	6	15	13	15	>=4	4	-
Eco027	S83L D87N	S80I	S458A	6	14	6	6	>=4	4	+
Eco029	S83L D87N	S80I	-	6	11	7	6	>=4	>=8	-
Eco030	S83L D87N	S80I E84V	-	6	9	6	6	>=4	>=8	+
Eco033	S83L	-	-	11	28	28	27	<=0,25	0,5	-
Eco038	S83L	-	-	6	26	28	28	<=0,25	1	-
Eco039	S83L D87N	S80I	-	6	11	11	11	>=4	>=8	-
Eco040	S83L D87N	S80I E84V	-	6	8	6	6	>=4	>=8	+
Eco045	S83L D87N	S80I	-	6	12	9	6	>=4	>=8	-
Eco050	S83L D87N	S80I E84V	-	6	6	6	6	>=4	>=8	+
Eco051	S83L D87N	S80I	-	6	11	7	6	>=4	>=8	-
Eco052	-	-	-	13	23	22	22	<=0,25	1	-
Eco053	S83L D87N	S80I	-	6	10	7	6	>=4	>=8	-
Eco057	S83L D87N	S80I	S458A	6	6	6	6	>=4	>=8	+
Eco059	S83L D87N	S80I	S458A	6	6	6	6	>=4	>=8	+

¹Regiones Determinantes de Resistencia a Quinolonas; -: negativo; ²: Concentración Inhibitoria Mínima; ³: Beta-Lactamasas de Espectro Extendido; *: Puntos de corte tomados de CLSI 2017; NA: Ácido Nalidíxico; LVX: Levofloxacina; CIP: Ciprofloxacina; NOR: Norfloxacino.

Fuente: Resultados de Laboratorio
Elaboración: Autor

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

Durante los 4 meses del periodo de investigación, se detectó una prevalencia del 23.2% de ITU en las comunidades estudiadas, la cual se asoció con varias especies bacterianas. En específico, y con respecto a las cepas de *E. coli* identificadas en este estudio (n=59), la prevalencia de ITU por este patógeno se identificó mayoritariamente en la comunidad de Guamote (46%), esto debido posiblemente a su mayor densidad poblacional (52.392 hab., INEC 2015). A pesar de que la Comunidad de Colta también posee una alta densidad poblacional (46.392 hab., 2015), su prevalencia de ITU por *E. coli* fue más baja (29%), siendo similar a la prevalencia de ITU por *E. coli* de la comunidad de Zumbahua (25%), donde la densidad poblacional es considerablemente más baja (12.643 hab. INEC 2015). En general se pudo determinar una baja prevalencia de ITU por *E. coli* en las poblaciones estudiadas, la cual se podría investigar más a fondo para determinar las causas de esta característica en estas poblaciones rurales, ya que, a nivel urbano, la prevalencia de ITU por *E. coli* llega hasta el 29 % (Blanco et al., 2016). De igual manera y como se describe en otras revisiones *E. coli* se presentó como el principal agente etiológico de ITU (83%) seguido por *Klebsiella spp* y *P. mirabilis* (Bartoloni et al., 2012). Es importante destacar que en el presente estudio se aislaron otros microorganismos capaces de producir ITU (*Acinetobacter lwoffii*, *Serratia marcescens* y *Salmonella spp*), los cuales son de importancia clínica como

se menciona en diversas investigaciones (Silva-Sánchez et al., 2013). En este estudio, la mayoría de los casos de ITU correspondieron al sexo femenino (95%), debido principalmente a condiciones fisiológicas como el embarazo, edad de inicio de la vida sexual, actividad sexual, cambio de pH de la orina, atrofia urogenital en la menopausia y condiciones anatómicas de la mujer, que conducen a la colonización de la uretra por enterobacterias, desencadenando una ITU, como se ha reportado anteriormente (Martínez et al., 2013)

Se observaron tres casos (5.08%) de ITU en varones, de los cuales, dos sujetos (3.38%) presentaban edades entre 60 a 80 años. Esta característica de ITU en pacientes masculinos de edad avanzada, es común cuando presentan factores de riesgo como: inflamación de próstata o comorbilidades con otras enfermedades como diabetes o cáncer, las cuales producen inmunodepresión (Martínez et al., 2013). Además, se encontró un paciente masculino entre 21 y 30 años que presentó ITU, lo cual amerita un estudio más exhaustivo para determinar la causa de su infección.

En este estudio el panorama de resistencia antimicrobiana no fue la excepción, ya que observamos fenotipos de multiresistencia en varios casos. Esto se convierte en un problema sanitario, al contemplar el hecho de que las resistencias encontradas pertenecen a cepas de *E. coli* aisladas de habitantes de zonas indígenas del Ecuador, lo que conllevaría al uso de

antimicrobianos de mayor espectro, y fomentar el desarrollo de nuevos mecanismos de resistencia en estas zonas, en donde hasta ahora no se ha descrito la presencia de carbapenemasas.

Los resultados de sensibilidad antimicrobiana revelaron 16 cepas con fenotipo MDR, que presentaron resistencia al menos a un antibiótico de 3 o más familias de antimicrobianos y 1 cepa con posible fenotipo de XDR, es decir que presentó resistencia al menos a un antibiótico de la mayoría de las familias de antimicrobianos, manteniendo sensibilidad a 2 clases de antimicrobianos (Tabla 19 y Anexo 1). No se detectó ninguna cepa con fenotipo de resistencia a todas las familias de antimicrobianos (panresistencia). Esta presencia de microorganismos multirresistentes preocupa por el hecho de la situación actual en otras partes del mundo, donde se ve que los niveles de resistencia se encuentran en los fenotipos de XDR mayoritariamente, e incluso se han descrito cepas panresistentes. La presencia de cepas MDR en la población indígena del Ecuador supone un riesgo por la posible selección de otros mutantes con mayor resistencia.

Las cepas de *E. coli* analizadas, mostraron varios fenotipos de resistencia a los diferentes grupos de antimicrobianos betalactámicos. Dentro de los cuales 23 cepas presentaron expresión fenotípica de producción de betalactamasas clásicas (TEM-1, TEM-2, SHV-1) que proporcionan resistencia a aminopenicilinas, carboxipenicilinas y manteniendo sensibilidad a cefalosporinas. Este fenotipo se considera de

incidencia moderada (Navarro et al., 2010), pero en este caso observamos una alta incidencia de estos casos (38.9%) (Tabla 19 y Anexo 1).

Se detectaron 3 cepas con fenotipo de hiperproducción de AmpC, de las cuales, dos cepas (Eco004 y Eco036) mostraron resistencia a ampicilina, asociación con inhibidores de betalactamasas, cefalosporinas de tercera generación y cefamicinas (cefexitina), mientras que la cepa restante (Eco048) solo presentó resistencia a cefazolina y cefexitina, aunque se puede observar un ligero aumento en las CIM de ampicilina y ampicilina/sulbactam (Tabla 19 y Anexo 1). Este mecanismo de resistencia puede asemejarse en ocasiones al perfil de producción de BLEE, y un marcador en estos casos es la resistencia a cefexitina. Este tipo de mecanismos de resistencia es natural de *E. coli* ya que posee esta betalactamasa de forma constitutiva, que generalmente se mantiene en niveles muy bajos de expresión, pero que bajo presión selectiva puede conllevar a la sobreexpresión y proporcionar resistencia a la mayoría de los betalactámicos, manteniendo sensibilidad a los carbapenémicos (Navarro et al., 2010).

Los mayores porcentajes de resistencia antimicrobiana se presentan en: trimetoprim/sulfametoxazol, ampicilina, ciprofloxacino, ampicilina/sulbactam y cefalosporinas de tercera generación con el 56.7%, 51.7%, 31.7%, 26.7% y 15% respectivamente. Las tasas de resistencias menores al 20% en antibióticos como cefalosporinas y la ausencia de

cepas resistentes a carbapenémicos, refleja que la prevalencia de mecanismos de resistencia como BLEE, están emergiendo en estas poblaciones rurales. Con estos resultados se vuelve importante la vigilancia epidemiológica de este mecanismo de resistencia, ya que estas cepas BLEE podrían producir infecciones más graves en pacientes hospitalizados de estas comunidades. Lo que conllevaría al empleo de antimicrobianos de mayor espectro (carbapenémicos), fomentando la aparición de mecanismos de resistencia más graves como las carbapenemasas (hoy en día como un grave problema de salud pública a nivel urbano) (Bartoloni et al., 2016).

La producción de BLEE en cepas aisladas de muestras clínicas es de mucha importancia epidemiológica, ya que su propagación se puede facilitar por transferencia horizontal en ambiente hospitalario y comunitario, por lo que la detección de este mecanismo de resistencia supone un problema de salud pública a tener muy en cuenta en estas zonas rurales del Ecuador. Su detección debe suponer una alerta en el sistema de salud para prevenir su expansión, además de realizar una caracterización más exhaustiva de este mecanismo de resistencia como se han realizado en otros estudios. (Bartoloni et al., 2016; Cruz et al., 2013; Silva et al., 2013; Blanco et al., 2016)

En este estudio 6 cepas de *E. coli* presentaron un fenotipo de BLEE, lo que se vió reflejado con perfiles de resistencia a la mayoría de

betalactámicos, pero manteniendo sensibilidad a carbapenémicos. Las cepas con este mecanismo de resistencia presentaron niveles de MIC para ceftriaxona desde 8ug/ml hasta ≥ 64 ug/ml (Anexo 1).

En estas cepas BLEE, se observó dos casos (Eco040, Eco050) sensibles a ceftazidima (MIC de ≤ 1 ug/ml) (Anexo 1), con una MIC de 8ug/ml para ceftriaxona. Aunque se requeriría una confirmación mediante estudios moleculares, esta mayor sensibilidad a ceftazidima con respecto a ceftriaxona es frecuente en cepas portadoras de enzimas del grupo CTX-M (Naas et al., 2007).

Estos problemas de resistencia a betalactámicos por la producción de enzimas hidrolíticas (BLEE, carbapenemasas) se han descrito en todo el mundo (OMS, 2014). Aunque estudios de la prevalencia de estos mecanismos de resistencia en Ecuador son escasos, reportes de estudios realizados en la región muestran que el panorama de resistencia antimicrobiana es semejante al encontrado en este estudio. Un ejemplo es la descripción de la prevalencia del 11% de BLEE una zona rural (Chaco-Bolivia) (Bartoloni et al., 2016), que se compara con la prevalencia del 10% (n=6) cepas de *E. coli* productoras de BLEE detectadas entre las 59 cepas de este estudio (Tabla 19 y Anexo 1). Lo cual nos puede indicar exposición previa a tratamiento con betalactámicos en estas poblaciones, lo que lleva al incremento de las tasas de resistencia en estos antimicrobianos.

En general, las tasas de resistencia antibiótica encontrada en varios antimicrobianos (trimetoprim/sulfametoxazol, ampicilina, ciprofloxacino, ampicilina/sulbactam, cefalosporinas de tercera generación) descritas anteriormente, se pueden atribuir a un tratamiento antibiótico previo por estos antimicrobianos, lo que refleja la facilidad con la que las cepas de *E. coli* son capaces de adaptarse y crear resistencia.

A pesar de la resistencia antimicrobiana detectada en este estudio, aún se observa una sensibilidad del 83.3% en cefazolina (Figura 21), lo que posibilita el uso de cefalosporinas de administración oral en el caso de ser necesario (cefalexina o cefuroxima). En nuestro estudio, también se encontraron bajas tasas de resistencia a nitrofurantoina y fosfomicina (6.7% y 1.7% respectivamente), posibilitando el uso de estos antimicrobianos para el tratamiento empírico de ITU en estas poblaciones estudiadas. En casos graves de ITU en los que se requiera hospitalización, se sugiere terapia parenteral con gentamicina, por la alta sensibilidad (93.3%) encontrada en este estudio (Figura 21).

Por otra parte, desde que las quinolonas salieron al mercado, el uso de estos antimicrobianos se generalizó desde el principio, debido a las diversas características que poseen, y se convirtieron rápidamente en una de las primeras opciones al momento de tratar infecciones. Aunque el uso indiscriminado durante todos estos años, se ve reflejado en estudios que muestran el incremento de la resistencia en estos antimicrobianos

(Braykov et al., 2016) e informes de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2014).

En algunos estudios realizados en Sudamérica, los mecanismos de resistencia a quinolonas mediados por plásmidos (RQMP) se han identificado en cepas de *E. coli*, como es el caso de un estudio realizado en Argentina, donde la investigación se basó en estudiar cepas de *E. coli* con fenotipo BLEE (55 *Enterobacteriae*; 16 *E. coli*). En ese estudio, se evidenció un alto porcentaje de presencia de los genes *aac(6')-Ib-cr* y *qnr* (42% y 33% respectivamente) en las cepas *Enterobacteriae*, lo que se vió reflejado en una alta tasa de resistencia a quinolonas (93%) (Cruz et al., 2013).

La resistencia a quinolonas encontrada en nuestro estudio fue del 31.7% para ciprofloxacino y 43.3% para ácido nalidíxico, lo que se puede comparar con otros estudios realizados en la región, donde se observa un 39% de resistencia a ciprofloxacino y 49% a ácido nalidíxico en Chaco en 2015 (Bolivia) (Bartolini et al., 2016), en donde no se explica el desarrollo de los altos niveles de resistencia a fluoroquinolonas encontrada, aunque al igual que en este estudio, la implementación de centros médicos y consumo de antibióticos, sería la principal causa del desarrollo de resistencia.

En otra investigación realizada por Pallechi y colaboradores en una comunidad remota del Amazonas de Perú, se encontraron tasas del 14%

de resistencia a ciprofloxacino y 44 % a ácido nalidíxico. En nuestro estudio, la resistencia a ciprofloxacino fue del 31.7% y para el ácido nalidíxico fue del 43.3% (Figura 21). Esta diferencia en las tasas de resistencia al ácido nalidíxico, puede estar explicado por el consumo de cloroquina, un compuesto usado para el tratamiento de malaria en esa zona amazónica del Perú, y que se ha demostrado puede producir mutaciones y conferir resistencia a quinolonas (Pallechi et al., 2012). Además, en esta investigación se atribuyó a la baja salubridad de la población, como el principal vehículo para la transferencia de cepas resistentes, ya que el río que alimenta a esa población, es también una afluente de una zona urbana cercana al Chaco, donde el consumo de antibióticos es generalizado, lo que pudo ocasionar la liberación de mutantes al río que luego pudieron haber llegado a la zona rural del Chaco. Este vehículo de transporte de cepas resistentes no se observa en las poblaciones analizadas en nuestro estudio, pero desde hace varios años atrás, la implementación de centros médicos y hospitales básicos, pudieron haber desarrollado el aumento de la presencia de farmacias y el aumento de prescripción de antimicrobianos, presumiendo que la implementación de los sistemas de salud en las diferentes zonas rurales del Ecuador, la falta de estudios epidemiológicos, la falta de protocolos estandarizados para el tratamiento de infecciones y el incremento del comercio de antimicrobianos, podrían ser las principales causas del desarrollo de la resistencia antimicrobiana detectada.

En 2012 otro estudio realizado en Bolivia por Bartoloni y colaboradores, encontraron resistencia a ciprofloxacino del 44% en tres zonas rurales. Una característica importante fueron los datos obtenidos de consumo de antibióticos de los pacientes que participaron en el estudio, ya que se pudo observar la prescripción por médicos de la zona y también en ciertos casos el autoconsumo. Estos datos se correlacionaron con la presencia de resistencia antimicrobiana en las zonas rurales que presentaban mayor consumo de ampicilina y en donde también se encontró una mayor presencia de resistencia a cefalosporinas de tercera generación (Bartoloni et al., 2012). La alta resistencia a quinolonas no se pudo explicar, pero se podría intuir que el consumo previo de quinolonas es también una causa del desarrollo de resistencia, ya que a pesar de los bajos recursos económicos de las zonas estudiadas, se detectó la presencia de cepas productoras de CTX-M con resistencia a quinolonas y presencia de genes plasmídicos de resistencia a quinolonas. Al igual que en este estudio, en el nuestro se encontraron altos niveles de resistencia a ampicilina, trimetoprim/sulfametoxazol y quinolonas. Las zonas rurales analizadas en nuestro estudio también se presentan como zonas rurales de escasos recursos económicos, pero que cuentan con centros de salud y médicos que prescriben antibioticoterapia, por lo que al igual que el estudio mencionado anteriormente, el desarrollo de resistencia en las zonas rurales puede deberse a la implementación de protocolos de

antibioticoterapia para tratar infecciones y la facilidad para el expendio de antibióticos en las farmacias, sin la prescripción correspondiente.

