



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
Facultad de Medicina
Departamento de Microbiología

TESIS DOCTORAL

Interacción de mecanismos plasmídicos y cromosómicos de resistencia a quinolonas en *Escherichia coli* y su efecto en la resistencia, *fitness* y toxicidad celular.

Trabajo realizado para alcanzar el grado de Doctor por el Licenciado en Biología D. Jesús Machuca Barcena

Sevilla, mayo de 2014



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
Facultad de Medicina
Departamento de Microbiología

Dr. D. Álvaro Pascual Hernández, Catedrático de Microbiología de la Universidad de Sevilla y Dr. D. José Manuel Rodríguez Martínez, Profesor contratado Doctor del Departamento de Microbiología de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICAN:

Que la tesis para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla que lleva por título “Interacción de mecanismos plasmídicos y cromosómicos de resistencia a quinolonas en *Escherichia coli* y su efecto en la resistencia, *fitness* y toxicidad celular” ha sido realizada por D. Jesús Machuca Barcena bajo nuestra supervisión, considerando que reúne los requisitos necesarios para su presentación.

Y para que conste donde proceda firmamos el presente certificado en Sevilla a 13 de mayo de 2014.

Fdo. Dr. D. Álvaro Pascual Hernández

Fdo. Dr. D. José Manuel Rodríguez Martínez

Agradecimientos

Después de más de tres años de trabajo, por fin está terminada la Tesis Doctoral, así que toca mostrar mi agradecimiento a todas las personas que han hecho posible que este momento llegara. Al principio de empezar este proyecto pensaba no escribir agradecimientos, simplemente pensaba dar las gracias de forma privada. Sin embargo, ahora prefiero que quede constancia escrita de estos agradecimientos ya que creo que es lo más justo para cada una de las personas que me han ayudado durante estos años.

En primer lugar darle las gracias a mis dos directores. Al Dr. José Manuel Martínez por haberme enseñado prácticamente todo lo que sé del trabajo en el laboratorio y por haber estado siempre ahí para resolverme las dudas científicas, así como haber escuchado mis opiniones. Al Dr. Álvaro Pascual por permitirme realizar este trabajo bajo su tutela, por sus sabios consejos y haberme permitido compaginar el desarrollo de este proyecto con mi formación como Especialista en Microbiología.

Al Dr. Javier Aznar agradecerle haber sido mi tutor del Trabajo Fin de Máster y del Proyecto de Tesis Doctoral.

Al Dr. Jesús Blázquez por cedernos los vectores pCP20 y pKD4 necesarios para la realización de este trabajo. Así como al Dr. Germán Bou por cedernos el vector pKOBEG y permitirme rotar durante un mes y medio en su laboratorio.

Agradecer, como no, a todo el personal de la “Cátedra”: Carmen Velasco, Carmen Conejo, Isabel, Sofía, Fani, Eva y Lara, por haberme facilitado el trabajo en el laboratorio, y haberme resuelto muchas de las dudas que me han ido surgiendo, tanto científicas, como administrativas o, simplemente, espirituales.

También mostrar mi agradecimiento a todos los Facultativos del Servicio de Microbiología del H. U. V. Macarena: Anabel, Ninive, Encarna, Marina, Lorena, Inma, Felipe y Enrique. Sin vuestra ayuda no habría podido terminar la Tesis a la vez que la Residencia. Gracias por haberme permitido escaparme durante las guardias, y alguna mañana, a la “Cátedra”.

Gracias a la Alejandra por haberme enseñado todo lo que sabía, por haber plaeado conmigo, simplemente gracias por haberme ayudado. Y sobre todo, mis mayores agradecimientos son para Paula, gracias por todo, por haberme aguantado durante estos años y haber estado siempre ahí para resolver mis dudas metodológicas.

Y ahora me toca agradecer a tres personas que aunque quizás no hayan sido tan importantes desde un punto de vista científico, si lo han sido desde un punto de vista personal. En primer lugar, agradecer a Pilar contestarme el primer correo electrónico que le mandé y ser la responsable de que eligiera la especialidad de Microbiología en el Virgen Macarena, gracias a ti empezó todo. En segundo lugar a mi R mayor, Mar. Gracias por haber estado ahí durante los cuatro años de residencia, por las risas, por los desayunos, por nuestras conversaciones telefónicas. Y en tercer lugar a Fran. Por nuestras charlas y risas en el laboratorio y sobre todo por tu apoyo en estos últimos meses, fundamentalmente durante el rotatorio en La Coruña. En resumen agradecer a los tres vuestro apoyo no sólo como compañeros de trabajo, sino como amigos.

Y por último agradecer a mi familia y amigos el estar siempre ahí, preguntando como me iba y aguantando mis mosqueos cuando los experimentos no salían. Y en especial a mi padre, porque si no se le hubiera antojado que hiciera el Doctorado, seguramente no me habría metido en esta aventura.

1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. Quinolonas	7
1.1.1. Estructura y clasificación	8
1.1.2. Relación estructura-actividad	10
1.2. Mecanismo de acción de las quinolonas	11
1.2.1. Estructura y función de las topoisomerasas	11
1.2.2. Mecanismo de acción de las quinolonas.....	13
1.2.3. Efecto de las quinolonas sobre las células bacterianas	15
1.3. Mecanismos de resistencia a quinolonas	17
1.3.1. Mecanismos cromosómicos	20
1.3.1.1. Modificación de las dianas.....	21
1.3.1.2. Sistemas de expulsión activa.....	22
1.3.1.3. Alteraciones de la permeabilidad de la membrana	25
1.3.2. Mecanismos plasmídicos	26
1.3.2.1. Protección de la diana: genes <i>qnr</i>	26
1.3.2.2. Modificación enzimática de las quinolonas: gen <i>aac(6')-Ib-cr</i>	31
1.3.2.3. Sistemas de expulsión activa: genes <i>qepA</i> y <i>oqxAB</i>	32
1.3.2.4. Efecto de los mecanismos plasmídicos en la sensibilidad a quinolonas	32
1.3.2.5. Epidemiología de los mecanismos plasmídicos de resistencia a quinolonas	33
1.4. Especies reactivas de oxígeno	34
1.4.1. ROS y actividad bactericida de los antimicrobianos	36
1.4.2. ROS y resistencia bacteriana	38
1.5. Fitness bacteriano	39
1.5.1. Determinación del <i>fitness</i> bacteriano	40

1.5.2.	Efecto de la resistencia antibiótica sobre el <i>fitness</i> bacteriano	42
1.6.	Efecto citotóxico de los mecanismos plasmídicos de resistencia	46
2.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	47
2.1.	Justificación del estudio e hipótesis de trabajo.....	49
2.2.	Objetivos de este estudio.....	50
3.	MATERIAL Y MÉTODOS	51
3.1.	Material.....	53
3.1.1.	Cepas de laboratorio.....	53
3.1.2.	Medios de cultivo	54
3.1.3.	Vectores empleados	54
3.1.4.	Soluciones y reactivos.....	55
3.1.5.	Productos químicos	56
3.2.	Métodos de Biología Molecular.....	57
3.2.1.	PCR (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)	57
3.2.2.	Electroforesis en geles de agarosa.....	58
3.2.3.	Purificación de producto de PCR.....	59
3.2.4.	Lisis alcalina (miniprep): aislamiento de ADN plasmídico.....	59
3.2.5.	Digestión con endonucleasas	60
3.2.6.	Técnicas de clonación	61
3.2.7.	Preparación de células electrocompetentes	63
3.2.8.	Electroporación	64
3.2.9.	Reemplazamiento genético	64
3.2.10.	Inactivación de genes cromosómicos.....	67

3.2.11. Estudio de la expresión génica.....	69
3.2.12. Extracción de proteínas.....	72
3.3. Métodos de Microbiología.....	73
3.3.1. Preparación de los agentes antimicrobianos	73
3.3.2. Sensibilidad <i>in vitro</i>	73
3.3.2.1. Microdilución	73
3.3.2.2. Técnicas de difusión	74
3.3.2.3. Determinación de la Concentración Preventiva de Mutantes.....	74
3.3.3. Cálculo de la frecuencia de aparición de mutantes	75
3.3.4. Producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS).....	76
3.3.5. Curvas de crecimiento	77
3.3.6. Ensayos de competición.....	78
3.3.7. Ensayos de citotoxicidad	79
3.3.8. Microscopía Electrónica de Transmisión	80
4. RESULTADOS	81
4.1. Construcción de la colección de cepas isogénicas	83
4.2. Efecto de los genes <i>qnr</i> sobre la sensibilidad a quinolonas, <i>fitness</i> bacteriano y toxicidad celular	87
4.2.1. Efecto de los genes <i>qnr</i> sobre la actividad de quinolonas	87
4.2.1.1. Efectos sobre la CMI y la CMB	88
4.2.1.2. Discrepancias entre CLSI y EUCAST	94
4.2.1.3. Efecto sobre la CPM.....	98
4.2.1.4. Efecto sobre la frecuencia de aparición de mutantes	100
4.2.1.5. Producción de especies reactivas de oxígeno.....	104

4.2.2.	Efecto de los genes <i>qnr</i> sobre el <i>fitness</i> bacteriano.....	107
4.2.2.1.	Ensayos individuales: curvas de crecimiento.....	107
4.2.2.2.	Ensayos de competición.....	114
4.2.3.	Efecto citotóxico de los genes <i>qnr</i> sobre las células bacterianas	122
4.2.3.1.	Ensayos de viabilidad celular.....	123
4.2.3.2.	Estudio por microscopía electrónica de transmisión	123
4.3.	Efecto del gen <i>qepA2</i> sobre la sensibilidad a quinolonas, <i>fitness</i> bacteriano y toxicidad celular	127
4.3.1.	Efecto del gen <i>qepA2</i> sobre la actividad de quinolonas	127
4.3.1.1.	Efectos sobre la CMI y la CMB	127
4.3.1.2.	Discrepancias entre CLSI y EUCAST.....	128
4.3.1.3.	Efecto sobre la CPM.....	130
4.3.2.	Efecto del gen <i>qepA2</i> sobre el <i>fitness</i> bacteriano	131
4.3.2.1.	Ensayos individuales: curvas de crecimiento.....	131
4.3.2.2.	Ensayos de competición.....	133
4.3.3.	Efecto citotóxico del genes <i>qepA</i> sobre las células bacterianas.....	134
4.3.3.1.	Ensayos de viabilidad celular.....	135
5.	DISCUSIÓN	137
6.	CONCLUSIONES.....	155
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	159
8.	ANEXOS	181

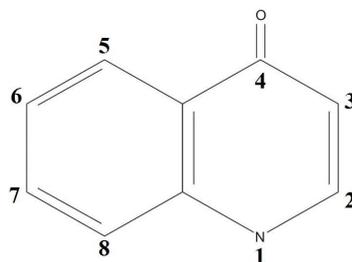
1. Introducción

1.1. Quinolonas

Las quinolonas son agentes antimicrobianos de amplio espectro que se descubrieron en los años 40 de forma fortuita en el contexto del desarrollo de agentes antimaláricos. Se observó que los compuestos derivados de la 1,8-naftiridina presentaban actividad antibacteriana, obteniéndose la estructura básica de las quinolonas: un anillo de piridona con un sustituyente carboxilado en posición 3. En 1962, Lesher y colaboradores desarrollaron la primera quinolona de uso clínico: el ácido nalidíxico, antimicrobiano con actividad frente a ciertas bacterias Gramnegativas¹. Así, ya en 1964 el ácido nalidíxico se usaba en Reino Unido para el tratamiento de infecciones del tracto urinario².

El núcleo básico de las quinolonas está constituido por una molécula de 4-quinolona (Figura 1). Sobre este compuesto se han llevado a cabo múltiples modificaciones para obtener moléculas con un mayor espectro de acción y mejores características farmacocinéticas que el ácido nalidíxico.

Figura 1. Estructura de la 4-quinolona



Las modificaciones más notables fueron la adición de un átomo de flúor en la posición 6 y un grupo piperacínico o metil-piperacínico en la posición 7, modificaciones que

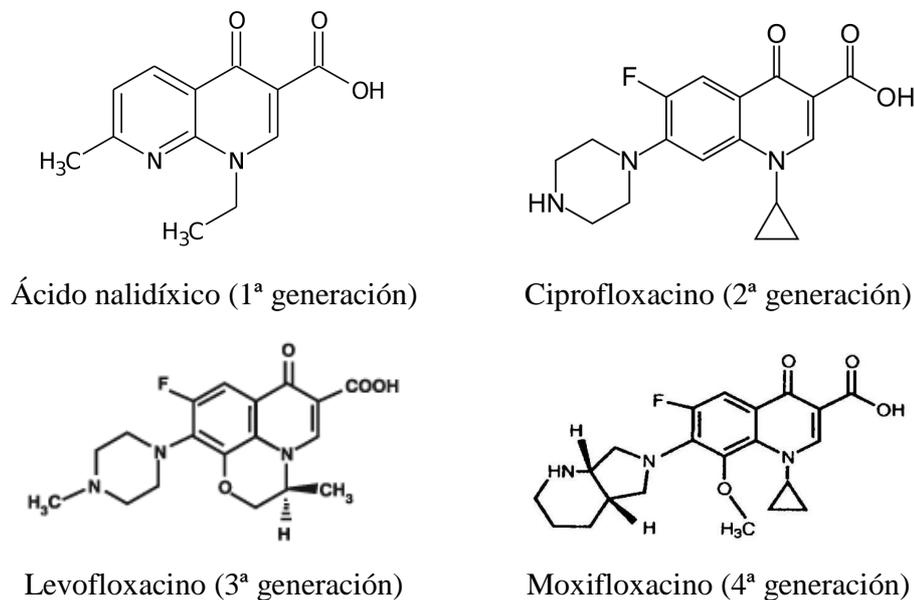
condujeron a una mayor actividad biológica y mejores propiedades farmacocinéticas (buena absorción oral y amplia distribución tisular). Este grupo de quinolonas se conocen como fluoroquinolonas, antimicrobianos de primera línea en múltiples procesos infecciosos³.

1.1.1. Estructura y clasificación

La estructura de las quinolonas de uso clínico está formada por dos anillos, con un átomo de nitrógeno en la posición 1, un grupo carboxilo en la posición 3 y un grupo ceto en la posición 4.

Las quinolonas pueden clasificarse, al igual que sucede con las cefalosporinas, en generaciones según su espectro de acción, estructura química y época de aparición (Figura 2 y Tabla 1). En esta clasificación las quinolonas quedan agrupadas en cuatro generaciones, quedando fuera las quinolonas no fluoradas y los híbridos entre quinolona y oxazolidona⁴⁻⁶.

Figura 2. Estructura química de diferentes quinolonas correspondientes a distintas generaciones.



La primera generación de quinolonas (ácido nalidíxico y ácido oxolínico) son activas frente a algunas bacterias Gramnegativas y se pueden usar para el tratamiento de infecciones urinarias no complicadas, ya que debido a sus parámetros farmacocinéticos sólo alcanzan una concentración adecuada en las vías urinarias.

Las quinolonas de segunda generación (norfloxacino y ciprofloxacino) presentan el átomo de flúor en la posición 6 y el grupo piperacínico o metil-piperacínico en la posición 7, ampliándose su espectro de acción y mejorando sus propiedades farmacocinéticas, pudiendo llegar a actuar frente a microorganismos Grampositivos y *Pseudomonas* spp.

Tabla 1. Características generales de las quinolonas clasificadas por generaciones.

Generación	Quinolona	Actividad	Indicaciones
Primera generación	Ácido nalidíxico Cinoxacina Ácido pipemídico	Gramnegativos (salvo <i>Pseudomonas</i> spp.)	Infecciones del tracto urinario no complicadas
Segunda generación Clase I	Norfloxacino Lomefloxacino	Gramnegativos (salvo <i>Pseudomonas</i> spp.)	Infecciones del tracto urinario no complicadas
Segunda generación Clase II	Ciprofloxacino Ofloxacino	Gramnegativos, algunos Grampositivos y patógenos atípicos	Infecciones del tracto urinario y sistémicas
Tercera generación	Levofloxacino Esparfloxacino Gatifloxacino	Gramnegativos, algunos Grampositivos (alternativa frente a <i>S. pneumoniae</i> y estafilococos sensibles a meticilina) y patógenos atípicos	Infecciones del tracto urinario, sistémicas y respiratorias
Cuarta generación	Moxifloxacino Trovafloracino Clinafloxacino Sitafloxacino	Gramnegativos, Grampositivos, anaerobios y patógenos atípicos	Infecciones del tracto urinario, sistémicas, respiratorias e intraabdominales.

Las quinolonas de tercera generación (levofloxacino) presentan, además del átomo de flúor en la posición 6, una amplia variedad de sustituciones en las posiciones 1, 7 y 8, lo que les permite ampliar su espectro de acción sobre microorganismos Grampositivos, siendo activas frente a *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*⁴⁻⁶.

Las quinolonas de cuarta generación presentan una elevada potencia y un espectro de acción más amplio, pudiendo actuar frente a micobacterias y bacterias anaerobias.

1.1.2. Relación estructura-actividad

Al tratarse de agentes antibacterianos principalmente sintéticos es relativamente fácil discernir la relación entre la estructura de las quinolonas y sus propiedades farmacocinéticas, microbiológicas y tóxicas. A pesar de que ciertos sustituyentes pueden ocasionar importantes cambios en las propiedades químicas y biológicas de las quinolonas, las propiedades finales de la molécula van a depender de la interacción entre los radicales y el núcleo básico de la molécula.

La posición 1 está relacionada con la unión a las topoisomerasas tipo II, diana de las quinolonas. El sustituyente encontrado con mayor frecuencia en esta posición es un grupo ciclopropil, responsable de incrementar la actividad frente a microorganismos Gramnegativos. La presencia de un anillo bencénico fluorado aumenta la actividad frente a patógenos intracelulares y bacterias anaerobias.

En la posición 2 se observan pocas modificaciones, siendo el radical más frecuente el hidrógeno. La presencia de un grupo carboxílico en la posición 3 es esencial para la actividad de la quinolona. También es esencial para la actividad antibacteriana de la molécula el grupo ceto de la posición 4. Estas dos posiciones se encuentran en la zona de unión al complejo ADN-topoisomerasa.

En cuanto a la posición 5, la presencia de un grupo amino aumenta la actividad frente a microorganismos Grampositivos; por su parte, la presencia de un grupo metilo genera una mayor potencia frente a *S. pneumoniae*.

En la posición 6 la presencia de un átomo de flúor supuso un aumento significativo de la actividad antibacteriana, debido al incremento del espectro de acción y a una mejor penetración intracelular. Este radical se encuentra presente en la inmensa mayoría de las quinolonas de uso clínico.

Debido al efecto del radical de la posición 7 en la potencia, espectro de acción y propiedades farmacocinéticas de las quinolonas, esta posición ha sido de las más investigadas. Los radicales lineales o pequeños disminuyen la potencia antibacteriana, mientras que las moléculas con anillos heterocíclicos de 5 o 6 átomos de carbono, en la posición 7, presentan una buena actividad. Los grupos más comunes son: piperacina (ciprofloxacino y norfloxacino), metil-piperacina (levofloxacino y ofloxacino) y aminopirrolidina (gatifloxacino). Este último tipo de radical aumenta la actividad frente a

microorganismos Grampositivos y anaerobios. La presencia de un grupo metilo en el carbono 4 del anillo de piperacina genera un incremento de la actividad frente a bacterias Grampositivas, pero a cambio de un descenso de la actividad frente a *P. aeruginosa*.

Finalmente, en la posición 8 los radicales halogenados (flúor y cloro principalmente) generan un aumento de la actividad frente a bacterias anaerobias y mejoran la absorción oral. El problema es que estos radicales ocasionan fototoxicidad. La presencia de un grupo metoxi (moxifloxacino) en esta posición provoca un incremento de la actividad y expansión del espectro de acción.

1.2. Mecanismo de acción de las quinolonas

Aunque el ácido nalidíxico comenzó a utilizarse para el tratamiento de infecciones del tracto urinario en los años sesenta, no fue hasta 1977 cuando se conoció su mecanismo de acción. En este año se demostró que este compuesto inhibía específicamente a la ADN girasa en *Escherichia coli*⁷. Posteriormente se comprobó que las quinolonas no sólo afectaban a la ADN girasa, sino también a la topoisomerasa IV. Estas dos enzimas son esenciales para las células, participando en el proceso de síntesis del ADN.

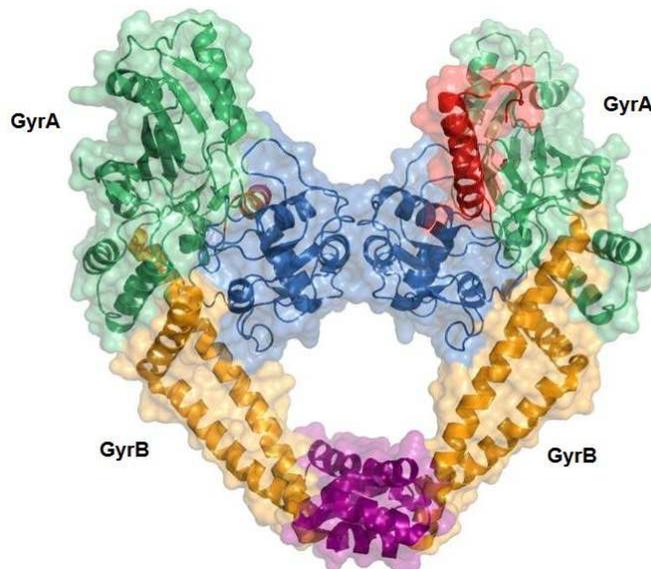
1.2.1. Estructura y función de las topoisomerasas

Las topoisomerasas se clasifican en función de su mecanismo de acción en dos grupos: topoisomerasas tipo I y tipo II. La acción de ambas enzimas es similar: provocan la rotura del ADN, promueven el paso de una cadena de ADN por la rotura y finalmente llevan a cabo el sellado de la rotura. Sin embargo se diferencian en base al número de hebras de ADN que cortan por ronda de acción⁸.

Las topoisomerasas tipo I producen el corte de una sola hebra de ADN eliminando el superenrollamiento negativo, permitiendo de esta forma la relajación del ADN. Por su parte, las topoisomerasas tipo II provocan el corte de las dos hebras. Éste último tipo de topoisomerasa constituye la diana de las quinolonas, concretamente la ADN girasa y la topoisomerasa IV. Estas enzimas son imprescindibles para el empaquetamiento del ADN, la replicación, la transcripción, la recombinación, etc. Ambas enzimas interactúan con el ADN a través de su extremo amino terminal.

La ADN girasa y la topoisomerasa IV son heterotetrámeros con dos subunidades A y dos subunidades B (Figura 3). Las subunidades A de la ADN girasa y la topoisomerasa IV están codificadas por los genes *gyrA* y *parC*, respectivamente; las subunidades B están codificadas por *gyrB* en la ADN girasa y *parE* en la topoisomerasa IV⁹. En bacterias Gramnegativas la topoisomerasa inhibida principalmente por las quinolonas es la ADN girasa, mientras que en bacterias Grampositivas la principal diana de estos antimicrobianos es la topoisomerasa IV. Ya que estas enzimas tienen funciones diferentes, es esperable que las bacterias difieran en su respuesta a las quinolonas en función de la diana primaria de éstas.

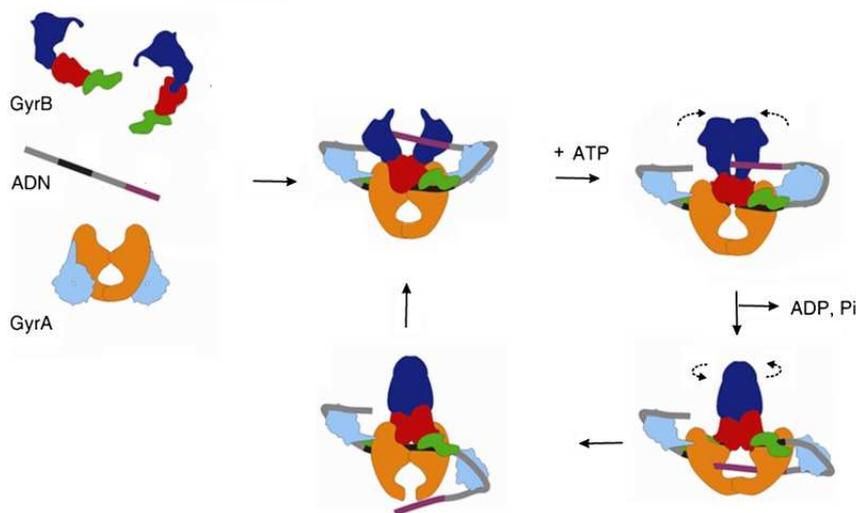
Figura 3. Estructura de la ADN girasa de *Mycobacterium tuberculosis*.
Adaptado de Piton y cols¹⁰.



En general, las topoisomerasas tipo II presentan una secuencia altamente conservada, aunque presentan diferentes funciones celulares, que reflejan sus distintas preferencias catalíticas⁹. La ADN girasa es la única capaz de introducir superenrollamientos negativos en el ADN, algo esencial para mantener un nivel adecuado de enrollamiento del ADN y que pueda llevarse a cabo la replicación y la transcripción. Esta actividad se debe a una caja de 7 aminoácidos (Gln-Arg-Arg-Gly-Gly-Lys-Gly) situada en el extremo carboxi terminal de la subunidad A (GyrA) de la proteína; de modo que mutaciones en esta región eliminan la habilidad de la ADN girasa de introducir superenrollamientos^{11,12}. Por su parte, la

topoisomerasa IV relaja superenrollamientos negativos y tiene actividad decatenasa, encargándose de la separación de las hebras de ADN tras la replicación, lo que permite la segregación de los cromosomas bacterianos¹³.

Figura 4. Esquema de acción de la ADN girasa. Modificado de Collin y cols¹⁴.



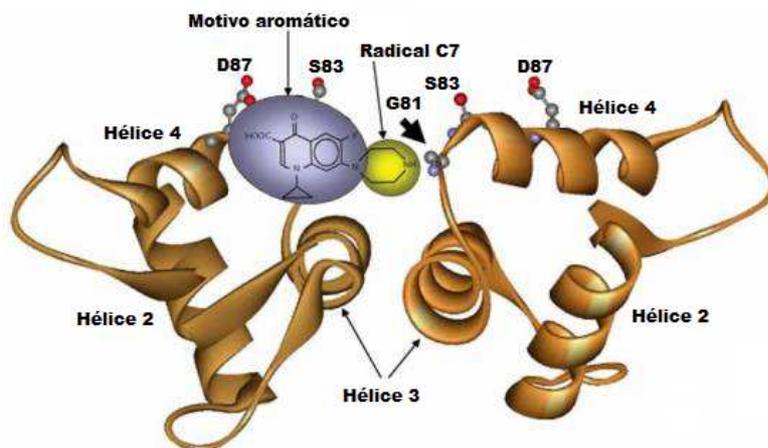
En *E. coli*, las subunidades GyrA (857 aminoácidos, 97 KDa) y ParC (752 aminoácidos, 75 KDa) comparten aproximadamente un 36% de identidad aminoacídica, mientras que GyrB (804 aminoácidos, 90 KDa) y ParE (630 aminoácidos, 70 KDa) el 40%. A pesar de sus diferencias estructurales y funcionales, el sitio activo de ambas enzimas lo representa un residuo de tirosina (Tyr122), el cual se localiza en la región amino terminal de las subunidades A. Esta región es la zona más conservada, situándose en ella la región QRDR (*Quinolone Resistance Determining Region*), donde se concentran las mutaciones responsables de la resistencia a quinolonas.

1.2.2. Mecanismo de acción de las quinolonas

Durante los últimos años no ha habido consenso sobre el mecanismo de acción de las quinolonas, existiendo polémica sobre cual era la diana primaria a la que se unían estos antimicrobianos. Los últimos resultados de cristalografía por rayos X llegan a ser contradictorios.

Acorde a estos datos cristalográficos se han establecido dos modelos. El primero de ellos establece que la hélice 4 de la ADN girasa es la que se une directamente a la quinolona (Figura 5). Según este modelo, el extremo del radical de la posición 7 de la quinolona (normalmente un grupo piperacnil) interacciona con residuos localizados en el extremo amino de la hélice 4, como el residuo 81, de una de las subunidades GyrA. Por otro lado, los grupos carboxílico y ceto de las posiciones 3 y 4 del antimicrobiano interaccionan con los residuos aminoacídicos de las posiciones 83 y 87, respectivamente, de la otra subunidad GyrA¹⁵.