La importancia de un correcto uso y prescripción de antimicrobianos se ha convertido en un reto para los organismos internacionales de salud (OMS/OPS) que en 2017 presentaron el informe GLASS Report donde se determinan las pautas necesarias a seguir para evitar el uso indiscriminado de antibióticos y las recomendaciones al momento de prescribir un tratamiento efectivo.

En nuestro estudio, las cepas con resistencia a quinolonas, fue explicada por la presencia de mutaciones en los genes de las RDRQ de las topoisomerasas, ya que estas cepas presentaron diferentes combinaciones de sustituciones aminoacídicas en estos genes, que se correlacionaron con mayor resistencia antimicrobiana.

En este contexto, la presencia de una sola mutación en *gyrA* (S83L) se observó en 4 cepas (Eco007, Eco011, Eco033, Eco038), las cuales presentan un fenotipo de resistencia al ácido nalidíxico y sensibilidad a las fluoroquinolonas. Este fenotipo de resistencia a ácido nalidíxico y sensibilidad a ciprofloxacino y levofloxacino en presencia de una sola mutación en *gyrA*, se ha descrito anteriormente (Navarro et al., 2010). Además, en estas cepas también observamos la ausencia de BLEE, por lo que podemos demostrar que cepas con pocas mutaciones no presentan corresistencias.

Varias cepas (Eco008, Eco030, Eco040, Eco050) presentaron doble mutación en *gyrA* (S83L, D87N) y en *parC* (S80I, E84V), que producen un incremento de las MICs en las fluoroquinolonas, con valores superiores a 4ug/ml para ciprofloxacino y mayores a 8ug/ml para levofloxacino, características que han sido descritas anteriormente (Sato et al., 2013) (Navarro et al., 2010). Tres de estas cepas (Eco030, Eco040, Eco050) además producen BLEE, por lo que podemos sugerir que las corresponsencias aparecen cuando hay un mayor número de mutaciones, posiblemente por la mayor presión selectiva que estas cepas tuvieron.

La mayoría de las cepas con resistencia a fluoroquinolonas de este estudio (Eco014, Eco020, Eco022, Eco029, Eco039, Eco045, Eco051, Eco053), presentaron el perfil genotípico de doble mutación en *gyrA* (S83L, D87N) y una mutación en *parC* (S80I), cuyos perfiles fenotípicos de resistencia a quinolonas se presenta al igual que en el caso anterior con resistencia a ácido nalidíxico, ciprofloxacino (mayor a 4ug/ml) y levofloxacino (mayor a 8ug/ml). Aunque también encontramos cepas que no presentaron una CIM muy elevada para levofloxacino (4ug/ml), lo que indica nuevamente la correlación entre una mayor cantidad de mutaciones y el incremento de la CIM de las fluoroquinolonas. Además, en todos estos casos, no hubo ninguna cepa productora de BLEE, por lo que podemos indicar que la presencia de mutación doble en *gyrA* y una mutación simple en *parC*, no está correlacionado con la producción de BLEE, posiblemente

porque las cepas no han sido expuestas a altas cantidades de antibióticos betalactámicos.

También podemos encontrar otras cepas (Eco017, Eco027, Eco057, Eco059), con doble mutación en *gyrA* (S83L, D87N), una mutación en *parC* (S80I) y una mutación en *parE* (S458A), que al igual que en las cepas con doble mutación en *gyrA* y *parC*, presentaron elevados niveles de CIM para las fluoroquinolonas y en un caso (Eco027) también presentó la producción de BLEE.

Con los resultados obtenidos se demuestra que un mayor número de mutaciones en las RDRQ está ligado a un aumento de la CIM de las quinolonas. Este fenómeno se observa en todas las cepas con más de dos mutaciones en las RDRQ.

En el caso de la cepa Eco005, esta no presentó mutaciones en las RDRQ, pero presentó resistencia al ácido nalidíxico y ciprofloxacina por difusión de disco, además presentó sensibilidad disminuida por CIM a levofloxacino y sensibilidad disminuida por difusión de disco a norfloxacino. Este perfil fenotípico de pseudoresistencia encontrada en este caso, se podría deber a la expresión de otros mecanismos de resistencia como la presencia de bombas de eflujo, impermeabilidad de membrana las que pueden estar ligadas a una resistencia de bajo nivel. En el caso de la cepa Eco009, tampoco presenta mutaciones en los genes de las topoisomerasas, pero su característica fenotípica se presenta con un ligero

aumento en la CIM de ciprofloxacina y levofloxacino, manteniendo sensibilidad, aunque se presenta resistente a ácido nalidíxico y con sensibilidad disminuida a ciprofloxacina por difusión de disco, por lo que al igual que a la cepa anterior (Eco005), este fenómeno se puede atribuir a la producción de bombas de expulsión o disminución en la permeabilidad de la membrana, que pueden ser las principales causas de este fenotipo. En el caso de la cepa Eco052, que tampoco presentó mutaciones en las RDRQ, sólo se detectó resistencia al ácido nalidíxico, que se puede deber a la expresión de uno de los mecanismos anteriormente citados.

Se detectó un caso puntual, la cepa Eco016 que presenta altos niveles de resistencia a quinolonas, pero sin mutaciones en las RDRQ. Los reportes de este fenómeno son infrecuentes. Sin embargo, un estudio publicado en 2011 muestra cepas con altos niveles de resistencia a ciprofloxacino (4ug/ml) y levofloxacino (8ug/ml), que fueron atribuidos a la presencia de Resistencia a Quinolonas Mediados por Plásmidos (RQMP). Esta RQMP fue determinada por la presencia de los genes *qnrS* y *oqxAB*, el primero que codifica para una proteína que recubre y protege la ADN girasa y el segundo que codifica la sobreexpresión de bombas de expulsión activa. Estos mecanismos junto con la disminución de la permeabilidad de membrana, podría explicar los altos valores de CIM de ciprofloxacino y levofloxacino encontrados en nuestra cepa Eco016 (Sato et al., 2013) (Navarro et al., 2010).

Estos resultados ponen de manifiesto que el consumo previo de antimicrobianos está relacionado con el aumento de la resistencia. Aunque las comunidades estudiadas presentan niveles socioeconómicos bajos, esto no ha imposibilitado el desarrollo de resistencia antimicrobiana, tal vez debido a la presencia de centros de salud, personal médico y farmacias, lo que promueve el consumo de antimicrobianos con o sin prescripción médica. Esto también se podría justificar con el hecho de que los niveles de resistencia antimicrobiana en zonas urbanas como la capital del Ecuador, Quito, donde los niveles de resistencia a las fluoroquinolonas son más elevados >40% en cepas de *E. coli* aisladas de ITU comunitarias y mayor al 50% en cepas hospitalarias (INSPI-Q, 2018), posiblemente por el mayor acceso a los antimicrobianos y por existir mayor autoprescripción.

Con estos resultados y los reportes de alerta por organismos internacionales de la resistencia antimicrobiana, se pone de manifiesto que uno de los principales retos es el control del consumo de antibióticos tanto en humanos como en animales.

En referencia a esto último hay que tener en cuenta que Ecuador es prácticamente un país agrícola, donde el uso de antibióticos para la cría de ganado y aves no está regulado y por tanto los organismos competentes de estas áreas deben tomar medidas para evaluar los niveles de resistencia a nivel agrícola, mediante estudios epidemiológicos y de evaluación de uso de antibióticos en animales.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

1. La epidemiología de la infección urinaria en poblaciones nativas amerindias Kichwas en lo que se refiere a sexo, edad, factores de riesgo, etc., no parece mostrar grandes diferencias con la observada en poblaciones urbanas.
2. Las mayores cifras de resistencia antimicrobiana se observan en trimetoprim-sulfametoxazol, ampicilina y fluoroquinolonas.
3. La prevalencia de fenotipos compatibles con la producción de BLEE es de un 10%, en las cepas de *E. coli* causantes de ITU en las comunidades estudiadas.
4. Fosfomicina, nitrofurantoina, amoxicilina/ácido clavulánico y gentamicina presentan un perfil de sensibilidad bastante conservado, que habilitan su uso como terapia empírica con seguridad.
5. La gran mayoría de los aislados resistentes a fluoroquinolonas, presentaron mutaciones en los diferentes genes de las RDRQ de las topoisomerasas.
6. Todas las cepas con resistencia a ciprofloxacino presentaron al menos tres mutaciones en las RDRQ, siendo la doble mutación en *gyrA* (S83L, D87N) más una mutación en *parC* (S80I) la más frecuente en este estudio.

7. La presencia de una sola mutación en *gyrA* (S83L) condiciona resistencia a ácido nalidíxico, pero manteniendo sensibilidad a fluoroquinolonas.
8. La resistencia aislada a ácido nalidíxico, en ausencia de mutaciones en las topoisomerasas, probablemente se asocie a mecanismos de resistencia plasmídicos, la hiperproducción de bombas de eflujo o impermeabilidad de membrana.
9. Solamente un aislado mostró resistencia a ciprofloxacino en ausencia de mutaciones en RDRQ, lo cual se podría vincular probablemente a mecanismos de resistencia de difusión plasmídica.
10. Las mutaciones encontradas en los genes *gyrA*, *parC* y *parE* reflejan que la población se encuentra bajo presión selectiva por el uso de antimicrobianos.
11. La resistencia antibiótica es similar o discretamente inferior a otros estudios realizados en Iberoamérica. No obstante, son niveles de resistencia preocupantes si se tiene en cuenta que se trata de poblaciones indígenas aisladas, con un acceso al consumo de antimicrobianos inferior al habitual.

BIBLIOGRAFÍA

- Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Informes mensuales de la AEMPS. Diciembre 2010. www.aemps.gob.es/informa/boletinMensual/2010/diciembre/informe-medicamentos.thm.
- Ahlam A, Norhan K. Molecular Analysis of Quinolone Resistance-Determining Regions in Avian Pathogenic *Escherichia coli*. IJAR 2013; 1:145-157, <http://www.journalijar.com/article/429/molecular-analysis-of-quinolone-resistance-determining-regions-in-avian-pathogenic-escherichia-coli/>
- Aldred KJ, Kerns RJ, Osheroff N. Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry* 2014;53:1565-1574
- Alós JI. Quinolonas. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009; 27(5): 290–297. Recuperado de: <http://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-quinolonas-S0213005X09002468>
- Álvarez DA, Garza GS, Vázquez R. Quinolonas. Perspectivas actuales y mecanismos de resistencia. *Rev Chilena Infectol* 2015; 32 (5): 499-504
- Arnoldi, E. et al. Functional determinants of gate-ADN selection and cleavage by bacterial type II topoisomerases. *Nucleic Acids Res* 2013.; 41, 9411–9423
- Asociación Española de Urología. Guía de Práctica Clínica. Cistitis no complicada en la mujer; 2006. Recuperado de: <http://www.aeu.es/UserFiles/Guia28.pdf>
- Azanza J, Sádaba B, Mediavilla A. *Farmacología Humana*. Tercera edición. Barcelona: Masson; 1998, 68: 1145-1151
- Baby et al., Adhesins of Uropathogenic *Escherichia coli* (ECUP). *Int J Med Microbiol Trop Dis* 2016; 1-18.
- Bansal Sandhya y Tandon Vibha. Contribution of mutations in ADN gyrase and topoisomerase IV genes to ciprofloxacin resistance in

- Escherichia coli* clinical isolates. EISEVIER, International Journal of Antimicrobial Agents 2011; 37, 253-255., doi: 10.3389/fmicb.2011.00022
- Bao-Tao Liu, 3. X.-P.-S.-M.-L.-R.-X.-H.-H. Detection of mutations in the *gyrA* and *parC* genes in *Escherichia coli* isolates carrying plasmid-mediated quinolone resistance genes from diseased food-producing animals. Journal of Medical Microbiology 2012; 61: 1591–1599
 - Bartoloni, A., Pallecchi, L., Riccobono, E., Mantella, A., Magnelli, D., Di Maggio, T., ... Rossolini, G. M. (2012). Relentless increase of resistance to fluoroquinolones and expanded-spectrum cephalosporins in *Escherichia coli*: 20years of surveillance in resource-limited settings from Latin America. *Clinical Microbiology and Infection*, 19(4), 356–361. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03807.x>
 - Bartoloni, A., Sennati, S., Di Maggio, T., Mantella, A., Riccobono, E., Strohmeyer, M., ... Rossolini, G. M. (2016). Antimicrobial susceptibility and emerging resistance determinants (*bla*CTX-M, *rmtB*, *fosA3*) in clinical isolates from urinary tract infections in the Bolivian Chaco. *International Journal of Infectious Diseases*, 43, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2015.12.008>
 - 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>
 - Blair J, Webber M, Baylay A, Ogbolu D y Piddock L Molecular mechanisms of antibiotic resistance. Macmillan Publishers Limited 2014; 1-12

- Blasi F, Alberti S, Tarsia P, Santus P, Centanni S, Allegra L. Plurifloxacin. A brief review in the treatment of acute exacerbation of chronic bronchitis. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2007; 2 (1): 27-31.
- Brandon P, Bland C, Griffin B, Stover K, Eiland L, McLaughlin M. A Review of Antibiotic Use in Pregnancy. *Pharmacotherapy*. 2015; 35(11):1052–1062. Doi: 10.1002/phar.1649.
- Braykov NP, Eisenberg JNS, Grossman M, et al. Antibiotic Resistance in Animal and Environmental Samples Associated with Small-Scale Poultry Farming in Northwestern Ecuador. *LaPara TM*, ed. *mSphere*. 2016;1(1):e00021-15. doi:10.1128/mSphere.00021-15.
- Breines DM, Ouabdesselam S, Ng EY, Tankovic J, Shah S, Soussy CJ, Hooper DC. 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: 175-179. PMID: PMC163680
- Briales A, Rodríguez-Martínez JM, Velasco C, Díaz de Alba P, Rodríguez-Bano J, Martínez-Martínez L, et al. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr* and *aac(6)-Ib-cr* in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases in Spain. *Int J Antimicrob Agents* 2012;39:431–4.
- Cabral JHM, Jackson AP, Smith CV, Shikotra N, Maxwell A, Liddington RC. Crystal structure of the breakage-reunion domain of ADN gyrase. *Nature* 1997; 388:903–6.
- Cabrera Albert, M. J. (2007). *Quinolonas y Sulfonamidas. Aspectos básicos para la enseñanza de pregrado*. PortalesMedicos.com. Recuperado de <http://www.portalesmedicos.com/publicaciones/articulos/537/1/Quinol>

onas-y-Sulfonamidas.-Aspectos-basicos-para-la-enseñanza-de-pregrado

- Campos A, Enríquez M, Patiño N. Actualidades farmacológicas Quinolonas. Revista Fac Med UNAM. 2008; 51(4): 173–177. Recuperado de: <http://www.ejournal.unam.mx/rfm/no51-4/RFM051000412.pdf>
- Chattaway M, Aboderin A, Fashae K, Okoro C, Opintan J y Okeke I, Fluoroquinolone-resistant enteric bacteria in Sub-Saharan Africa: Clones, Implications and Research Needs. *Frontiers in Microbiology* 2016; 1-12.
- Chenia H, Pillay B, Pillay D. Analysis of the mechanisms of fluoroquinolone resistance in urinary tract pathogens. JAC 2006; 58: 1274-1278, doi:10.1093/jac/dkl404
- 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 DTW, Fernandes PB. Structure-activity relationships of the fluoroquinolones. Antimicrob Agents Chemother 1989; 33: 131-135.
- Clark, M. A., Finkel, R., Rey, J. A., & Whalen, K. (2012). Quinolonas, antagonistas del ácido fólico y antisépticos del tracto urinario. In *Farmacología Harvey* (5ta ed., pp. 478–490). LWW
- Correia S, Poeta P, Hébraud M, Capelo JL, Igrejas G., Mechanisms of quinolone action and resistance: where do we stand? *Journal of Medical Microbiology* 2017;66:551–559 DOI 10.1099/jmm.0.000475
- Courvalin P. Plas-mediated 4-Quinolone Resistance: a real or apparent absence?. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 681-684.
- Crumplin GC. Aspects of chemistry in the development of the 4-quinolones antibacterial agents. *Rev Infect Dis* 1988; 10: 2-9
-

- Cué Brugueras, Manuel, Morejón García, Moisés, & Salup Díaz, Rosa. (2005). Actualidad de las quinolonas. *Revista Cubana de Farmacia*, 39(1), 1. Recuperado en 25 de junio de 2017, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152005000100011&lng=es&tlng=es
- Cueto, M. d. (2013). Infección de tracto urinario. Recuperado el 10 de Junio de 2018, de LA MICROBIOLOGÍA EN EL DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN DEL TRACTO URINARIO: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/otrosdeintereses/seimc-dc2013-LibroInfecciondeltractoUrinario.pdf>
- Davis, S. L., Neuhauser, M. M., & McKinnon, P. S. Antimicrobe. 2014. Recuperado el 2017, de Antimicrobe: <http://www.antimicrobe.org/new/d17.asp>
- De la Fuente CM, Dauros SP, Bello TH, Domínguez YM, Mella MS, Sepúlveda AM, et al. Mutations in *gyrA* and *gyrB* genes among strains of Gramnegative bacilli isolated from Chilean hospitals and their relation with resistance to fluoroquinolones. *Rev Med Chil.* 2007;135 (9):1103-1110. <http://europepmc.org/abstract/med/18064363>
- Deck D, PharmD, Winston L. Farmacología Básica y Clínica. Mc Graw Hill. 2010; 11 (46): 819-822
- Deguchi K, Fukuoka A, Yasuda M, Nakano S, Kanematsu E, Nishino y et al. Alterations in the GyrA subunit of ADN Gyrase and the ParC subunit of Topoisomerase IV in quinolone-resistant clinical isolates of *K. pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 699-701. Doi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC163775/pdf/410699.pdf>

- Domagala JM. Structure-activity and structure-side-effect relationship for the quinolone antibacterials. *J Antimicrob Chemother* 1994; 33: 685-706.
- Dorman CJ, Corcoran CP. (2009) Bacterial ADN topology and infectious disease. *Nucleic Acids Res.* 37, 672–678
- Dorman CJ. et al. ADN supercoiling and the anaerobic and growth phase regulation of *tonB* gene expression. *J Bacteriol* 1988;170, 2816–2826
- Drlica K, Zhao X. ADN Gyrase, Topoisomerase IV, and the 4-Quinolones. *ASM* 1997; 61:377-392, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9293187>
- Drlica, K. Mechanism of fluoroquinolone action. *Curr. Opin. Microbiol* 1999; 2, 504–508
- Drusano, G, Labro, M.-T, Cars, O, Mendes, P, Shah, P, Sörgel, F, & Weber, W. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of fluoroquinolones. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 1998; 4 Suppl 2, S27–S41. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23111670>
- Eaves Deborah J, Luke Randall, Douglas T. Gray, Antony Buckley, Martin J. Woodward, Allan P. White, and Laura J. V. Piddock. Prevalence of mutations within the quinolone resistance-determining region of *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE* and association with antibiotic resistance in Quinolone-Resistant *Salmonella enterica*. Oct. 2004, p. 4012–4015 0066-4804/04/\$08.00 0 DOI: 10.1128/AAC.48.10.4012–4015.2004
- El Sayyed H, Le Chat L, Lebailly E, Vickridge E, Pages C, Cornet F, et al. Mapping Topoisomerase IV Binding and Activity Sites on the *E. coli* Genome. *PLoS Genet* 2016;12;5: e1006025. doi:10.1371/journal.pgen.100602

- Everett, MJ, Jin YF, Ricci V. & Piddock LJV. Contribution of individual mechanisms to fluoroquinolone resistance in 36 *Escherichia coli* strains isolated from humans and animals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1996; 40, 2380–6. PMID: PMC 163538.
- Fàbrega A, Madurga S, Giralt E, Vila J. Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Microb Biotechnol* 2009;2: 40–61. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-7915.2008.00063.x>. PubMed PMID: 21261881
- Fang H, Huang H, Shi Y, Hedin G, Nord CE, Ullberg M. Prevalence of qnr determinants among extended-spectrum -lactamase-positive *Enterobacteriaceae* clinical isolates in southern Stockholm, Sweden. *Int J Antimicrob Agents* 2009;34:268–70.
- Ferjani S, Saidani M, Ennigrou S, Hsairi M, Faouzi A, Boutibia I. Multidrug resistance and high virulence genotype in uropathogenic *Escherichia coli* due to diffusion of ST131 clonal group producing CTX-M-15: an emerging problem in a Tunisian hospital. May 2014, Volume 59, Issue 3, pp 257–262 <https://link.springer.com/article/10.1007/s12223-013-0292-0>
- Ferjani S, Virulence determinants, phylogenetic groups and fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolated from cystitis and pyelonephritis, Vol. 60, Tunis: Elsevier; 2011, Vol. 60 páginas 270-274), URL: <http://www.em-consulte.com/article/759671/alertePM>
- Ferrero L, Cameron B, Manse B et al. Cloning and primary structure of *Staphylococcus aureus* ADN topoisomerase IV: a primary target of fluoroquinolones. *Mol Microbiol* 1994;13:641–653.
- File TM jr, Garau J, Blasi F, et al. Guidelines for empiric antimicrobial prescribing in community-acquired pneumonia. *Chest* 2004; 125: 1888-1901.

- Fu Y, Zhang W, Wang H, Zhao S, Chen Y, Meng F, et al. Specific patterns of *gyrA* mutations determine resistance difference to ciprofloxacin and levofloxacin in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. BMC Infect Dis 2013;13:8.
- Fuchs LY, Chihu L, Conde C, González VM, Noguez AH, Calderon E, et al. Mecanismos moleculares de la resistencia bacteriana. Salud Pública Mex. 1994; 36: 428-438. <http://www.redalyc.org/pdf/106/10636410.pdf>
- Fuentes J. Información farmacológica Fluoroquinolonas. IATREIA Revista médica Universidad de Antioquia 1990; 3: 158-164.
- García Rodríguez JA, García Sánchez JE, Gobernado M, Picazzo JJ, editores. Antimicrobianos en Medicina. 2° ed. Barcelona: Sociedad Española de Quimioterapia 2006.
- Gharib A, El-Aziz N; Molecular Analysis of Quinolone Resistance-Determining Regions in Avian Pathogenic *Escherichia coli* Int. J. of Adv. Res. (10). 0] (ISSN 2320-5407).Gharib and Norhan K Abd El-Aziz (2013); Molecular analysis of quinolone resistance-determining regions in avian pathogenic *Escherichia coli* Int. J. of Adv. Res. 2013 (10). 0] (ISSN 2320-5407).
- Giedraitienė A, Vitkauskienė A , Naginienė R , Pavilionis A. Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. Medicina (kaunas). 2011; 47(3):137-146. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21822035>
- González E. Infección del Tracto Urinario. Nefrología al día. 2012; 6(1):98-112 Recuperado de:<http://www.revistanefrologia.com/es-publicacion-nefrologia-articulo-infecciones-tracto-urinario-XX34216421200194>
- González I, Georgiou M, Alcaide F, Balas D, Liñares J, & de la Campa AG. Fluoroquinolone Resistance Mutations in the *parC*, *parE*, and *gyrA* genes of clinical isolates of viridans group

- streptococci*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1998; 42(11): 2792–2798.
- González-Martín J, García-García JM, Anibarro L, Vidal R, Esteban J, Blanquear R, et al. Documento de consenso sobre diagnóstico, tratamiento y prevención de la tuberculosis. Arch Bronconeumol 2010; 46: 255-274
 - Gouvêa R, Santos F, Aquino M, & Pereira V. (2015). Fluoroquinolones in Industrial Poultry Production, Bacterial Resistance and Food Residues: a Review. Brazilian Journal of Poultry Science, 1-10.
 - Grabe M, Bjerklund, Johansen T, Botto H, Cek M, Naber K, Tenke P, et al. Guía clínica sobre las infecciones urológicas. European Association of Urology. 2010; 1298-1372.http://www.aeu.es/UserFiles/17GUIA_CLINICA_SOBRE_LAS_INFECIONES_UROLOGICAS.pdf
 - 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: 232-243.
 - Hafizah C. Pillay B, Pillay D. Analysis of the mechanisms of fluoroquinolone resistance in urinary tract pathogens. J Antimicrob Chemother 2006; 58 (6): 1274-1278. Doi: <https://doi.org/10.1093/jac/dkl404>
 - 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: 879–885.

- Hernández Alvaro, Sánchez B. Maria Y Martínez José L. Quinolone resistance: much more than predicted. *Frontiers in Microbiology*, 2011; 2. doi: 10.3389/fmicb.2011.00022
- Hernández E, Araque M, Millán Y, Millán B, Vielma S. Prevalencia de B-Lactamasas CTX-M-15 en grupos filogenéticos de *Escherichia Coli* uropatógena aisladas en pacientes de la comunidad en Mérida, Venezuela. 2014; 55(1): 32 - 43;; <http://www.scielo.org.ve/pdf/ic/v55n1/art05.pdf>
- Hiasa H, Shea ME. ADN gyrase-mediated wrapping of the ADN strand is required for the replication fork arrest by the ADN gyrase-quinolone- ADN ternary complex. *J Biol Chem* 2000; 275:34780–6.
- Higgins P, Fluit A, Milatovic D, Verhoef J, Shmitz F. Mutations in GyrA, ParC, MexR and NfxB in clinical isolates of *Pseudomona aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents* 2003; 21: 409-13. Doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0924-8579\(03\)00009-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0924-8579(03)00009-8)
- Holm, C., Goto, T., Wang, J. C., & Botstein, D. (1985). ADN topoisomerase II is required at the time of mitosis in yeast. *Cell*, 41(2), 553–563. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(85\)80028-3](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(85)80028-3)
- Hooper DC, Jacoby GA. Topoisomerase inhibitors: fluoroquinolone mechanisms of action and resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2016;6:a025320. doi: <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a025320>. PubMed PMID: 27449972.
- Hooper DC. Mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Drug Resist Updat* 1998;2:38–55.
- Hopkins KL, Davies RH, Threlfall EJ. Mecanismos de Resistencia a Quinolonas en *Escherichia coli* y *Salmonella*: Investigaciones Recientes. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2005, 25(5): 358-375, <http://www.bago.com/BagoArg/Biblio/infectoweb363.htm>

- Hsu YH, Chung MW, Li TK. Distribution of gyrase and topoisomerase IV on bacterial nucleoid: Implications for nucleoid organization. *Nucl Acids Res.* 2006; 34: 3128-3138.
- <https://farmacomedia.files.wordpress.com/2010/05/quinolonas.pdf>
- Información Farmacoterapéutica de la Comarca. Infección Urinaria en el Adulto: Actualización. 2011, 19(9); 58. Recuperado de: https://www.osakidetza.euskadi.eus/contenidos/informacion/cevime_infac/eu_miez/adjuntos/Infac_v19_n9.pdf
- Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC) Tabulados Censales <https://www.ecuadorencifras.gob.ec/informacion-censal-cantonal/>
- Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública. (2016). *Vigilancia De Resistencia Antimicrobiana - ECUADOR*. Quito. Recuperado de: <http://www.investigacionsalud.gob.ec/webs/ram/wp-content/uploads/2016/08/Instructivo-de-An%C3%ADlisis-Acumulado-de-Sensibilidad-Antimicrobiana-AASA.pdf>
- Jacoby G. Mechanisms of resistance to quinolones. *Infections Diseases Society of America* 2005; Volume 41. Issue Supplement_2.
- Jaktaji R, Mohiti E. Study of Mutations in the ADN gyrase *gyrA* Gene of *Escherichia coli*. *IJPR* 2009; 9:43-48, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3869551/>
- Jepson , R., Mihaljevic , L., & Craig , J. (2003). Arándanos para la prevención de infecciones urinarias. *Cochrane*(4), 1-19. Recuperado de: http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/meADNt/arandanos_para_la_preencion_de_infecciones_urinarias.pdf
- Johnning A, Kristiansson E, Fick J, Weijdegård B and Larsson DGJ Resistance Mutations in *gyrA* and *parC* are Common in *Escherichia*

- Communities of both Fluoroquinolone-Polluted and Uncontaminated Aquatic Environments. *Front. Microbiol* 2015; 6:1355.
- Johnson JR, Johnston B, Clabots C, Kuskowski MA, Castanheira M. *Escherichia coli* sequence type ST131 as the major cause of serious multidrug-resistant *E. coli* infections in the United States. *Clin Infect Dis* 2010; 51:286–294. <http://dx.doi.org/10.1086/653932>.
 - Johnson JR, Johnston B, Kuskowski MA, Sokurenko EV, Tchesnokova V. Intensity and mechanisms of fluoroquinolone resistance within the H30 and H30Rx subclones of *Escherichia coli* sequence type 131 compared with other fluoroquinolone-resistant *E. coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59:4471–4480. doi: 10.1128/AAC.00673-15.
 - Johnson JR, Tchesnokova V, Johnston B, Clabots C, Roberts PL, Billig M, et al. Abrupt emergence of a single dominant multidrug-resistant strain of *Escherichia coli*. *J Infect Dis.* (2013);207:919–28. Doi: <https://doi.org/10.1093/infdis/jis933>
 - Juma B, Kariuki S, Waiyaki P, Mutugi M, Bulimo W. Molecular characterization of fluoroquinolone resistance genes in isolates obtained from patients with diarrhea in Machakos District Hospital, Kenya. *Afr. J. Pharmacol. Ther.* 2016; 5:118-127
 - Karczmarczyk M, M. Q. Mechanisms of Fluoroquinolone Resistance in *Escherichia coli* Isolates. *American Society for Microbiology* 2011; 7113–7120
 - Kato J, Nishimura Y, Imamura R, Niki H, Hiraga S, Suzuki H. New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli*. *Cell* 1990; 63:393–404.
 - 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>.
 - Khodursky A, Cozzarelli N. The Mechanism of Inhibition of

- Topoisomerase IV by quinolone antibacterials. *J Biol Chem* USA 1998;272 :27668–27677
- Kim J, Ohtani H, Tsujimoto M, Sawada Y. Quantitative comparison of the convulsory activity of combinations of twelve fluorquinolones with five nonsteroidal anti-inflammatory agents. *Drug Metab Pharmacokinet* 2009; 24: 167-174.
 - Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol* 2010;8:423–435. doi: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2333>. PubMed PMID: 20440275
 - Kong FYS, Tabrizi SN, Fairley CK, et al: The efficacy of azithromycin and doxycycline for the treatment of rectal chlamydia infection: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother* 70: 1290–1297, 2015. doi: 10.1093/jac/dku574.
 - Komp P, Karlsson A, Hughes D. Mutation Rate and Evolution of Fluoroquinolone Resistance in *Escherichia coli* Isolates from Patients with Urinary Tract Infections. *American Society for Microbiology* 2003; 47:3222-3232, doi: 10.1128/AAC47.10.3222-3232.2003
 - Korona-Glowniak I, Skrzypek K, Siwiec R, Worbek A, Malm A. Fluoroquinolone-resistance mechanisms and phylogenetic background of clinical *Escherichia coli* strains isolated in south-east Poland. *New Microbiology*, 2016, 210-215.
 - Kumagai Yumi, J.-I. K. Quinolone-Resistant Mutants of *Escherichia coli* ADN. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996 Mar; 40(3): 710–714.
 - Lee JK, Lee YS, Park YK, Kim BS. Mutations in the *gyrA* and *parC* genes in ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* in Korea. *Microbiol Immunol* 2005;49:647-53.
 - Leo E, Gould KA, Pan X, et al. Novel symmetric and asymmetric DNA scission determinants for *Streptococcus pneumoniae*

- topoisomerase IV and gyrase ans clustered in the DNA breakage site. *J Biol Chem* 2005; 280: 14252-14263
- Levine C, Hiasa H, Marians KJ. DNA gyrase and topoisomerase IV: biochemical activities, physiological roles during chromosome replication, and drugs sensitivities. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1400: 29-43.
 - Leyva S, Leyva E. Fluoroquinolonas. Mecanismos de acción y resistencia, estructura, síntesis y reacciones fisicoquímicas importantes para propiedades medicinales. *Bol. Soc. Quím. Méx.* 2008; 2(1), 1-13
 - Ling JM, Chan EW, Lam AW, Cheng AF. Mutation in topoisomerase genes of fluoroquinolone-resistant *Salmonella* in Hong Kong. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:3567–73
 - Loebstein, R., Addis, A., Ho, E., Andreou, R., Sage, S., Donnenfeld, A. E., Koren, G. (1998). Pregnancy outcome following gestational exposure to fluoroquinolones: a multicenter prospective controlled study. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(6), 1336–9. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9624471>
 - López A, Aguirre J, Roitter C, García A, Cecchetto E, Plaza D, et al. Farmacología general de los antibióticos. Farmacología aplicada-Hospital Tránsito Cáceres de Allende. 2010
 - Maeda Y, Kiba A, Ohnishi K, Hikichi Y. Amino Acid Substitutions in GyrA of *Burkholderia glumae* Are Implicated in Not Only Oxolinic Acid Resistance but Also Fitness on Rice Plants. *AEM* 2007; 73: 1114-1119, doi:10.1128/AEM.02400-06
 - Maguiña C, Solari L. Nuevas y Viejas quinolonas. *Rev Med Hered* 2002; 13(4).
 - Mak J, Kim M, Pham J, Tapsall J, White P. Antibiotic resistance determinants in nosocomial strains of multidrugresistant