Figura 5. Modelo de Unión de la quinolona a la hélice 4.
Adaptado de Drlica y cols¹⁵.



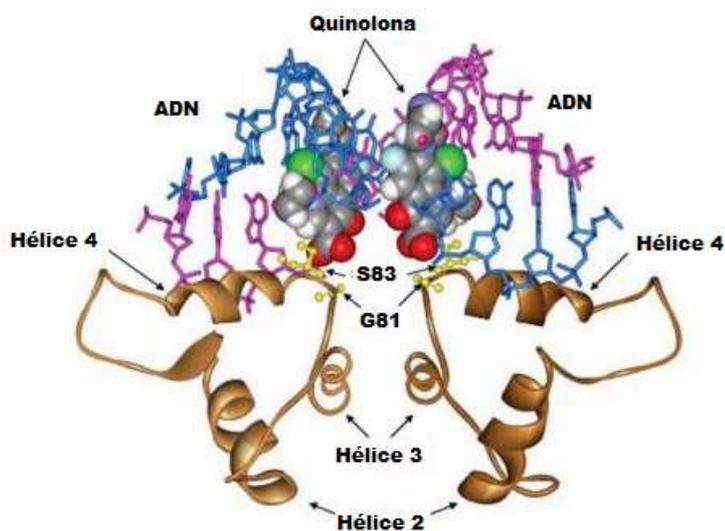
En el segundo modelo, llamado modelo de intercalación del ADN, las quinolonas interaccionan directamente con el ADN (Figura 6). El sustituyente de la posición 7 interactúa con las bases del ADN y no con el aminoácido 81 de la ADN girasa. La interacción del antimicrobiano con la topoisomerasa tiene lugar a través de un ión Mg^{2+} , ión que pone en contacto el grupo C3-carboxílico con residuos situados en el QRDR de las topoisomerasas. Existe controversia sobre si el grupo ceto de la posición 4 de las quinolonas interactúa con el QRDR a través de un ión Mg^{2+} o forma puentes de hidrógeno con aminoácidos situados fuera del QRDR de las topoisomerasas^{15,16}.

Estos modelos explican parte del efecto que algunas mutaciones cromosómicas tienen sobre la resistencia a quinolona (como los residuos 81, 83 y 87), pero no la importancia de las demás posiciones aminoacídicas de las topoisomerasas. Tampoco explican el efecto de los

diferentes radicales que pueden aparecer en las posiciones 1 y 8, los cuales son importantes para la actividad antibacteriana de la quinolona¹⁷.

Algunos autores mantienen que la interacción de la quinolona con su diana es un proceso secuencial, y sostienen que ambos modelos realmente son el mismo, representando dos pasos diferentes de la formación del complejo quinolona-topoisomerasa-ADN¹⁵.

Figura 6. Modelo de Intercalación del ADN. Adaptado de Drlica y cols¹⁵.



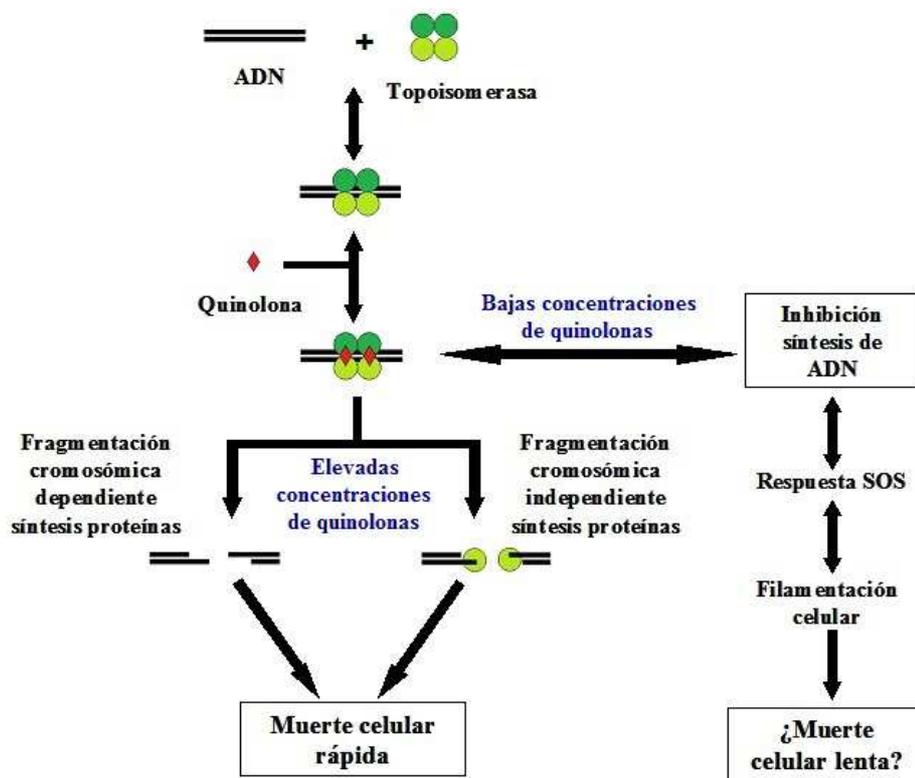
1.2.3. Efecto de las quinolonas sobre las células bacterianas

Las quinolonas tienen un doble efecto sobre las células bacterianas, por un lado un efecto bacteriostático y por otro un efecto bactericida (Figura 7).

El efecto bacteriostático ocurre a bajas concentraciones de quinolonas. En esas condiciones se forman los complejos quinolona-topoisomerasa-ADN, en cuyo interior aparecen roturas de ADN de doble cadena. Estos complejos impiden el movimiento de la horquilla de replicación; por lo tanto, se produce la inhibición de la replicación y del crecimiento bacteriano. Es un fenómeno reversible no relacionado con la acción letal de las quinolonas¹⁶. Durante esta etapa bacteriostática se podrían liberar algunos extremos monocatenarios de ADN (sin tratarse de una fragmentación de todo el cromosoma), los cuales podrían inducir la activación del sistema SOS^{18,19}. Este sistema está implicado en la

reparación del ADN, recombinación y mutagénesis. Una de las consecuencias de la activación de este sistema es la expresión del gen *sfiA*, gen que codifica un inhibidor de la división celular, promoviendo la filamentación celular²⁰. La activación del sistema SOS contribuye a la adquisición de resistencia a quinolonas. Se desconoce si mediante esta ruta se podría producir la muerte celular.

Figura 7. Representación esquemática de la acción de las quinolonas.
Modificado de Cheng y cols¹⁶.



El efecto bactericida de las quinolonas se debe a que ocasionan la fragmentación cromosómica, lo que desencadena una serie de reacciones que conllevan a la muerte celular. Las quinolonas producen la fragmentación cromosómica por dos vías diferentes: una dependiente de la síntesis de proteínas y otra independiente de dicha síntesis²¹. En general, las quinolonas más antiguas actúan a través de la primera vía y las modernas a través de la segunda²². Entre las quinolonas que actúan por la primera vía se encuentran el ácido nalidíxico y el norfloxacin. En algunos casos la acción letal de las quinolonas que actúan

por la vía dependiente de la síntesis de proteínas es inhibida en condiciones de anaerobiosis, lo que indica que para el efecto bactericida de ciertos antimicrobianos es necesaria la presencia de oxígeno.

En la ruta dependiente de síntesis de proteínas la fragmentación cromosómica podría deberse a 3 sucesos: 1) digestión de la girasa por proteasas, 2) corte en el ADN por una nucleasa a ambos lados del complejo quinolona-topoisomerasa-ADN o 3) desnaturalización de proteínas¹⁵. En cualquiera de los casos se produce la liberación de extremos de ADN monocatenario que activan por diferentes vías la muerte celular.

Elevadas concentraciones de ciprofloxacino matan a las bacterias mediante la vía independiente de la síntesis de proteínas. Parece ser que en esta ruta las quinolonas actúan sobre la disociación de las subunidades de las topoisomerasas, lo que deja los extremos monocatenarios de ADN del complejo quinolona-topoisomerasa-ADN al descubierto, produciéndose la muerte celular²³.

Los sistemas toxina-antitoxina también contribuyen al efecto bactericida de las quinolonas. Se ha comprobado como mutaciones en el sistema MazEF en *E. coli* aumentan la supervivencia en tratamientos con ácido nalidíxico. Se cree que este sistema produce la muerte celular por una ruta dependiente de especies reactivas de oxígeno^{24,25}.

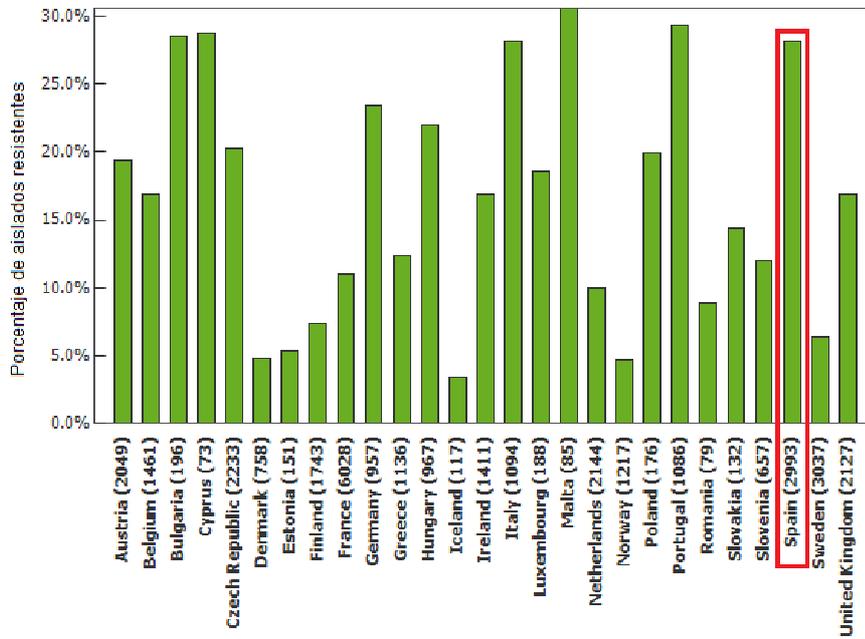
1.3. Mecanismos de resistencia a quinolonas

La aparición de resistencia a betalactámicos, junto con las mejoras tanto en la actividad biológica como en las propiedades farmacocinéticas aportadas por las modificaciones estructurales del ácido nalidíxico, convirtieron a la segunda generación de quinolonas en antimicrobianos de primera línea frente a numerosas infecciones. Sin embargo, el principal problema del uso de fluoroquinolonas ha sido la rápida aparición de resistencia a las mismas. La resistencia emergió primero en bacilos Gramnegativos no fermentadores y en bacterias Grampositivas, pero pronto apareció en enterobacterias y otros microorganismos de importancia clínica^{26,27}.

En los últimos años se ha comprobado un incremento de las tasas de resistencia a quinolonas en enterobacterias. En la Figura 8 se puede observar las tasas de resistencia de *E. coli* a fluoroquinolonas en los años 2005 y 2012 en diferentes países de Europa.

Figura 8. Comparativa de las tasas de resistencia a fluoroquinolonas (fenotipo R) en *E. coli* en 2005 y 2012. Fuente EARS-Net.

A) 2005



B) 2012

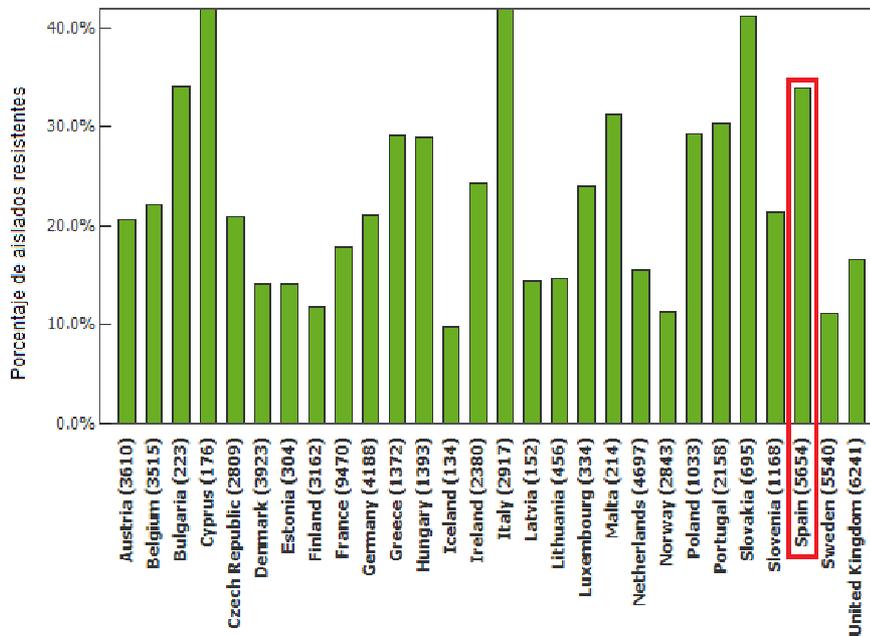
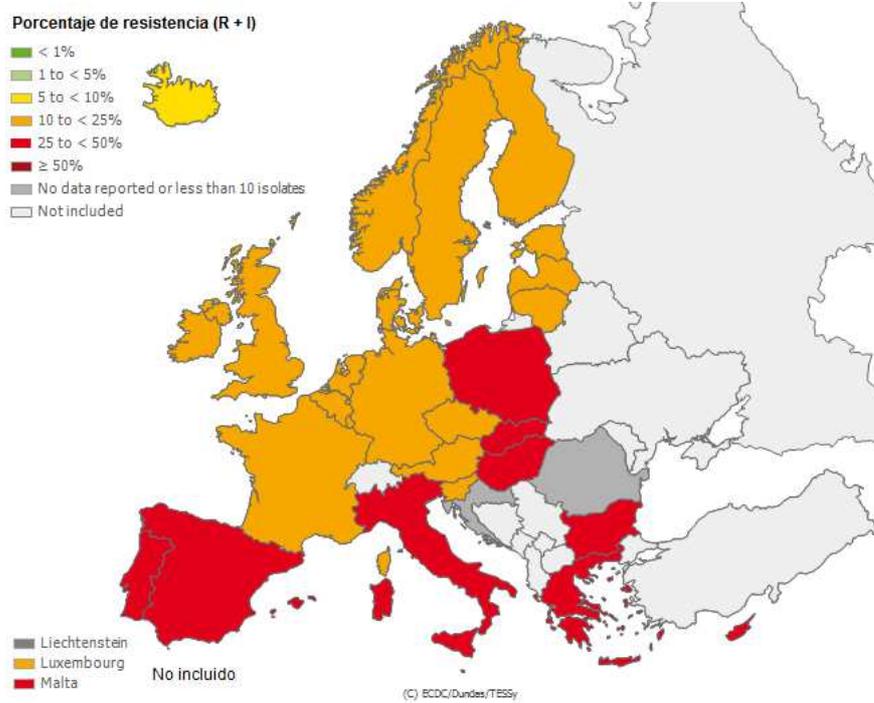
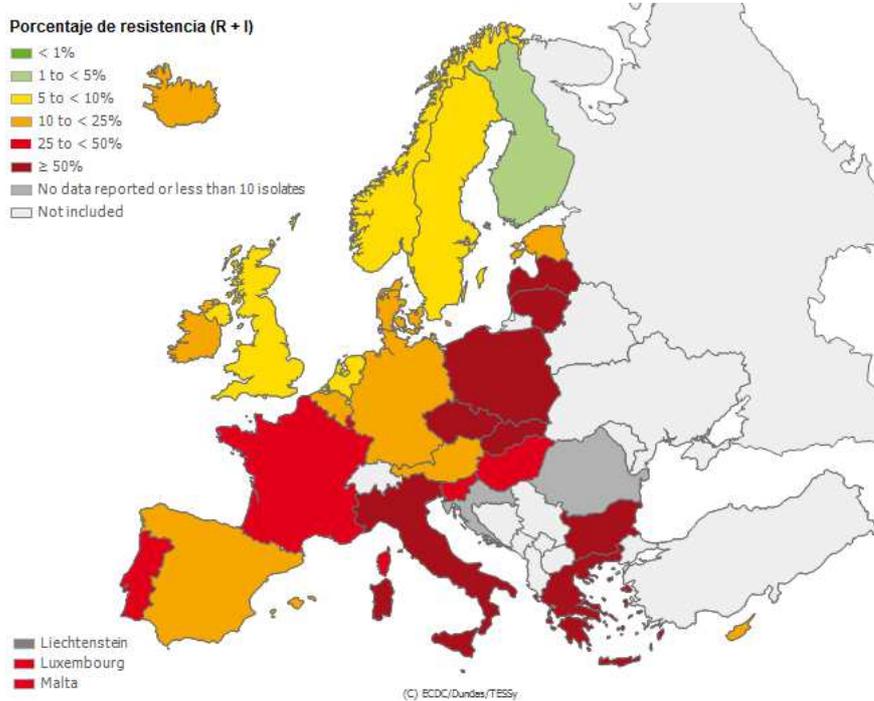


Figura 9. Panorama europeo de la resistencia a fluoroquinolonas en *E. coli* y *K. pneumoniae* (fenotipos I y R) en 2012. Fuente: EARS-Net.

A) *E. coli*



B) *K. pneumoniae*



En nuestro país, según datos del EARS-Net (*European Antimicrobial Resistance Surveillance Network*; <http://www.ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARS-Net>), la tasa de resistencia a quinolonas ha aumentado en este periodo de un 28% a un 34% en *E. coli*. En el caso de *Klebsiella pneumoniae* la tasa de resistencia a fluoroquinolonas ha aumentado en España en el mismo periodo del 11% al 16,5%. Este aumento de la resistencia a quinolonas no sólo se observa en nuestro país, sino que es una tendencia generalizada en la mayoría de los países europeos.

En la Figura 9 se puede ver el estado de la resistencia a fluoroquinolonas en Europa en el año 2012 de *E. coli* y *K. pneumoniae*. En los mapas se muestran los porcentajes de cepas no sensibles, incluyendo cepas con fenotipo resistente (R) y de sensibilidad intermedia (I).

Inicialmente se pensó que la resistencia a quinolonas tardaría en aparecer ya que se trataba de fármacos de origen sintético con un nuevo mecanismo de acción, sin embargo la resistencia apareció rápidamente. La adquisición de resistencia a quinolonas es un proceso secuencial, provocado principalmente por la acumulación de mutaciones cromosómicas en los genes que codifican las topoisomerasas tipo II. Aunque las mutaciones en los genes de la ADN girasa y la topoisomerasa IV suponen el principal mecanismo de resistencia, existen otros mecanismos tanto cromosómicos como plasmídicos.

1.3.1. Mecanismos cromosómicos

Los mecanismos cromosómicos de resistencia a quinolonas son tres: modificaciones en los genes de las dianas de las quinolonas (ADN girasa y topoisomerasa IV), alteraciones en las bombas de expulsión activa y cambios en la permeabilidad de la membrana debido a mutaciones en los genes codificantes de porinas. A principios de los años 90 se aisló en un modelo murino de infección peritoneal una cepa de *P. aeruginosa* con elevados niveles de resistencia a quinolonas debido, entre otros factores, a una modificación del lipopolisacárido (LPS)²⁸, pero existe poca información al respecto de este mecanismo de resistencia. Algunos autores sostienen que en *E. coli* la modificación del LPS podría darse como respuesta al estrés oxidativo²⁹.

1.3.1.1. Modificación de las dianas

La resistencia a quinolonas se debe principalmente a mutaciones en los genes codificantes de las topoisomerasas tipo II. En bacterias Gramnegativas las mutaciones se concentran en la región QRDR de *gyrA*, entre los aminoácidos 67 y 106. Aunque se han descrito numerosas mutaciones con diferente repercusión en la disminución de la sensibilidad a quinolonas, las mutaciones principalmente implicadas en el desarrollo de resistencia en la subunidad A de la ADN girasa se dan en las posiciones Ser83 y Asp87 en *E. coli*, o en las posiciones equivalentes en otros microorganismos³⁰. En la mayoría de los casos estas sustituciones suponen el cambio de un residuo apolar por uno polar; este cambio afecta a la estructura tridimensional de la topoisomerasa, modificando su sitio activo y/o disminuyendo la afinidad de las quinolonas por ella³¹. En *E. coli* los cambios más comunes son Ser83Leu, Ser83Thr y Asp87Asn, aunque no son las únicas sustituciones posibles. Se ha comprobado que mutaciones adicionales producidas en la posición Ser80 de *parC* provocan una disminución adicional de la sensibilidad a quinolonas³².

Tabla 2. Principales mutaciones descritas en el QRDR de *gyrA* en *E. coli*^{38,39}.

Aminoácido silvestre	Sustituciones	Aumento de la CMI (Número de veces)
Ala67	Ser	4
Gly81	Cys, Asp	8
Asp82	Gly	8
Ser83	Leu, Thr, Ala, Trp	10 – 32
Ala84	Pro	8
Asp87	Asn, Val, Gly, Tyr, Ala	16
Gln106	His, Arg	4 – 10

Como puede observarse en la Tabla 2, no todas las mutaciones confieren el mismo descenso de la sensibilidad a quinolonas, siendo las posiciones mencionadas anteriormente las que confieren un mayor aumento de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)^{30,33-35}. La Tabla 2 recoge las principales mutaciones descritas en aislados clínicos de *E. coli*. Se han realizado estudios con cepas isogénicas de *E. coli* donde se ha comprobado que el efecto de

las mutaciones en las posiciones 83 y 87 de GyrA es similar al hallado en aislados clínicos^{36,37}.

En microorganismos Grampositivos la resistencia a quinolonas se debe inicialmente a mutaciones en *parC*, y posteriormente a mutaciones en *gyrA*⁴⁰. Como ya se ha mencionado, existe un alto grado de conservación entre los genes de las topoisomerasas, lo que se ve reflejado en que las mutaciones asociadas a resistencia se localizan en puntos homólogos del QRDR de *gyrA* y *parC*; las posiciones 81, 83 y 87 de GyrA equivalen a las posiciones 78, 80 y 84 de ParC⁴¹.

También se han descrito mutaciones en los genes codificantes de la subunidad B de la ADN girasa (*gyrB*) y la topoisomerasa IV (*parE*), aunque su relevancia parece ser mucho menor. En el caso de *gyrB*, las sustituciones se producen principalmente en la región comprendida entre los residuos 426 y 447³⁸.

Tanto en bacterias Gramnegativas como en Grampositivas el nivel de resistencia a quinolonas es proporcional al número de mutaciones.

La alteración de la diana es un fenómeno secuencial, facilitando la presencia de una mutación la aparición de una segunda, y así sucesivamente hasta presentar 3 o 4 mutaciones, lo que conduce a elevados niveles de resistencia. Este proceso secuencial tiene importantes consecuencias epidemiológicas, ya que existe un elevado riesgo de seleccionar microorganismos con alto nivel de resistencia durante el tratamiento con fluoroquinolonas en cepas con alguna mutación preexistente en los genes de las topoisomerasas tipo II⁴².

1.3.1.2. Sistemas de expulsión activa

Aunque la modificación de la diana es el mecanismo más importante de resistencia a quinolonas, cada vez se da más importancia a la presencia de mecanismos de flujo activo (bombas de expulsión) capaces de expulsar el antimicrobiano de la bacteria, impidiéndose de este modo alcanzar las concentraciones suficientes de quinolonas para dañar irreversiblemente el ADN⁴³.

Los sistemas de expulsión activa juegan un papel esencial en las bacterias, contribuyendo al mantenimiento de la homeostasis celular. Estos sistemas pueden ser específicos para una molécula o eliminar moléculas estructuralmente diferentes. Los genes que codifican estos sistemas pueden encontrarse en el cromosoma bacteriano o en elementos

genéticos móviles. Algunos de estos sistemas son expresados constitutivamente (siendo responsables de la resistencia intrínseca a ciertos antimicrobianos en distintas especies de microorganismos), mientras que otros son controlados por sistemas de regulación o inducidos por mutaciones⁴⁴.

Los sistemas de expulsión activa bacterianos se clasifican en cinco categorías según el número de componentes del sistema, su secuencia aminoacídica, los sustratos que elimina, la fuente de energía utilizada para el transporte de las moléculas a través de la membrana y el número de segmentos transmembrana. Las cinco familias se detallan a continuación⁴⁵ (Figura 10).

- **Familia RND (*Resistance Nodulation Division*)**

Este sistema de bacterias Gramnegativas está formado por 3 componentes: una proteína transportadora o bomba localizada en la membrana interna, una proteína de fusión situada en el espacio periplásmico y una proteína localizada en la membrana externa o canal. En *E. coli* las proteínas que forman este sistema son AcrB, AcrA y TolC, respectivamente. La energía procede de un gradiente de protones. TolC puede interaccionar con bombas de otras familias como MFS (ErmAB) o ABC (MacAB).

El sistema AcrAB-TolC es el principal sistema de transporte activo en *E. coli*. En *P. aeruginosa* este sistema está representado por MexAB-OrpM.

- **Superfamilia ABC (*ATP-Binding Cassette*)**

Este sistema obtiene la energía de la hidrólisis de ATP y es capaz tanto de expulsar compuestos del interior celular como capturarlos del exterior. Aparece en bacterias Grampositivas y Gramnegativas; en estos últimos se asocia a una proteína de fusión y a una de membrana externa. En *E. coli* esta representado por el sistema MacAB.

- **Familia MATE (*Multidrug And Toxic-compound Extrusion*)**

Este sistema presente en microorganismos Grampositivos y Gramnegativos utiliza un gradiente de protones para obtener la energía para expulsar compuestos del interior celular. En *E. coli* el sistema YhdE pertenece a esta familia.

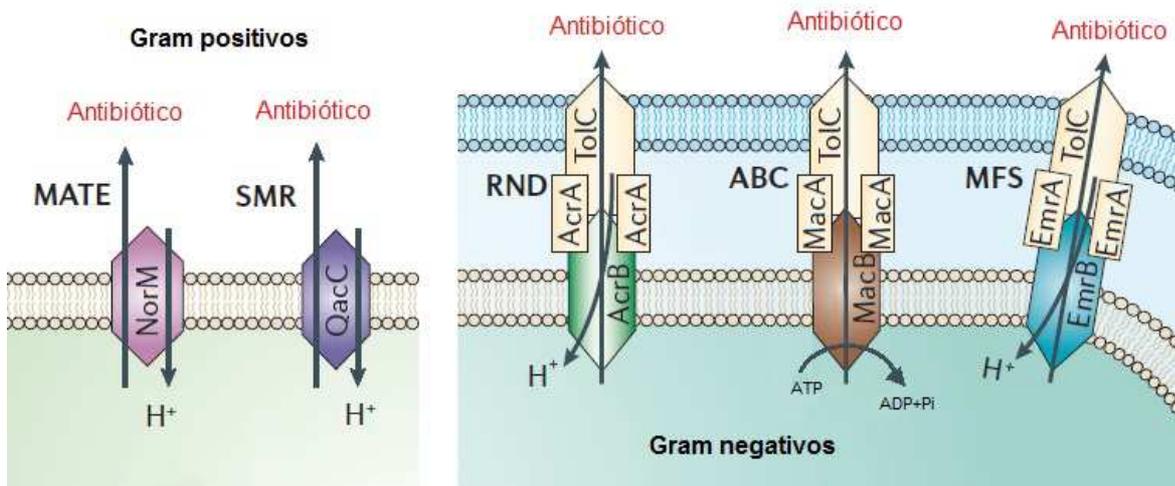
- **Familia SMR (*Small Multidrug Resistance*)**

El sistema ErmE de *E. coli* se incluye dentro de esta familia de transportadores con cuatros segmentos transmembrana. La energía se obtiene de un gradiente de protones.

- **Superfamilia MFS (*Major Facilitator Superfamily*)**

La energía para el transporte de moléculas es obtenida de un gradiente de protones. En microorganismos Grampositivos es monocomponente, pero en bacterias Gramnegativas debe asociarse a una proteína de fusión y a una proteína de membrana externa. El sistema ErmAB de *E. coli* forma parte de esta superfamilia.

Figura 10. Representación esquemática de los diferentes sistemas de expulsión activa.
Modificado de Piddock⁴⁵.