Acinetobacter baumannii. J Antimicrob Chemother 2009; 63: 47-54.
Doi: <https://doi.org/10.1093/jac/dkn454>

- 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, E., Osorio, J., Delgado, J., Esparza, G. E., Mota, G., Blanco, V. M., ... Villegas, M. V. (2013). Infecciones del tracto urinario bajo en adultos y embarazadas: consenso para el manejo empírico. *Infectio*, 17(3), 122–135. [https://doi.org/10.1016/S0123-9392\(13\)70719-7](https://doi.org/10.1016/S0123-9392(13)70719-7)
- Marínez-Martínez L, Pascual A., Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* 1998; 351: 797-799.
- Mediavilla, A, Flórez, J., Azanza, J. ., & Sádaba, B. (2014). Quinolonas. Sulfamidas. Trimetoprima. Cotrimoxazol. Nitroflirantoína. Antisépticos. En *Farmacología Humana* (6ta ed., pp. 1027–1043;). M.a.s.o.n.
- Mella S, Acuña G, Muñoz M, Perez C, Labarca J, Gonzalez G, et al. Quinolonas: Aspectos generales sobre su estructura y clasificación. *Rev Chil Infect* (2000); 17 (1): 53-56.
- Mensa J, Gatell JM, García-Sánchez JE, Letang E, López-Suñé E, Marco F. Guía de terapéutica antimicrobiana. Barcelona: Editorial Antares 2014
- Millán Y., Hernández E. Millán B. y Araquea M. Factores de virulencia y determinantes de *E. coli* uropatógena. *Revista Argentina de Microbiología* 2014; 32 (1).
- Ministerio de Salud Pública del Ecuador. Dirección de Normatización del Ecuador. Protocolos Terapéuticos. Dirección de Normatización del Ecuador. 2012; 81, 258. Recuperado de: <https://eliochoa.files.wordpress.com/2014/05/guias-msp-protocolo-manejo.pdf>

- Monturus de Carandin, E. (2013). Las interacciones entre replicación, segregación y diferenciación celular en modelos eucariotas, 196. Recuperado de <http://eprints.ucm.es/22883/1/T34737.pdf>
- Morgan-Linnell S, Boyd L, Steffen D, Zechiedrich L. Mechanisms accounting for fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* clinical Isolates. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, Jan. 2009, p. 235–242; doi:10.1128/AAC.00665-08
- Morgan-Linnell, S. K, Zechiedrich L. Contributions of the combined effects of topoisomerase mutations toward fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother* 2007; 51:4205–4208.
- Mosquito S, Ruiz J, Bauer JL, Ochoa TJ. Mecanismos moleculares de Resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. *Rev Perú Med Exp Salud Pública* 2011; 28(4): 648-656. http://www.scielosp.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S172646342011000400013&lng=en&nrm=iso&tlng=en
- Munshi M, Sack D, Hider K, Ahmed Z, Rahaman M, Morshed M. Plasmid-mediated resistance to nalidixic acid in *Shigella dysenteriae* type 1. 1987. *Lancet* 2, 419–21
- Naas, T., Oxacelay, C., & Nordmann, P. (2007). Identification of CTX-M-type extended-spectrum- β -lactamase genes using real-time PCR and pyrosequencing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(1), 223–230. <https://doi.org/10.1128/AAC.00611-06>
- Nakamura S. Mechanism of quinolone resistance. *Journal of Infection and Chemotherapy* 1997; 3: 128-138. doi: [org/10.1007/BF02491502](https://doi.org/10.1007/BF02491502).
- Nam YS, Cho SY, Yang HY, Park KS, Jang JH, Kim YT, Jeong JW, Suh JT, and Lee HJ. Investigation of mutation distribution in ADN 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: pp. 126-129
- Navarro, F., Miró, E., & Mirelis, B. (2010). Interpretive reading of enterobacteria antibiograms. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(9), 638–645. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2010.05.002>
 - Nordmann P, Poirel L. Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother* 2005;56:463–9.
 - Ochoa Theresa J, Gómez-Duarte Oscar G. Antibiotic Resistance in *Escherichia coli*. Springer International Publishing Switzerland. Antibiotic Resistance in *Escherichia coli*, (2016); Chapter 13, De https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-45092-6_13.
 - O'Farrell N. Moi H. European guideline for the management of donovanosis, 2010; <http://std.sagepub.com/content/21/9/609>
 - OMS. ANTIMICROBIAL RESISTANCE Global Report on Surveillance.2014
 - Ostadhadi S, Rashidi M, Zolfaghari S, Maradeneh J, Nikoui V. Involvement of Mutation in Serine 83 of Quinolone Resistance-Determining Region of *gyrA* Gene in Resistance to Ciprofloxacin in *Escherichia coli*. *IJPT* 2015; 14:16-21, <http://ijpt.iuims.ac.ir>
 - Owens RC Jr, Ambrose PG. Antimicrobial safety: focus on fluoroquinolones. *Clin Infect Dis* 2005; 41: S 144-157.
 - Pallechi L, Bartolini A, Riccobono E., et al,. Quinolone Resistance in absence of selective Pressure: The experience of a very remote community in the amazon forest. *PLOS neglected Tropical Diseases* 2012; 6: 1-7.
 - Paltansing S, Kraakman M, Ras J, Wessels E, Bernards A. Characterization of fluoroquinolone and cephalosporin resistance

- mechanisms in *Enterobacteriaceae* isolated in a Dutch teaching hospital reveals the presence of an *Escherichia coli* ST131 clone with a specific mutation in *parE*. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68: 40–45
- Panhotra, B, Desai B, Sharma P. Nalidixic acid- Resistant *Shigella dysenteriae* I. *Lancet* 1985, 763.
 - Park-Wyllie LY, Juurlink DN, Kopp A, Shah BR, Stukel TA, Stumpo C, Dresser L, Low DE, Mamdani MM. Outpatient gatifloxacin therapy and dysglycemia in older adults. *N Engl J Med* 2006; 354:1352-1361.
 - Paul S, Linardopoulou E, Billing M, Tchesnokova V, Price L, Johnson J, Chattopadhyay S, Sokurenko E. Role of homologous recombination in adaptive diversification of extraintestinal *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 195. 2013 (2):231–242. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026578>
 - Pérez H, Robles A. Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana. *Revista Médica MID*. 2013; 4: 186-191. https://www.researchgate.net/publication/242406321_Aspectos_basicos_de_los_mecanismos_de_resistencia_bacteriana
 - Petri W. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Mc Graw Hill. Decima segunda edición. Professor of Pharmacology and Medicine School of Medicine, University of California, San Diego La Jolla, California. 2012. 1472p
 - Petri W. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Mc Graw Hill. Decima segunda edición. Professor of Pharmacology and Medicine School of Medicine, University of California, San Diego La Jolla, Californi. 2006, 11 (43): 1118-1122
 - Petty NK, Zakour NL, Stanton M, Skippington E, Totsika M, Forde B, et al. Global Dissemination of a multidrug resistant *Escherichia coli* clon. Washington University School of Medicine. 2014,

- 15;111(15):5694-9. Doi: 10.1073/pnas.1322678111. Epub 2014 Mar 31.
- Piekarska Katarzyna, Tomasz Wołkowicz, Katarzyna Zacharczuk, Magdalena Rzczkowska, Anna Chróst, Elzbieta Bareja, Monika Olak, Rafał Gierczynski. Co-existence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants and mutations in *gyrA* and *parC* among fluoroquinolone-resistant clinical *Enterobacteriaceae* isolated in a tertiary hospital in Warsaw, Poland. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2014; 45:238–243
 - Price LB, Johnson JR, Aziz M, Clabots C, Johnston B, Tchesnokova V, et al. The epidemic of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* ST131 is driven by a single highly pathogenic subclone, H30-Rx. *mBio*. 2013;4:e00377–413. Doi: 10.1128/mBio.00377-13
 - RAM-IMSPI-Q. (2016). Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos – RAM. Recuperado el 10 de Junio de 2018, de Datos Vigilancia RAM 2016: <http://www.investigacionsalud.gob.ec/webs/ram/wp-content/uploads/2018/05/DATOS2016CRNRAM-s.pdf>
 - Redgrave LS, Sutton SB, Webber MA, Piddock LJ. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends Microbiol* 2014; 22:438445. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2014.04.007>. PubMed PMID: 24842194
 - Reece RJ, Maxwell A. ADN gyrase: structure and function. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1991; 26:335–75. Doi: <http://dx.doi.org/10.3109/10409239109114072>
 - Reguera, R. M., Perez-Pertejo, Y., Redondo, C. M., Diaz-Gonzalez, R., & Balaña-Fouce, R. (2007). La ADN topoisomerasa tipo I de protozoos patógenos como diana terapéutica de fármacos

- antitumorales. Medicina. Recuperado de <http://www.scielo.org.ar/pdf/medba/v67n6/v67n6a16.pdf>
- Rincon Cruz G., Radice, M., Sennati, S., Pallecchi, L., Rossolini, G. M., Gutkind, G., & Di Conza, J. A. (2013). Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants among oxyiminocephalosporin-resistant Enterobacteriaceae in Argentina. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 108(7), 924–927. <https://doi.org/10.1590/0074-0276130084>
 -
 - Riveros M, Riccobono E, Durand D, Mosquito S, Ruiz J, Rossolini G, y otros. Plasmid-mediated quinolone resistance genes in enteroagregative *Escherichia coli* from infants in Lima, Perú. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2012; 540-542.
 - Robicsek A, Jacoby GA, Hooper DC. The worldwide emergence of plasmidmediated quinolone resistance. *Lancet Infect Dis* 2006; 6(10):629–40.. DOI: 10.1016/S1473-3099(06)70599-0
 - Roca J. Topoisomerasas de ADN de tipo II. *Investigación y Ciencia* 2003; 40-49.
 - Roderova M, Halova D, Papousek I, Dolejska M, Masarikova M, Hanulik V, et al. Characteristics of Quinolone Resistance in *Escherichia coli* Isolates from Humans, Animals, and the Environment in the Czech Republic. *Front Microbiol.* 2016; 7: 2147, doi: 10.3389/fmicb.2016.02147
 - Rodríguez-Martínez, JM. Mecanismos de Resistencia a Quinolonas Mediada Por Plásmidos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 2006;23(1):25–31. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0213005X05748977>
 - Ruiz, 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. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1997; 39: 839–40.
- Ruiz J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and ADN gyrase protection. *J Antimicrob Chemother.* 2003; 51:1109-17. Doi: <https://doi.org/10.1093/jac/dkq222>
 - Ruiz J, Pons MJ, Gomes C. Transferable mechanisms of quinolone resistance. *Int J Antimicrob Agents* 2012; 40: 196-203, doi:10.1016/j.ijantimicag.2012.02.011.
 - Ruppé É, Woerther, P. , & Barbier, F. Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. Orleans: Intensive Care 2015; 1-15, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4531117/>
 - 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: 1001–1005.
 - Sánchez M, Sayalero M, Sánchez A. Ciprofloxacina en las infecciones urinarias. Argentina: Intramed; 2010. URL: <http://www.intramed.net/contenidover.asp?contenidoID=58267>
 - Sánchez-Céspedes J, Sáez-López E, Frimodt-Møller N, Vila J, & Soto SM. Effects of a mutation in the *gyrA* gene on the virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, (2015); 59(8), 4662–4668. doi:10.1128/AAC.00665-15.
 - Sandhya Bansal, Vibha Tandon. Contribution of mutations in ADN gyrase and topoisomerase IV genes to ciprofloxacin resistance in *Escherichia coli* clinical isolates. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2011; 37: 253–255.

- Saravolatz LD, Leggett J. Gatifloxacin, gemifloxacin, and moxifloxacin: The role of 3 new fluoroquinolones. *Clin Infect Dis* 2003; 37: 1210-1215.
- Sato, T., Yokota, S. I., Uchida, I., Okubo, T., Usui, M., Kusumoto, M., ... Tamura, Y. (2013). Fluoroquinolone resistance mechanisms in an *Escherichia coli* isolate, HUE1, without quinolone resistance-determining region mutations. *Frontiers in Microbiology*, 4(125), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00125>
- Serra, H. A. (2008). Quinolonas. Recuperado May 25, 2017, from <http://www.montpellier.com.ar/Uploads/Separatas/sepQuinolonasFarmacologiaM.pdf>
- Sharma, P. C., Jain, A., & Jain, S. Fluoroquinolone antibacterials: A review on chemistry, microbiology and therapeutic prospects. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 2009; 66(6), 587–604
- Sierra Ortigosa (2005). Bases Moleculares de la Resistencia a Quinolonas en *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Corynebacterium spp.* (Tesis de Doctorado). Universidad de Barcelona
- Silva-Sánchez, J., Cruz-Trujillo, E., Barrios, H., Reyna-Flores, F., Sánchez-Pérez, A., Garza-Ramos, U., & Garza-Ramos, U. (2013). Characterization of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance (PMQR) Genes in Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae Pediatric Clinical Isolates in Mexico. *PLoS ONE*, 8(10), e77968. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077968>
- Soussy CJ, Wolfson JS, Ng EY, et al. 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: 2588–92. doi: 10.1128/AAC.37.12.2588

- 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.dsig.de/images>
- Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. Clin Microbiol Rev 2009; 22:664–89. DOI: 10.1128/CMR.00016-09
- Suzuki Shingo, Horinouchi Takaaki and Furusawa Chikara. Prediction of antibiotic resistance by gene expression profiles: Nat Commun 2014, 5:5792. <http://www.nature.com/doi/10.1038/ncomms6792> <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms6792>. doi: 10.1038/ncomms6792
- Taléns-Visconti R, Garrigues T, Cantón E. Quinolonas y *Streptococcus pneumoniae*. Mecanismo de acción y resistencia. Rev Esp Quimioterap, Diciembre 2002; Vol.15 (Nº 4): 313-324
- Thomas Le I, Couetdic G, Clermont O, Brahimi N, Plesiat P, Bingen E. In vivo selection of a target/efflux double mutant of *Pseudomonas aeruginosa* by ciprofloxacin therapy. J Antimicrob Chemother 2001;48:553- 5.
- Tillotson CJ. Role de gemifloxacin in community–acquired pneumonia. Expert Rev Anti infect Ther 2008, 6(4): 405-18. 35.
- Tomé, A., & Filipe, A. (2011). Alta Incidencia de Efectos Adversos Neuropsiquiátricos Asociada con el Uso de Quinolonas. Drug Safety, 34(6),465–488. Recuperado de <http://www.bago.com/BagoArg/Biblio/psiqweb752.htm>
- Totsika M, Beatson S, Sarkar S, Minh-Phan D, Petty N, Bachmann N, et al. Insights into a Multidrug Resistant *Escherichia coli* Pathogen of the Globally Disseminated ST131 Lineage: Genome Analysis and Virulence Mechanisms: Plos One 2011 october;6; 1-

11.

<http://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0026578&type=printable>.