En *E. coli* se han descrito 7 bombas de la superfamilia MFS, 6 de la familia RND y sólo una de las familias SMR y MATE y la superfamilia ABC. En esta bacteria el sistema AcrAB-TolC juega un importante papel en la expulsión activa de quinolonas. Este sistema en *E. coli* se encuentra regulado por varios genes como *marR*, *marA* o *soxS*. Mutaciones en el gen *acrR*, represor local de *acrAB*, incrementa la actividad de la bomba. Algo similar sucede con la inactivación de *marR*. La expresión de los genes *acrA*, *acrB* y *tolC* es activada por el producto del gen *marA*. Este gen en condiciones normales se encuentra reprimido por MarR. Sin embargo, mutaciones en el gen *marR* ocasionan la desrepresión de *marA*, induciéndose la

expresión del sistema AcrAB-TolC. Esto ocasiona un aumento de la expulsión de quinolonas del interior celular, disminuyendo la concentración interna de estos antimicrobianos. A su vez, *marR* regula la expresión de la porina OmpF. Mutaciones en *marR* provocan también una disminución de la expresión de la porina OmpF, vía MarA. Esto ocasiona una disminución de la entrada de quinolonas a la célula bacteriana. En resumen, mutaciones en la proteína MarR aumentan la resistencia a las quinolonas al disminuir su concentración interna, tanto por un aumento de la expulsión de los fármacos como por una disminución de la entrada de éstos^{46,47}.

1.3.1.3. Alteraciones de la permeabilidad de la membrana

En bacterias Gramnegativas el acceso al interior celular de las quinolonas sucede por difusión pasiva (quinolonas hidrofóbicas) o a través de porinas (quinolonas hidrofílicas). La pérdida de porinas o la expresión de porinas alteradas estructuralmente contribuyen a una disminución de la sensibilidad a quinolonas. Este mecanismo no suele tener relevancia clínica a menos que vaya asociado a otros mecanismos de resistencia, ya que no inhiben completamente la entrada de quinolonas a la célula⁴⁸.

En *E. coli* la principal porina está codificada por el gen *ompF*, y supone la principal vía de entrada de las quinolonas hidrofílicas al interior celular. La disminución de la expresión de las porinas puede deberse a modificaciones o inactivaciones de los genes codificantes de éstas, así como en los genes reguladores, como es el caso del operón *mar*. Mutantes con la expresión de *ompF* disminuida presentan un aumento de la CMI de quinolonas de entre 2 y 4 veces⁴⁹.

En *K. pneumoniae* las principales porinas son OmpK35 y OmpK36. En este caso, las mutaciones que producen una disminución de la expresión de dichas porinas solo tienen efecto sobre la sensibilidad a quinolonas en cepas con mecanismos adicionales de resistencia a quinolonas (modificaciones en las topoisomerasas o mutaciones que afecten a sistemas de expulsión activa)⁵⁰.

1.3.2. Mecanismos plasmídicos

En 1998 Martínez-Martínez y colaboradores descubrieron el primer mecanismo de resistencia a quinolonas mediado por plásmido en una cepa de *K. pneumoniae* procedente de Alabama (EE.UU.). Se observó que transconjugantes que contenían este plásmido (pMG252) presentaban un incremento de la CMI de quinolonas, que en el caso de *E. coli* fue de 8 a 64 veces. Se comprobó que este incremento de la resistencia se debía a un gen de 657 pares de bases al que se denominó *qnr* (de *quinolone resistance*)⁵¹. A partir de este descubrimiento se han descrito varios mecanismos de resistencia a quinolonas mediados por plásmidos.

Actualmente se han descrito tres tipos de mecanismos plasmídicos de resistencia a quinolonas: 1) protección de la diana, 2) modificación enzimática de las quinolonas y 3) sistemas de expulsión activa.

1.3.2.1. Protección de la diana: genes *qnr*

En los últimos años han aparecido nuevas variantes alélicas del gen *qnr*, adquiriendo el nombre de *qnrA1* el primero que se describió. La búsqueda de nuevos mecanismos plasmídicos de resistencia a quinolonas ha llevado al descubrimiento de otras cinco proteínas similares: QnrS, QnrB, QnrC, QnrD y QnrVC. Se han descrito varias variantes alélicas de estas proteínas, existiendo actualmente: 7 QnrA, 74 QnrB, 9 QnrS, 2 QnrD, 5 QnrVC y un solo representante de QnrC (revisado en marzo de 2014 <http://www.lahey.org/qnrStudies>).

QnrS fue descrita en el año 2005 en un aislado de *Shigella flexneri* causante de un brote de enterocolitis en Japón. Se trata de una proteína de 218 aminoácidos⁵².

En el año 2006 Jacoby y colaboradores descubrieron un nuevo gen *qnr* (*qnrB*) en cepas de *K. pneumoniae* procedentes de la India,. Este gen codifica una proteína de 214 aminoácidos⁵³.

En el año 2009 se describió la presencia de dos nuevas proteínas Qnr: QnrC y QnrD. El gen *qnrC* fue descubierto en un aislado clínico de *Proteus mirabilis* portador del plásmido pHS9 en China. QnrC es una proteína de 221 aminoácidos⁵⁴. Por su parte, QnrD, proteína de 214 aminoácidos, también fue descubierto en China, pero en este caso en una cepa de *Salmonella enterica*⁵⁵.

En el año 2008 se describió en Brasil un gen tipo *qnr* en el cromosoma de *Vibrio cholerae* (denominado *qnrVC*)⁵⁶. Al tratarse de un gen cromosómico no fue aceptado como gen *qnr*. A la vez se detectó una forma no funcional en plásmidos de la familia *Vibrionaceae*. Posteriormente se describieron en plásmidos de *V. cholerae* y *Vibrio fluvialis* dos nuevas variantes funcionales: *qnrVC4* y *qnrVC5*, respectivamente⁵⁷, siendo aceptado el gen *qnrVC* como gen *qnr*. QnrVC1 es una proteína de 218 aminoácidos.

En la Tabla 3 se muestra la identidad aminoacídica entre las primeras proteínas descritas de cada familia de proteínas Qnr.

Tabla 3. Identidad aminoacídica de las distintas clases de proteínas Qnr⁵²⁻⁵⁶.

	QnrA1	QnrB1	QnrC	QnrD1	QnrS1
QnrB1	43%	-	-	-	-
QnrC	64%	41%	-	-	-
QnrD1	48%	61%	43%	-	-
QnrS1	59%	44%	59%	32%	-
QnrVC1	57%	48%	74%	46%	65%

Los genes *qnr* codifican proteínas pertenecientes a la familia de proteínas con repeticiones pentapeptídicas. Estas proteínas se caracterizan por presentar repeticiones de una secuencia de 5 aminoácidos semiconservada: [Ser, Thr, Ala o Val] [Asp o Asn] [Leu o Phe] [Ser, Thr o Arg] [Gly]⁵⁸.

Actualmente existe consenso a nivel mundial para la nomenclatura y definición de los genes *qnr*⁵⁹. Un gen *qnr* se define como un gen de origen natural que codifica una proteína de repeticiones pentapeptídicas y confiere bajo nivel de resistencia a ácido nalidíxico o a fluoroquinolonas. Las familias de genes *qnr* difieren en al menos un 30% de su secuencia nucleotídica o aminoacídica. Dentro de cada familia, los diferentes alelos difieren en uno o más aminoácidos.

Se conocen más de 1.000 proteínas pertenecientes a esta familia, sin embargo no se conoce claramente su función biológica. MfpA es una proteína de esta familia presente en el cromosoma de varias especies de micobacterias con una identidad aminoacídica del 18,9% con QnrA1⁶⁰. Esta proteína, de función desconocida, provoca un descenso de la sensibilidad

a quinolonas cuando se expresa en *E. coli* ya que compite con el ADN para unirse a la ADN girasa. De este modo, las quinolonas no pueden formar el complejo con el ADN y la topoisomerasa^{60,61}. También se ha visto que existen proteínas con repeticiones pentapeptídicas que forman parte de un sistema toxina-antitoxina, como McbG. McbG protege a la ADN girasa de la microcina B17, molécula que inhibe esta enzima al igual que las quinolonas⁶².

La función fisiológica de las proteínas Qnr no se conoce actualmente. Se ha postulado que estas proteínas podrían pertenecer a un sistema toxina-antitoxina; actuarían como antitoxinas protegiendo a la ADN girasa y a la topoisomerasa IV de alguna toxina natural todavía no conocida⁶³. Las proteínas Qnr también podrían actuar como GyrI, un regulador de la ADN girasa⁶⁴. Por último, la presencia de una caja de unión a LexA en las proximidades de *qnrB* y *qnrD* podría indicar que estas proteínas están implicadas en la protección de las células ante daños en el ADN^{65,66}.

Se ha visto que las proteínas Qnr no están implicadas ni en modificación enzimática de las quinolonas ni en la disminución de la concentración intracelular de éstas, sino que interactúan directamente con la ADN girasa y la topoisomerasa IV. La unión entre la proteína Qnr y la topoisomerasa se produce antes de que el enzima se una al ADN, de forma que se reduce el efecto de las quinolonas^{67,68}.

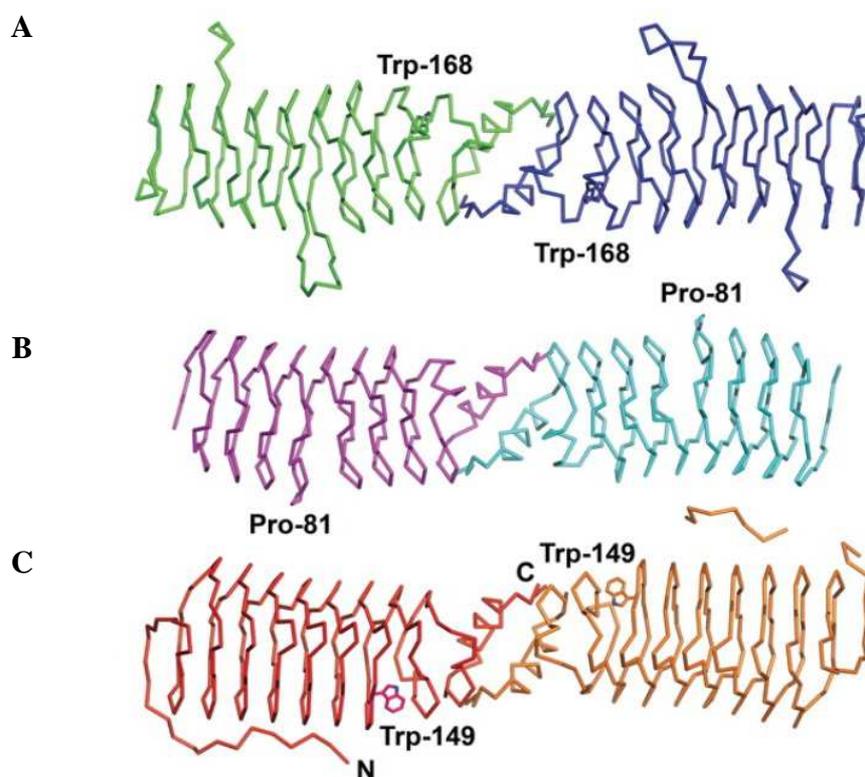
Aunque se han encontrado diversos genes tipo *qnr* en el cromosoma tanto de bacterias Gramnegativas como Grampositivas, se desconoce el posible origen de la mayoría de proteínas Qnr. Se piensa que los genes *qnr* se originaron a partir de microorganismos acuáticos y/o ambientales. En el caso de QnrA1 es posible que su origen se encuentre en *Shewanella algae*, ya que se ha identificado un gen tipo *qnr* en el cromosoma de esta bacteria que presenta en torno a un 97% de identidad aminoacídica con *qnrA1*. Además el contenido G+C del genoma de esta bacteria (52%) coincide con el del gen *qnrA1*⁶⁹.

En el cromosoma de diferentes especies de la familia Vibrionaceae se han encontrado genes tipo *qnr* que presentan una homología de entre el 40 y el 67% con los genes *qnr*. En *V. splendidus* hay un gen cromosómico que presenta una identidad aminoacídica del 84 y 88% con *qnrS1* y *qnrS2*, respectivamente^{70,71}. Con respecto a QnrB, existen proteínas de codificación cromosómica con una elevada identidad aminoacídica en *Stenotrophomonas maltophilia* (Smqnr, 88%) y *Serratia marcescens* (Smaqnr, 80%). Smqnr es responsable de la

resistencia intrínseca de *S. maltophilia* a quinolonas, y Smaqnr origina una reducción de la sensibilidad a quinolonas cuando se expresa en *E. coli*^{72,73}.

También se han descrito genes tipo *qnr* en el cromosoma de gran cantidad de microorganismos Grampositivos: *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens* o *Bacillus subtilis*. La expresión de estos genes en *E. coli* provoca una disminución de la sensibilidad a quinolonas⁷⁴, por lo que podrían estar implicados en la resistencia natural a quinolonas de algunas de las especies donde se han descrito. Estos genes cromosómicos muestran una identidad aminoacídica entre el 15 y 32% con respecto a los genes *qnr*, observándose ciertas posiciones conservadas en ambos tipos de genes. Estos datos sugieren que los genes tipo *qnr* de codificación cromosómica de microorganismos Grampositivos y de Gramnegativos podrían actuar de reservorio potencial de nuevos genes *qnr* plasmídicos.

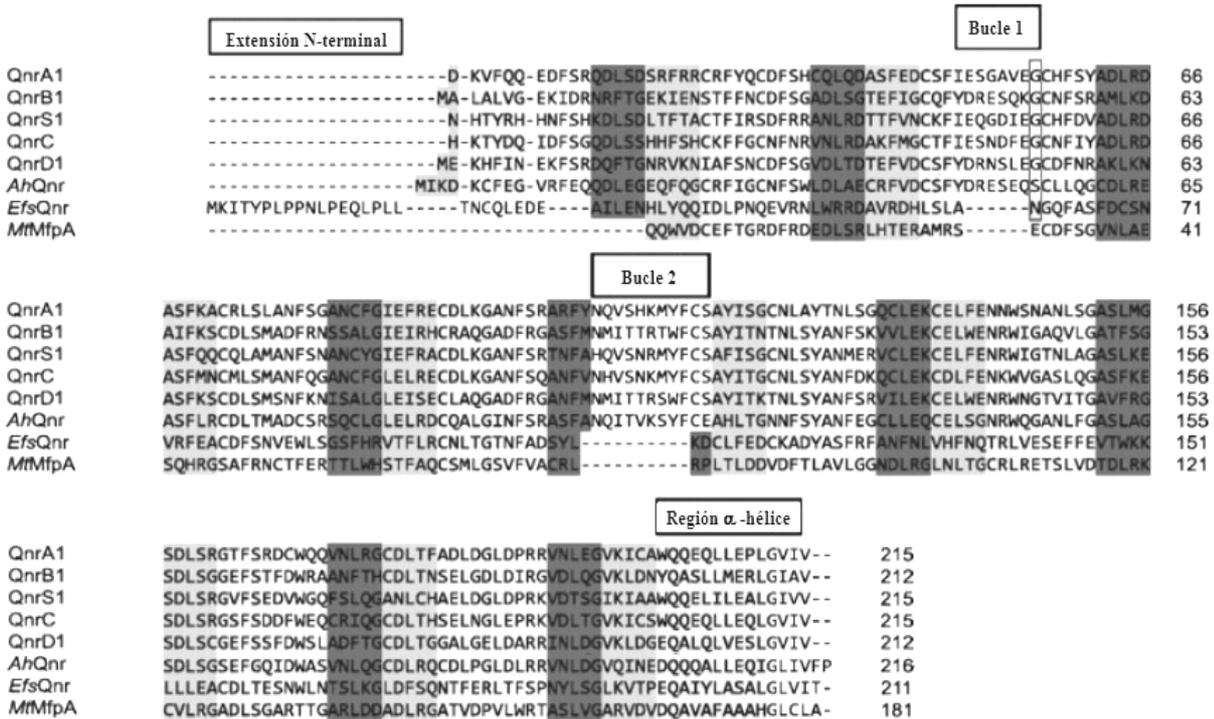
Figura 11. Comparación de las estructuras de AhQnr (A), MtMfpA (B) y EfsQnr (C). Modificado de Xiong y cols⁷⁵.



Mediante la cristalización de diversas proteínas pentapeptídicas encontradas en el cromosoma de microorganismos Grampositivos y Gramnegativos (MtMfpA de *M. tuberculosis*, EfsQnr de *E. faecalis* y AhQnr de *Aeromonas hydrophila*) se ha visto que la estructura tridimensional de estas proteínas consiste en la formación de una β -hélice cuadrangular y dextrógira. Esta estructura es similar en tamaño, curvatura y características electrostáticas a la forma B del ADN^{61,75,76} (Figura 11).

Al estudiar las secuencias de los genes *qnr* y compararlas con las secuencias de las proteínas pentapeptídicas anteriores, se observó que las proteínas Qnr, así como AhQnr, están formadas por 36 repeticiones pentapeptídicas interrumpidas por dos asas que se proyectan hacia el exterior de la proteína. Estos dos bucles están ausentes en las proteínas pentapeptídicas de *E. faecalis* y *M. tuberculosis*⁷⁷ (Figura 11). Además, la secuencia de estos lazos se encuentra altamente conservada, sobre todo la del lazo más largo o bucle 2 (Figura 12). Mutaciones en el bucle 2 de la proteína AhQnr afectan a la protección de la ADN girasa frente a quinolonas, lo que indica el posible papel de este asa para el desarrollo de la actividad de la proteína.

Figura 12. Alineamiento de las secuencias aminoácidas de QnrA1, QnrB1, QnrS1, QnrC, QnrD1, AhQnr, EfsQnr y MtMfpA. Modificado de Park y cols⁷⁷.



Las bacterias que portan genes *qnr* poseen con una alta frecuencia otros mecanismos de resistencia a quinolonas: modificaciones en las dianas, pérdida de porinas, etc. Se han descrito casos en los que se ha detectado la presencia de más de un gen *qnr* en el mismo plásmido, normalmente se trata de la coexistencia de *qnrS* con *qnrA* o *qnrB*. En estos casos no se aprecia un efecto aditivo entre ellos^{78,79}.

Los genes de resistencia a quinolonas se han encontrado en plásmidos de tamaños muy variados (7 – 320 Kb) y de distintos grupos de incompatibilidad, así como asociados a otros determinantes de resistencia.

Los genes *qnrA* y *qnrB* se han encontrado en integrones de clase 1 y asociados a secuencias ISCR1. Los genes *qnrB* se han visto también asociados a la recombinasa Orf1005 o a ISEcp1. A diferencia de *qnrA* y *qnrB*, los genes *qnrS* no se asocian a ISCR1 ni a integrones (aunque existen casos en que se asocian a estructuras tipo Tn3) y suelen aparecer en plásmidos más pequeños⁸⁰. Otra diferencia entre estos tres genes es el hecho de que los plásmidos portadores de *qnrA* y *qnrB* suelen portar otros determinantes de resistencia a betalactámicos, aminoglucósidos, cloranfenicol, tetraciclina, rifampicina o cotrimoxazol, mientras que los que portan *qnrS* no, quizás debido a su menor tamaño⁸⁰⁻⁸². De los entornos genéticos de *qnrC* y *qnrD* existen muy pocos datos; mientras que *qnrVC* se ha detectado en integrones de clase 1^{57,83}.

1.3.2.2. Modificación enzimática de las quinolonas: gen *aac(6')-Ib-cr*

En 2006 se describió un nuevo gen responsable del aumento de la CMI de ciprofloxacino en aislados clínicos de *E. coli* en Shanghai⁸⁴. Se trataba de una variante de una acetiltransferasa (*aac(6')-Ib*) capaz de acetilar aminoglucósidos, confiriendo resistencia a tobramicina, amikacina y kanamicina. Esta nueva variante, denominada Aac(6')-Ib-cr es capaz también de acetilar quinolonas con un grupo piperacínil (ciprofloxacino y norfloxacino). La enzima Aac(6')-Ib-cr presenta dos cambios aminoacídicos con respecto a la variante silvestre: Trp120Arg y Asp179Tyr, los cuales son suficientes para el incremento de la CMI de ciprofloxacino. Este gen se ha identificado como casete de resistencia en integrones de tipo 1⁸⁴.

1.3.2.3. Sistemas de expulsión activa: genes *qepA* y *oqxAB*

Como ya se mencionó anteriormente, las bombas de expulsión activa pueden estar codificados por el cromosoma bacteriano o por plásmidos.

En 2007 se describió por primera vez la bomba QepA; esta proteína de 511 aminoácidos perteneciente a la familia MFS fue descrita en aislados clínicos de *E. coli* de Japón y Bélgica^{85,86}. Se ha descrito una nueva variante de esta bomba (QepA2) con un par de cambios aminoacídicos y con un efecto similar a QepA⁸⁷.

Otro sistema de expulsión activa que confiere una disminución de la sensibilidad a quinolonas y es de codificación plasmídica es OqxAB. Esta bomba fue descrita por primera vez en 2004 en una cepa de *E. coli* de origen porcino⁸⁸. Posteriormente se ha visto que los genes responsables de este sistema se encuentran presentes en el cromosoma de *K. pneumoniae*⁸⁹. Esta bomba pertenece a la familia RND y confiere resistencia a otros antimicrobianos como el cloranfenicol.

El gen *oqxAB* se ha descrito asociado al transposón Tn3 y a IS26⁸¹; por su parte *qepA* se ha asociado con IS15 e ISCR3C⁹⁰.

1.3.2.4. Efecto de los mecanismos plasmídicos en la sensibilidad a quinolonas

Los mecanismos plasmídicos de resistencia a quinolonas, aunque aumentan la CMI de dichos antimicrobianos, no producen por si mismos niveles de resistencia clínica a las mismas⁸¹.

La presencia de un gen *qnr* provoca un aumento de unas 8 veces la CMI de ácido nalidíxico y de 64 veces la de ciprofloxacino en el caso de *qnrA1*, *qnrB1* y *qnrS1*^{91,92}. En el caso de QnrC y QnrD1 el aumento de la CMI de ciprofloxacino es de 32 y 64 veces, respectivamente^{54,55}.

El efecto *in vitro* de los genes *qnr* se ha comprobado *in vivo* mediante el uso de modelos animales. Se han realizado modelos murinos, tanto de infección del tracto urinario como de neumonía, utilizando cepas isogénicas de *E. coli* o *K. pneumoniae*⁹³⁻⁹⁶. En estos modelos se ha estudiado el efecto de los genes *qnr*, en algunos casos en combinación con otros mecanismos que confieren resistencia a quinolonas (principalmente la mutación

Ser83Leu en *gyrA*), sobre la eficacia de ciprofloxacino y/o levofloxacino. Los estudios publicados coinciden en demostrar que la presencia de los genes *qnrA*, *qnrB* y *qnrS* reduce la eficacia y actividad bactericida de las fluoroquinolonas evaluadas, a pesar de que estos genes sólo confieren bajo nivel de resistencia a fluoroquinolonas.

Estos mecanismos plasmídicos favorecen la emergencia de mutantes con menor sensibilidad a quinolonas. La presencia de las proteínas QnrA, QnrB y QnrS aumenta la Concentración Preventiva de Mutantes (CPM) de ciprofloxacino entre 2 y 8 veces⁹¹, obteniéndose valores similares a las concentraciones alcanzadas en suero por este antimicrobiano durante el tratamiento de una infección^{95,97}.

El aumento de la CMI provocado por la acetiltransferasa *aac(6')-Ib-cr* es menor que en el caso de los genes *qnr* y sólo afecta a ciprofloxacino y norfloxacino, ocasionando un aumento de 4 veces la CMI de estas fluoroquinolonas. A pesar del leve aumento de la CMI, esta enzima produce un incremento de 10 veces la CPM⁸⁴.

En el caso de las bombas de expulsión plasmídicas, la presencia de QepA ocasiona un aumento de la CMI de ácido nalidíxico y ciprofloxacino de 2 y 32 veces, respectivamente⁹⁰. OqxAB ocasiona un aumento de 8 y 16 veces la CMI de ácido nalidíxico y ciprofloxacino, respectivamente⁹⁸.

En múltiples estudios se ha visto que existe relación entre la resistencia a quinolonas y a otros antimicrobianos. Esto es debido a que los plásmidos que portan genes *qnr* suelen portar también genes que codifican betalactamasas de espectro extendido (BLEEs), otras betalactamasas o enzimas inactivantes de aminoglucósidos⁹⁹. Este hecho explicaría parcialmente la asociación de resistencia a fluoroquinolonas y betalactámicos en enterobacterias, así como la capacidad de coselección entre ambos grupos de antimicrobianos.

1.3.2.5. Epidemiología de los mecanismos plasmídicos de resistencia a quinolonas

Desde el descubrimiento a finales de los años 90 del primer mecanismo plasmídico de resistencia a quinolonas se han llevado a cabo multitud de estudios para conocer la prevalencia de estos mecanismos de resistencia en aislados clínicos, encontrando en general

una prevalencia baja. Estos genes presentan una distribución cosmopolita. Se han encontrado principalmente en enterobacterias, siendo *Enterobacter* spp. y *K. pneumoniae* las que con mayor frecuencia contienen estos mecanismos^{80,81}. En un reciente estudio de prevalencia de mecanismos plasmídicos de resistencia a quinolonas realizado en Europa (entre 1994 y 2009) en muestras de origen humano, animal y ambiental, se observó que el 15% de las cepas de *E. coli* analizadas presentaban estos mecanismos. En este estudio *qnrS1* fue el mecanismo encontrado con mayor frecuencia¹⁰⁰.

Una de las principales limitaciones existentes cuando se estudian estos mecanismos es la ausencia de marcadores fenotípicos específicos de los mismos, ya que por sí mismos sólo causan un ligero aumento de la CMI que no llega a rebasar los puntos de corte de resistencia, lo que hace que la detección deba realizarse por métodos moleculares en cepas sospechosas, lo que probablemente ha originado una subestimación de la prevalencia de estos mecanismos.

1.4. Especies reactivas de oxígeno

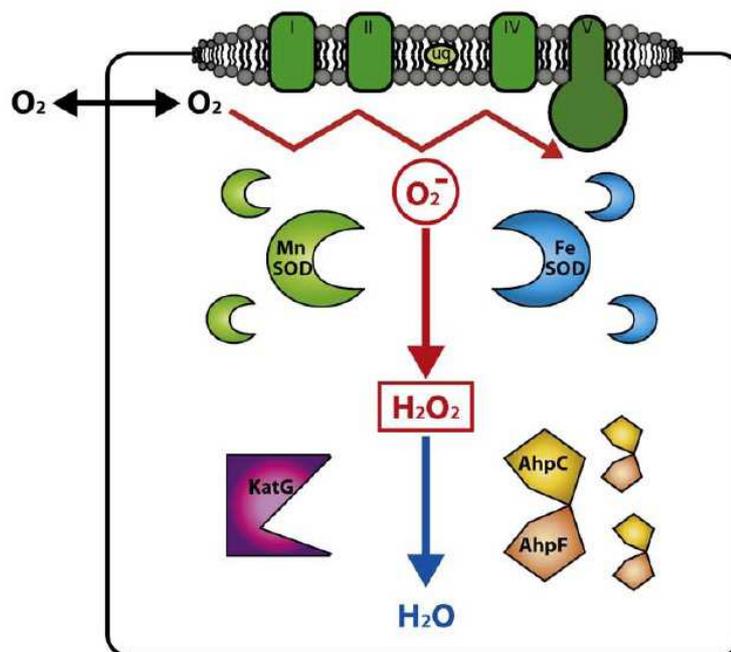
A pesar del mayor rendimiento energético del metabolismo aerobio frente al anaerobio, durante la respiración aerobia se forman especies reactivas de oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*) parcialmente reducidas que son perjudiciales para la célula^{101,102}.

Las ROS son generadas por reducción del oxígeno, produciéndose radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo ($OH\cdot$) por la reducción del oxígeno con uno, dos o tres electrones, respectivamente.