- Turner, A. K, Nair S, Wain J. The acquisition of full fluoroquinolone resistance in *Salmonella Typhi* by accumulation of point mutations in the topoisomerase targets. J. Antimicrob. Chemother 2006; 58:733–740.
- Vakili, Bahareh F. K. Detection of quinolone-resistance mutations. Journal of Research in Medical Sciences 2014 Jun; 19(6): 567–570.
- Ventriglia, M. V, Vives, E. A., & Rothlin, D. M. R. (2003). Farmacología ii, 9. Recuperado de
- Vila J, Ruiz J, Goñi P, Marcos M, Jiménez de Anta M. Mutation in the *gyrA* gene of quinolone-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39: 1201-3. Doi: 10.1128/AAC.39.5.1201
- Vila J, Ruiz J, Marco F, Barcelo A, Goñi P, Giralt, E, & Jimenez de Anta T. (1994). Association between double mutation in *gyrA* gene of ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* and MICs. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 38(10), 2477–2479. PMID: PMC 284767
- Viñuela ML. Resistencia plasmídica a fluorquinolonas en enterobacterias. Tesis doctoral, Universidad de Salamanca 2015.
- Wagstaff AJ, Balfour JA. Grepafloxacin. Drugs 1997; 53: 817-824.
- Wang L, Lee F, Tai C, Kasai H. Comparison of *gyrB* gene sequences, 16S rRNA gene sequences and ADN-ADN hybridization in the *Bacillus subtilis* group. IJSEM 2007; 57:1846–1850, doi: 10.1099/ijms.0.64685-0
- Webber, M.A. et al. (2013) Clinically relevant mutant ADN gyrase alters supercoiling, changes the transcriptome, and confers multidrug resistance. MBio 4, e00273–e313

- Weigel L, Anderson G, Tenover F. ADN Gyrase and Topoisomerase IV Mutations Associated with Fluoroquinolone Resistance in *Proteus mirabilis*. AAC 2002; 46: 2582–2587, doi: 10.1128/AAC.46.8.2582–2587.2002
- Willmott CJ, Maxwell A. A single point mutation in the ADN gyrase A protein greatly reduces binding of fluoroquinolones to the gyrase-ADN complex. Antimicrob Agents Chemother 1993; 37:126–7. Doi: 10.1128/AAC.37.1.126.
- Wise R, Andrews JM, Edwards LJ. In vitro activity of Bay 09867, a new quinolone derivate, compared with those of other antimicrobial agents. Antimicrob Agents Chemotrher 1983; 23: 559-564.
- Wolfson JS, Hooper DC. Fluoroquinolone antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev 1989; 2: 378-424.
- Woodhead M, Blasi F, Edig S, Garau J, Huchon G, Ieven M, et al. Guidelines for de management of adult lower respiratory tract infections. Clin Microbiol Infect 2011; 17: E1-E59
- World Health Organization. (2017). Global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS) report: early implementation 2016-2017. Recuperado el 10 de Junio de 2018, de <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259744/9789241513449-eng.pdf;jsessionid=97220B52DE6710D8D30373CE71EAECE3?sequence=1>
- Yague G, Morris JE, Pan XS, Gould KA, Fisher LM. Cleavable-complex formation by wild-type and quinolone-resistant *Streptococcus pneumoniae* type II topoisomerases mediated by gemifloxacin and other fluoroquinolones. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46:413–9.
- Yamamoto S, Higuchi Y, Nojima M, Current therapy of acute uncomplicated cystitis, International International Journal of

- Urology; 2010, Vol 17. (450-456).
- Yoshida H, Bogaki M, Nakamura M, et al. Quinolone resistance-determining region in the ADN gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;34:1271–2. Doi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC171799/>
 - Zurfluh K, Abgottspon H, Hachler H, Nuesch M, Stephan R. Quinolone Resistance Mechanisms among Extended-Spectrum BetaLactamase (ESBL) Producing *Escherichia coli* isolated from rivers and lakes in Switzerland. *PLoS ONE* 2014; 9 e95864. doi:10.1371
 - Zurita J, Porcentaje de Resistencia Bacteriana, Hospital Vozandes. Cartilla de datos estadísticos. Quito-Ecuador, 2017.
 - 52nd International Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), 9-12 September 2012, San Francisco.

ADENDUM

ARTICULO CIENTIFICO

ARTÍCULO

Resistencia bacteriana de *Escherichia coli* uropatogénica en población nativa amerindia Kichwas del Ecuador

William M. Guamán, Víctor R. Tamayo, José E. Villacís, Jorge A. Reyes ², Olga S. Muñoz, Judith N. Torres, Washington R. Paz, María J. Vallejo, María G. Echeverría, Carolina E. Satan, Juan L. Muñoz, Rodrigo M. Grijalva.

Resistencia bacteriana de *Escherichia coli* uropatogénica en población nativa amerindia Kichwa de Ecuador

William M. Guamán¹, Víctor R. Tamayo², José E. Villacís³, Jorge A. Reyes², Olga S. Muñoz³, Judith N. Torres¹, Washington R. Paz¹, María J. Vallejo³, María G. Echeverría³, Carolina E. Satan², Juan L. Muñoz⁴, Rodrigo M. Grijalva³

¹ Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador.

² Instituto Nacional de Investigación de Salud Pública, "Dr. Leopoldo Izquieta Pérez" INSP-QLIP CZ9, Quito, Ecuador.

³ Universidad de las Fuerzas Armadas, Centro de Nanociencia y Nanotecnología, Sangolquí, Ecuador.

⁴ Universidad de Salamanca, Salamanca, España

Rev Fac Cien Med (Quito), 2017; 42 (1): 32-41

Recibido: 07/06/16; Aceptado: 10/10/16

Correspondencia:

William Guamán

Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Central del Ecuador

williguaman@gmail.com

Resumen

Contexto: *Escherichia coli* uropatógena (ECUP) se presenta como uno de los principales agentes etiológicos en infecciones del tracto urinario (ITUs) no complicadas (70-95%). El objetivo del tratamiento de ITUs no complicadas es obtener curación clínica y microbiológica. Para ello, es de particular importancia el conocimiento de las tasas de resistencia antibiótica local.

Objetivo: identificar los perfiles de resistencia a antibióticos de primera línea para ITUs no complicadas en poblaciones nativas amerindias Kichwas ecuatorianas, en donde el tratamiento empírico se basa en trimetoprim/sulfametoxazol, ampicilina, y ciprofloxacina mayoritariamente.

Métodos: se analizaron 335 muestras de orina procedentes de las poblaciones de Zumbahua, Colta y Guamote, en un periodo de 4 meses (febrero-mayo 2016). Las muestras fueron incubadas por 24 y 48 horas en agar Eosin Methylene Blue (EMB), para luego ser identificadas en género y especie por pruebas bioquímicas. Para determinar la susceptibilidad antibiótica, se realizó la técnica de difusión en disco de Kirby-Bauer. Para la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), se utilizó la técnica de microdilución en caldo (Vitek 2). El método de doble disco fue la técnica utilizada para la detección de betalactamasas de espectro extendido (BLEE).

Resultados: noventa (26,9%) muestras mostraron un recuento significativo de $\geq 10^5$ (ufc)/ml, compatibles con ITUs. El microorganismo identificado con mayor frecuencia fue *E. coli* (n=75; 83,3%). La resistencia antibiótica encontrada para los aislados de *E. coli* fue de 56,7% a trimetoprim/sulfametoxazol, 52,5% a ampicilina, 43,3% a ácido nalidixico, 32,5% a ciprofloxacina, 28,3% a norfloxacina, 25% a levofloxacina, 15,85% a cefazolina, 17,5% a ceftioxima, 15% a cefuroxima, 15% a ceftazidima, cefotaxima, y ceftriaxona, 15% a cefepima, 7,5% a nitrofurantoina y 1,7% a fosfomicina. Se identificaron 7 aislados productores de betalactamasas de espectro extendido (BLEE).

Conclusión: con los resultados obtenidos se recomienda no utilizar ampicilina, trimetoprim/sulfametoxazol, ni quinolonas en la zona estudiada como terapia empírica. Se sugiere instaurar tratamiento empírico con fosfomicina o nitrofurantoina para ITUs no complicadas.

Descriptores DeCs: *Escherichia coli* uropatogénica, infección de tracto urinario, resistencia a antibióticos, población amerindia kichwa, betalactamasas de espectro extendido, Ecuador.



Este artículo está bajo una licencia de Creative Commons de tipo Reconocimiento - No comercial - Sin obras derivadas 4.0 Internacional License

Rev Fac Cien Med (Quito), 2017; 42 (1):36-45 36

Abstract

Context: uropathogenic *Escherichia coli* (ECUP) is one of the main etiologic agents in uncomplicated urinary tract infections (UTIs), (70-95%). The end point of antibiotic therapy is a full clinical and microbiological response. Objective: to identify bacterial resistance profiles to firstline antibiotics, used to treat uncomplicated UTIs within indigenous communities in Ecuador, where the empiric treatment approach is based mainly on the use of trimethoprim/sulfamethoxazole, ampicillin and ciprofloxacin.

Methods: a total of 335 urine samples were collected and analysed during a four-month period (February-May 2016) in Zumbahua, Colta and Guamote. The samples were incubated for 24 and 48 hours in Eosin Methylene Blue (EMB) and subsequently identified at the genus and species level by biochemical tests. The Kirby-Bauer method (disc diffusion) was performed for phenotypic profiling of antibiotic susceptibility, and for the minimum inhibitory concentration (MIC), Vitek 2 broth micro-dilution was used. The double disk method was used for the identification of extended spectrum beta-lactamases (ESBL).

Results: 90/335 (26,9%) urine samples were compatible with ITU (significant count of $\geq 10^5$ colony forming units cfu/ml). The most frequently microorganism recovered was *E. coli* (n=75; 83,3%). The antibiotic resistance found in *E. coli* was trimethoprim/sulfamethoxazole 56,7%; 52,5% to ampicillin; 43,3% to nalidixic acid; 32,5% to ciprofloxacin; 28,3% to norfloxacin; 25% to levofloxacin; 15,85% to ceftazidime; 17,5% to ceftazidime; 15% to cefuroxime; 15% to ceftazidime, cefotaxime, and ceftriaxone; 15% to cefepime; 7,5% to nitrofurantoin and 1,7% to phosphomycin. Seven extended spectrum betalactamases (ESBL) isolates were identified.

Conclusion: these results drive to the recommendation of not using ampicillin, trimethoprim/sulfamethoxazole, nor quinolones in the area studied. We recommend empirical therapy with phosphomycin or nitrofurantoin.

Keywords: uropathogenic *Escherichia coli*, urinary tract infections, antibiotic resistance, amerindian kichwa population, extended spectrum beta-lactamases, Ecuador.

Introducción

Las infecciones del tracto urinario (ITUs) de etiología bacteriana son comunes en la especie humana; además, constituyen las infecciones nosocomiales más usuales en el mundo desarrollado y frecuentes en países en vías de desarrollo.¹⁻³ Las ITUs, incluyendo cistitis y pielonefritis, se consideran el tipo más frecuente de infecciones en humanos causando entre 150 a 250 millones de casos/año a nivel global¹. *E. coli* uropatógena (ECUP) es uno de los principales agentes etiológicos de ITU (70-95%)¹⁻³. Las ITUs afectan con mayor frecuencia a mujeres provocando clínicamente disuria, polaquiuria, tenesmo, urgencia urinaria, nicturia, dolor suprapúbico, hematuria, piuria y bacteriuria. Numerosos episodios pueden presentarse como cistitis que puede progresar a una pielonefritis e incluso urosepsis.^{4,5} En gestantes, las ITUs suelen cursar con bacteriuria asintomática.^{1,5-7}

El fallo terapéutico al tratamiento empírico se atribuye a mecanismos de resistencia bacteriana, principalmente a fluoroquinolonas, por modificación del sitio diana bacteriano⁸, a β -lactámicos mediante la producción de β -lactamasas plasmídicas, hiperproducción de β -lactamasas cromosómica de la clase

C (AmpC) o expresión de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE)⁹. La resistencia antimicrobiana constituye un problema sanitario a nivel asistencial y comunitario⁹.

La posibilidad de resistencia es determinante al momento de instaurar un tratamiento de ITU a nivel de la comunidad; amerita investigar una eventual resistencia antes de prescribir tratamientos empíricos para evitar el fallo terapéutico que generará complicaciones clínicas y mayor morbilidad.

Sujetos y métodos

Diseño del estudio: se realizó un estudio epidemiológico, descriptivo y observacional.

Universo y población: se analizaron 335 muestras de orina procedentes de las comunidades andinas rurales del Ecuador de a) Zumbahua (parroquia del cantón Saquisilí de la provincia de Cotopaxi, ubicada a 162 km de Quito, con 12.643 habitantes según datos del INEC del año 2015, con un 85% de población indígena), b) Colta (cantón de la provincia de Chimborazo, ubicada a 206 km de la ciudad de Quito, con 46.392 habitantes y 70% de población indígena) y c) Guamote (cantón de la provincia de Chimborazo, ubicada a 238 km de Quito, con 52.392 habitantes y 94,5% de su población amerindia).

Criterios de inclusión: se incorporaron al estudio a pacientes que asistieron a consulta externa de los servicios de salud de las poblaciones indicadas entre los meses de febrero a mayo del 2016, con sintomatología sugestiva de ITU. A cada paciente se solicitó una muestra de orina previa instrucción de la forma correcta de recolectar la muestra. Todas las muestras fueron cultivadas y los aislados que con un recuento significativo ($\geq 10^5$ (ufc)/ml) e identificación del agente biológico E.coli u otro patógeno fueron procesados.

Criterios de exclusión: se excluyeron pacientes con infecciones del tracto urinario complicadas, muestras repetidas y pacientes que no pertenecían a las comunidades nativas amerindias Kichwas.

Recolección y transporte de muestras: las muestras para urocultivo se procesaron el mismo día de la toma o máximo al día siguiente de la recolección utilizando un conservante que inhibe la multiplicación bacteriana (ácido bórico) que permitió mantener la muestra de orina hasta por 24 horas.

Como preservante-inhibidor, se preparó una solución de ácido bórico al 2%; el proceso comprende pesar 2 gramos de Boric Acid ultraPURETM (Gibco BRL 15583-024), químico que fue diluido en 100 ml de agua destilada estéril precalentada a 50°C. Posteriormente, en una cabina de bioseguridad (AirClean 600 PCR Workstation) se dispensó 500 μ l de solución de ácido bórico en tubos Falcon estériles de 15 ml; se adicionó 6 ml de la muestra de orina. Los tubos Falcon fueron luego almacenados y transportados en una caja térmica a temperatura constante entre 2 a 8°C hasta el Laboratorio de Microbiología del Centro de Referencia Nacional de Microbiología del Antimicrobianos (RAM) del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública "Dr. Leopoldo Izquieta Pérez" dependiente de la Coordinación Zonal 9 (INSP-QLIP CZ9).

Procesamiento de las muestras de orina en el laboratorio de microbiología: las muestras fueron recibidas teniendo en cuenta: a) la adecuada cadena de frío durante el transporte (2 a 8°C), b) correcta identificación de la muestra (nombre, cédula de ciudadanía, edad, sexo y unidad de salud remitente) y c) reporte del examen elemental y microscópico de orina (EMO). Una vez confirmados los requisitos anteriores, a cada muestra se asignó un código de laboratorio, registrándose estos datos en hojas de trabajo, conjuntamente con los datos clínicos de la muestra. Se preparó el material necesario para la siembra: a) asas calibradas estériles de 0,01 ml y placas preparadas con medio de cultivo Eosin Methylene Blue (EMB) rotuladas con el código de laboratorio asignado a cada muestra. Las muestras fueron homoge-

nizadas por inversión y sembradas mediante asa calibrada en placas con Eosin Methylene Blue (EMB), de acuerdo a las recomendaciones para procesamiento de urocultivos. Luego de la siembra, las placas se incubaron en condiciones anaerobias a 37°C durante 24 horas a 48 horas (si no hubo resultado positivo en las primeras 24 horas).

Conteo UFC e Identificación de aislados bacterianos: se consideró un recuento mayor a 10^5 (ufc)/ml para catalogar como positivo al urocultivo. Las cepas con recuento significativo fueron identificadas de manera preliminar como E.coli cuando se observaban colonias verdosas con brillo metálico en el agar EMB, por ser esta bacteria fermentadora de la lactosa contenida en el medio. Para la confirmación de género y especie, se utilizó una caracterización bioquímica de la siguiente manera: a) se preparó una suspensión bacteriana en solución salina 0,9% seguido de la siembra en agar citrato, medio SIM y en caldo rojo de metilo/Voges Proskauer (MR/VP); posteriormente se incubó en aerobiosis durante 24 horas a 37°C. Se identificó a la bacteria como E.coli si el resultado obtenido fue negativo en agar citrato, positivo para producción de indol, motilidad positiva en el medio SIM, positivo para el caldo MR y negativo para VP. Estos resultados se confirmaron mediante el uso de tarjetas de identificación Vitek 2 GN Cards REF 21341.

Crio-preservación de cepas de E.coli: las cepas identificadas como E.coli fueron almacenadas en criotubos en medio Brain Heart Infusion (BHI) en glicerol al 20% y conservadas a -80°C.

Antibiograma: para estudiar la susceptibilidad antibiótica, se incluyeron todas las cepas de E.coli que cumplieran los criterios de inclusión y de exclusión planteados. Se utilizaron antibióticos clínicamente útiles para el tratamiento de ITU y antibióticos indicadores de mecanismos de resistencia en el antibiograma: amoxicilina/ácido clavulánico, ampicilina/sulbactam, ampicilina, ceftazidima, ácido nalidixico, ciprofloxacina, levofloxacina, norfloxacina, ceftriaxona, cefuroxima, cefazolina, cefepima, gentamicina, fosfomicina, nitrofurantoina, ertapenem, meropenem, imipenem, trimetoprim/sulfametoxazol, piperacilina/tazobactam, tobramicina. Para determinar la susceptibilidad, se usaron colonias puras obtenidas a partir del cultivo en agar sangre al 5%. Las colonias fueron suspendidas en cloruro de sodio al 0,9% a concentración de 0,5 en la escala McFarland. A partir de las suspensiones bacterianas obtenidas se siguieron dos procesos: a) técnica de Kirby Bauer (difusión en+ discos) que requirió la inoculación de la suspensión bacteriana de cada aislado en una placa de medio Muller Hinton, a la que se colocaron los discos de forma estratégica para detectar mecanismos

de resistencia tipo β -lactamasas de espectro extendido (método de doble disco) y b) determinación de la concentración mínima inhibitoria (CIM) de acuerdo a los parámetros indicados por el fabricante (Vitek² Compact bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). La lectura de los cultivos se realizó conforme a las normas del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) del 2016.