Uno de los puntos clave de la formación de ROS es la interacción entre el oxígeno y la cadena de transporte respiratorio, concretamente las flavoenzimas cuyos centros activos participan en la transferencia de electrones al oxígeno (Figura 13). En condiciones de aerobiosis, el oxígeno penetra al interior celular y reacciona, entre otras moléculas, con las flavoenzimas de la cadena respiratoria, generándose radical superóxido. La cadena de transporte electrónico es la principal fuente de radical superóxido¹⁰³. Este radical es eliminado por las enzimas superóxido dismutasas citoplasmáticas, las cuales producen H_2O_2 a partir de O_2^- , compuesto también tóxico para la célula y que debe ser eliminado por otras enzimas: catalasas o peroxidasas.

Las células tienen diferentes reguladores para combatir la formación de ROS. En *E. coli* el sistema SoxR-SoxS regula los niveles de O_2^- ; la presencia de O_2^- activa este sistema, el cual induce la expresión de superóxido dismutasa, deshidratatas resistentes a O_2^- y enzimas reparadoras del ADN. Este sistema también regula la expresión de *marA*, gen implicado, como ya se ha mencionado, en la resistencia a antimicrobianos^{29,104}. En cuanto a la eliminación del peróxido de hidrógeno, en las células hay peroxidasa de expresión constitutiva, pero también existe el sistema OxyR-OxyS, una peroxidasa cuya expresión se activa en presencia de elevados niveles de H_2O_2 vía el regulador KatG¹⁰⁵.

Figura 13. Generación de ROS en condiciones naturales.
Adaptado de Dwyer y cols¹⁰⁵.



En la célula existen enzimas que eliminan los radicales O_2^- y H_2O_2 , pero no enzimas que catalicen la eliminación de radical hidroxilo. Este radical se forma a partir del H_2O_2 vía reacción Fenton¹⁰⁶. En esta reacción el ión ferroso es oxidado a ión férrico por el H_2O_2 liberándose $OH\cdot$. Esta reacción sucede cuando se desestabilizan los centros sulfoférricos de diferentes enzimas que participan en el metabolismo redox de las células, hecho que sucede en condiciones de estrés oxidativo. El radical hidroxilo provoca daño en el ADN, lípidos y proteínas, con el consiguiente efecto tóxico o mutagénico¹⁰⁷.

En los últimos años se está prestando especial atención a la relación entre la formación de ROS y la actividad de los antimicrobianos, para intentar conocer mejor el mecanismo de acción de los antimicrobianos y el desarrollo de resistencia.

1.4.1. ROS y actividad bactericida de los antimicrobianos

Se considera que los principales antimicrobianos bactericidas (quinolonas, betalactámicos y aminoglucósidos) inducen en las bacterias la muerte celular mediante una respuesta de estrés oxidativo que aumentaría los niveles intracelulares de ROS, concretamente de radical hidroxilo (Figura 14)¹⁰⁸. Este efecto no es producido por antimicrobianos bacteriostáticos.

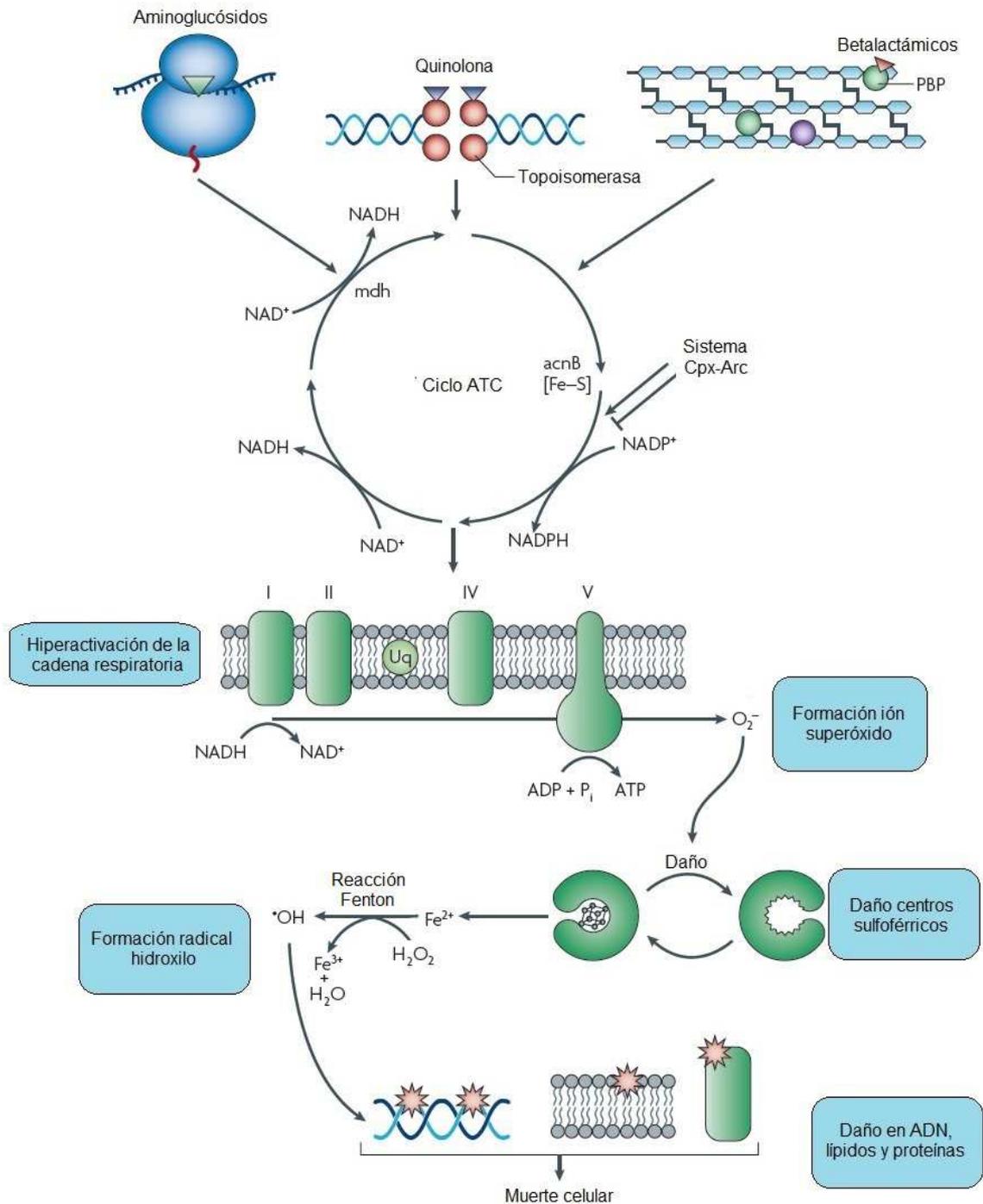
La presencia del antimicrobiano favorece la oxidación de NADH a través de la cadena respiratoria mediante la estimulación del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (ATC). La hiperactividad de la cadena respiratoria, provocada por la unión del antimicrobiano a su diana, estimula la formación de O_2^- . Este acúmulo de O_2^- rebasa los sistemas de defensa celulares, de modo que el O_2^- provoca la oxidación de los centros sulfoféricos de muchas deshidratasa, lo que conlleva a la desestabilización de estos centros y a la liberación de ión ferroso. El ión ferroso liberado es reducido por el H_2O_2 , producido a partir de O_2^- por acción de la superóxido dismutasa, mediante reacción de Fenton, originándose $OH\cdot$. Este radical provoca daño en el ADN, lípidos y proteínas contribuyendo a la muerte celular¹⁰⁹.

Las quinolonas, los aminoglucósidos y los betalactámicos también inducen la formación de ROS mediante la activación del sistema de dos componentes Cpx-Arc. La activación de este sistema altera el metabolismo celular (provoca la activación del ciclo de los ácidos tricarboxílicos) y el potencial de membrana de las células bacterianas, lo que conlleva a la formación de $OH\cdot$ ¹⁰⁸ (Figura 14).

Aunque el mecanismo por el que provocan la muerte celular sería el mismo para los tres grupos de antimicrobianos, se ha comprobado que para el efecto bactericida de las quinolonas son esenciales las superóxido dismutasas SodA y SodB, mientras que para los betalactámicos y los aminoglucósidos el enzima esencial es la peroxidasa AhpC¹¹⁰.

Entre las evidencias que apoyan este mecanismo está el hecho de que tanto los quelantes de iones (que inhiben la formación de $OH\cdot$ vía reacción Fenton) como la tiourea (compuesto que secuestra el $OH\cdot$) reducen la letalidad de los antimicrobianos bactericidas¹⁰⁸.

Figura 14. Mecanismo de muerte celular inducido por antimicrobianos bactericidas. Adaptado de Kohanski y cols¹⁰⁹.



En los últimos dos años se han publicado otros estudios que sostienen que la acción letal de los antimicrobianos bactericidas no se debe exclusivamente a la formación de

ROS^{111,112}, ya que estos radicales sólo actúan a bajas concentraciones de antimicrobianos, pero no a concentraciones elevadas.

1.4.2. ROS y resistencia bacteriana

Las quinolonas pueden inducir el desarrollo de resistencia por una vía independiente del sistema SOS, así como por una vía dependiente de SOS mediada por la inducción de RecA^{113,114}. En la vía dependiente de SOS se produce la expresión de la polimerasa V, la cual tiene una alta tasa de error y es la principal responsable de la aparición de mutaciones en el ADN¹¹⁵.

Como se ha expuesto en el apartado anterior, los antimicrobianos bactericidas estimulan la producción de ROS, y uno de los radicales originados (OH·) es capaz de dañar directamente al ADN y provocar la acumulación de mutaciones en el material genético. Si se inhibe la formación de ROS, el tratamiento con antimicrobianos bactericidas no genera un aumento de la tasa de mutaciones; mientras que cuando no está inhibida la formación de estos radicales se observa un aumento de las mutaciones¹¹⁶. Estos datos apoyan el hecho de que existe una correlación entre ROS y mutagénesis.

Entre los daños producidos en el ADN por ROS se encuentran la producción de roturas de una o las dos hebras del ADN, así como la introducción de bases anómalas. La guanina es particularmente sensible a la acción de las ROS por su bajo potencial redox, siendo la 7,8-dihidro-8-oxoguanina uno de los principales productos de la oxidación de este nucleótido^{105,117}.

La colocación de bases anómalas en el ADN ocasiona la aparición de mutaciones, ya que la base 7,8-dihidro-8-oxoguanina es capaz de emparejarse con adenina, lo que conlleva la transversión de un alineamiento G:C por T:A si la base no es reparada. Este punto puede ser crítico para la hipermutabilidad, mutagénesis oxidativa inducida por antimicrobianos, y en definitiva para la adquisición de resistencia. Las especies reactivas de oxígeno crearían la base sobre la que después actúa la respuesta SOS para provocar las mutaciones¹⁰⁵.

Las células tienen sistemas para eliminar las bases anómalas. El sistema GO está formado por tres proteínas que evitan la incorporación de la base 7,8-dihidro-8-oxoguanina al ADN. MutT actúa sobre las bases libres convirtiéndolas en la forma monofosfato, evitando

su incorporación al ADN. MutM es una glicosilasa que elimina la base anómala del ADN, y MutY la glicosilasa que elimina la adenina incorporada de forma incorrecta^{118,119}.

Tras la actuación de estas glicosilasas se crea un sitio abásico en el ADN. Para la solución de los sitios abásicos se necesita la actuación compenetrada de endonucleasa, ligasa y polimerasa. Si dos sitios abásicos se encuentran próximos se podrían generar roturas de doble hebra, lo que desencadenaría la respuesta SOS^{120,121}. Estos sitios son muy buenos sustratos de la ADN polimerasa V, por lo que son puntos calientes para la introducción de mutaciones.

La polimerasa V, así como otras polimerasas (polimerasa III y IV), están implicadas no sólo en la mutagénesis provocada por los antimicrobianos bactericidas, sino también en la muerte celular mediada por estos antimicrobianos. Se ha comprobado que estas polimerasas, en situaciones de estrés oxidativo son capaces de introducir en el ADN una alta cantidad de 7,8-dihidro-8-oxoguanina, apareciendo estas bases próximas en el ADN. Como se ha mencionado, esto ocasiona la aparición de múltiples roturas de doble cadena que provocan, además de la activación del sistema SOS, la muerte celular¹¹⁷.

En resumen, cualquier condición que fomente el estrés oxidativo, incluido el tratamiento a concentraciones subletales de un antimicrobiano bactericida, fomenta la mutagénesis y, por ende, la emergencia de resistencia a los antimicrobianos. Las concentraciones subletales se dan en tratamientos incompletos o cuando el fármaco tiene una accesibilidad limitada al lugar de la infección¹²².

1.5. *Fitness* bacteriano

El *fitness* o éxito biológico se define como la capacidad de un genotipo o un organismo, ya sea unicelular o pluricelular, de sobrevivir y reproducirse en un ambiente dado¹²³. La resistencia a los antimicrobianos, particularmente a fluoroquinolonas, se ha asociado tradicionalmente a una reducción del *fitness* de las bacterias o a un coste biológico, teoría que ha sido apoyada por múltiples estudios¹²⁴⁻¹²⁶. Una de las posibles causas de este coste biológico se encuentra en el hecho de que las dianas de los antimicrobianos suelen llevar a cabo importantes funciones fisiológicas (síntesis de la pared celular, transcripción y traducción del ADN, regulación del estado de superenrollamiento del ADN, etc.)¹²³. Por

tanto, no es sorprendente que las cepas con mutaciones en los genes codificantes de estas dianas presenten una disminución del *fitness* a la vez que un aumento de la resistencia. La adquisición de plásmidos de resistencia mediante transmisión horizontal también se ha observado que produce una reducción del *fitness*, debido a que la replicación del plásmido o la expresión de genes plasmídicos supone un coste energético extra para la célula y puede interferir en el crecimiento bacteriano¹²⁷. Esto ha llevado a pensar que la reducción en el consumo de antimicrobianos (y por tanto de la presión selectiva) beneficiaría a las bacterias sensibles frente a las resistentes por selección natural, llevando a la disminución de éstas últimas^{128,129}.

Existen varias razones por las que es importante estudiar el *fitness* bacteriano: 1) el coste biológico tiene un gran impacto en el desarrollo, mantenimiento y desaparición de la resistencia antimicrobiana^{130,131}; 2) el desarrollo de nuevos fármacos debería considerar el impacto en el *fitness* bacteriano, desarrollándose fármacos cuyos mecanismos de resistencia presenten coste biológico, ya que el *fitness*, al igual que la tasa de mutaciones de resistencia, es un parámetro importante en el desarrollo de resistencia bacteriana¹³¹; y 3) el estudio del *fitness* bacteriano nos permite un mejor conocimiento de la fisiología y regulación del metabolismo bacteriano^{132,133}.

1.5.1. Determinación del *fitness* bacteriano

Para establecer la relación entre *fitness* y resistencia antimicrobiana se requieren experimentos con cepas isogénicas, de modo que se pueda establecer claramente la relación entre genotipo, fenotipo de resistencia y *fitness*. Establecer esta conexión con aislados clínicos es difícil, ya que no suelen obtenerse aislados isogénicos sensible y resistente de un mismo paciente, por lo que en estos casos habría numerosos factores que distorsionarían la información obtenida¹²³.

El *fitness* siempre debe calcularse en relación a una cepa control. Existen varias formas de medir el *fitness* como se indica en la Figura 15.

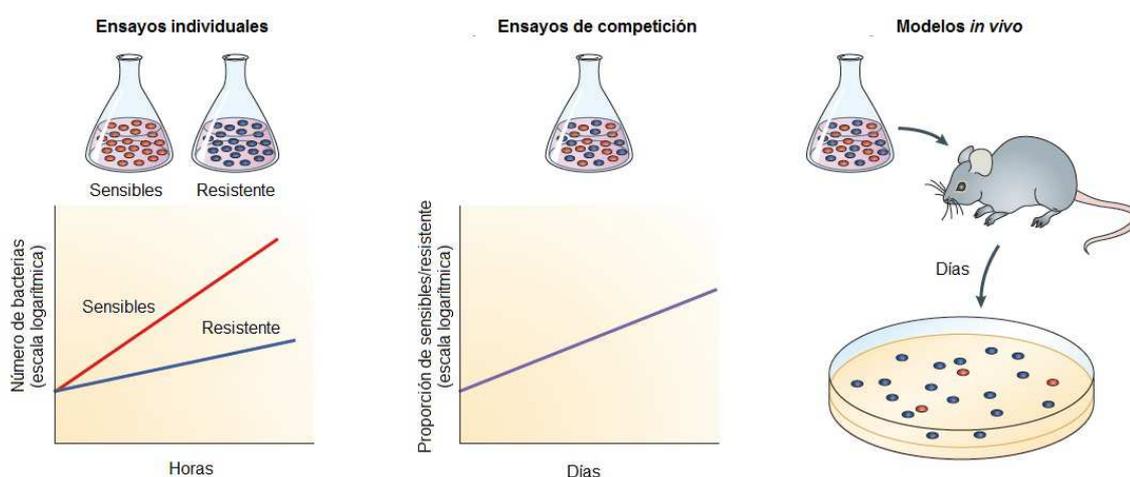
- **Ensayos individuales:** es la forma más sencilla de medir el *fitness*, basta con calcular la tasa de crecimiento y/o el tiempo de generación durante la fase exponencial. Con estos ensayos se pueden detectar diferencias iguales o superiores al 5% en el tiempo de generación de dos cepas distintas¹²³.

- **Ensayos de competición:** en estos ensayos se hace crecer juntas a las dos cepas que queremos comparar, mezclándolas en una proporción 1:1 inicialmente y dejándolas crecer durante varias generaciones. Posteriormente los cultivos se siembran en placas que permitan la diferenciación de ambas cepas. Es un método laborioso, ya que requiere pases del cultivo cada varios ciclos de crecimiento en medio fresco^{37,134}.

Estos ensayos tienen la ventaja de que tienen en cuenta varios componentes del *fitness* (periodo de latencia, fase exponencial y estacionaria del crecimiento y eficiencia en el uso de recursos). Con esta técnica se pueden detectar diferencias en el *fitness* entre ambas cepas iguales o superiores al 1% por generación¹³⁵. Con el uso de marcadores fluorescentes se podría llegar a discriminar diferencias en torno al 0,1%¹³⁶.

- **Modelos animales:** en estos ensayos *in vivo* se pueden llevar a cabo tanto ensayos de competición como individuales. El uso de estos modelos tiene mayor repercusión clínica, ya que permite medir tasas de mortalidad teniendo en cuenta el sistema inmune del huésped¹³⁷.

Figura 15. Determinación del *fitness* bacteriano. Adaptado de Andersson y cols¹²³.



A la hora de interpretar los anteriores ensayos hay que considerar que el *fitness* se ve afectado por factores ambientales; por tanto, algunas mutaciones que muestran un bajo coste *in vitro* pueden presentar un alto coste en modelos murinos, y viceversa¹³⁸.

1.5.2. Efecto de la resistencia antibiótica sobre el *fitness* bacteriano

La resistencia a los antimicrobianos depende de dos factores, la aparición de resistencias *de novo* y la adquisición de mecanismos de resistencia por transferencia horizontal, soliendo presentar ambos mecanismos un coste biológico¹²⁷. El nivel de exposición de la población resistente a los antimicrobianos va a influir en gran medida en la expansión de la resistencia^{139,140}.

No todas las mutaciones que conducen a la adquisición de resistencia afectan al *fitness*. Existen mutaciones neutras o sin coste, como la mutación Lys42Arg en la proteína S12 de la subunidad pequeña ribosomal que confiere resistencia a estreptomicina y no tiene coste biológico en *E. coli* y *S. enterica*¹⁴¹.

La resistencia, como se ha mencionado, provoca normalmente una reducción del *fitness*. Se ha comprobado que aunque se retire la presión antibiótica, si se mantiene una pequeña proporción de bacterias resistentes y con bajo *fitness* en una población, al reintroducir de nuevo el fármaco las bacterias resistentes volverán a aumentar en frecuencia, debido a su mayor éxito biológico con presión selectiva frente a las bacterias sensibles¹⁴². Por tanto, el *fitness* es un factor clave para la reducción de las tasas de resistencia.

Las bacterias pueden disminuir el coste de las mutaciones que conllevan la adquisición de resistencia mediante la adquisición de mutaciones compensatorias, las cuales restauran el *fitness* total o parcialmente^{134,143,144}. La aparición de estas mutaciones compensatorias es mucho más común que la reversión directa de la mutación que confiere resistencia, aunque existen ejemplos de ésta última en la literatura¹⁴⁵⁻¹⁴⁷. Las mutaciones compensatorias reducen el coste biológico generado por la resistencia de forma eficiente sin ocasionar una pérdida de resistencia.

Las mutaciones compensatorias pueden ser intragénicas^{134,148,149}, así como extragénicas^{150,151}. Además, pueden producirse en genes estructurales o en genes reguladores. El coste biológico de las mutaciones que confieren resistencia podría reducirse mediante la regulación de los mecanismos de resistencia, es decir, por la inducción de la resistencia en presencia del antimicrobiano. De modo que sólo se expresa el mecanismo de resistencia en aquellas circunstancias en que la población resistente tiene un mayor *fitness* que la sensible¹⁵².

La relación entre nivel de resistencia y *fitness* bacteriano no siempre es inversamente proporcional. Las mutaciones compensatorias, además de ocasionar un aumento del *fitness*, pueden asociarse a un incremento en el nivel de resistencia. Marcusson y colaboradores comprobaron en una colección isogénica de cepas de *E. coli*, donde se combinaban varios mecanismos de resistencias (mutaciones en el QRDR de *gyrA* y *parC*, así como en genes reguladores de la expresión de bombas de expulsión: *acrR* y *marR*), que ciertas mutaciones compensatorias provocaban un aumento del *fitness* y de la resistencia. En este caso las mutaciones que afectaban a la expresión de los sistemas de expulsión activa ocasionaban la mayor caída del *fitness*, la cual podía revertirse con la presencia de mutaciones adicionales en los genes *gyrA* y *parC*³⁷. Estas mutaciones además provocaban un aumento del nivel de resistencia. En aislados clínicos de *E. coli* resistentes a fluoroquinolonas se ha visto como las mutaciones en el QRDR de los genes de las topoisomerasas son los mecanismos de resistencia más frecuente, mientras que las mutaciones que alteran la expresión de los sistemas de expulsión activo son bastante infrecuentes¹⁵³, apoyando los datos obtenidos por Marcusson y colaboradores *in vitro*.

De este modo, las mutaciones compensatorias podrían provocar que una subpoblación resistente adquiriera incluso un mayor *fitness* que la población sensible, siendo seleccionada por selección natural esta población en ausencia de presión antibiótica y ocasionando la expansión de la resistencia.

Un concepto importante relacionado con el *fitness* es el de epistasia. La epistasia se define como la interacción entre genes, de modo que el efecto de uno de ellos modifica la función o expresión de otro u otros genes. Las interacciones epistáticas entre genes también repercuten en el *fitness*, viéndose que la aparición de dos mutaciones en genes distintos pueden ocasionar un menor coste biológico que la suma de los costes biológicos generados por ambas mutaciones por separado¹⁵⁴. A este respecto, Baker y colaboradores han observado que en *S. enterica* la presencia de la mutación Asp87Gly en *gyrA* supone una reducción del *fitness* del 4% y la mutación Ser80Ile un incremento del 8%. Sin embargo, la combinación de ambas mutaciones supuso un incremento del *fitness* del 28%. Por tanto, la interacción epistática de ambas mutaciones ocasiona un incremento del *fitness* del 24%¹⁵⁴. El acúmulo de mutaciones a su vez provoca un aumento de los niveles de resistencia, por lo que por selección natural se vería favorecida la presencia de las dos mutaciones y del alto nivel de

resistencia frente a la presencia de una sola mutación. Esto cuadraría con el hecho de que la resistencia a quinolonas sea un proceso secuencial, de modo que la aparición de una primera mutación en *gyrA* favorecería la aparición de una segunda mutación en *parC*.

En lo que respecta a la adquisición de resistencia mediante transferencia horizontal de elementos móviles, hay que tener en cuenta que el número de marcadores de resistencia adquiridos por este mecanismo en los patógenos humanos es relativamente bajo¹⁴⁴. Existen 4 puntos clave para la adquisición de resistencia de esta forma: 1) debe existir conexión ecológica entre la bacteria donadora y la receptora, 2) ambas bacterias deben compartir hábitat, 3) es importante el efecto fundador, de modo que el primer gen que se transfiera será el que tenga más posibilidades de mantenerse, y 4) el coste biológico de la adquisición, no sólo del mecanismo de resistencia, sino del elemento móvil que lo transporte.

El descenso del *fitness* generado por la adquisición de genes de resistencia plasmídicos se cree que radica en el coste metabólico extra que supone para la bacteria la replicación, transcripción y traducción del plásmido¹⁴⁴. Este coste no es igual en todas las bacterias para un mismo plásmido, ya que como se ha mencionado anteriormente el coste biológico depende del ambiente.

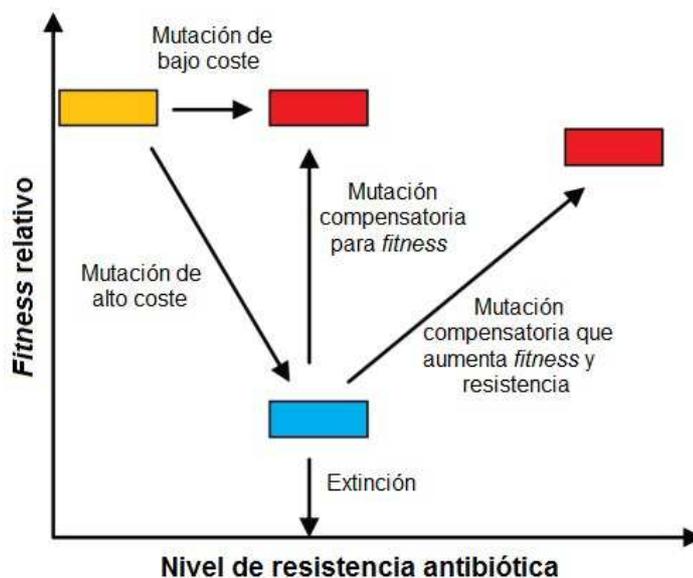
En el caso de los genes de resistencia transferidos por plásmidos, la compensación del *fitness* a menudo se debe a la regulación de factores de transcripción codificados en el mismo plásmido¹⁵⁵. También pueden producirse mutaciones cromosómicas que aumenten la estabilidad de los elementos móviles, manteniendo la resistencia¹⁴⁴. A su vez, hay que tener en cuenta diferentes factores de la bacteria receptora, de modo que la estabilidad de un mismo plásmido de resistencia puede ser diferente en distintas bacterias.

Existen pocos estudios que hayan evaluado el *fitness* asociado a los plásmidos que portan varios marcadores de resistencia a antimicrobianos, aunque parece que estos plásmidos ocasionan una bajada del *fitness* a la bacteria portadora en general¹⁵⁶. Un aspecto importante en este sentido sería la coselección de resistencias a diferentes familias de antimicrobianos. La resistencia a un fármaco podría aumentar en ausencia de dicho fármaco simplemente porque vaya en el mismo vector que otro marcador de resistencia para el que si exista una presión selectiva en el medio. En este sentido se ha visto como la reducción de un tipo de antimicrobiano no siempre consigue la reducción de las tasas de resistencia¹⁵⁷. Por tanto, los mecanismos plasmídicos de resistencia a quinolonas podrían aumentar su

prevalencia en ausencia de quinolonas debido a que suelen aparecer en plásmidos que codifican betalactamasas, por lo que el uso de betalactámicos favorecería la expansión de estos mecanismos. Se han realizado pocos estudios sobre el *fitness* asociado a los mecanismos plasmídicos de resistencia a quinolonas, centrándose los publicados en *qnrA*, aunque estos estudios han utilizado diferentes alelos y diferentes vectores, así como diferentes formas de medida del *fitness*^{144,156}.

En resumen, la resistencia bacteriana podría evolucionar por varias rutas (Figura 16). Podrían aparecer mutaciones con bajo coste o sin él que confirieran resistencia y que se mantuvieran. Por otro lado, habría mutaciones que ocasionarían resistencia pero a costa de una importante reducción del *fitness*. Las bacterias con estas mutaciones tenderían a extinguirse, salvo que aparecieran mutaciones compensatorias que restauraran el *fitness*. Estas mutaciones compensatorias podrían no afectar al nivel de resistencia o aumentarlo, originando una población bacteriana más resistente y con igual o mayor *fitness* que la población salvaje. Esta población resistente podría expandirse en ausencia de presión antibiótica simplemente por selección natural³⁷.

Figura 16. Modelo de la evolución de la resistencia antimicrobiana.
Adaptado de Marcusson y cols³⁷.



1.6. Efecto citotóxico de los mecanismos plasmídicos de resistencia

Otro aspecto que podría estar relacionado con el *fitness* es la posible citotoxicidad de los mecanismos plasmídicos de resistencia a quinolonas. Los diferentes estudios bioquímicos llevado a cabo con genes *qnr*, así como con genes tipo *qnr* cromosómicos, indica que estos genes interaccionan con las topoisomerasas^{67,68}, por lo que la expresión de estos genes podría tener un efecto tóxico sobre las células. En los últimos años se ha publicado que la sobreexpresión del gen cromosómico tipo *qnr* de *E. faecalis* (*Efsqnr*) en un modelo heterólogo de *E. coli* ocasiona agrupación celular y pérdida de viabilidad, pero no tiene efecto bactericida como las quinolonas⁷⁶. Este gen además de interaccionar con la ADN girasa, se supone que inhibe otros procesos celulares aún no conocidos, probablemente aquellos implicados en la separación de las células hijas. Se desconoce si los genes *qnr* plasmídicos u otros mecanismos de resistencia a quinolonas mediados por plásmidos podrían tener un efecto similar y un coste biológico. Si esto fuese así podría explicar la frecuente pérdida de los plásmidos portadores de estos genes en ausencia de presión antibiótica.

2. Hipótesis y objetivos

2.1. Justificación del estudio e hipótesis de trabajo

Desde la introducción de las quinolonas en la práctica clínica, se ha producido un aumento de las tasas de resistencia a estos antimicrobianos en enterobacterias a nivel mundial.

En 1998 se describió el primer mecanismo plasmídico de resistencia a quinolonas. Desde entonces se ha evidenciado que la resistencia a quinolonas por estos mecanismos es un fenómeno emergente. El bajo nivel de resistencia a quinolonas que producen los mecanismos plasmídicos puede favorecer la selección de mecanismos adicionales que incrementen el nivel de resistencia, hasta llegar a sobrepasar los puntos de corte establecidos por las agencias internacionales y, por tanto, conducir a resistencia de nivel clínico y fracaso terapéutico. El efecto que estos mecanismos plasmídicos de resistencia a quinolonas ejercen por sí solos o en combinación con mecanismos cromosómicos sobre el *fitness* bacteriano es desconocido.

Las hipótesis de este estudio son las siguientes:

1. La asociación de mecanismos plasmídicos y cromosómicos de resistencia a quinolonas contribuye significativamente a aumentar la resistencia frente a estos antimicrobianos.
2. La producción de especies reactivas de oxígeno en respuesta a la acción de las quinolonas, y que se vincula a la actividad bactericida de estos antimicrobianos, se ve reducida por la presencia de mecanismos de resistencia tanto cromosómicos como plasmídicos.
3. Los mecanismos plasmídicos de resistencia a quinolonas, solos o en asociación con mecanismos cromosómicos, modifican el *fitness* bacteriano.

-
4. La sobreexpresión de los mecanismos plasmídicos de resistencia a quinolonas puede ejercer un efecto citotóxico sobre las células bacterianas.

2.2. Objetivos de este estudio

El objetivo general de este estudio se centra en el análisis del papel que los mecanismos plasmídicos de resistencia a quinolonas, en combinación con mecanismos cromosómicos, juegan en la aparición y desarrollo de resistencia a quinolonas, así como en la modificación del *fitness* bacteriano. Para desarrollar este objetivo en ausencia de otros factores que pudieran interferir se diseñará y contruirá una colección de cepas isogénicas de *E. coli* en la que se representen la mayoría de los mecanismos de resistencia a quinolonas comúnmente encontrado en aislados clínicos, contemplando aquellos de naturaleza tanto cromosómica como plasmídica.

Los objetivos específicos que se propusieron en este trabajo fueron:

1. Análisis de la contribución de los mecanismos cromosómicos y plasmídicos de resistencia a quinolonas sobre la actividad de quinolonas y su impacto sobre el desarrollo de resistencia de nivel clínico.
2. Análisis de la contribución de los mecanismos cromosómicos y plasmídicos de resistencia a quinolonas sobre la producción de especies reactivas de oxígeno.
3. Determinar el efecto de los mecanismos cromosómicos y plasmídicos, tanto en combinaciones de bajo nivel de resistencia como resistentes a quinolonas, sobre el *fitness* bacteriano bajo diferentes condiciones de crecimiento
4. Análisis del posible efecto citotóxico causado por sobreexpresión de mecanismos plasmídicos sobre las células bacterianas.

3. Material y métodos

3.1. Material

3.1.1. Cepas de laboratorio

Para llevar a cabo los diferentes experimentos que forman parte de este trabajo de tesis doctoral se utilizaron las siguientes cepas de colección, algunas de las cuales fueron construidas en proyectos previos del Departamento de Microbiología de la Universidad de Sevilla⁹¹. Las cepas construidas durante el desarrollo de este trabajo se detallan en el apartado de resultados.

Tabla 4. Cepas comerciales.

Cepas comerciales	Genotipo
<i>E. coli</i> DH10B	F ⁻ endA1 recA1 galE15 galK16 nupG rpsL ΔlacX74 φ80lacZΔM15 araD139 Δ(ara,leu)7697 mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) λ ⁻
<i>E. coli</i> BL21	F- <i>dcm ompT hsdS</i> (rB- mB-) gal [malB+]K-12(λS)

Tabla 5. Cepas de colección.

Cepas de colección	
<i>E. coli</i> ATCC 25922	
<i>E. coli</i> ATCC 25922 S83L (<i>gyrA</i>)	<i>E. coli</i> ATCC 25922 con la mutación Ser83Leu en <i>gyrA</i> (EC02)
<i>E. coli</i> ATCC 25922 S83L (<i>gyrA</i>) S80R (<i>parC</i>)	<i>E. coli</i> ATCC 25922 con las mutaciones Ser83Leu en <i>gyrA</i> y Ser80Arg en <i>parC</i> (EC04)

3.1.2. Medios de cultivo

Tabla 6. Medios de cultivo utilizados.

Medio	Descripción	Componentes
Medio Luria Bertani (LB)	Medio rico en nutrientes.	Triptona 10 g/l, extracto de levadura 5g/l, cloruro sódico 10 g/l; pH 7. Para obtener LB agar se añade 15 g/l de agar.
Mueller-Hinton Agar (MHA)	Medio sólido para el estudio de sensibilidad a antimicrobianos.	Peptona 17,5 g/l, sólidos de infusión de carne 4 g/l, almidón 1,5 g/l, agar 15 g/l; pH 7,4.
Mueller-Hinton Caldo (MHB)	Medio líquido para el estudio de sensibilidad a antimicrobianos.	Peptona 17,5 g/l, sólidos de infusión de carne 4 g/l, almidón 1,5 g/l; pH 7,4.
Medio SOC	Medio líquido utilizado en el protocolo de transformación.	Triptona 20 g/l, extracto de levadura 5g/l, cloruro sódico 0,5 g/l, 10 ml/l de cloruro potásico (250 mM). Tras autoclavar añadir 5 ml/l de cloruro magnésico 2M y 20 ml/l de glucosa 1M.
Caldo de triptona y soja (TSB) con glicerol al 10%	Medio líquido para la congelación de microorganismos	Peptona de caseína 17 g/l, peptona de soja 3 g/l, cloruro sódico 5 g/l, fosfato monopotásico 2,5 g/l, dextrosa 2,5 g/l; pH 7,3.
Medio M9	Medio deficiente en nutrientes	Sales M9 5x 200 ml/l, sulfato magnésico 1M 2ml/l, cloruro cálcico 1 M 100 µl/l, glucosa 20%; pH 7,0.

3.1.3. Vectores empleados

Los vectores empleados en los diferentes experimentos que forman parte de este trabajo se detallan en la Tabla 7.

Tabla 7. Vectores plasmídicos utilizados.

Vector	Características	Utilidad
pCR-Blunt II-TOPO	Multicopia, kanamicina ^R	Vector de clonación
pBK-CMV	Multicopia, kanamicina ^R	Vector de clonación
pACYC184	Bajo número de copias, cloranfenicol ^R	Vector de clonación
pET29a	Multicopia, kanamicina ^R	Vector de expresión
pST76c	Bajo número de copias, termosensible, cloranfenicol ^R	Reemplazamiento genético
pUCRP12	Ampicilina ^R	Reemplazamiento genético
pKD4	Kanamicina ^R	Inactivación de genes cromosómicos
pKOBEG	Termosensible, cloranfenicol ^R	Inactivación de genes cromosómicos
pCP20	Termosensible, cloranfenicol ^R	Inactivación de genes cromosómicos

3.1.4. Soluciones y reactivos

I Miniprep (lisis alcalina)

- Solución II o de lisis (1 ml): 50 µl SDS 20%, 20 µl NaOH 5N y 930 µl agua destilada.
- Solución III alcalina (100 ml): 60 ml acetato potásico 5M, 11,5 ml ácido acético y 28,5 ml agua destilada.

II Tampón de electroforesis

- TAE 50x (1l): 242 g Tris base, 57,1 ml ácido acético glacial, 37,2 g Na₂EDTA dihidratado. Añadir agua hasta un volumen de un litro.

III Soluciones tampón

- PBS: 0,144 g KH₂PO₄, 1,775 g NaHPO₄ heptahidratado, 8,5 g NaCl y agua destilada hasta un litro; pH 7,2.
- Solución salina: 9 g NaCl y agua destilada hasta un litro.

-
- Tampón Tris EDTA (TE) 10x: 10 ml Tris-HCl 1M pH 8, 2 ml Na₂EDTA 0,5M pH 8 y 88 ml agua destilada.
 - Tris-HCl 1M, pH 8: 121,1g Tris base y 800 ml agua destilada; ajustar con HCl a pH 8.

IV Solución de Lauril Sulfato Sódico (SDS) 20%

- 20 g SDS y 100 ml agua destilada.

V Solución de lisozima (10 mg/ml)

- 10 mg Lisozima y 1 ml agua destilada.

VI Antimicrobianos (polvo valorado)

- Quinolonas: ácido nalidíxico, ciprofloxacino, levofloxacino, moxifloxacino, norfloxacino y ofloxacino.
- Betalactámicos: ampicilina.
- Aminoglucósidos: kanamicina.
- Otros: cloranfenicol, rifampicina.

VII Otros enzimas

- Enzimas de restricción: BglII, XhoI, NdeI, BamHI, ScaI.
- ARNasa I.

3.1.5. Productos químicos

- Acetato potásico
- Acetona
- Ácido acético
- Ácido clorhídrico concentrado
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)
- Agar Agarosa D-1 baja EEO
- Agua con ARNasa (5 µg/ml)
- Agua destilada y milliQ
- Albúmina sérica bovina (BSA)
- Azul de bromofenol
- Azul de Coomassie
- β-mercaptoetanol
- Bromuro de etidio
- Cloruro cálcico
- Cloruro magnésico

- Cloruro potásico
- Cloruro sódico
- DCFH-DA (2',7' diacetato de diclorofluoresceína)
- Dietil pirocarbonato (DEPC)
- Dimetil sulfóxido (DMSO)
- Dodecilsulfato sódico (SDS)
- Etanol absoluto
- Extracto de levadura
- Ferrocianato potásico
- Fosfato disódico hidratado
- Fosfato potásico dihidratado
- Fosfato sódico
- Glicerol
- Glucosa
- Glutaraldehído
- Hidróxido sódico
- Isopropanol
- Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG)
- Metanol
- Paraformaldehído
- Ponceau
- Sacarosa
- Sulfato magnésico
- Tetraóxido de osmio
- Triptona
- Tris base
- Tris clorhídrico
- X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido)
- Xylene cyano

3.2. Métodos de Biología Molecular

3.2.1. PCR (*Polimerase Chain Reaction*)

Esta técnica de biología molecular consigue la amplificación de un fragmento concreto de ADN mediante el uso de cebadores específicos, permitiendo su posterior secuenciación o visualización en geles de agarosa.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo con una polimerasa de Finnzymes (Phusion High-Fidelity DNA Polimerasa, *pfu* polimerasa). Esta polimerasa genera fragmentos de ADN con extremos romos, lo que permite la clonación directa en el vector pCR-Blunt II-TOPO. Las condiciones generales fueron las que se detallan a continuación.

Tabla 8. Volúmenes de cada reactivo usados en una PCR estándar.

Componente	Volumen
Agua milliQ	18 μ l
2x Phusion Master Mix	25 μ l
Cebador A	2,5 μ l
Cebador B	2,5 μ l

A esta mezcla debe añadirse 2 μ l de ADN. El ADN puede obtenerse a partir de purificaciones o de colonias frescas crecidas en placa directamente. En este último caso el procedimiento a seguir es:

1. Resuspender una colonia en 100 μ l de agua milliQ estéril y hervir a 100°C durante 10 minutos.
2. Centrifugar 2 minutos a 13.000 rpm.
3. Añadir 2 μ l de sobrenadante a la mezcla de PCR.

El programa estándar para llevar a cabo la reacción de PCR es:

Tabla 9. Condiciones generales de la PCR.

Fase	Temperatura	Tiempo	Nº ciclos
Desnaturalización inicial	98°	30 s.	1
Amplificación	98°C	10 s.	35
	55°C	30 s.	
	72°C	30s / 1 Kb	
Elongación final	72°C	10 min.	1

En función de los cebadores y el tamaño del amplicón, la temperatura de la fase de amplificación y la duración de la fase de elongación se modificaron.

3.2.2. Electroforesis en geles de agarosa

Esta técnica permite la separación de moléculas de ADN en función de su tamaño al ser sometidas a un campo eléctrico. Permite la visualización, entre otros, de los productos de PCR y plásmidos.

3.2.3. Purificación de producto de PCR

La purificación de ADN a partir de geles de agarosa se llevó a cabo mediante el uso de QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). El protocolo que se siguió fue:

1. Cortar la banda de gel con el ADN que se desea purificar.
2. Pesar el gel y añadir 300 μ l de buffer QG por cada 100 mg de gel de agarosa.
3. Incubar a 50°C durante 10 minutos.
4. Añadir 100 μ l de isopropanol por cada 100 mg de agarosa y mezclar bien.
5. Pasar a una columna y centrifugar 1 minuto a 13.000 rpm.
6. Descartar el filtrado y añadir a la columna 500 μ l de buffer QG. Centrifugar 1 minuto a 13.000 rpm.
7. Descartar el filtrado y añadir a la columna 750 μ l de buffer PE. Centrifugar 1 minuto a 13.000 rpm.
8. Descartar el filtrado y centrifugar 3 minutos a 13.000 rpm.
9. Pasar la columna a un tubo Eppendorf limpio de 1,5 ml y añadir 40 μ l de agua milliQ.
10. Centrifugar 1 minuto a 13.000 rpm.
11. Conservar el eluido, que contiene el ADN purificado, a -20°C.

3.2.4. Lisis alcalina (miniprep): aislamiento de ADN plasmídico

Mediante este método se consigue la desnaturalización alcalina de las moléculas de ADN circular de gran tamaño (cromosoma bacteriano y plásmidos de elevado tamaño), permaneciendo estables los plásmidos de pequeño tamaño. El protocolo es el siguiente:

- 1 Centrifugar 1,5 ml de un cultivo crecido durante toda la noche en LB a 3.000 rpm durante 2 minutos.
 - 2 Descartar el sobrenadante y resuspender el sedimento en 100 μ l de agua destilada.
 - 3 Añadir 200 μ l de la solución de lisis, mezclar suavemente y dejar 3 minutos a temperatura ambiente.
 - 4 Añadir 150 μ l de la solución III alcalina, mezclar suavemente y mantener a 4°C durante 10 – 15 minutos.
 - 5 Centrifugar durante 15 minutos a 13.000 rpm.
-

-
- 6 Recuperar el sobrenadante y añadir el mismo volumen de isopropanol. Centrifugar durante 7 minutos a 13.000 rpm.
 - 7 Descartar el sobrenadante y añadir 800 μ l de etanol 70%. Centrifugar durante 7 minutos a 13.000 rpm.
 8. Descartar el sobrenadante y dejar secar el sedimento. Resuspender en 30 – 40 μ l de agua milliQ con ARNasa (5 μ g/ml) e incubar a 37°C durante 15 minutos.

En aquellos casos en los que se requería una solución con una elevada concentración de plásmidos se realizó la lisis alcalina mediante QIAfilter Plasmid Purification Maxi Kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.2.5. Digestión con endonucleasas

Las endonucleasas o enzimas de restricción producen la rotura del enlace fosfodiéster del ADN. Las endonucleasas tipo II reconocen secuencias palindrómicas y cortan las dos hebras de ADN en esta región, sin necesidad de ATP.

Las condiciones generales de una reacción de digestión para un volumen final de 20 μ l son las que se recogen en la Tabla 10, pudiendo verse modificadas en función de la cantidad de ADN a digerir o de producto de digestión requerido.

Tabla 10. Condiciones generales de la digestión con endonucleasas

Componente	Volumen
Agua milliQ	2 μ l
ADN	15 μ l
Tampón 10x	2 μ l
Endonucleasa	1 μ l

Los 15 μ l de ADN equivalen a 5 – 10 μ g de ADN purificado.

Las reacciones de restricción se incubaron a 37°C entre 1 hora y toda la noche, procediéndose posteriormente a la inactivación térmica de la endonucleasa. Los productos obtenidos se visualizaron en geles de agarosa al 1%, purificándose a continuación en aquellos casos en que se requerían para aplicaciones posteriores.

3.2.6. Técnicas de clonación

Estas técnicas permiten introducir los diferentes genes *qnr* y el gen *qepA2* en los distintos fondos genéticos con el fin de determinar su efecto sobre la sensibilidad a quinolonas, *fitness* bacteriano y citotoxicidad.

Se utilizaron diferentes vectores y enzimas de restricción en función de los fragmentos de ADN y su uso posterior. Se siguieron dos protocolos de clonación: clonación de extremos romos (pCRTM-Blunt II-TOPO[®], Invitrogen) y clonación dirigida.

I. Clonación de extremos romos

Los fragmentos de ADN amplificados con la *pfu* polimerasa pueden clonarse directamente en el vector pCR-Blunt II-TOPO, sin necesidad de tratamiento posterior, ya que esta polimerasa genera extremos romos.

Para optimizar la reacción de ligación lo adecuado es añadir el producto de PCR en proporción 10:1 frente al vector. Para 25 ng de vector (1 µl), la cantidad de inserto que es necesaria añadir a la reacción de ligación para que esta sea óptima se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$X \text{ ng producto de PCR} = \frac{10 \cdot (Y \text{ pb producto PCR}) \cdot (25 \text{ ng pCR Blunt II} - \text{Topo})}{3.500 \text{ pb pCR Blunt II} - \text{Topo}}$$

En la Tabla 11 se recogen las condiciones de la reacción de ligación.

Tabla 11. Condiciones generales de una reacción de ligación.

Componente	Volumen
pCR-Blunt II-Topo	1 µl
Tampón 10x	1 µl
Producto de PCR	1 – 5 µl
T4 ADN ligasa	1 µl
Agua milliQ hasta un volumen de 10 µl	

La mezcla anterior se incubaba a 16°C durante 1 hora.

II. Clonación dirigida

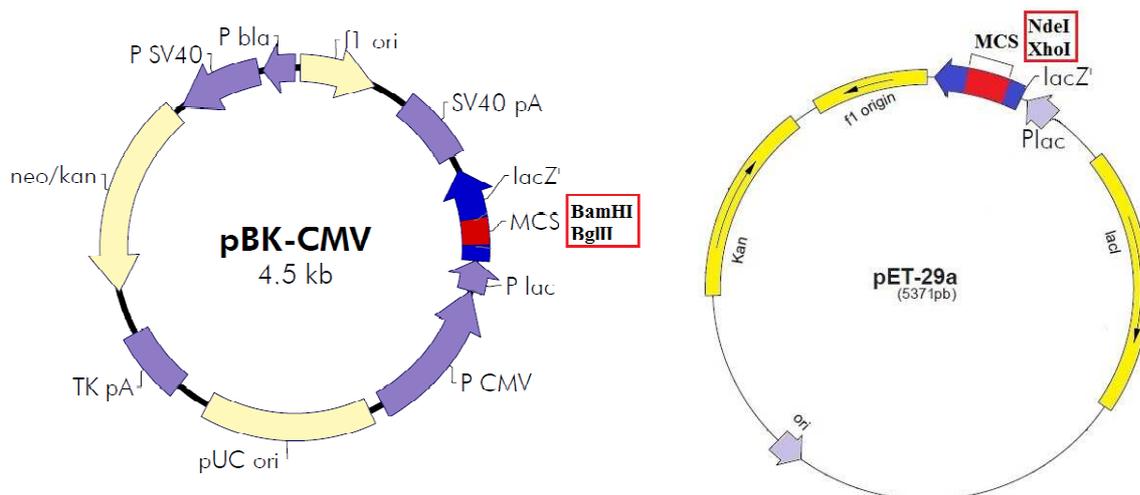
Este procedimiento se utilizó para introducir los genes *qnr* (y tipo *qnr*) y el gen *qepA2* en los diferentes fondos genéticos, para lo cual se clonaron en los vectores pBK-CMV (Stratagene), pACYC184 (New England Biolabs) y pET29a (Novagen). Estos tres vectores presentan una región MCS (Múltiple Cloning Site Region) con sitios de restricción de múltiples restrictasas.

Tanto el ADN como el vector fueron digeridos con la endonucleasa correspondiente originándose extremos cohesivos compatibles. Posteriormente el vector fue desfosforilado para evitar su autoligación. A continuación se procedió a purificar el inserto de ADN y el vector digerido y cuantificarlos, ya que para optimizar la reacción de ligación lo ideal es una proporción de inserto:vector de 3:1. La cuantificación se llevó a cabo espectrofotométricamente a 260 nm en cubetas de cuarzo de 10 mm. Los parámetros usados para cuantificar el ADN fueron:

$$DO_{260nm} = 1 \Rightarrow 50 \mu\text{g/ml ADN}$$

Las condiciones de ligación fueron similares a las del apartado anterior. Tras la ligación, el producto se electroporó en las cepas elegidas.

Figura 17. Esquema de vectores utilizados en la clonación dirigida. En la región MCS sólo se indican las enzimas de restricción utilizadas en este proyecto.



En el vector pBK-CMV se clonaron los genes *qnr* y *qepA2* con su promotor natural.

El vector y los genes amplificados por PCR se digirieron con el enzima BamHI, en el caso de los genes *qnr*, o BglII, en el caso del gen *qepA2*. Posteriormente se comprobó mediante secuenciación que estos genes se hubieran clonado en orientación inversa al promotor del operón de la lactosa (P_{lac}) presente en el vector.

En el vector pACYC184 se clonó el gen *qnrA1* siguiendo el mismo esquema utilizado para clonar los genes *qnr* en el vector pBK-CMV⁹⁷.

En el vector pET29a se clonaron los genes *qnr*, *qepA2* y el gen *Efsqnr*, pero sin su promotor natural. El vector y los productos de amplificación se digirieron con las enzimas XhoI y NdeI para generar extremos cohesivos y que la clonación ocurriera únicamente en la orientación y la fase de lectura adecuada. De este modo, la expresión de los genes clonados se llevó a cabo mediante el promotor P_{lac} . Este promotor es inducible por IPTG. Mediante secuenciación se confirmó el resultado de la clonación.

3.2.7. Preparación de células electrocompetentes

Con este protocolo se obtienen células capaces de captar ADN exógeno. De esta forma se introducen las diferentes construcciones plasmídicas en los distintos fondos genéticos, analizando posteriormente el fenotipo que confieren estas construcciones.

El procedimiento se detalla a continuación:

1. Inocular la cepa elegida en LB e incubar en agitación durante 18 horas.
2. Diluir el inóculo 1:100 y crecer el cultivo hasta alcanzar una densidad óptica (D.O.) a 600 nm de 0,5 – 0,6.
3. Mantener el cultivo en hielo durante 15 minutos.
4. Hacer alícuotas del cultivo y centrifugar 20 minutos a 4.200 rpm a 4°C.
5. Descartar el sobrenadante y lavar el sedimento con agua destilada estéril fría (se añade el mismo volumen que se centrifugó).
6. Centrifugar 20 minutos a 4.200 rpm a 4°C.
7. Descartar el sobrenadante, concentrar las alícuotas y repetir el lavado.
8. Repetir el paso anterior dos veces más, pero en este caso lavando con glicerol al 10% estéril y frío.
9. Descartar el sobrenadante y resuspender el sedimento en aproximadamente 800 μ l de glicerol al 10%.

10. Hacer alícuotas y conservar a -80°C hasta su utilización.

3.2.8. Electroporación

Mediante esta técnica conseguimos la transferencia de material genético desde el exterior al interior celular. Consiste en la aplicación de descargas eléctricas a las bacterias, lo que ocasiona cambios en el potencial de membrana y otras propiedades celulares, produciéndose desorganizaciones y roturas transitorias de la membrana que permiten la entrada de ADN exógeno.

1. Añadir 3 – 4 μl del producto de ligación a electroporar en una alícuota de células electrocompetentes. Mantener en hielo aproximadamente 10 minutos.
2. Añadir esta mezcla a la cubeta de electroporación fría y aplicar un pulso (2,5 kV y 5 ms). La electroporación se realizó con el sistema Micropulser (BioRad).
3. Añadir 800 μl de medio SOC en la cubeta. Recuperar el medio e incubar a 37°C en agitación durante 1 hora.
4. Sembrar el volumen anterior en placas de medios selectivos específicos en cada caso.

3.2.9. Reemplazamiento genético

Con este protocolo se consigue alterar la secuencia de un gen cromosómico de *E. coli*¹⁵⁸. La modificación de la región elegida se lleva a cabo mediante mutagénesis dirigida, para lo que es necesario el diseño de cebadores específicos con los cambios nucleotídicos que queremos introducir en la secuencia del gen. Este fragmento mutado sustituirá posteriormente al fragmento original en el cromosoma bacteriano.

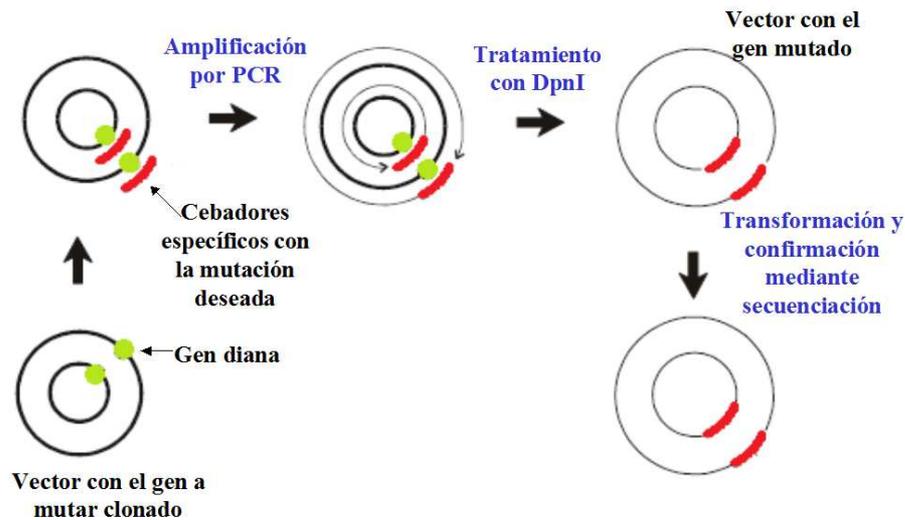
En este caso el protocolo de reemplazamiento genético se realizó para obtener las cepas con la segunda mutación en el gen *gyrA*: Asp87Asn.

El protocolo que se siguió se detalla a continuación.

1. Clonar el gen de interés, o fragmento de éste, en un vector de clonación.
2. Realizar la reacción de mutagénesis dirigida. Para ello se utilizó el sistema QuikChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) siguiendo el protocolo del fabricante (Figura 18).