Análisis estadístico: el análisis estadístico usó el programa WhoNet 5.6 (Who Collaborating Centre for Surveillance of Antimicrobial Resistance Boston, Massachusetts, versión de junio de 2006).

Resultados

Se recolectaron 335 muestras de orina entre los meses de febrero y mayo de 2016; noventa especímenes (26,9%) tuvieron un recuento significativo (mayor a 105 ufc/ml) en el urocultivo. El microorganismo

identificado mayoritariamente fue E.coli (75 aislados, 83%), seguido de Klebsiella spp (5 aislados, 6%), Proteus mirabilis (3 aislados, 4%), Acinetobacter Iwoffii (2 aislados, 2%), Serratia marcescens (2 aislados, 2%), Salmonella spp (2 aislados, 2%) y Shigella sonnei (1 aislado, 1%). De los 75 aislados identificados como E.coli, 15 fueron descartados por tratarse de muestras repetidas de la misma paciente o porque no provenir de las comunidades nativas amerindias Kichwas sujetas a estudio. Un total de 60 aislados con urocultivo positivo fueron sometidos a ensayos de susceptibilidad AST. El mayor número de casos provino de la comunidad de Guamote (28 pacientes, 46,7%), predominantemente de mujeres, donde se observó el mayor número de casos (57 pacientes, 95%) con un rango de edad entre 11 a 20 años (17 pacientes, 28,3%). La distribución por lugar de recolección de muestra y por grupos de edad se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Distribución de los urocultivos positivos por hospital y centro de salud, y grupos de edad

Institución	n°/%	Sexo (n°/%)	n° de pacientes por rango de edad/%						
			11 - 20 años	21 - 30 años	31 - 40 años	41 - 50 años	51 - 60 años	61 - 70 años	71 - 80 años
H. Colta	17/28,3	M (2/3)	-	-	-	-	-	1/1,7	1/1,7
		F (15/25)	3/5,0	4/6,7	-	1/1,7	1/1,7	4/6,7	2/3,3
H.B. Guamote	28/46,7	M (1/2)	-	1/1,7	-	-	-	-	-
		F (27/45)	10/16,7	4/6,7	7/11,7	4/6,7	1/1,7	-	1/1,7
C.S. Zumbahua	5/8,3	M (-/-)	-	-	-	-	-	-	-
		F (5/8)	-	1/1,7	1/1,7	3/5,0	-	-	-
H. Zumbahua	10/16,7	M (-/-)	-	-	-	-	-	-	-
		F (10/17)	4/6,7	2/3,3	1/1,7	1/1,7	-	1/1,7	1/1,7
Total	60/100	M (3/5)	17/28,3	12/20	9/15	9/15	2/3,3	6/10,0	5/8,3
		F (57/95)							

Fuente: Historia clínica
Elaboración: Autores



Los resultados de susceptibilidad antibiótica revelaron que la resistencia a los fármacos era: 56,7% al trimetoprim/ sulfametoxazol, 52,5% a ampicilina, 43,3% al ácido nalidixico, 32,5% a ciprofloxacina, 28,3% a norfloxacina, 26,7% a ampicilina/sulbactam, 25% a levofloxacina, 17,5% a cefoxitina, 15,85% a

cefazolina, 15% a cefuroxima, ceftazidima, cefotaxima, ceftriaxona y cefepima, 7,5% a gentamicina, 7,5% a nitrofurantoina, 6,7% a tobramicina, 3,3% a amoxicilina/ácido clavulánico y piperacilina/tazobactam, 1,7% a fosfomicina y no existió resistencia a meropenem, imipenem y ertapenem. (Tabla 2).

Tabla 2. Distribución de las tasas de resistencia encontradas en las 60 cepas analizadas.

Antibiótico	%R	%I	%S
Ampicilina	52,5	1,7	45,85
Amoxicilina/Ácido clavulánico	3,3	5	91,7
Ampicilina/Sulbactam	26,7	18,3	55
Piperacilina/Tazobactam	3,3	0	96,7
Cefazolina	15,85	0	84,15
Cefuroxima	15	0	85
Ceftazidima	15	0	85
Cefotaxima	15	0	85
Ceftriaxona	15	0	85
Cefoxitina	17,5	1,7	80,85
Cefepima	15	0	85
Meropenem	0	0	100
Ertapenem	0	0	100
Imipenem	0	0	100
Gentamicina	7,5	0,85	91,65
Tobramicina	6,7	3,3	90
Ácido nalidixico	43,3	3,3	53,3
Ciprofloxacina	32,5	1,65	65,8
Levofloxacina	25	6,65	68,35
Norfloxacina	28,3	3,3	68,3
Trimetoprim/Sulfametoxazol	56,7	0,85	42,5
Nitrofurantoina	7,5	6,65	85,85
Fosfomicina	1,7	0	98,3

R: resistente; I: intermedio; S: sensible (CLSI 2016)
La tabla está realizada en función de grupos farmacológicos

Fuente: Resultados de laboratorio
Elaboración: Autores

Los perfiles de resistencia mostraron 14 aislados (23,3%) que no tuvieron resistencia a ninguno de los antibióticos usados en este estudio y 29 aislados con perfiles fenotípicos de resistencia antibiótica diferentes, 32 aislados (53,3%) fueron productores de betalactamasas, 7 aislados (12%) fueron productoras de BLEE, las cuales mantenían susceptibilidad a carbapenémicos, y 2 aislados (3,3%) presentaron un perfil fenotípico compatible con hiperproducción de AmpC, en relación a la resistencia encontrada a la cefoxitina y a las cefalosporinas de tercera generación.

En base a los perfiles de resistencia se clasificaron a 18 aislados, (30%), fueron clasificados como MDR (moderadamente resistente) y uno aislado (1,6%) como posible XDR (extensivamente resistente). Tabla 3.

Discusión

El 27% de las muestras estudiadas fueron positivas para ITU. Este alto porcentaje guarda concordancia con las tasas encontradas en otros estudios a nivel mundial.^{3,9-12} De igual manera y como se describe en otras revisiones^{3,4,13,14} *E. coli* se presentó como el principal agente etiológico de ITU (83%) seguido por *Klebsiella* spp y *Proteus mirabilis*¹⁵⁻¹⁹. Es importante destacar que en el presente estudio se aislaron otros microorganismos capaces de producir ITU (*Acinetobacter woffii*, *Serratia marcescens* y *Salmonella* spp), los cuales son de importancia clínica como se menciona en diversas investigaciones^{7,20-24}. La mayoría de los casos de ITU correspondieron al sexo femenino (95%), concordante con los datos reportados anteriormente^{1,3,7,9}. El embarazo, edad de inicio de la vida sexual, actividad sexual, cambio de pH de la orina, atrofia urogenital en la menopausia y condiciones anatómicas de la mujer, se presentan como las principales causas que predisponen a una ITU, que conducen a la colonización de la uretra por enterobacterias desencadenando una ITU^{1,3,7-9,25-27}.

Se observaron tres (5%) casos de ITU en varones; dos sujetos (3%) con edades entre 60 a 80 años, característica descrita en la bibliografía que señala la mayor edad y presencia de comorbilidades como los principales factores de riesgo para el desarrollo de ITU^{15,26,28}. Además, se encontró un paciente masculino entre 21 y 30 años que presentó ITU, lo cual amerita un estudio más exhaustivo para determinar la causa de su infección. En cuanto a los perfiles de susceptibilidad, el estudio reveló que los mayores porcentajes de resistencia presentan la asociación trimetoprim /sulfametoxazol, ampicilina, ciprofloxacina^{7,29-38}, ampicilina/sulbactam y cefalosporinas con el 57%, 52%, 32,5%, 27% y 15% respectivamente. Se encontró menos del 20% de resistencia para antibióticos como cefalosporinas, amoxicilina/ácido clavulánico,

piperacilina/tazobactam, carbapenémicos y gentamicina, lo que se asemeja a los resultados obtenidos en otros estudios^{7,29-33}. En general, se presentan altas tasas de resistencia antibiótica, las cuales se pueden atribuir a un tratamiento antibiótico previo por otras noxas. La sensibilidad a la cefazolina mayor al 80% indica la posibilidad de utilizar cefalosporinas de administración oral en el caso de necesitarlo (cefalexina o cefuroxima). Concuerdan con otros estudios^{7,11,39}, una baja tasa de resistencia a nitrofurantoina y fosfomicina 7% y 2% respectivamente. A pesar de las limitaciones del estudio en términos del número de pacientes y cultivos aislados, los perfiles de susceptibilidad-resistencia son determinantes, por lo que se sugiere el tratamiento empírico con nitrofurantoina o fosfomicina. Debe considerarse que a futuro la resistencia mediada por plásmidos podría ser un importante determinante de resistencia a la nitrofurantoina, medicamento clave para el tratamiento de infecciones de tracto urinario sin complicaciones⁴⁰.

Al optar por terapia parenteral en casos graves, se sugiere el uso de gentamicina (alta sensibilidad, del 92%). Se sugiere la vigilancia de la resistencia bacteriana a fin de evitar el desarrollo de resistencias.

Conclusión

Se encontró ITU en el 27% de la población estudiada. De acuerdo a los perfiles AST encontrados en las poblaciones investigadas, los fármacos de primera línea que podrían prescribirse en casos de ITU serían: fosfomicina, nitrofurantoina (excepto en el tercer trimestre de embarazo y sobre 37 semanas de gestación), amoxicilina/ácido clavulánico y gentamicina. Un segundo grupo de antibióticos sugerido incluye cefuroxima, ceftazidima, cefotaxima, ceftriaxona, cefazolina y cefoxitina. Se sugiere no prescribir trimetoprim/sulfametoxazol, ciprofloxacina, norfloxacina, levofloxacina, ampicilina y ampicilina/sulbactam por la alta resistencia encontrada. El trimetoprim/sulfametoxazol está contraindicado en el primer y tercer trimestres de embarazo; no se recomienda prescribir ciprofloxacina, norfloxacina y levofloxacina por la resistencia que presentan y por estar contraindicadas las quinolonas en el embarazo; se evitará prescribir ampicilina y la combinación ampicilina/sulbactam por la alta resistencia encontrada.

Estos resultados no son concluyentes en vista que la resistencia a antibióticos se modifica notablemente por auto-prescripción y por la movilidad y migración. Si bien es cierto que las tasas de resistencia a antibiótico, en términos generales, es menor en las comunidades nativas amerindias Kichwas comparado con grupos poblacionales de grandes centros urbanos, se recomienda mantener estudios de este tipo

Tabla 3. Distribución del perfil de resistencia de las 60 cepas analizadas en este estudio

Cepa	Mecanismos de resistencia	Clasificación
n % Perfil de resistencia	Beta-lactamas BLE Am pC	A B C
1 2 -	-	- - -
4 3	-	- - -
3 5 NAL	-	- - -
1 1 SXT	-	- - -
1 1 NIT	-	- - -
1 1 AMP	-	- - -
1 1 SXT NAL	-	- - -
1 1 CZO FOX	-	- - -
3 5 AMP SAM	+	- - -
1 1 NIT SXT NAL	+	- - -
1 1 AMP SXT NAL	+	- - -
9 1 AMP SAM SXT	+	- - -
5		
1 1 LVX SXT NAL NOR	-	- - -
1 1 CIP LVX NAL NOR	-	- - -
2 3 CIP LVX SXT NAL NOR	-	- - -
1 1 TPZ CIP LVX NAL NOR	+	- - -
2 3 AMP SAM NIT SXT NAL	+	- - -
1 1 AMP CIP LVX NIT SXT NAL	+	- - -
1 1 FOX CIP LVX NIT SXT NAL NOR	-	- - -
3 5 AMP SAM CIP LVX SXT NAL NOR	+	- - -
1 1 AMP SAM CIP LVX NIT SXT NAL NOR	+	- - -
1 1 AMP SAM GEN TOB CIP LVX NIT SXT NAL NOR	+	- - -
1 1 AMP GEN TOB CIP LVX NIT SXT NAL NOR	+	- - -
2 3 CTX CXM AMC AMP SAM CZO FOX CAZ CRO FEP SXT	+	- - -
1 1 CTX CXM AMP CZO FOX CAZ CRO FEP CIP LVX SXT NAL NOR	+	- - -
1 1 CTX CXM AMC AMP SAM CZO FOX CAZ CRO FEP CIP LVX NIT SXT NAL NOR	+	- - -
1 1 CTX CXM AMC AMP SAM CZO FOX CAZ CRO FEP TOB CIP LVX SXT NAL NOR	+	- - -
1 1 FOS CTX CXM AMP SAM CZO FOX CAZ CRO FEP CIP LVX NIT SXT NAL NOR	+	- - -
1 1 CTX CXM AMP SAM CZO FOX CAZ CRO FEP GEN TOB CIP LVX NIT SXT NAL NOR	+	- - -
1 1 CTX CXM AMP SAM TPZ CZO FOX CAZ CRO FEP TOB CIP LVX NIT SXT NAL NOR	+	- - -
1 1 CTX CXM AMC AMP SAM CZO FOX CAZ CRO FEP GEN TOB CIP LVX SXT NAL NOR	+	- - -

β-lactamasa+: cepa que hidroliza aminopenicilinas y carboxipenicilinas.

BLEE (β-lactamasa de espectro extendido)+: cepa capaz de hidrolizar a casi la totalidad de cefalosporinas manteniendo sensibilidad a cefamicinas, inhibidores de β-lactamasas y carbapenémicos.

AmpC (hiperproducción de cefalosporinas cromosómicas clase C)+: cepa capaz de hidrolizar todos los β-lactámicos excepto carbapenémicos.

A: MDR multidrogo-resistente (cepa resistente a un antibiótico de 3 o más familias).

B: XDR extensivamente resistente (cepa resistente por lo menos a 1 antibiótico de cada familia, con susceptibilidad a 2 o menos antibióticos de cada familia).

C: PDR panresistente (cepa resistente a todas las familias de antibióticos).

Clave: NAL (ácido nalidixico); SXT (sulfametoxazol/trimetoprim); NIT (nitrofurantoin AMP (ampicilina); CZO (cefazolina); FOX (cefotaxima); SAM (ampicilina/sulbatam); LVX (levofloxacina); NOR (norfloxacina); CIP (ciprofloxacina); TPZ (piperacilina/tazobactam); GEN (gentamicina); TOB (tobramicina); CTX (cefotaxima); CXM (cefuroxima); AMC (amoxicilina/ác. clavulánico); CZO (cefazolina); CAZ (ceftazidima); CRO (ceftriaxona); FEP (cefepima).

Fuente: resultados de laboratorio.

Elaboración: autores.

en poblaciones de características similares, a fin de monitorear patrones de susceptibilidad/resistencia como guía para el manejo clínico. Se insiste en el uso racional de antibióticos, empleando fármacos con menor resistencia en casos de ITU y de forma selectiva restringiendo el uso de quinolonas por la gran variabilidad de mutaciones genéticas que se presentan y que son transmitidas a fármacos de otras familias.

La elevada prevalencia de ITU, la multiplicidad de uropatógenos aislados, la identificación de grupos de mayor riesgo y la diversidad de perfiles de resistencia antibiótica, evidencian la necesidad de implementar estudios locales que orienten acciones de salud y vigilancia epidemiológica, acorde a las particularidades de cada población.

El documento constituye un aporte al conocimiento de los patrones de resistencia a distintos antibióticos que facilita el mejor manejo clínico de ITU, patología en la que el tratamiento farmacológico es un desafío para los médicos.

Contribución de los autores

El protocolo de investigación y el diseño de la misma, la recolección de datos, el análisis estadístico, la valoración e interpretación de los datos, el análisis crítico, la discusión, la redacción y la aprobación del manuscrito final fueron realizados por todos los autores quienes contribuyeron de igual forma en todo el proceso. El autor correspondiente representa al colectivo de autores.

Disponibilidad de datos y materiales

Los datos que sustentan este manuscrito están disponibles bajo requisición al autor correspondiente.