3. Subclonar el gen ya mutado en el vector suicida pST76C en el sitio de restricción para BamHI. Este vector es portador de una diana de restricción para ScaI adyacente al lugar de clonación.
4. Transformar las cepas deseadas con la construcción e incubar a 30°C en presencia de cloranfenicol.
5. Seleccionar colonias resistentes a cloranfenicol e inducir la integración del fragmento mutado. Esto se consigue realizando pases sucesivos de las colonias con variaciones de la temperatura:
 - a. Incubar 2 – 6 horas a 30°C.
 - b. Dar un nuevo pase e incubar 12 horas a 42°C.
 - c. Dar un nuevo pase e incubar 12 horas a 37°C.

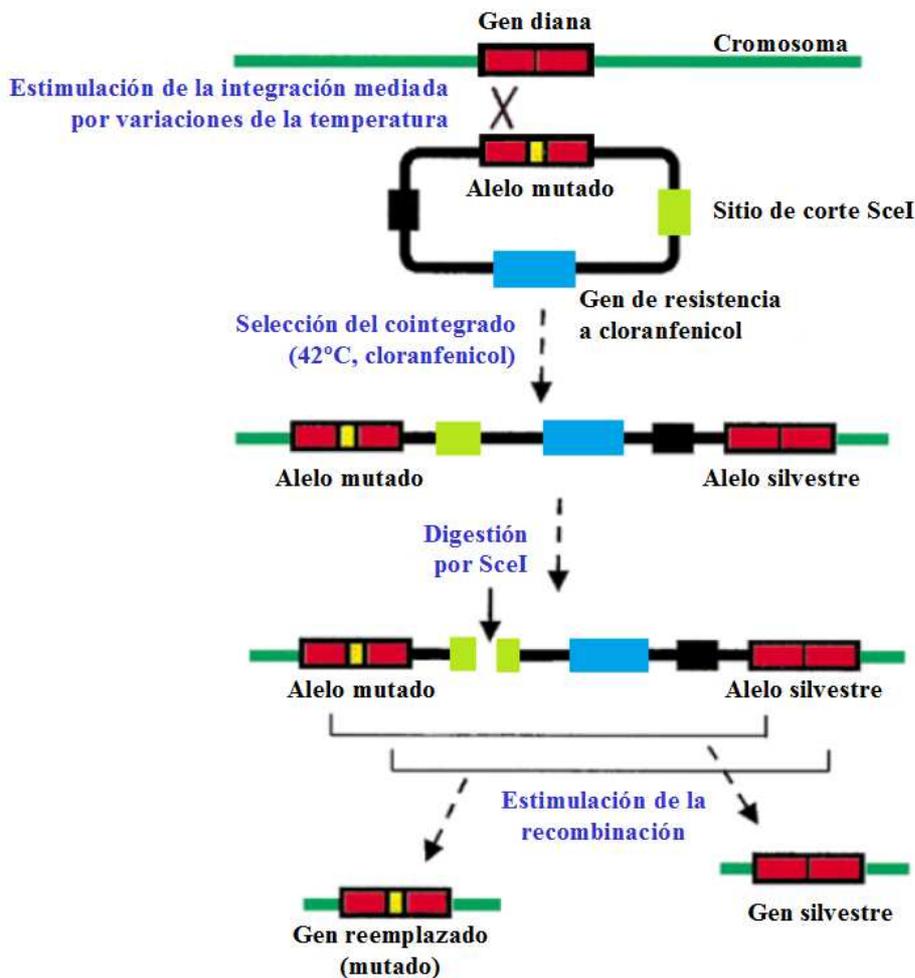
Figura 18. Esquema del proceso de mutagénesis dirigida.



6. Seleccionar las colonias de mayor tamaño y dar un nuevo pase. Incubar durante 12 horas a 37°C. Las colonias deben tener aspecto homogéneo.
7. Verificar la integración mediante PCR y seleccionar las colonias con PCR positiva.
8. Hacer electrocompetentes de las colonias seleccionadas y transformarlas con el vector pUCRP12. A partir de este vector se produce el enzima ScaI que corta la

-
- diana situada en el vector integrado, lo que estimula la recombinación y la resolución del cointegrado.
9. Comprobar la resolución del cointegrado y con ello la fijación de la mutación en el cromosoma bacteriano (secuenciación del QRDR de *gyrA*).
 10. La eliminación del vector pUCRP12 se consigue mediante pases sucesivos en placas sin antimicrobiano, obteniéndose finalmente bacterias sensibles a ampicilina.

Figura 19. Esquema del proceso de reemplazamiento genético . Modificado de Posfai¹⁵⁸.

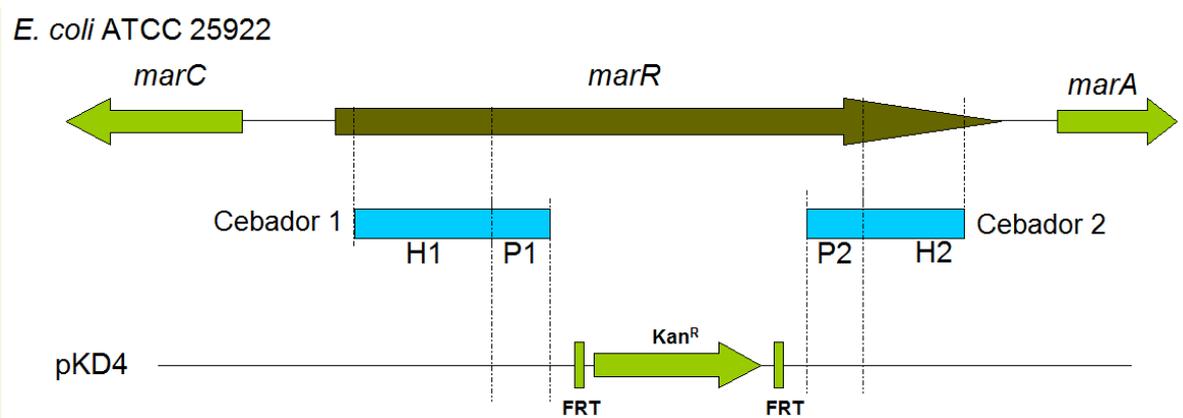


3.2.10. Inactivación de genes cromosómicos

Para la inactivación de *marR* y *lacZ* se llevó a cabo el protocolo descrito por Datsenko y Wanner¹⁵⁹, el cual permite la interrupción de genes cromosómicos. Previo a la realización de este protocolo debemos amplificar el gen de resistencia a kanamicina del plásmido pKD4 usando cebadores que incluyan regiones homologas a los extremos del gen que queremos inactivar (Figura 20).

Además, debemos transformar las cepas donde vayamos a realizar la inactivación con el vector pKOBEG. Este vector va a permitir la integración del fragmento amplificado mediante recombinación homóloga y la inactivación del gen deseado, ya que incluye los genes de la recombinasa del fago λ bajo el control de un promotor inducible por arabinosa.

Figura 20. Diseño de cebadores usados para la inactivación génica. Las regiones H1 y H2 representan regiones de homología de los cebadores con regiones del gen que se desea inactivar; las regiones P1 y P2 son las regiones utilizadas para amplificar el gen de resistencia.



Para la obtención del mutante con el gen inactivado el procedimiento a seguir es el siguiente (Figura 21):

1. Incubar LB con la cepa elegida con el vector pKOBEG durante 18 horas a 30°C y en agitación.
2. Hacer una dilución 1:100 del cultivo anterior e incubarlo a 30°C hasta alcanzar una D.O. a 600 nm de 0,2.
3. Añadir arabinosa hasta alcanzar una concentración del 1%.
4. Incubar el cultivo a 30°C hasta alcanzar una D.O. a 600 nm de 0,8.

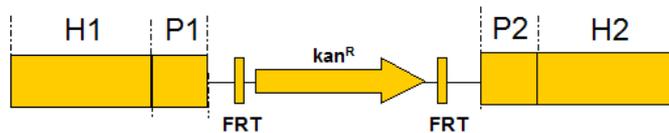
5. A partir de aquí se sigue el protocolo de preparación de células electrocompetentes descrito anteriormente.
6. Electroporar 1 μg del fragmento de ADN amplificado. Incubar durante toda la noche a 30°C en agitación.
7. Sembrar en placas con presión selectiva (cloranfenicol) e incubar a 30°C.

Comprobar mediante PCR que la inactivación del gen ha sido correcta. A continuación se procede a eliminar el vector pKOBEG:

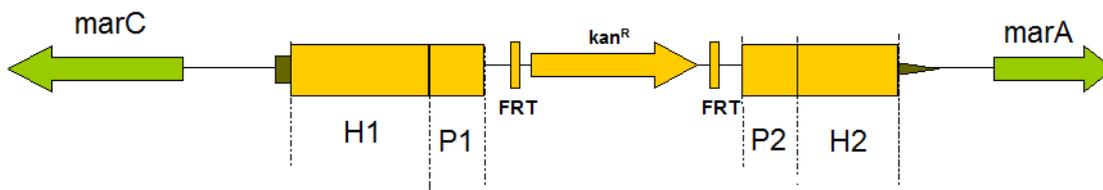
1. Incubar la bacteria mutante en LB a 44°C en agitación durante toda la noche.
2. Hacer diluciones del cultivo anterior y sembrar en placas sin presión selectiva.
3. Seleccionar colonias y dar pase a medio sin antimicrobiano, medio con cloranfenicol y medio con kanamicina.
4. Seleccionar las colonias que crecen en las placas con kanamicina y sin antimicrobianos, pero no en cloranfenicol.

Figura 21. Esquema del protocolo de inactivación génica

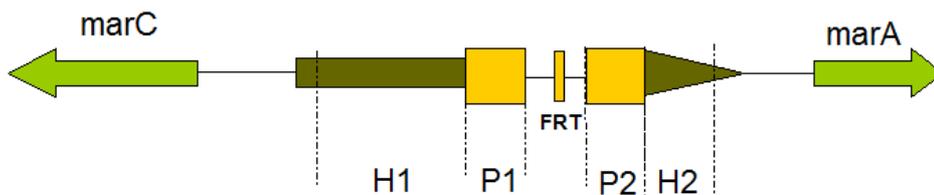
Paso 1: Amplificación mediante PCR del gen de resistencia a kanamicina



Paso 2: Transformación de células con el vector pKOBEG e integración del amplicón en el cromosoma.



Paso 3. Eliminación del gen de resistencia mediante el vector pCP20



Una vez eliminado el vector pKOBEG se puede eliminar el gen de resistencia con el siguiente protocolo:

1. Se hacen electrocompetentes de la cepa mutante.
2. Electroporar 1 µg del vector pCP20 e incubar 1 hora a 30°C.
3. Plaquear en medio con cloranfenicol e incubar a 30°C durante toda la noche.
4. Seleccionar colonias, dar pase en medio LB e incubar a 44°C para que pierdan el vector pCP20.
5. Dar un pase a LB e incubar a 44°C durante 18 horas.
6. Repetir el paso anterior.
7. Hacer diluciones y sembrar en medio con cloranfenicol, kanamicina y sin antimicrobiano.
8. Seleccionar las colonias que sólo crecen en el medio sin antimicrobiano y comprobar mediante PCR la pérdida del gen de kanamicina.

3.2.11. Estudio de la expresión génica

A la hora de cuantificar la expresión de los genes se llevó a cabo la extracción de los transcritos de los microorganismos a estudiar, la transformación de estos a ADN complementario mediante una reacción de retrotranscripción (RT-PCR) y finalmente la cuantificación de la expresión a través de una PCR cuantitativa (qPCR).

I. Purificación de ARN

La purificación del ARN se llevó a cabo mediante RNeasy[®] Protect Bacteria Mini Kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El protocolo realizado se detalla a continuación.

1. Inocular las cepas en 5 ml de LB e incubar en agitación a 37°C durante 18 horas.
2. Hacer una dilución 1:100 del cultivo anterior e incubar en agitación a 37°C hasta alcanzar una D.O. de 0,5 a 600 nm.
3. Tomar 2 alícuotas de 500 µl por cada muestra y añadir 1 ml de RNA Protect Reagent, vortear durante 5 s e incubar 5 min a temperatura ambiente.

-
4. Centrifugar 10 min a 5.000 g y descartar el sobrenadante.
 5. Añadir a cada alícuota 50 µl de tampón TE con lisozima a una concentración de 1 mg/ml e incubar 5 min a temperatura ambiente.
 6. Unificar las 2 alícuotas y añadir 700 µl de RLT con β-mercaptoetanol. Vortear la mezcla.
 7. Añadir 500 µl de etanol y mezclar con pipeta.
 8. Verter la muestra en una columna y centrifugar 15 s a 10.000 rpm. Descartar el filtrado.
 9. Añadir 700 µl de RW1 y centrifugar de nuevo 15 s a 10.000 rpm. Descartar el filtrado.
 10. Transferir la columna a un nuevo tubo colector y añadir 500 µl de RPE. Volver a centrifugar 15 s a 10.000 rpm y descartar el filtrado.
 11. Repetir el paso anterior.
 12. Centrifugar 1 min a 10.000 rpm y descartar el filtrado.
 13. Pasar la columna a un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 ml. Añadir 50 µl de agua libre de ARNasa e incubar 1 min a temperatura ambiente.
 14. Centrifugar 1 min a 10.000 rpm.
 15. Conservar el ARN a 4°C hasta el tratamiento con ADNasa.

Debido a que el ARN se utilizó para la cuantificación de la expresión génica, para evitar falsos positivos en las posteriores reacciones de PCR debido a la presencia de ADN se realizó un tratamiento con ADNasa I (Turbo DNA-free, Ambion):

1. Añadir a 50 µl de ARN 1,5 µl de ADNasa I y 5,7 µl de tampón 10x Turbo ADNasa. Incubar 30 minutos a 37°C.
 2. Añadir 7,5 µl de DNase Inactivation Reagent tras resuspenderlo en vórtex. Incubar 2 min a temperatura ambiente agitando el tubo un par de veces durante esta incubación para asegurar la dispersión del reactivo.
 3. Centrifugar 2 minutos a 12.000 rpm.
 4. Transferir el sedimento a un nuevo tubo. El ARN tratado puede conservarse a -80°C.
-

II. RT-PCR

La RT-PCR es una variante de la PCR convencional basada en un paso de retrotranscripción para obtener ADNc a partir de ARN.

Para la realización de esta técnica es necesario primero cuantificar el ARN, ya que se requiere que este se encuentre a una concentración de 50 ng/μl para realizar los ensayos de expresión génica. El ARN purificado se cuantificó espectrofotométricamente a 260 nm en cubetas de cuarzo de 10 mm. Los parámetros usados para cuantificar el ARN se detallan a continuación:

$$DO_{260nm} = 1 \Rightarrow 40 \mu\text{g/ml ARN de cadena sencilla}$$

$$DO_{260nm}/DO_{280nm} = 2,0 \Rightarrow 100\% \text{ pureza ARN de cadena sencilla}$$

Una vez cuantificado el ARN se ajustó su concentración a 50 ng/μl y se procedió a realizar la RT-PCR con el kit Transcriptor First Strand cDNA Sintesis de Roche siguiendo las instrucciones del fabricante:

1. Mezclar 11 μl de ARN a 50 ng/μl con 2 μl de Random Hexamer Primer e incubar 10 min a 65°C. Pasar a hielo pasado este tiempo.
2. Añadir a la mezcla anterior los compuestos recogidos en la Tabla 12.
3. El programa de la reacción de transcripción fue 10 min a 25°C, 30 min a 55°C y 5 min a 85°C.

Tabla 12. Componentes de la reacción de RT-PCR.

Componente	Volumen
Transcriptor RT Reaction Buffer 5x	4 μl
Protector RNase Inhibitor	0,5 μl
dNTP Mix	2 μl
Retrotranscriptasa	0,5 μl

III. qPCR o PCR cuantitativa

El último paso para el estudio de la expresión génica es la PCR cuantitativa, una variante de la PCR que permite cuantificar la concentración de ADN; esta tecnología detecta la acumulación del producto de PCR mediante el uso de fluorescencia.

La reacción de PCR cuantitativa se llevó a cabo en el termociclador de Roche Lightcycler, utilizando la sonda SybrGreen (Fast Start DNA Master Sybr Green, Roche), partiendo de una dilución 1:5 del ADNc.

Se utilizó el gen *mdh* como gen de referencia para la cuantificación relativa de la expresión de los genes a estudiar. La cuantificación se realizó mediante el método del Ct comparativo $(2^{-\Delta\Delta Ct})^{160}$.

3.2.12. Extracción de proteínas

Para poder estudiar el efecto citotóxico de los genes *qnr* y *qepA2*, dichos genes se clonaron (sin su promotor natural) en un vector de expresión inducible con IPTG: el vector pET29a. Este vector además de la sobreexpresión del gen, permite la posterior purificación o detección específica de la proteína al añadir una cola de poli-histidina al final de ésta. Estas construcciones se clonaron en la cepa *E. coli* BL21. Esta cepa es deficiente en la proteasa dependiente de la ATPasa Lon, por lo que tiene disminuida la degradación de proteínas, hecho que permite la sobreexpresión de la proteína recombinante.

El protocolo que se siguió para la extracción de proteínas se detalla a continuación.

1. Inocular las cepas en LB e incubar en agitación a 37°C durante 18 horas.
2. Hacer una dilución 1:100 del cultivo anterior e incubar a 37°C en agitación hasta una D.O. de 0,6 a 600 nm.
3. Alcanzada la D.O. inducir el cultivo con IPTG 0,2 mM.
4. Recoger alícuotas de 10 ml a tiempo 0 (T₀), una hora (T₁), dos horas (T₂) y tres horas (T₃). Conservar estas alícuotas en hielo. Recoger alicuotas a diferentes tiempos permite conocer el tiempo óptimo de inducción.
5. Centrifugar 15 min a 4.000 rpm a 4°C y descartar sobrenadante.
6. Lavar con 10 ml de NaPO₄ 10mM pH 7,2, centrifugar 15 min a 4.000 rpm a 4°C y eliminar sobrenadante.
7. Resuspender el sedimento en 5 ml de NaPO₄ 10mM pH 7,2.
8. Sonicar la suspensión bacteriana manteniendola en hielo. Realizar 7 pulsos de 30 s con un intervalo de 60 s entre cada pulso. Comprobar el descenso de turbidez.
9. Añadir 5 µl de inhibidores de proteasas.

10. Centrífugar 45 min a 13.000 rpm a 4°C. Descartar sedimento.

En el sobrenadante se encuentran las proteínas del citoplasma de las bacterias. Este sobrenadante puede conservarse a -30°C.

El siguiente paso es la cuantificación de las proteínas. Dicha cuantificación se llevó a cabo mediante PierceTM BCA Protein Assay Kit (Termo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente se ajusta la concentración de proteínas a 0,25 µg/µl.

3.3. Métodos de Microbiología

3.3.1. Preparación de los agentes antimicrobianos

Los antimicrobianos utilizados se prepararon siguiendo las indicaciones del CLSI¹⁶¹ a una concentración de 4096 µg/ml en la mayoría de los casos. Las alícuotas se conservaron a -80°C.

3.3.2. Sensibilidad *in vitro*

3.3.2.1. Microdilución

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de un antimicrobiano se define como la menor concentración de dicho agente capaz de inhibir el crecimiento visible de una población bacteriana. Este valor se obtiene incubando una cantidad conocida de bacterias con diluciones definidas del antimicrobiano a testar.

Los valores de CMI se calcularon mediante microdilución de acuerdo con las normas del CLSI¹⁶¹. A partir de placas de cultivo fresco se preparó un 0,5 McFarland en Mueller Hinton caldo. Se utilizaron placas de microdilución de 96 pocillos, las cuales una vez preparadas con las diferentes concentraciones de antimicrobianos se inocularon con una dilución 1:100 del cultivo anterior. Estas placas se incubaron a 37°C durante 20 horas. Se establecieron controles de crecimiento y esterilidad del medio. Se usó la cepa de referencia *E. coli* ATCC 25922 como control.

A partir de las placas en las que se calculó la CMI de ciprofloxacino, se estudió la Concentración Mínima Bactericida (CMB) de esta fluoroquinolona. La CMB se define como la concentración de antimicrobiano capaz de eliminar el 99,9% de la población original. Para estudiar este parámetro se realizaron subcultivos de los pocillos de la placa de microdilución de las concentraciones igual y superiores a la CMI. Estas placas se incubaron 20 horas a 37°C y se estudió el descenso de la población con respecto al inóculo inicial.

3.3.2.2. Técnicas de difusión

Además de mediante microdilución en caldo, la CMI de ciprofloxacino se calculó mediante el sistema de difusión en gradiente Etest[®] (AB BIODISK, Biomerieux).

También se utilizó el sistema de disco difusión para el estudio de la sensibilidad/resistencia de las diferentes cepas. En este caso también se siguieron las indicaciones del CLSI¹⁶¹.

3.3.2.3. Determinación de la Concentración Preventiva de Mutantes

La Concentración Preventiva de Mutantes (CPM) es aquella concentración de un antimicrobiano que impide la aparición de mutantes resistentes de un solo paso dentro de una población bacteriana. Este parámetro depende de la CMI.

Otro parámetro relacionado con la CMI y la CPM es la Ventana de Selección de Mutantes (VSM)¹⁶². La VSM es el intervalo de concentración de antimicrobiano comprendido entre la CMI y la CPM; es de esperar que concentraciones de antimicrobianos incluidas dentro de la VSM favorezcan la aparición y enriquecimiento selectivo de subpoblaciones resistentes dentro de una población bacteriana. Aquellas concentraciones superiores al límite de la VSM (concentraciones por encima de la CPM) no favorecerán este enriquecimiento, y la aparición de mutantes será más difícil debido a la necesidad de al menos dos mutaciones. Por tanto, lo ideal sería que los antimicrobianos estuvieran la mayor parte del tiempo a concentraciones por encima de su CPM.

Para el cálculo de la CPM se siguió el protocolo de Marcusson y colaboradores¹⁶³ con modificaciones. El protocolo realizado fue:

1. Inocular las cepas en 10 ml de LB e incubar en agitación a 37°C durante 18 horas.

2. Hacer una dilución 1:100 del cultivo anterior en MHB e incubar a 37°C en agitación hasta que alcance una D.O. a 540 nm igual a 1. Esta D.O. equivale a unas 10^9 céls/ml.
3. Centrifugar durante 20 min a 4.000 rpm. Descartar el sobrenadante.
4. Resuspender el sedimento en 300 μ l de MHB.
5. Sembrar 100 μ l del concentrado anterior en placas con antimicrobianos; hacer diluciones seriadas en base 10 y sembrar 100 μ l de éstas en placas sin antimicrobianos para conocer el inóculo inicial.
6. Incubar las placas a 37°C y hacer recuentos cada 24 horas durante 96 horas.

La CPM es la concentración más baja donde no se observa crecimiento bacteriano pasadas 96 horas.

Para determinar la supervivencia de las distintas cepas, se siguió el siguiente protocolo:

1. Inocular 10 ml de MHB con un octavo de la placa de la concentración de la CPM.
2. Agitar en vórtex.
3. Sembrar 100 μ l de la suspensión anterior en placas sin antimicrobiano e incubar a 37°C durante 24 horas.
4. Contar las colonias crecidas pasado este tiempo.

3.3.3. Cálculo de la frecuencia de aparición de mutantes

Mediante esta técnica se pretende conocer la frecuencia de aparición de mutantes ocasionada por una determinada concentración de antimicrobiano. El protocolo a seguir fue:

1. Preparar un 0,5 McFarland en LB a partir de un cultivo fresco.
2. Incubar durante 18 horas a 37°C en agitación una dilución 1:10⁴ del 0,5 McFarland anterior.
3. Sembrar 100 μ l en placas de MHA suplementadas con las concentraciones deseadas de antimicrobiano. Hacer diluciones seriadas y sembrar en placas sin presión antibiótica 100 μ l de las diluciones 10⁶, 10⁷ y 10⁸. Incubar a 37°C durante toda la noche.
4. Contar el número de colonias en las placas sin antimicrobiano y calcular el tamaño del inóculo (ufc/ml). Reincubar las placas con presión selectiva 24 horas.

-
5. Contar el número de colonias en las placas con presión selectiva y calcular el número de mutantes (ufc/ml).

La frecuencia de aparición de mutantes se calcula como el cociente entre el número de mutantes y el tamaño del inóculo.

3.3.4. Producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)

Se estudio la producción de ROS para comprobar si la presencia de mutaciones cromosómicas o de mecanismos plasmídicos afectaban a la producción de estos compuestos; de modo que pudiera relacionarse un cambio en la producción de ROS con un cambio en la sensibilidad a ciprofloxacino o en la frecuencia de aparición de mutantes.

El protocolo que se siguió se detalla a continuación:

1. Inocular las cepas en 3 ml de TSB suplementado con glucosa al 0,25% e incubar a 37°C en agitación durante 18 horas.
2. Hacer una dilución 1:100 del cultivo anterior en medio M9 e incubar a 37°C en agitación hasta una D.O. de 0,14 a 600 nm (inicio fase exponencial).
3. Añadir ciprofloxacino a una concentración final de 1 mg/l. Incubar durante 2,5 horas a 37°C en agitación.
4. Inocular dos pocillos de una placa *microtiter* con 200 µl del cultivo anterior cada uno (pocillos control).
5. Añadir DCFH-DA (5 mM) en el resto del cultivo bacteriano a una concentración final de 5 µM. Inocular 4 pocillos de una placa *microtiter* con 200 µl del cultivo anterior.
6. Incubar a 37°C durante 18 horas en estático.
7. Medir la absorbancia a 535 nm en el sistema de lectura de placas *microtiter* Infinite 200PRO (Tecan). La excitación se realiza a una longitud de onda de 485 nm.

La producción de ROS se calcula como la diferencia entre los pocillos con DCFH-DA y los pocillos control.

3.3.5. Curvas de crecimiento

Para el estudio del efecto sobre el *fitness* de los diferentes mecanismos de resistencia a quinolonas estudiados en este proyecto se realizaron curvas de crecimiento de las diferentes cepas de la colección. Las curvas de crecimiento se obtuvieron en el sistema Infinite 200PRO. Estas curvas se obtuvieron en dos condiciones: en medio rico en nutrientes (medio LB) y en medio deficiente (medio M9).

I. Medio LB

Para realizar las curvas de crecimiento en LB se siguió el siguiente protocolo:

1. Inocular medio LB con las cepas a estudiar e incubar 6 horas a 37°C en agitación.
2. Obtener un 0,5 McFarland con el cultivo anterior.
3. Hacer una dilución 1:10.000 e inocular con ella una placa *microtiter* (150 µl por pocillo)
4. Medir la D.O. a 595 nm durante 20 horas en el sistema Infinite 200PRO. Las mediciones se realizaron cada 20 minutos.

Una vez obtenidos los datos se procedió a calcular la tasa máxima de crecimiento (μ) y el tiempo de generación (τ). El cálculo de estos parámetros se realizó con la siguiente fórmula:

$$\log D.O._t = \log D.O._0 + \mu t$$
$$\mu = \frac{\log D.O._t - \log D.O._0}{t}$$
$$\tau = \frac{\log 2}{\mu}$$

Para calcular estos parámetros se utilizaron sólo las mediciones incluidas dentro de la fase exponencial de crecimiento. Se calculó la tasa de crecimiento para cada medición del Infinite 200PRO según la fórmula anterior. Posteriormente se calculó la tasa máxima de crecimiento de las cepas como la media de los 3 valores

más elevados, descartando los valores extremos. A partir de la tasa de crecimiento se calculó el tiempo de generación¹⁵⁶.

II. Medio M9

Se realizó el mismo protocolo que en el caso anterior, pero en este caso sólo se realizó una dilución 1:10 del 0,5 McFarland y las medidas de D.O. se prolongaron 48 horas, midiendo cada 20 minutos.

Para el cálculo de la tasa máxima de crecimiento se utilizaron los 6 valores más elevados.

3.3.6. Ensayos de competición

Para calcular el *fitness* relativo de las diferentes cepas evaluadas con respecto a la cepa de referencia *E. coli* ATCC 25922 se realizaron ensayos en condiciones de competición basados en un modelo de *E. coli* $\Delta lacZ$, cepa que en placas con IPTG y X-Gal no produce colonias azules sino blancas. Este modelo, usado en estudios previos, no afecta al *fitness*¹⁶⁴.

Se utilizaron como cepas control *E. coli* ATCC 25922 $\Delta lacZ$, para las cepas que no poseían mecanismos plasmídicos de resistencia a quinolonas, y *E. coli* ATCC 25922 $\Delta lacZ$ pBK-CMV, para aquellas que poseían mecanismos plasmídicos.