Referencias

1. Mohsen Tabasi, Mohammad Reza Asadi Karam, Mehri Habibi, et al. Phenotypic assays to determine virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) isolates and their correlation with antibiotic resistance pattern. *Osong Public Health Res Perspect* 2015; 6(4):261-268.
2. Ulett G, Totsika M, Schaale K, et al. Uropathogenic *Escherichia coli* virulence and innate immune responses during urinary tract infection. *Microbiology* 2013; 16:100-107.
3. Sivick KE, Mobley HL. Waging war against uropathogenic *Escherichia coli*: winning back the urinary tract. *Infect Immun* 2010; 78:568-85.
4. Miranda Estrada L, Ruiz Rosas M, Molina López J, et al. Relación entre factores de virulencia, resistencia a antibióticos y los grupos filogenéticos de *Escherichia coli* uropatógena en dos localidades de México. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Disponible en: <http://doi.org/10.1016/j.eimc.2016.02.021>
5. Navarro F, Miró E, Mirelis B. Lectura interpretada del antibiograma de enterobacterias. *NOMBRE REVISTA* 2010; 28(9):638-645.
6. Zurita J. E. coli urinario: tendencia de la resistencia en el Ecuador desde 1999 al 2007. *Revista Ecuatoriana de Ginecología y Obstetricia* 2009; 14(1-2): .
7. Medina Polo J, Guerrero Ramos F, Pérez Cadavid S, et al. Infecciones urinarias adquiridas en la comunidad que requieren hospitalización: factores de riesgo, características microbiológicas y resistencia a antibióticos. *Actas Urológicas Españolas* 2015; 39(2):104-111.
8. Gálvez San Román JL, Jiménez Hidalgo C, Portillo Cano MM, et al. Características y cambios epidemiológicos

Consentimiento para publicación

La identidad de los individuos participantes en el estudio es anónima y confidencial, por lo que no se obtuvo un consentimiento específico para su publicación.

Aprobación ética y consentimiento

El protocolo y el consentimiento fueron aprobados.

Financiamiento

Los recursos fueron provistos por los autores.

Conflicto de interés

Los autores NO reportan conflicto de interés alguno.

Agradecimientos

Los autores reconocen la colaboración valiosa prestada por la Dra. Anita Villafuerte Directora del Hospital Claudio Benati de Zumbahua, del T. Med. José Álvarez y de la Lcda. Maricela Guanotuña laboratoristas de este hospital. Del Dr. Franklin Agualongo, y de la Dra. Karina Ganchala directores del Centro de Salud Tipo B de Zumbahua, y de la Lcda. Mayra Lara laboratorista de este centro. De la Dra. Gladys Mera, del Dr. Héctor Lazo Directores del Hospital de Colta, y del Lcdo. Paúl Velásquez laboratorista de este hospital. De la Dra. Érika Sánchez directora del hospital de Guamote y del MSc. Lcdo. Rodolfo Chicaiza laboratorista de este hospital. No podemos dejar de mencionar la colaboración brindada por los profesionales de la salud de estas unidades médicas

- de los pacientes con infección del tracto urinario en los servicios de urgencias hospitalarios. <http://dx.doi.org/10.4321/S1137-6627/2016000100005>
9. Foxman B. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Disease-a-month* 2003; 49(2):53-70.
 10. Marlene J, Camulombo C, Alvarez BR, et al. Evaluación de la resistencia antimicrobiana de cepas de *Escherichia coli* causantes de infecciones urinarias en la provincia de Huambo, Angola. *Revista Cubana de Ciencias Biológicas* 2015; 4(2):71-77.
 11. Blanco VM, et al. Prevalence and risk factors for urinary tract infections start in the community caused by *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases in Colombia. *Enferm Infec Microbiol Clin* 2016; 34(9):559-565.
 12. Betrán A, Cortés AM. Evaluación de la resistencia antibiótica de *Escherichia coli* en infecciones urinarias adquiridas en la comunidad del Sector Sanitario de Barbastro (Huesca). *Rev Esp Quimioter* 2015; 28(5):263-266.
 13. Millán Ysheth, Hernández Erick, Millán Beatriz, et al. Distribución de grupos filogenéticos y factores de virulencia en cepas de *Escherichia coli* uropatógena productora de β -lactamasa CTX-M-15 aisladas de pacientes de la comunidad en Mérida, Venezuela. *Revista Argentina de Microbiología* 2014; 46(3): 175-181.
 14. Orrego Marin C, Henao-Mejia C, Cardona-Arias J. Prevalencia de infección urinaria, uropatógenos y perfil de susceptibilidad antimicrobiana. *Acta Med Colomb* 2014; 39:352-358.
 15. Páramo Rivas F, Tovar Serrano A, Rendón Macías M. Resistencia antimicrobiana en pacientes con infección de vías urinarias hospitalizados en el servicio de Medicina Interna del Nuevo Sanatorio Durango, de enero a diciembre de 2013. *Med Int Mex* 2015; 31:34-40.
 16. Martínez P, Garzón D, Mattar S. CTX-M-*Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* aislados de infecciones de las vías urinarias adquiridas en la comunidad en Valledupar, Colombia. *Braz J Infect Dis* 2012; 16(5):420-5.
 17. Bartolini A, Sennati S, et al. Sensibilidad a los antimicrobianos y determinantes de resistencia emergentes (blaCTX-M, rMTB, fosA3) en aislados clínicos de las infecciones del tracto urinario en el Chaco boliviano. *International Journal of Infectious Diseases* 2016. 43:1-6.
 18. Alves M, Lins G, Medeiros A, et al. Antibiotic resistance patterns of urinary tract infections in a north-eastern Brazilian capital. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 2016; 58:2.
 19. Arana D, Rubio M, Alós J. Evolution of antibiotic multiresistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from urinary tract infections: a 12 years analysis (2003-2014). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 2017; 35(5):293-298.
 20. Visca P, Seifert H, Townner KJ. *Acinetobacter* infection-an emerging threat to human health. *IUBMB Life* 2011; 63(12):1048-1054.
 21. Shio-Shin J, et al. Epidemiology and antimicrobial susceptibility profiles of pathogens causing urinary tract infections in the Asia-Pacific region: results from the study for monitoring antimicrobial resistance trends (SMART), 2010-2013. *Int J Antimicrob Agents* 2016; 47(4):328-334.
 22. Méndez Y, Caicedo E, Guio S, et al. Caracterización clínica de infecciones de vías urinarias producidas por enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido en Duitama (Colombia), durante 2010-2015. *Infectio* 2017; 21(1):15-18.
 23. Kow N, Holthaus E, Barber M. Bacterial uropathogens and antibiotic susceptibility of positive urine cultures in women with pelvic organ prolapse and urinary incontinence. *Neurourology and Urodynamics* 2016; 35:69-73.
 24. Guevara N, Guzmán M, Merentes A, et al. Patrones de susceptibilidad antimicrobiana de bacterias gramnegativas aisladas de infecciones del tracto urinario en Venezuela: resultados del estudio SMART 2009-2012. *Rev Chilena Infectol* 2015; 32 (6):639-648.
 25. GPC 2013. Infección de vías urinarias en el embarazo. Ministerio de Salud Pública.
 26. Martínez E, et al. Infecciones del tracto urinario bajo en adultos y embarazadas: consenso para el manejo empírico. *Infectio* 2013; 17(3):122-135.
 27. Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia. Protocolo SEGO. Infección urinaria y gestación (actualizado febrero 2013). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pog.2013.09.001>
 28. Lau SM, Peng MY, Chang FY. Resistance rates to commonly used antimicrobials among pathogens of both bacteremic and non-bacteremic community-acquired urinary tract infection. *J Microbiol Immunol Infect* 2004; 37:185-191.
 29. Alvaro M. Perfil microbiológico y resistencia bacteriana de infecciones del tracto urinario adquiridas en la

- comunidad en pacientes ambulatorios del Hospital Nacional Daniel Alcides Carrión, Callao-Perú [Tesis]. Lima: Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2002.
30. Kahlmeter G, Ahman J, Matuschek E. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* causing uncomplicated urinary tract infections: a european update for 2014 and comparison with 2000 and 2008. *Infect Dis Ther* 2015; 4:417-423.
 31. Troya C, Herrera D, Guevara A, et al. Monitoreo local de resistencia a los antibióticos en *Escherichia coli* en una zona rural del Ecuador: más allá del modelo biomédico. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.23936/pfr.v1i1.128.g190>
 32. Seija V, et al. Factores asociados al desarrollo de infección urinaria de origen comunitario causada por *Escherichia coli* resistente a fluoroquinolonas. *Rev Chilena Infectol* 2014; 31(4):400-405.
 33. Salles M, Zurita J, Mejía C, Villegas M. Las infecciones resistentes gram-negativas en el ámbito ambulatorio en América Latina. *Epidemiol Infect* 2013; 141:2459-2472. doi:10.1017/S095026881300191X
 34. González R, García A, Mohedano R, et al. El papel de la reparación de roturas de doble cadena de ADN en *Escherichia coli* en la sensibilidad a quinolonas: implicaciones terapéuticas. *Rev Esp Quimioter* 2015; 28(3):139-144.
 35. Montañez-Valverde Raúl A, et al. Infección urinaria alta comunitaria por *E. coli* resistente a ciprofloxacina: características asociadas en pacientes de un hospital nacional en Perú. *An Fac Med*. 2015; 76(4):385-91.
 36. Oyebola Fasugba, et al. Resistencia a la ciprofloxacina en la comunidad y adquirida en el hospital *Escherichia coli* Infecciones del tracto urinario. Una revisión sistemática y meta-análisis de estudios observacionales. *BMC Infectious Diseases* 2015; 15:545.
 37. Gutiérrez P, et al. Eficacia y seguridad de la ciprofloxacina en el tratamiento de las infecciones de las vías urinarias (IVU) en adultos: revisión sistemática con metaanálisis. *Gac Med Mex* 2015; 151:225-244.
 38. Rattanaumpawan P, Tolomeo P, Bilker WB, Fishman NO, Lautenbach E. Risk factors for fluoroquinolone resistance in gram-negative bacilli causing healthcare-acquired urinary tract infections. *J Hosp Infect* 2010; 76(4):324-327.
 39. Nisel Yilmaz, Neval Ağuş, Arzu Bayram, et al. Antimicrobial susceptibilities of *Escherichia coli* isolates as agents of community-acquired urinary tract infection (2008-2014). *Türk J Urol* 2016; 42(1):32-36.
 40. Pak-Leung Ho, Ka-Ying Ng, Wai-U Lo, et al. Plasmid-mediated OqxAB is an important mechanism for nitrofurantoin resistance in *Escherichia coli*. *Agents Chemother Antimicrob Agents Chemother* 2016; 60(1):537-543.

DIVULGACIÓN CIENTÍFICA
EN CONGRESOS

Ponencia 1:

- **W. Guamán**, R. Tamayo, F. Villavicencio, J. Villacís, M. Grijalva, J. Muñoz Bellido. Mecanismos Moleculares de Resistencia a Fluoroquinolonas en *E. coli* Uropatógenas aisladas de Población Nativa Amerindia Kichwa del Ecuador



Póster 1:

- **W. Guamán**, R. Tamayo, J. E. Villacís, J. Reyes, M. Grijalva, J. Torres, J. Muñoz Bellido. Resistencia a sulfametoxazol/trimetoprim, fluoroquinolonas, betalactámicos, nitrofurantoína y fosfomicina en *Escherichia coli* uropatógena causante de infecciones de tracto urinario (ITU) no complicadas, en población indígena del Ecuador.



Se deja constancia que

William Guaman

participó en calidad de

Asistente al Congreso Latinoamericano de Microbiología de Medicamentos y Cosméticos - CLAMME

Rosario, Santa Fe, Argentina. 26 al 30 de Septiembre de 2016

Marcelo Galas
Presidente ALAM-CAM

Hector Morbidoni
Presidente SLAMTB

Graciela Torno
Presidente CLAMME

Gustavo Giusiano
Presidente AAM

Manuel Gómez Carrillo
Presidente ALAM

Póster 2:

- **W. Guamán**, R. Tamayo, F. Villavicencio, J. Villacís, M. Grijalva, J. Muñoz Bellido. Resistencia antibiótica a Ciprofloxacina por mutaciones de los genes *gyrA*, *parC* y *parE* en cepas de *Escherichia coli* uropatógena aisladas de población nativa amerindia Kichwa de Ecuador



ANEXO

Anexo 1. Perfiles de resistencia por CIM encontrados en las 59 cepas de *E. coli* analizadas

Código	BLEE	AMP	AMC*	SAM	TZP	CZ	FOX	CAZ	CRO	FEP	ETP	IMP	GN	TOB	NA*	CIP	LEV	FOS*	NIT	SXT
Eco_001	NEG	4	25	<=2	<=4	<=4	<=4	<=1	<=1	<=1	<=0,5	<=0,25	<=1	<=1	24	<=0,25	<=0,12	31	<=16	<=20
Eco_002	NEG	<=2	25	<=2	<=4	<=4	<=4	<=1	<=1	<=1	<=0,5	<=0,25	<=1	<=1	22	0,5	<=0,12	31	64	<=20
Eco_003	NEG	<=2	25	<=2	<=4	<=4	<=4	<=1	<=1	<=1	<=0,5	<=0,25	<=1	<=1	30	0,5	<=0,12	31	<=16	<=20
Eco_004	NEG	>=32	12	>=32	8	>=64	>=64	16	16	<=1	<=0,5	<=0,25	<=1	<=1	26	0,5	<=12	29	<=16	>=320
Eco_005	NEG	<=2	22	<=2	<=4	<=4	<=4	<=1	<=1	<=1	<=0,50	<=0,25	<=1	<=1	6	0,5	4	25	<=16	>=320
Eco_006	NEG	>=32	21	>=32	<=4	<=4	<=4	<=1	<=1	<=1	<=0,5	<=0,25	<=1	<=1	28	0,5	<=0,12	26	<=16	>=320
Eco_007	NEG	8	27	<=2	<=4	<=4	<=4	<=1	<=1	<=1	<=0,50	<=0,25	<=1	<=1	6	0,5	0,5	32	<=16	<=2°
Eco_008	NEG	<=2	26	<=2	<=4	<=4	<=4	<=1	<=1	<=1	<=0,5	<=0,25	<=1	<=1	6	>=4	>=8	29	<=16	>=320
Eco_009	NEG	>=32	20	>=32	8	<=4	<=4	<=1	<=1	<=1	<=0,5	<=0,25	<=1	<=1	12	1	1	25	64	>=320
Eco_010	NEG	>=32	20	>=32	<=4	<=4	<=4	<=1	<=1	<=1	<=0,5	<=0,25	<=1	<=1	15	0,5	1	25	64	>=320
Eco_011	NEG	>=32	20	8	<=4	<=4	<=4	<=1	<=1	<=1	<=0,5	<=0,25	<=1	<=1	6	<=0,25	0,5	25	<=16	>=320
Eco_012	NEG	>=32	21	>=32	<=4	<=4	<=4	<=1	<=1	<=1	<=0,5	<=0,25	<=1	<=1	25	<=0,25	<=0,12	27	<=16	>=320
Eco_013	NEG	4	22	<=2	<=4	<=4	<=4	<=1	<=1	<=1	<=0,50	<=0,25	<=1	<=1	25	0,5	<=0,12	25	<=16	<=20
Eco_014	NEG	>=32	23	4	<=4	<=4	<=4	<=1	<=1	<=1	<=0,50	<=0,25	<=1	<=1	6	>=4	4	28	64	>=320
Eco_015	NEG	>=32	21	>=32	<=4	<=4	<=4	<=1	<=1	<=1	<=0,50	<=0,25	<=1	<=1	24	0,5	<=0,12	23	<=16	>=320
Eco_016	NEG	>=32	21	16	<=4	<=4	<=4	<=1	<=1	<=1	<=0,5	<=0,25	<=1	<=1	6	>=4	>=8	29	<=16	>=30
Eco_017	NEG	<=2	23	<=2	>=128	<=4	<=4	<=1	<=1	<=1	<=0,5	<=0,25	<=1	<=1	6	>=4	>=8	27	<=16	<=20
Eco_018	NEG	>=32	23	>=32	<=4	<=4	<=4	<=1	<=1	<=1	<=0,5	<=0,25	<=1	<=1	31	<=0,25	<=0,12	28	<=16	>=320
Eco_019	NEG	4	22	<=2	<=4	<=4	16	<=1	<=1	<=1	<=0,50	<=0,25	<=1	<=1	6	>=4	>=8	38	64	>=320
Eco_020	NEG	<=2	25	<=2	<=4	<=4	<=4	<=1	<=1	<=1	<=0,50	<=0,25	<=1	<=1	6	>=4	4	30	<=16	<=20
Eco_021	NEG	>=32	21	16	<=4	<=4	<=4	<=1	<=1	<=1	<=0,5	<=0,25	<=1	<=1	26	<=0,25	<=0,12	26	<=16	<=20
Eco_022	NEG	>=32	22	16	<=4	<=4	<=4	<=1	<=1	<=1	<=0,5	<=0,25	<=1	<=1	6	>=4	4	27	64	>=320
Eco_023	NEG	>=32	22	16	<=4	<=4	<=4	<=1	<=1	<=1	<=0,5	<=0,25	<=1	<=1	27	<=0,25	<=0,12	26	<=16	>=320
Eco_024	NEG	4	23	<=2	<=4	<=4	<=4	<=1	<=1	<=1	<=0,5	<=0,25	<=1	<=1	25	<=0,25	<=0,12	27	<=16	<=20
Eco_025	NEG	16	24	<=2	<=4	<=4	<=4	<=1	<=1	<=1	<=0,5	<=0,25	<=1	<=1	25	<=0,25	<=0,12	26	<=16	<=20
Eco_026	NEG	4	21	4	<=4	<=4	<=4	<=1	<=1	<=1	<=0,5	<=0,25	<=1	<=1	23	<=0,25	<=0,12	28	32	<=20
Eco_027	POS	>=32	17	16	16	>=64	16	16	>=64	>=64	<=0,5	<=0,25	<=1	<=1	6	>=4	4	30	128	>=320
Eco_028	NEG	<=2	26	<=2	<=4	<=4	<=4	<=1	<=1	<=1	<=0,5	<=0,25	<=1	<=1	28	<=0,25	<=0,12	26	32	<=20

Eco_029	NEG	<=2	23	<=2	<=4	<=4	<=4	<=1	<=1	<=1	<=0,5	<=0,25	<=1	<=1	6	>=4	>=8	26	<=16	>=320
Eco_030	POS	>=32	16	>=32	8	>=64	<=4	16	>=64	>=64	<=0,5	<=0,25	>=16	>=16	6	>=4	>=8	17	<=16	>=320
Eco_031	NEG	>=32	21	16	<=4	<=4	<=4	<=1	<=1	<=1	<=0,5	<=0,25	<=1	<=1	28	<=0,25	<=0,12	26	<=16	>=320
Eco_032	NEG	4	23	<=2	<=4	<=4	<=4	<=1	<=1	<=1	<=0,5	<=0,25	<=1	<=1	24	<=0,25	<=0,12	25	<=16	<=20
Eco_033	NEG	<=2	24	<=2	<=4	<=4	<=4	<=1	<=1	<=1	<=0,5	<=0,25	<=1	<=1	11	<=0,25	0,5	38	128	>=320
Eco_034	NEG	>=32	18	>=32	<=4	<=4	<=4	<=1	<=1	<=1	<=0,5	<=0,25	<=1	<=1	22	<=0,25	<=0,12	25	<=16	>=320
Eco_035	NEG	>=32	21	>=32	<=4	<=4	<=4	<=1	<=1	<=1	<=0,5	<=0,25	<=1	<=1	28	<=0,25	<=0,12	26	<=16	>=320
Eco_036	NEG	>=32	12	>=32	8	>=64	>=64	16	16	<=1	<=0,5	<=0,25	<=1	<=1	27	<=0,25	<=0,12	34	32	>=320
Eco_037	NEG	<=2	24	<=2	<=4	<=4	8	<=1	<=1	<=1	<=0,5	<=0,25	<=1	<=1	30	<=0,25	<=0,12	28	<=16	<=20
Eco_038	NEG	<=2	25	<=2	<=4	<=4	<=4	<=1	<=1	<=1	<=0,5	<=0,25	<=1	<=1	6	<=0,25	1	27	<=16	<=20
Eco_039	NEG	>=32	24	4	<=4	<=4	<=4	<=1	<=1	<=1	<=0,5	<=0,25	>=16	>=16	6	>=4	>=8	28	64	>=320
Eco_040	POS	>=32	15	>=32	16	>=64	<=4	<=1	8	<=1	<=0,5	<=0,25	<=1	>=16	6	>=4	>=8	27	<=16	>=320
Eco_041	NEG	<=2	26	<=2	<=4	<=4	<=4	<=1	<=1	<=1	<=0,5	<=0,25	<=1	<=1	27	<=0,25	<=0,12	27	<=16	<=20
Eco_042	NEG	<=2	26	<=2	<=4	<=4	<=4	<=1	<=1	<=1	<=0,5	<=0,25	<=1	<=1	28	<=0,25	<=0,12	28	<=16	<=20
Eco_043	NEG	>=32	20	16	<=4	<=4	<=4	<=1	<=1	<=1	<=0,5	<=0,25	<=1	<=1	22	<=0,25	<=0,12	30	<=16	<=20
Eco_044	NEG	4	20	<=2	<=4	<=4	<=4	<=1	<=1	<=1	<=0,5	<=0,25	<=1	<=1	17	<=0,25	0,25	25	<=16	>=320
Eco_045	NEG	>=32	20	16	<=4	<=4	<=4	<=1	<=1	<=1	<=0,5	<=0,25	<=1	<=1	6	>=4	>=8	25	<=16	>=320
Eco_046	NEG	>=32	20	16	4	<=4	<=4	<=1	<=1	<=1	<=0,5	<=0,25	<=1	<=1	24	<=0,25	<=0,12	25	<=16	>=320
Eco_048	NEG	8	18	4	<=4	>=64	>=64	<=1	<=1	<=1	<=0,5	<=0,25	<=1	<=1	21	<=0,25	<=0,12	35	<=16	<=20
Eco_049	NEG	<=2	24	<=2	<=4	<=4	<=4	<=1	<=1	<=1	<=0,5	<=0,25	<=1	<=1	29	<=0,25	<=0,12	39	<=16	<=20
Eco_050	POS	>=32	21	4	<=4	>=64	16	<=1	8	<=1	<=0,5	<=0,25	<=1	<=1	6	>=4	>=8	26	<=16	>=320
Eco_051	NEG	>=32	20	16	<=4	<=4	<=4	<=1	<=1	<=1	<=0,5	<=0,25	<=1	<=1	6	>=4	>=8	26	<=16	>=320
Eco_052	NEG	4	22	4	<=4	<=4	<=4	<=1	<=1	<=1	<=0,5	<=0,25	<=1	<=1	13	<=0,25	1	28	<=16	<=20
Eco_053	NEG	>=32	20	16	<=4	<=4	<=4	<=1	<=1	<=1	<=0,5	<=0,25	>=16	8	6	>=4	>=8	28	<=16	<=20
Eco_054	NEG	<=2	23	<=2	<=4	<=4	<=4	<=1	<=1	<=1	<=0,5	<=0,25	<=1	<=1	19	<=0,25	1	29	<=16	>=320
Eco_055	NEG	8	19	4	<=4	<=4	<=4	<=1	<=1	<=1	<=0,5	<=0,25	<=1	<=1	21	<=0,25	<=0,12	24	<=16	<=20
Eco_056	NEG	>=32	20	>=32	<=4	<=4	<=4	<=1	<=1	<=1	<=0,5	<=0,25	<=1	<=1	24	<=0,25	<=12	26	<=16	<=20
Eco_057	POS	>=32	18	>=32	16	>=64	>=64	>=64	>=64	8	<=0,5	<=0,25	>=16	8	6	>=4	>=8	25	128	>=320
Eco_058	NEG	4	24	<=2	<=4	<=4	<=4	<=1	<=1	<=1	<=0,5	<=0,25	<=1	<=1	25	<=0,25	<=0,12	27	<=16	<=20
Eco_059	POS	>=32	19	>=32	<=4	>=64	8	<=1	>=64	2	<=0,5	<=0,25	4	2	6	>=4	>=8	6	64	>=320
Eco_060	NEG	<=2	24	<=2	<=4	<=4	<=4	<=1	<=1	<=1	<=0,5	<=0,25	<=1	<=1	27	<=0,25	<=0,12	27	<=16	<=20

*: Valores obtenidos por difusión de disco; AMP: Ampicilina; AMC: Amoxicilina/Ácido clavulánico; SAM: Ampicilina/Sulbactam; TZP: Piperacilina/Tazobactam; CZ: Cefazolina; FOX: Cefoxitina; CAZ: Ceftazidima; CRO: Ceftriaxona; FEP: Cefepime; ETP: Ertapenem; IMP: Imipenem; GN: Gentamicina; TOB: Tobramicina; NA: Ácido Nalidíxico; CIP: Ciprofloxacina; LEV: Levofloxacina; SXT: Trimetoprim/Sulfametoxazol; FOS: Fosfomicina; NIT: Nitrofurantoina; En amarillo: cepas sensibles a todos los antimicrobianos; En verde: cepas con fenotipo de producción de penicilinasas; En rojo: cepas con fenotipo de hiperproducción de ampC; En violeta: cepas con resistencia a quinolonas; En celeste: cepas productoras de BLEE; En marrón: cepas resistentes a NIT; En gris: cepas resistentes a SXT; En azul: cepas resistentes a TOB; En naranja: cepas con sensibilidad disminuida.

Fuente: Resultados de laboratorio

Elabración: Autor

Anexo 2. Características de laboratorio de las 59 cepas de *E. coli* analizadas

Cod. Lab	Edad	HCL	CI	Hospital/Centro de Salud	Nitritos	Leucocitos	Bacterias	Otros	Cultivo (24 h + Ac. B)	Código
C-003	17	1071	606273803	HB. Guamote	-	-	+++		>100.000 UFC/ml	Eco_001
C-008	49	5194	501810717	CS Zumbahua	+	+++	+++		>100.000 UFC/ml	Eco_002
C-012	30	68549	604032201	HB. Guamote	+	+++	+++		>100.000 UFC/ml	Eco_003
C-013	72	3605	600598759	HB. Guamote	+	+++	+++		>100.000 UFC/ml	Eco_004
C-015	18	34428	605020437	HB. Guamote	-	-	++		>100.000 UFC/ml	Eco_005
C-016	41	8066	602691495	HB. Guamote	-	-	++		>100.000 UFC/ml	Eco_006
C-021	67	6458	502712532	H. Zumbahua	+	+++	+++		>100.000 UFC/ml	Eco_007
C-035	45	65	502165699	CS Zumbahua	-	+++	++		>100.000 UFC/ml	Eco_008
C-037	17	42174	605667187	HB. Guamote	+	-	+++		>100.000 UFC/ml	Eco_009
C-038	30	4665	502927601	CS Zumbahua	-	++	++		>100.000 UFC/ml	Eco_010
C-059	17	22811	504483371	H. Zumbahua	+	-	+++		>100.000 UFC/ml	Eco_011
C-065	19	31965	605547470	HB. Guamote	+	+++	+++		>100.000 UFC/ml	Eco_012
C-069	18	34070	605633340	HB. Guamote	-	-	+++		>100.000 UFC/ml	Eco_013
C-083	33	40457	1717539066	HB. Guamote	-	+++	+++		>100.000 UFC/ml	Eco_014
C-084	19	7217	619960724	H. Colta	+	-	++		>100.000 UFC/ml	Eco_015
C-048	39	2552	603122495	HB. Guamote	+	+	+++		>100.000 UFC/ml	Eco_016
C-088	42	1155	501998447	CS. Zumbahua	+	-	+++		>100.000 UFC/ml	Eco_017
C-092	20	36787	605501089	H. Colta	+	+	+++		>100.000 UFC/ml	Eco_018
C-095	38	68231	603383670	HB. Guamote	+	+++	+++		>100.000 UFC/ml	Eco_019
C-099	67	1637	600983381	H. Colta	-	+	++		>100.000 UFC/ml	Eco_020
C-102	16	36308	606271336	HB. Guamote	+	-	+++		>100.000 UFC/ml	Eco_021

C-105	23	7993	503702714	H. Zumbahua	+	-	+++		>100.000 UFC/ml	Eco_022
C-106	34	534	502827660	CS. Zumbahua	+	+++	++		>100.000 UFC/ml	Eco_023
C-133	47	15939	602424731	HB. Guamote	-	-	+++		>100.000 UFC/ml	Eco_024
C-138	79	52619	502720733	CS. Zumbahua	-	-	++		>100.000 UFC/ml	Eco_025
C-140	26	3446	604097436	HB. Guamote	+	+++	+++		>100.000 UFC/ml	Eco_026
C-143	59	9926	601316854	HB. Guamote	-	-	+++		>100.000 UFC/ml	Eco_027
C-144	18	66449	605605799	HB. Guamote	+	+++	+++		>100.000 UFC/ml	Eco_028
C-147	68	39765	600969547	H. Colta	+	-	+++		>100.000 UFC/ml	Eco_029
C-148	56	18469	601777865	H. Colta	+	-	++		>100.000 UFC/ml	Eco_030
C-149	19	18933	504359373	H. Zumbahua	-	+	++		>100.000 UFC/ml	Eco_031
C-151	43	5446	502115280	H. Zumbahua	+	-	+++		>100.000 UFC/ml	Eco_032
C-153	21	14646	550094213	H. Zumbahua	+	-	+++		>100.000 UFC/ml	Eco_033
C-162	24	25807	604718643	HB. Guamote	+	+++	+++		>100.000 UFC/ml	Eco_034
C-164	42	24196	602742082	HB. Guamote	-	-	+++		>100.000 UFC/ml	Eco_035
C-052	19	1463	605304716	HB. Guamote	+	+++	+++		>100.000 UFC/ml	Eco_036
C-173	79	1247	601495815	H. Colta	-	-	++		>100.000 UFC/ml	Eco_037
C-179	20	17333	503894701	H. Zumbahua	-	-	++		>100.000 UFC/ml	Eco_038
C-182	33	21	502909385	H. Zumbahua	-	-	++		>100.000 UFC/ml	Eco_039
C-196	33	51933	603837233	HB. Guamote	+	+++	+++		>100.000 UFC/ml	Eco_040
C-199	16	27799	500522016	H. Zumbahua	+	-	+++		>100.000 UFC/ml	Eco_041
C-223	65	2730	600791446	H. Colta	-	+	+	Gl: +	>100.000 UFC/ml	Eco_042
C-228	20	44456	606269934	HB. Guamote	+	+++	+++		>100.000 UFC/ml	Eco_043
C-235	24	4649	302189568	H. Colta	-	+++	++		>100.000 UFC/ml	Eco_044

C-239	64			H. Colta	-	++	+		>100.000 UFC/ml	Eco_045
C-249	29	49989	604475632	HB. Guamote	-	+++	+++		>100.000 UFC/ml	Eco_046
C-261	32	52153	604057794	HB. Guamote	+	-	+++		>100.000 UFC/ml	Eco_048
C-264	32	2248	603383688	HB. Guamote	+	++	+++		>100.000 UFC/ml	Eco_049
C-266	16	1473	604802785	H. Colta	-	+	+	GL:+	>100.000 UFC/ml	Eco_050
C-269	23	44945	605190164	H. Colta	-	+	+		>100.000 UFC/ml	Eco_051
C-270	80			H. Colta	+++	+	+	GL:+	>100.000 UFC/ml	Eco_052
C-285	37	39916	6003338708	HB. Guamote	+	+++	+++		>100.000 UFC/ml	Eco_053
C-142	16	48316	605670562	HB. Guamote	-	+++	+++		>100.000 UFC/ml	Eco_054
C-317	22	28701	605095041	HB. Guamote	+	+++	+++		>100.000 UFC/ml	Eco_055
C-323	48	30207	602395295	H. Colta	-	+	++	Gl: +++	>100.000 UFC/ml	Eco_056
C-329	63	9522	601140486	H. Colta	+	-	+++		>100.000 UFC/ml	Eco_057
C-332	28	34753	604565556	H. Colta	+	+++	++		>100.000 UFC/ml	Eco_058
C-227	24	33549	605579556	H. Colta	+	+	+		>100.000 UFC/ml	Eco_059
C-225	79	927	601305980	H. Colta	-	++	+		>100.000 UFC/ml	Eco_060

Fuente: Resultados de laboratorio
Elaboración: Autor

VNiVERSITAS
STVDII
SALAMANTIINI

A decorative flourish consisting of several overlapping, flowing loops and curves, rendered in a dark red color, positioned below the text.

TESIS DOCTORAL

SALAMANCA, 2020



WILLIAM GUAMÁN
GUALPA

Evaluación de Mecanismos Moleculares de Resistencia a Fluoroquinolonas en Cepas de *E. coli* Uropatógenas en Población Nativa Amerindia Kichwa del Ecuador.



UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

Programa de Doctorado: Salud y Desarrollo en los Trópicos

Evaluación de Mecanismos Moleculares de Resistencia a Fluoroquinolonas en Cepas de *E. coli* Uropatógenas en Población Nativa Amerindia Kichwa del Ecuador.

TESIS DOCTORAL

William Guamán Gualpa

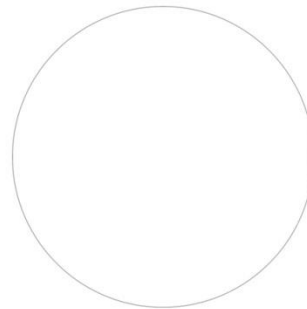
2020



**UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

Programa de Doctorado: *Salud y Desarrollo en los Trópicos*



**Evaluación de Mecanismos Moleculares de Resistencia a Fluoroquinolonas
en Cepas de *E. coli* Uropatógenas en Población Nativa Amerindia Kichwa del
Ecuador.**

TESIS DOCTORAL

William Guamán Gualpa

2020