El protocolo que se siguió para los ensayos de competición fue el siguiente:

1. Inocular las cepas en LB e incubar a 37°C en agitación durante 18 horas. En el caso de las cepas con mecanismos plasmídicos se añadió antimicrobiano (30 µg/ml de kanamicina) al medio para impedir la pérdida del vector.
2. Hacer un 0,5 McFarland a partir del cultivo anterior.
3. Mezclar en proporción 1:1 la cepa a testar con la cepa control que corresponda: *E. coli* ATCC 25922 $\Delta lacZ$ o *E. coli* ATCC 25922 $\Delta lacZ$ pBK-CMV.
4. Inocular con 200 µl de la mezcla anterior 5 ml de LB y sembrar diluciones seriadas en base 10 de esta mezcla para conocer el tamaño del inóculo. Incubar a 37°C en agitación durante 24 horas.
5. Refreshar el cultivo (hacer una dilución 1:1000 en LB e incubar a 37°C en agitación) cada 24 horas hasta las 96 horas.

- Realizar diluciones seriadas en base 10 y sembrar las diluciones 10^6 y 10^7 en placas con IPTG 100 μM y X-Gal 40 mg/l (con o sin antimicrobiano). En estas placas la cepa a testar crece formando colonias azules y la cepa control colonias blancas.

Una vez obtenidos los recuentos de colonias azules y blancas se procede a calcular el *fitness* siguiendo la siguiente fórmula³⁷:

$$W = \ln \left(\frac{A_{96}/A_0}{B_{96}/B_0} \right)$$

, donde A_{96} y A_0 son las bacterias/ml de la cepa a testar al final (96 horas) y al comienzo del ensayo de competición, respectivamente, y B_{96} y B_0 los valores equivalentes para la cepa control.

Se realizaron al menos 6 réplicas de cada competición. La significación estadística de la diferencia de *fitness* relativo a la cepa de referencia *E. coli* ATCC 25922 se calculó mediante el test T-Student (intervalo de confianza 95%, dos colas). Se utilizó un nivel de significación estadística de 0,05.

3.3.7. Ensayos de citotoxicidad

Para comprobar si la sobreexpresión de los mecanismos plasmídicos de resistencia a quinolonas estudiados tenían efecto citotóxico, se clonaron en un vector de expresión inducible (pET29a) y se indujeron con IPTG 0,2 mM; de modo que se comprobó si se producía una disminución de la población bacteriana con respecto al inóculo original.

El protocolo desarrollado fue el siguiente:

- Inocular las cepas en LB e incubar en agitación a 37°C durante 18 horas.
- Hacer una dilución 1:100 e incubarla a 37°C en agitación hasta alcanzar una D.O. a 600 nm de 0,8.
- Separar dos alícuotas. A una de ellas añadir IPTG 0,2 mM.
- Incubar las dos alícuotas a 37°C en agitación durante 2 horas.

5. Hacer diluciones en base 10 y sembrar en placas las diluciones 10^6 , 10^7 y 10^8 .

Se calculó la supervivencia relativa de cada cepa con respecto a la cepa control *E. coli* BL21 con el vector pET29a, descartando así el posible efecto citotóxico del vector.

3.3.8. Microscopía Electrónica de Transmisión

Se estudiaron mediante microscopía electrónica de transmisión las cepas donde se sobreexpresaron los genes *qnr*. Con esta técnica se comprobó si dicha sobreexpresión provocaba cambios morfológicos a nivel celular que estuvieran relacionados con efectos citotóxicos.

El protocolo realizado se detalla a continuación:

1. Inocular las cepas en LB e incubar en agitación a 37°C hasta alcanzar una D.O. a 600 nm de 0,4.
2. Inducir el cultivo con IPTG 0,2 mM durante dos horas.
3. Centrifugar 15 min a 4.000 rpm.
4. Lavar dos veces con tampón fosfato 0,1M pH 7,4.
5. Fijar las muestras en glutaraldehído al 2,5% (Merck) con paraformaldehído al 4% en tampón fosfato durante 4 horas a 4°C.
6. Lavar en tampón fosfato durante 12 horas a 4°C.
7. Postfijar las muestras en tetraóxido de osmio al 2% más ferrocianido potásico al 3% durante una hora a temperatura ambiente.
8. Realizar 3 lavados con agua destilada.
9. Deshidratar la muestras con un gradiente de acetona: 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% y 100%.
10. Embeber las muestras en resina *epoxy* (Spurr) y seccionar las muestras utilizando el sistema Reichert Jung Ultracut E.

Las secciones se visualizaron en el Centro de Investigación, Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla (CITIUS) con el microscopio electrónico Philips CM-10.

4. Resultados

4.1. Construcción de la colección de cepas isogénicas

Se obtuvo una colección de 89 cepas isogénicas utilizando la cepa de referencia *E. coli* ATCC 25922 como fondo genético. Se contruyeron 9 mutantes isogénicos que contenían combinaciones de las siguientes mutaciones cromosómicas: Ser83Leu y/o Asp87Asn en *gyrA* y/o Ser80Arg en *parC* (obtenidas por reemplazamiento genético) y/o delección del gen *marR* (obtenida por inactivación cromosómica). También se construyó un mutante portador de una delección del gen *lacZ*. Mediante electroporación se obtuvieron nuevas cepas portadoras de los genes *qnrA1*, *qnrB1*, *qnrC*, *qnrD1*, *qnrS1* o *qepA2* clonados en el vector pBK-CMV, y en el caso del gen *qnrA1* también clonado en el vector pACYC184⁹⁷; así como cepas portadoras de los vectores pBK-CMV y pACYC184. La colección puede dividirse en cinco grupos:

- Un primer grupo compuesto por las cepas isogénicas sólo portadoras de mutaciones cromosómicas (Tabla 13).
- Un segundo grupo formado por las cepas isogénicas que contenían el vector pBK-CMV vacío (Tabla 14).
- Un tercer grupo formado por las cepas isogénicas que contenían un gen *qnr* clonado en el vector pBK-CMV (Tabla 15).
- Un cuarto grupo formado por las cepas isogénicas que contenían el vector pACYC184, vacío o con el gen *qnrA1* (Tabla 16).
- Y un quinto grupo formado por las cepas isogénicas portadoras del gen *qepA2* (Tabla 17).

El laboratorio disponía de tres de estas cepas: *E. coli* ATCC 25922 (ATCC 25922), *E. coli* ATCC 25922 Ser83Leu (EC02) y *E. coli* ATCC Ser83Leu Ser80Arg (EC04)⁹¹, las cuales

servieron de base para obtener el resto de las cepas isogénicas, bien mediante la introducción de la segunda mutación en *gyrA* (Asp87Asn), la delección de *marR* y/o la delección de *lacZ*.

Tabla 13. Colección de cepas isogénicas I. Genotipo de las cepas isogénicas portadoras sólo de mutaciones cromosómicas.

Cepa	<i>gyrA1</i>	<i>gyrA2</i>	<i>parC</i>	<i>marR</i>	<i>lacZ</i>
ATCC 25922	-	-	-	-	-
EC01	-	-	-	Δ	-
EC02 ⁹¹	S83L	-	-	-	-
EC03	S83L	-	-	Δ	-
EC04 ⁹¹	S83L	-	S80R	-	-
EC05	S83L	-	S80R	Δ	-
EC06	S83L	D87N	-	-	-
EC07	S83L	D87N	-	Δ	-
EC08	S83L	D87N	S80R	-	-
EC09	S83L	D87N	S80R	Δ	-
EC70	-	-	-	-	Δ

Tabla 14. Colección de cepas isogénicas II. Genotipo de las cepas isogénicas portadoras del vector pBK-CMV vacío.

Cepa	<i>gyrA1</i>	<i>gyrA2</i>	<i>parC</i>	<i>marR</i>	<i>lacZ</i>	Vector
ATCC 25922 pBK-CMV	-	-	-	-	-	pBK-CMV
EC01 pBK-CMV	-	-	-	Δ	-	pBK-CMV
EC02 pBK-CMV	S83L	-	-	-	-	pBK-CMV
EC03 pBK-CMV	S83L	-	-	Δ	-	pBK-CMV
EC04 pBK-CMV	S83L	-	S80R	-	-	pBK-CMV
EC05 pBK-CMV	S83L	-	S80R	Δ	-	pBK-CMV
EC06 pBK-CMV	S83L	D87N	-	-	-	pBK-CMV
EC07 pBK-CMV	S83L	D87N	-	Δ	-	pBK-CMV
EC08 pBK-CMV	S83L	D87N	S80R	-	-	pBK-CMV
EC09 pBK-CMV	S83L	D87N	S80R	Δ	-	pBK-CMV
EC70 pBK-CMV	-	-	-	-	Δ	pBK-CMV

Tabla 15. Colección de cepas isogénicas III. Genotipo de las cepas isogénicas portadoras de un gen *qnr* clonado en el vector pBK-CMV.

Cepa	<i>gyrA1</i>	<i>gyrA2</i>	<i>parC</i>	<i>marR</i>	<i>qnr</i>
EC10 ⁹¹	-	-	-	-	pBK- <i>qnrA1</i>
EC11 ⁹¹	-	-	-	-	pBK- <i>qnrB1</i>
EC12	-	-	-	-	pBK- <i>qnrC</i>
EC13	-	-	-	-	pBK- <i>qnrD1</i>
EC14 ⁹¹	-	-	-	-	pBK- <i>qnrS1</i>
EC15	-	-	-	Δ	pBK- <i>qnrA1</i>
EC16	-	-	-	Δ	pBK- <i>qnrB1</i>
EC17	-	-	-	Δ	pBK- <i>qnrC</i>
EC18	-	-	-	Δ	pBK- <i>qnrD1</i>
EC19	-	-	-	Δ	pBK- <i>qnrS1</i>
EC20 ⁹¹	S83L	-	-	-	pBK- <i>qnrA1</i>
EC21 ⁹¹	S83L	-	-	-	pBK- <i>qnrB1</i>
EC22	S83L	-	-	-	pBK- <i>qnrC</i>
EC23	S83L	-	-	-	pBK- <i>qnrD1</i>
EC24 ⁹¹	S83L	-	-	-	pBK- <i>qnrS1</i>
EC25	S83L	-	-	Δ	pBK- <i>qnrA1</i>
EC26	S83L	-	-	Δ	pBK- <i>qnrB1</i>
EC27	S83L	-	-	Δ	pBK- <i>qnrC</i>
EC28	S83L	-	-	Δ	pBK- <i>qnrD1</i>
EC29	S83L	-	-	Δ	pBK- <i>qnrS1</i>
EC30 ⁹¹	S83L	-	S80R	-	pBK- <i>qnrA1</i>
EC31 ⁹¹	S83L	-	S80R	-	pBK- <i>qnrB1</i>
EC32	S83L	-	S80R	-	pBK- <i>qnrC</i>
EC33	S83L	-	S80R	-	pBK- <i>qnrD1</i>
EC34 ⁹¹	S83L	-	S80R	-	pBK- <i>qnrS1</i>
EC35	S83L	-	S80R	Δ	pBK- <i>qnrA1</i>
EC36	S83L	-	S80R	Δ	pBK- <i>qnrB1</i>
EC37	S83L	-	S80R	Δ	pBK- <i>qnrC</i>
EC38	S83L	-	S80R	Δ	pBK- <i>qnrD1</i>

Cepa	<i>gyrA1</i>	<i>gyrA2</i>	<i>parC</i>	<i>marR</i>	<i>qnr</i>
EC39	S83L	-	S80R	Δ	pBK- <i>qnrS1</i>
EC40	S83L	D87N	-	-	pBK- <i>qnrA1</i>
EC41	S83L	D87N	-	-	pBK- <i>qnrB1</i>
EC42	S83L	D87N	-	-	pBK- <i>qnrC</i>
EC43	S83L	D87N	-	-	pBK- <i>qnrD1</i>
EC44	S83L	D87N	-	-	pBK- <i>qnrS1</i>
EC45	S83L	D87N	-	Δ	pBK- <i>qnrA1</i>
EC46	S83L	D87N	-	Δ	pBK- <i>qnrB1</i>
EC47	S83L	D87N	-	Δ	pBK- <i>qnrC</i>
EC48	S83L	D87N	-	Δ	pBK- <i>qnrD1</i>
EC49	S83L	D87N	-	Δ	pBK- <i>qnrS1</i>
EC50	S83L	D87N	S80R	-	pBK- <i>qnrA1</i>
EC51	S83L	D87N	S80R	-	pBK- <i>qnrB1</i>
EC52	S83L	D87N	S80R	-	pBK- <i>qnrC</i>
EC53	S83L	D87N	S80R	-	pBK- <i>qnrD1</i>
EC54	S83L	D87N	S80R	-	pBK- <i>qnrS1</i>
EC55	S83L	D87N	S80R	Δ	pBK- <i>qnrA1</i>
EC56	S83L	D87N	S80R	Δ	pBK- <i>qnrB1</i>
EC57	S83L	D87N	S80R	Δ	pBK- <i>qnrC</i>
EC58	S83L	D87N	S80R	Δ	pBK- <i>qnrD1</i>
EC59	S83L	D87N	S80R	Δ	pBK- <i>qnrS1</i>

Tabla 16. Colección de cepas isogénicas IV. Genotipo de las cepas isogénicas portadoras del vector pACYC184.

Cepa	pACYC184	pBK-CMV
ATCC 25922 pACYC184	pACYC184	
ATCC 25922 pBK-CMV pACYC184	pACYC184	pBK-CMV
EC71	pACYC- <i>qnrA1</i>	-
EC72	pACYC- <i>qnrA1</i>	pBK- <i>qnrB1</i>
EC73	pACYC- <i>qnrA1</i>	pBK- <i>qnrC</i>
EC74	pACYC- <i>qnrA1</i>	pBK- <i>qnrD1</i>
EC75	pACYC- <i>qnrA1</i>	pBK- <i>qnrS1</i>

Tabla 17. Colección de cepas isogénicas V. Genotipo de las cepas isogénicas portadoras del gen *qepA2* clonado en el vector pBK-CMV.

Cepa	<i>gyrA1</i>	<i>gyrA2</i>	<i>parC</i>	<i>marR</i>	<i>qepA2</i>
EC60	-	-	-	-	pBK- <i>qepA2</i>
EC61	-	-	-	Δ	pBK- <i>qepA2</i>
EC62	S83L	-	-	-	pBK- <i>qepA2</i>
EC63	S83L	-	-	Δ	pBK- <i>qepA2</i>
EC64	S83L	-	S80R	-	pBK- <i>qepA2</i>
EC65	S83L	-	S80R	Δ	pBK- <i>qepA2</i>
EC66	S83L	D87N	-	-	pBK- <i>qepA2</i>
EC67	S83L	D87N	-	Δ	pBK- <i>qepA2</i>
EC68	S83L	D87N	S80R	-	pBK- <i>qepA2</i>
EC69	S83L	D87N	S80R	Δ	pBK- <i>qepA2</i>

Estas cepas se utilizaron para realizar todos los experimentos detallados en este proyecto de Tesis Doctoral. No se utilizaron cepas que presentaran sólo una mutación en *parC* ya que las mutaciones en este gen aparecen en *E. coli* tras una primera mutación en *gyrA*.

4.2. Efecto de los genes *qnr* sobre la sensibilidad a quinolonas, *fitness* bacteriano y toxicidad celular

4.2.1. Efecto de los genes *qnr* sobre la actividad de quinolonas

Durante el tratamiento antimicrobiano las bacterias están sometidas a concentraciones de antimicrobianos variables a lo largo del tiempo, pudiendo encontrarse estas concentraciones en algunos momentos por debajo de la CMI. Este hecho puede favorecer la selección de mutantes con una mayor CMI.

Los genes *qnr*, así como otros mecanismos de bajo nivel de resistencia a quinolonas, como *qepA2*, podrían favorecer la aparición de mutantes en dicha situación, ya que estos mecanismos aumentan la capacidad de las cepas de resistir a determinadas concentraciones

de fluoroquinolonas. Por ello, entre los objetivos de este estudio se encuentra la evaluación de la actividad de diferentes quinolonas frente a cepas portadoras de genes *qnr* en combinación con diversas mutaciones cromosómicas.

4.2.1.1. Efectos sobre la CMI y la CMB

Se determinó la CMI de ácido nalidíxico, ciprofloxacino, levofloxacino, moxifloxacino, norfloxacino y ofloxacino. También se determinó la CMI de cloranfenicol, debido a que la sensibilidad a este antimicrobiano se ve afectada por la inactivación de *marR*. En el caso del ciprofloxacino también se calculó la CMB. Estos valores se calcularon para 61 cepas pertenecientes a la colección, concretamente las incluidas en las Tablas 13 y 15, así como la cepa ATCC 25922 pBK-CMV.

Con respecto a las mutaciones cromosómicas (Tabla 18), la presencia de una mutación en *gyrA* (cepa EC02) ocasionó un aumento de 16 veces la CMI de ciprofloxacino; la delección de *marR* (cepa EC01) sólo ocasionó un aumento de dos veces la CMI de esta fluoroquinolona. La presencia de dos mutaciones cromosómicas provocó un incremento de entre 16 y 64 veces la CMI de ciprofloxacino (cepas EC03, EC04 y EC06); el aumento ocasionado por las combinaciones de tres mutaciones cromosómicas osciló entre 32 y 256 veces (cepas EC05, EC07 y EC08); por su parte, la cepa con cuatro mutaciones cromosómicas (EC09) tuvo una CMI de ciprofloxacino de 2 µg/ml, lo que supuso un aumento de 516 veces la CMI de la cepa *E. coli* ATCC 25922. La adición de la segunda mutación en *gyrA*, en ausencia de la mutación en *parC*, no tuvo ningún efecto sobre la CMI.

La presencia de cualquier gen *qnr* ocasionó un incremento de la CMI de ciprofloxacino y del resto de fluoroquinolonas evaluadas (Tabla 19). En el caso del ciprofloxacino, la CMI de la cepa *E. coli* ATCC 25922 portando algún gen *qnr* osciló entre 0,03 y 0,125 µg/ml (cepas EC10 – EC14), lo que supuso un aumento de entre 8 y 32 veces la CMI. Aquellas cepas que presentaban un gen *qnr* en combinación con una mutación cromosómica (cepas EC15 – EC24), la CMI se incrementó 4 y 32 veces en comparación con la cepa que no portaba el gen *qnr*. En las cepas con dos mutaciones cromosómicas, los genes *qnr* (cepas EC25 – EC34 y EC40 – EC44) incrementaron la CMI de ciprofloxacino también entre 4 y 32 veces con respecto a la cepa portadora sólo de mutaciones cromosómicas.

La presencia de tres mutaciones y un gen *qnr* aumentó la CMI unas 2 – 16 veces con respecto a la cepa portadora de las mutaciones cromosómicas correspondientes (cepas EC35 – EC39 y EC45 – EC55). La combinación de 4 mutaciones cromosómicas y un gen *qnr* (cepas EC55 – EC59) provocó un incremento de la CMI de ciprofloxacino de 2 – 8 veces con respecto a la cepa con las cuatro mutaciones cromosómicas y de 1024 – 4096 veces con respecto a la cepa *E. coli* ATCC 25922 (Tabla 19).

Tabla 18. CMI ($\mu\text{g/ml}$) y CMB ($\mu\text{g/ml}$) de ácido nalidíxico (NA), ciprofloxacino (CIP), levofloxacino (LVX), moxifloxacino (MXF), norfloxacino (NFX), ofloxacino (OFX) y cloranfenicol (CLR) de las cepas isogénicas de *E. coli* sin mecanismos plasmídicos de resistencia a quinolonas. Ver Tabla 13 (pág. 79).

Cepa	CMI							CMB CIP
	NA	CIP	LVX	MXF	NFX	OFX	CLR	
ATCC 25922	1	0,004	0,008	0,004	0,03	0,06	2	0,004
ATCC 25922 pBK-CMV	1	0,004	0,008	0,004	0,03	0,06	2	0,004
EC01	4	0,016	0,03	0,016	0,125	0,125	16	0,016
EC02	>256	0,06	0,125	0,06	0,5	0,5	2	0,125
EC03	>256	0,125	0,25	0,25	1	1	16	0,125
EC04	>256	0,25	0,25	0,25	2	1	2	0,25
EC05	>256	0,5	0,5	0,25	2	1	8	1
EC06	>256	0,06	0,125	0,06	0,5	0,5	2	0,125
EC07	>256	0,125	0,25	0,25	1	1	16	0,25
EC08	>256	1	1	2	4	2	2	1
EC09	>256	2	4	4	16	8	8	4

Los distintos genes *qnr* provocaron un incremento desigual de la CMI de ciprofloxacino (Tabla 19, Figuras 22 y 23). El gen *qnrS1* fue el que ocasionó un mayor incremento de la CMI de ciprofloxacino (entre 8 y 32 veces); por su parte *qnrD1* es el que ocasionó un menor aumento de la CMI, de 2 a 8 veces.

La delección de *marR* fue la única mutación cromosómica que no ocasionó resistencia clínica a ácido nalidíxico, lo mismo que sucedió con la presencia de los genes *qnr* en ausencia de mutación cromosómica o en combinación con la delección de *marR*.

Tabla 19. CMI ($\mu\text{g/ml}$) y CMB ($\mu\text{g/ml}$) de ácido nalidíxico (NA), ciprofloxacino (CIP), levofloxacino (LVX), moxifloxacino (MXF), norfloxacino (NFX), ofloxacino (OFX) y cloranfenicol (CLR) de las cepas isogénicas de *E. coli* portadoras de un gen *qnr*. Ver Tabla 15 (págs. 80 y 81).

Cepa	CMI							CMB CIP
	NA	CIP	LVX	MXF	NFX	OFX	CLR	
ATCC 25922	1	0,004	0,008	0,004	0,03	0,06	2	0,004
ATCC 25922 pBK-CMV	1	0,004	0,008	0,004	0,03	0,06	2	0,004
EC10	16	0,125	0,25	0,25	0,5	1	2	0,125
EC11	16	0,125	0,125	0,25	0,25	1	2	0,25
EC12	8	0,06	0,125	0,125	0,25	1	2	0,125
EC13	4	0,03	0,03	0,06	0,06	0,25	2	0,06
EC14	16	0,125	0,25	0,25	1	1	2	0,125
EC15	16	0,5	0,5	0,5	2	4	16	0,5
EC16	16	0,5	0,5	0,5	1	4	16	0,5
EC17	32	0,25	0,25	0,5	2	2	16	0,25
EC18	8	0,125	0,125	0,5	0,25	2	16	0,125
EC19	32	0,5	0,5	0,5	2	2	32	0,5
EC20	>256	0,5	0,5	0,5	2	4	2	0,25
EC21	>256	0,25	0,25	0,5	1	2	2	0,5
EC22	>256	0,25	0,5	0,25	1	4	2	0,5
EC23	>256	0,25	0,25	0,25	1	2	2	0,25
EC24	>256	1	2	2	4	8	2	2
EC25	>256	1	2	2	8	8	16	2
EC26	>256	1	1	2	2	4	8	1
EC27	>256	0,5	1	1	2	8	16	0,5
EC28	>256	0,5	0,5	0,5	2	4	16	0,5
EC29	>256	2	4	2	4	32	32	2
EC30	>256	2	2	2	16	32	2	4
EC31	>256	1	1	1	4	8	2	2
EC32	>256	1	2	1	8	16	2	2

Cepa	CMI							CMB CIP
	NA	CIP	LVX	MXF	NFX	OFX	CLR	
EC33	>256	0,5	1	1	4	4	2	1
EC34	>256	4	4	2	16	16	2	8
EC35	>256	8	4	4	16	8	8	16
EC36	>256	4	4	4	8	8	8	4
EC37	>256	4	4	4	8	16	8	4
EC38	>256	2	2	2	4	4	8	2
EC39	>256	8	8	4	16	16	8	8
EC40	>256	0,5	0,5	0,5	2	4	2	0,25
EC41	>256	0,25	0,25	0,5	1	2	2	0,5
EC42	>256	0,25	0,5	0,25	1	4	2	0,5
EC43	>256	0,25	0,25	0,25	1	2	2	0,25
EC44	>256	1	2	2	4	8	2	2
EC45	>256	1	2	2	8	8	16	2
EC46	>256	1	1	2	2	4	8	1
EC47	>256	0,5	1	1	2	8	16	0,5
EC48	>256	0,5	0,5	0,5	2	4	16	0,5
EC49	>256	2	4	2	4	32	32	2
EC50	>256	4	4	4	8	8	2	4
EC51	>256	2	2	2	4	4	2	2
EC52	>256	2	4	4	8	8	2	2
EC53	>256	2	4	4	8	8	2	2
EC54	>256	8	8	8	16	16	2	8
EC55	>256	4	8	4	16	8	8	4
EC56	>256	8	8	8	16	16	8	8
EC57	>256	8	8	8	16	16	8	8
EC58	>256	4	4	8	16	8	8	4
EC59	>256	16	16	32	32	32	8	16

Figura 22. Representación de los valores de CMI ($\mu\text{g/ml}$) de ciprofloxacino (CIP) de las cepas isogénicas de *E. coli* sin mutaciones cromosómicas (parte A), con las mutaciones $\Delta marR$ (parte B), Ser83Leu (parte C), Ser83Leu $\Delta marR$ (parte D), Ser83Leu Ser80Arg (parte E) y Ser83Leu Ser80Arg $\Delta marR$ (parte F) con o sin genes *qnr*. Ver Tablas 13 y 15 (págs. 79–81).

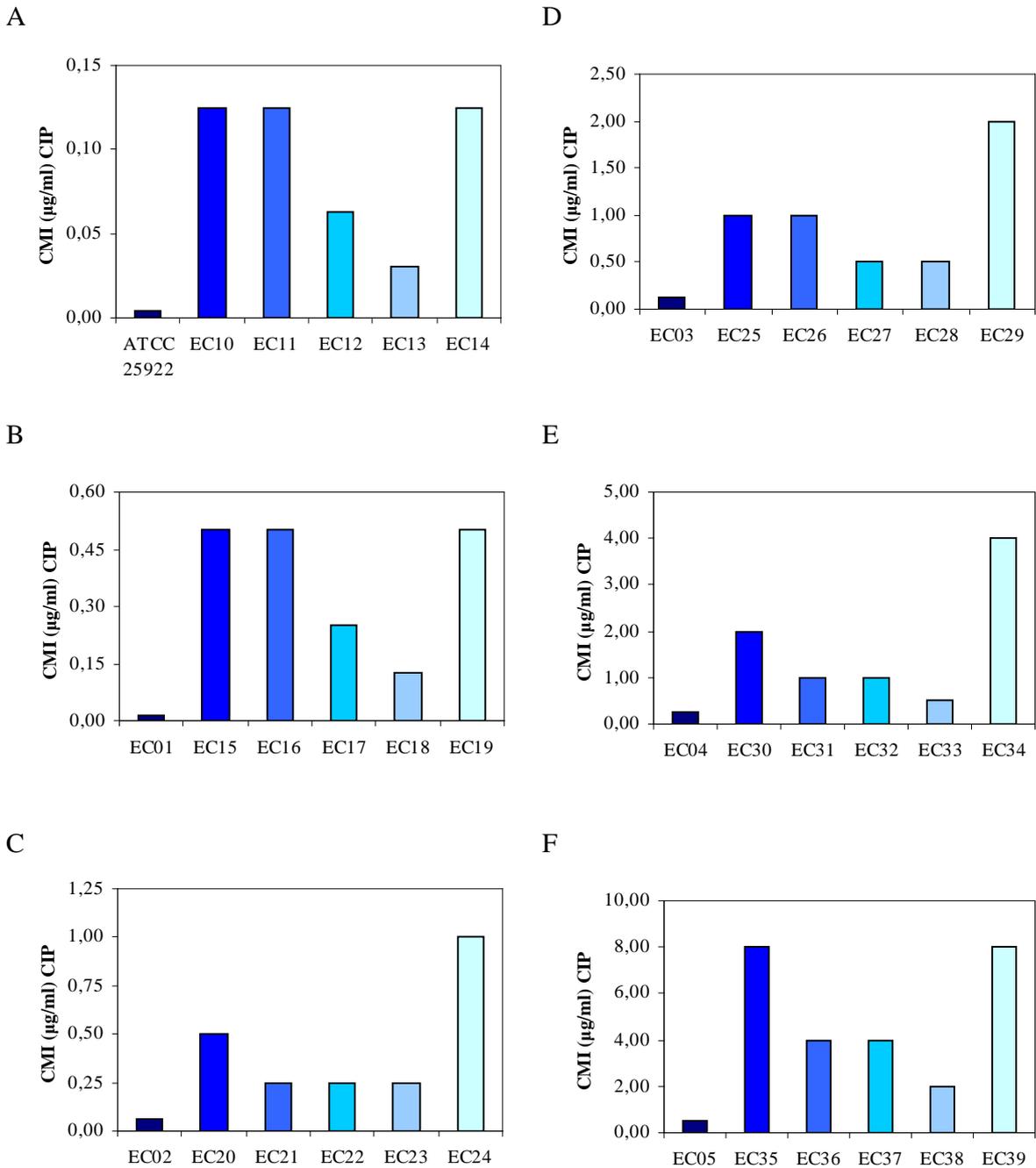
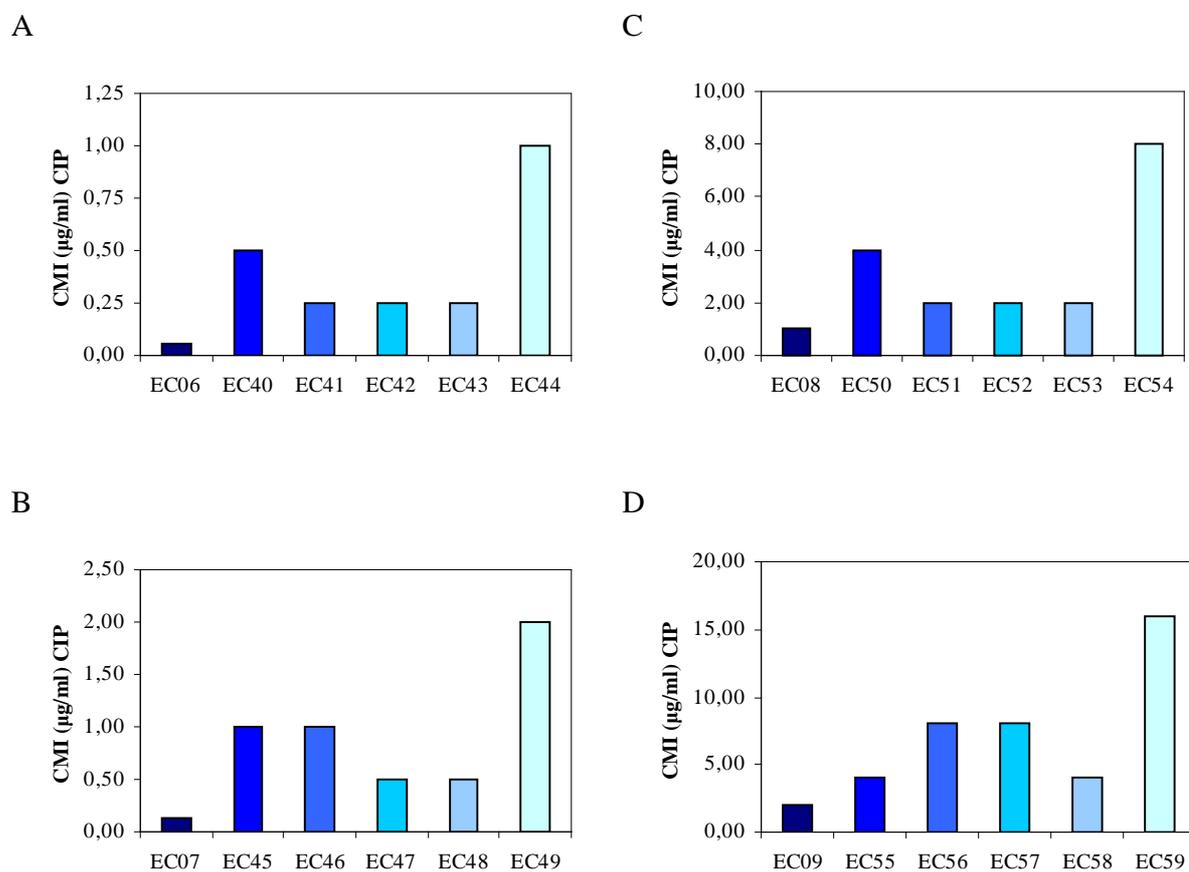


Figura 23. Representación de los valores de CMI ($\mu\text{g/ml}$) de ciprofloxacino (CIP) de las cepas isogénicas de *E. coli* con las mutaciones Ser83Leu Asp87Asn (parte A), Ser83Leu Asp87Asn ΔmarR (parte B), Ser83Leu Asp87Asn Ser80Arg (parte C) y Ser83Leu Asp87Asn Ser80Arg ΔmarR (parte D) con o sin genes *qnr*. Ver Tablas 13 y 15 (págs. 79 –81).



El efecto de los genes *qnr* sobre la actividad de levofloxacino, moxifloxacino y norfloxacino fue similar al producido para ciprofloxacino. La presencia de un gen *qnr* ocasionó un incremento de la CMI de ofloxacino menor al provocado para el resto de fluoroquinolonas (Tabla 19).

Los valores de CMB de ciprofloxacino fueron similares a los de CMI para todas las cepas isogénicas, variando únicamente una dilución en algunos casos (Tablas 18 y 19).

Se analizó el efecto de la coexpresión de dos genes *qnr* en *E. coli* sobre la sensibilidad a ciprofloxacino (Tabla 20). Se clonaron diferentes genes *qnr* en vectores compatibles (pBK-CMV y pACYC184). Se estudió el efecto sobre CMI de ciprofloxacino de la combinación de

qnrA1 y el resto de genes *qnr* (*qnrB1*, *qnrC*, *qnrD1* y *qnrS1*). La presencia de dos genes *qnr* no produjo efecto aditivo o sinérgico.

Tabla 20. CMI de ciprofloxacino ($\mu\text{g/ml}$) (CMI CIP) de las cepas isogénicas de *E. coli* portadoras de dos genes *qnr*. Ver Tablas 15 y 16 (págs. 80 y 81).

Cepa	Genes <i>qnr</i>	CMI CIP
ATCC 25922	-	0,004
ATCC 25922 pBK-CMV	-	0,004
ATCC 25922 pACYC184	-	0,004
ATCC 25922 pBK-CMV pACYC184	-	0,004
EC10	<i>qnrA1</i>	0,125
EC71	<i>qnrA1</i>	0,125
EC11	<i>qnrB1</i>	0,125
EC72	<i>qnrA1 + qnrB1</i>	0,125
EC12	<i>qnrC</i>	0,06
EC73	<i>qnrA1 + qnrC</i>	0,125
EC13	<i>qnrD1</i>	0,03
EC74	<i>qnrA1 + qnrD1</i>	0,125
EC14	QnrS1	0,125
EC75	<i>qnrA1 + qnrS1</i>	0,125

4.2.1.2. Discrepancias entre CLSI y EUCAST

Los puntos de corte de sensibilidad clínica a quinolonas para enterobacterias establecidos por el CLSI¹⁶¹ y el EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*, www.eucast.org) son diferentes, siendo más bajos los establecidos por la agencia europea (Tabla 21).

Tabla 21. Puntos de corte establecidos por CLSI y EUCAST.

Quinolona	CLSI / EUCAST		
	Sensible (S)	Intermedio (I)	Resistente (R)
NA	≤16 / -	- / -	≥ 32 / -
CIP	≤1 / ≤0,5	2 / 1	≥4 / >1
LVX	≤2 / ≤1	4 / 2	≥8 / >2
MXF	- / ≤0,5	- / 1	- / >1
NFX	≤4 / ≤0,5	8 / 1	≥16 / >1
OFX	≤2 / ≤0,5	4 / 1	≥8 / >1

Las discrepancias en la categoría clínica al utilizar los puntos de corte del EUCAST o el CLSI se dieron principalmente en aquellas cepas que presentaban entre dos y cuatro mecanismos de resistencia. La presencia de los genes *qnr* en ausencia de otro mecanismo de resistencia, a excepción de *qnrD1*, ocasionó discrepancia en alguna de las quinolonas evaluadas (Tabla 22).

Tabla 22. Comparación de los valores de CMI (μg/ml) obtenidos para las cepas isogénicas de *E. coli* portadoras de mutaciones cromosómicas y/o un gen *qnr* en relación a las categorías clínicas determinadas por el CLSI y el EUCAST. Marcados en negrita los valores de CMI clasificados en distintas categorías clínicas por ambos comités. S, sensible; I, intermedio; R, resistente. Ver Tablas 13 y 15 (págs. 79 – 81).

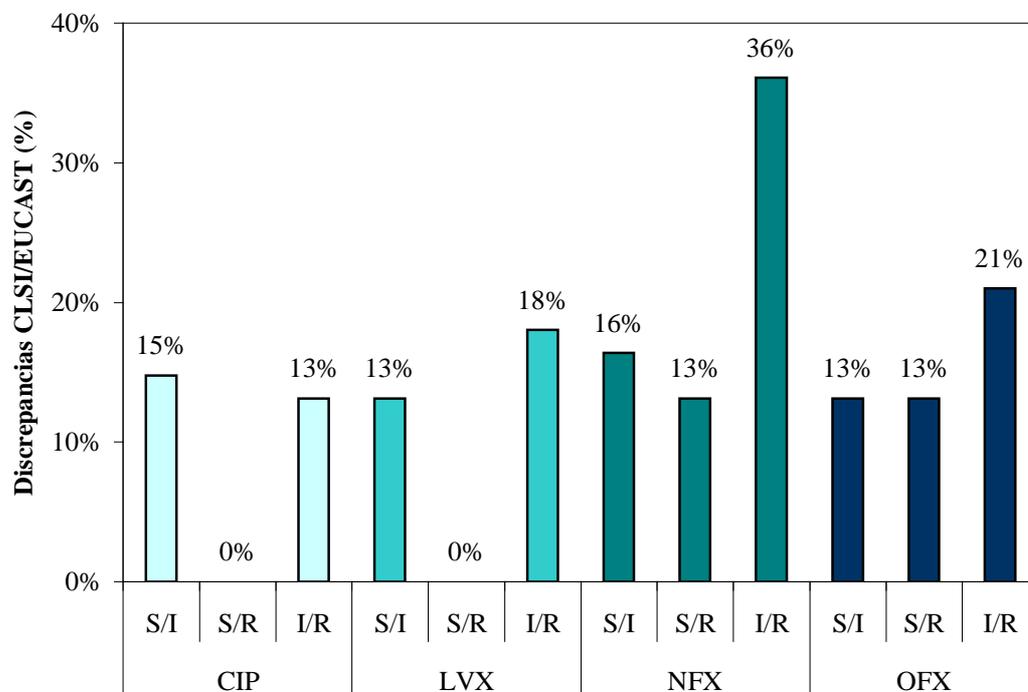
Cepa	CMI / CLSI / EUCAST			
	CIP	LVX	NFX	OFX
ATCC 25922	0,004/S/S	0,008/S/S	0,03/S/S	0,06/S/S
ATCC 25922 pBK-CMV	0,004/S/S	0,008/S/S	0,03/S/S	0,06/S/S
EC01	0,016/S/S	0,03/S/S	0,125/S/S	0,125/S/S
EC02	0,06/S/S	0,125/S/S	0,5/S/S	0,5/S/S
EC03	0,125/S/S	0,25/S/S	1/S/I	1/S/I
EC04	0,25/S/S	0,25/S/S	2/S/R	1/S/I
EC05	0,5/S/S	0,5/S/S	2/S/R	1/S/I
EC06	0,06/S/S	0,125/S/S	0,5/S/S	0,5/S/S

Cepa	CMI / CLSI / EUCAST			
	CIP	LVX	NFX	OFX
EC07	0,125/S/S	0,25/S/S	1/S/I	1/S/I
EC08	1/S/I	1/S/S	4/S/R	2/S/R
EC09	2/I/R	4/I/R	16/R/R	8/R/R
EC10	0,125/S/S	0,25/S/S	0,5/S/S	1/S/I
EC11	0,125/S/S	0,125/S/S	0,25/S/S	1/S/I
EC12	0,06/S/S	0,125/S/S	0,25/S/S	1/S/I
EC13	0,03/S/S	0,03/S/S	0,06/S/S	0,25/S/S
EC14	0,125/S/S	0,25/S/S	1/S/I	1/S/I
EC15	0,5/S/S	0,5/S/S	2/S/R	4/I/R
EC16	0,5/S/S	0,5/S/S	1/S/I	4/I/R
EC17	0,25/S/S	0,25/S/S	2/S/R	2/S/R
EC18	0,125/S/S	0,125/S/S	0,25/S/S	2/S/R
EC19	0,5/S/S	0,5/S/S	2/S/R	2/S/R
EC20	0,5/S/S	0,5/S/S	2/S/R	4/I/R
EC21	0,25/S/S	0,25/S/S	1/S/I	2/S/R
EC22	0,25/S/S	0,5/S/S	1/S/I	4/I/R
EC23	0,25/S/S	0,25/S/S	1/S/I	2/S/R
EC24	1/S/I	2/S/I	4/S/R	8/R/R
EC25	1/S/I	2/S/I	8/I/R	8/R/R
EC26	1/S/I	1/S/S	2/S/R	4/I/R
EC27	0,5/S/S	1/S/S	2/S/R	8/R/R
EC28	0,5/S/S	0,5/S/S	2/S/R	4/I/R
EC29	2/I/R	4/I/R	4/S/R	32/R/R
EC30	2/I/R	2/S/I	16/R/R	32/R/R
EC31	1/S/I	1/S/S	4/S/R	8/R/R
EC32	1/S/I	2/S/I	8/I/R	16/R/R
EC33	0,5/S/S	1/S/S	4/S/R	4/I/R
EC34	4/R/R	4/I/R	16/R/R	16/R/R

Cepa	CMI / CLSI / EUCAST			
	CIP	LVX	NFX	OFX
EC35	8/R/R	4/I/R	16/R/R	8/R/R
EC36	4/R/R	4/I/R	8/I/R	8/R/R
EC37	4/R/R	4/I/R	8/I/R	16/R/R
EC38	2/I/R	2/S/I	4/S/R	4/I/R
EC39	8/R/R	8/R/R	16/R/R	16/R/R
EC40	0,5/S/S	0,5/S/S	2/S/R	4/I/R
EC41	0,25/S/S	0,25/S/S	1/S/I	2/S/R
EC42	0,25/S/S	0,5/S/S	1/S/I	4/I/R
EC43	0,25/S/S	0,25/S/S	1/S/I	2/S/R
EC44	1/S/I	2/S/I	4/S/R	8/R/R
EC45	1/S/I	2/S/I	8/I/R	8/R/R
EC46	1/S/I	1/S/S	2/S/R	4/I/R
EC47	0,5/S/S	1/S/S	2/S/R	8/R/R
EC48	0,5/S/S	0,5/S/S	2/S/R	4/I/R
EC49	2/I/R	4/I/R	4/S/R	32/R/R
EC50	4/R/R	4/I/R	8/I/R	8/R/R
EC51	2/I/R	2/S/I	4/S/R	4/I/R
EC52	2/I/R	4/I/R	8/I/R	8/R/R
EC53	2/I/R	4/I/R	8/I/R	8/R/R
EC54	8/R/R	8/R/R	16/R/R	16/R/R
EC55	4/R/R	8/R/R	16/R/R	8/R/R
EC56	8/R/R	8/R/R	16/R/R	16/R/R
EC57	8/R/R	8/R/R	16/R/R	16/R/R
EC58	4/R/R	4/I/R	16/R/R	8/R/R
EC59	16/R/R	16/R/R	32/R/R	32/R/R

Se observó una tasa de discrepancia del 28% para ciprofloxacino, 31% para levofloxacino, 65% para norfloxacino y 47% para ofloxacino. En el caso de norfloxacino, el antimicrobiano con mayores discrepancias, el 36% de las determinaciones de esta quinolona fueron catalogadas como sensible por CLSI y resistente por EUCAST (Figura 24).

Figura 24. Discrepancias entre CLSI y EUCAST de las cepas isogénicas recogidas en la Tabla 22 en función de la fluoroquinolona evaluada.



4.2.1.3. Efecto sobre la CPM

Se analizó la CPM de ciprofloxacino y levofloxacino de 17 cepas isogénicas (portadoras de uno a tres mecanismos de resistencia) en comparación con *E. coli* ATCC 25922. Se estudiaron cepas con bajo nivel de resistencia a quinolonas. Estas cepas presentaban un rango de CMI de ciprofloxacino y levofloxacino entre 0,016 y 4 µg/ml.

La presencia de un gen *qnr* en ausencia de mutaciones cromosómicas (cepas EC10 – EC14) incrementó la CPM en 2 – 8 veces para las dos quinolonas analizadas (Tabla 23).

La cepa con una mutación en *gyrA* (EC20) presentó una CPM de 4 µg/ml para ambos antimicrobianos, lo que supuso un incremento con respecto a la cepa de referencia de 4 y 2 veces para ciprofloxacino y levofloxacino, respectivamente. La adición a esta cepa de un gen *qnr* (cepas EC20 – EC24) llevó los valores de CPM de ciprofloxacino y levofloxacino a 8 – 32 µg/ml, lo que supuso un incremento de 8 – 32 veces la CPM de ciprofloxacino con respecto a la cepa *E. coli* ATCC 25922, y de 4 – 16 veces en el caso del levofloxacino.

Tabla 23. CMI ($\mu\text{g/ml}$), CPM ($\mu\text{g/ml}$), VSM y tiempo de aparición de mutantes de ciprofloxacino (CIP) y levofloxacino (LVX) de las cepas isogénicas de *E. coli* analizadas. Ver Tablas 13 y 15 (págs. 79 – 81).

Cepa	CMI ($\mu\text{g/ml}$)		CPM ($\mu\text{g/ml}$)		VSM (CPM/CMI)		Tiempo de aparición de mutantes (h)	
	CIP	LVX	CIP	LVX	CIP	LVX	CIP	LVX
ATCC 25922	0,004	0,008	1	2	256	256	48	48
EC10	0,125	0,25	8	8	64	32	48	24
EC11	0,125	0,125	2	4	16	32	72	48
EC12	0,06	0,125	2	4	32	32	48	96
EC13	0,03	0,03	2	2	64	64	24	24
EC14	0,125	0,25	4	4	32	16	24	24
EC02	0,06	0,125	4	4	64	32	24	24
EC20	0,5	0,5	16	32	32	64	24	24
EC21	0,25	0,25	8	16	32	64	24	72
EC22	0,25	0,5	32	16	128	32	48	24
EC23	0,25	0,25	8	8	32	32	48	24
EC24	1	2	8	16	8	8	24	96
EC04	0,25	0,25	8	8	32	32	48	48
EC30	2	2	32	64	16	32	24	24
EC31	1	1	8	16	8	16	48	72
EC32	1	2	32	32	32	16	48	48
EC33	0,5	1	16	16	32	16	48	72
EC34	4	4	32	64	8	16	24	48

Con respecto a la cepa con las mutaciones en *gyrA* y *parC* (EC04), el incremento de la CPM fue de 8 y 4 veces para ciprofloxacino y levofloxacino, respectivamente, con respecto a la cepa *E. coli* ATCC 25922. La presencia de un gen *qnr* adicional (cepas EC30 – EC34) ocasionó valores de CPM de 8 – 32 $\mu\text{g/ml}$ y 16 – 64 $\mu\text{g/ml}$ para ciprofloxacino y levofloxacino, respectivamente. Por tanto, la presencia de estos genes de resistencia en combinación con las mutaciones Ser83Leu en *gyrA* y Ser80Arg en *parC* provocó que la CPM

de ciprofloxacino y levofloxacino aumentara 8 – 32 veces con respecto a la cepa *E. coli* ATCC 25922.

Ninguna de las cepas analizadas superó la Ventana de Selección de Mutantes (VSM) de la cepa *E. coli* ATCC 25922 (256 para ciprofloxacino y levofloxacino), oscilando este parámetro entre 8 y 128 para las cepas isogénicas analizadas para ambas quinolonas (Tabla 23).

Aunque las placas se incubaron 96 horas, en la mayoría de las cepas estudiadas los mutantes aparecieron entre las 24 y 48 horas.

4.2.1.4. Efecto sobre la frecuencia de aparición de mutantes

Se estudió la frecuencia de aparición de mutantes de 19 cepas isogénicas con sensibilidad disminuida a quinolonas y en la cepa *E. coli* ATCC 25922. Las 19 cepas analizadas presentaban uno o dos mecanismos de resistencia, siendo todas sensibles a ciprofloxacino según los puntos de corte del CLSI (valores de CMI entre 0,03 y 1 µg/ml).

Para comprobar la posibilidad de resistencia cruzada se realizaron los ensayos con 100 µg/ml de rifampicina, no observándose diferencias entre las cepas estudiadas. Esto indica que ni los genes *qnr* ni las mutaciones cromosómicas estudiadas (la mutación Ser83Leu en *gyrA* y la delección de *marR*) alteran la tasa de mutación de las células.

Se evaluaron dos concentraciones de ciprofloxacino para comprobar el efecto del fenotipo de bajo nivel de resistencia en la emergencia de mutantes resistentes: 1 µg/ml y la concentración equivalente a 4 veces el valor de la CMI de esta quinolona. Con esta última concentración no se observaron diferencias entre las distintas cepas (Tabla 24).

Sin embargo, si se observaron diferencias notorias en los ensayos realizados con 1 µg/ml de ciprofloxacino. En las cepas sin genes *qnr* las frecuencias de aparición de mutantes fueron inferiores a 10^{-10} (cepas EC01- EC04), no detectándose mutantes en muchos de los casos. Algo similar sucedió en la cepa *E. coli* ATCC 25922 con los genes *qnr* (cepas EC10 – EC14). La combinación de un gen *qnr* con la mutación Ser83Leu en *gyrA* (cepas EC20 – EC24) supuso un aumento de la frecuencia de mutación de 10^2 – 10^4 veces con respecto a la cepa que sólo portaba la mutación en *gyrA* (EC02), obteniéndose valores entre 10^{-9} y 10^{-7} (Tabla 24).

Tabla 24. Frecuencia de aparición de mutantes a 4 veces la CMI (4xCMI CIP) y 1 µg/ml de ciprofloxacino (1 CIP). Ver Tablas 13 y 15 (págs. 79 – 81).

Cepa	4xCMI CIP	1 CIP
ATCC 25922	$2,59 \cdot 10^{-8}$	$<7,40 \cdot 10^{-11}$
EC01	$<4,89 \cdot 10^{-10}$	$<4,53 \cdot 10^{-10}$
EC02	$3,00 \cdot 10^{-9}$	$<4,29 \cdot 10^{-11}$
EC03	$8,04 \cdot 10^{-10}$	$4,31 \cdot 10^{-11}$
EC04	$<1,97 \cdot 10^{-11}$	$<1,97 \cdot 10^{-11}$
EC10	$5,71 \cdot 10^{-11}$	$<5,23 \cdot 10^{-10}$
EC11	$<4,08 \cdot 10^{-10}$	$<4,08 \cdot 10^{-10}$
EC12	$2,18 \cdot 10^{-8}$	$<4,59 \cdot 10^{-10}$
EC13	$3,22 \cdot 10^{-8}$	$<1,19 \cdot 10^{-11}$
EC14	$<2,31 \cdot 10^{-10}$	$<2,31 \cdot 10^{-10}$
EC15	$1,96 \cdot 10^{-10}$	$2,66 \cdot 10^{-8}$
EC16	$1,14 \cdot 10^{-10}$	$5,98 \cdot 10^{-10}$
EC17	$1,01 \cdot 10^{-10}$	$1,01 \cdot 10^{-10}$
EC18	$<2,61 \cdot 10^{-11}$	$<2,61 \cdot 10^{-11}$
EC19	$<4,34 \cdot 10^{-10}$	$1,82 \cdot 10^{-11}$
EC20	$8,15 \cdot 10^{-9}$	$5,78 \cdot 10^{-8}$
EC21	$1,42 \cdot 10^{-9}$	$1,42 \cdot 10^{-9}$
EC22	$5,74 \cdot 10^{-9}$	$5,74 \cdot 10^{-9}$
EC23	$2,81 \cdot 10^{-9}$	$2,81 \cdot 10^{-9}$
EC24	$2,19 \cdot 10^{-8}$	$1,75 \cdot 10^{-7}$

De los mutantes estables obtenidos, todos fueron sensibles a ciprofloxacino según los puntos de corte del CLSI. Utilizando los criterios del EUCAST, el 22% de los mutantes estudiados fueron no sensibles a ciprofloxacino (Tabla 25). Estos mutantes sólo se obtuvieron a partir de las cepas que contenían algún gen *qnr* en combinación con una mutación cromosómica (Ser83Leu en *gyrA* o delección de *marR*).

Se procedió a caracterizar 28 de los mutantes estables mediante secuenciación del QRDR de *gyrA* y *parC* y estudio de la expresión de la bomba de expulsión AcrAB (mediante PCR cuantitativa a tiempo real del gen *acrB*).

No se encontró ningún mutante con mutaciones adicionales con respecto a su cepa parental en el QRDR de *parC*, y sólo dos presentaban una mutación adicional en el QRDR de *gyrA*. Concretamente fue un mutante derivado de la cepa EC01 y otro de la cepa EC19, ambos presentaron la mutación Ser83Leu en *gyrA* (Tabla 25).

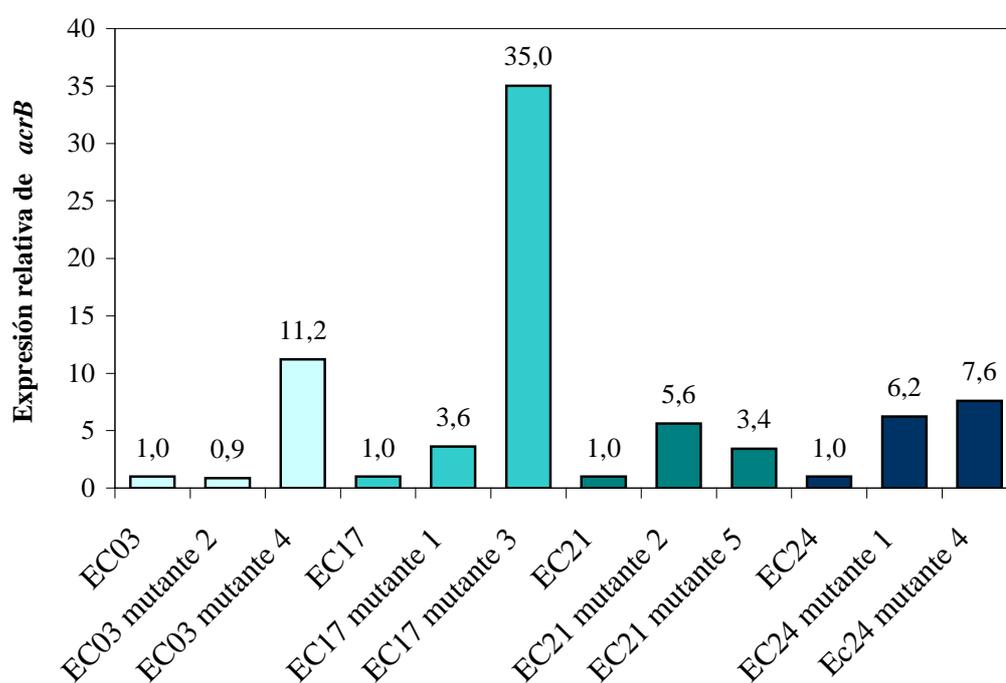
Tabla 25. Caracterización de los mutantes seleccionados de los ensayos de frecuencia de aparición de mutantes. D.D.: diámetro de halo obtenido (mm) para ciprofloxacino (CIP) mediante disco difusión. La expresión del gen *acrB* esta relativizada a la cepa original. Ver Tablas 13 y 15 (págs. 79 – 81).

Cepa / mutante	D.D. CIP (mm)	Secuencia QRDR		Expresión <i>acrB</i>
		<i>gyrA</i>	<i>parC</i>	
ATCC 25922	46	SAVYD	SACYE	1,0
ATCC 25922 mutante 1	39	SAVYD	SACYE	2,4
ATCC 25922 mutante 5	37	SAVYD	SACYE	0,8
EC02	34	LAVYD	SACYE	1,0
EC02 mutante 2	27	LAVYD	SACYE	2,8
EC02 mutante 5	32	LAVYD	SACYE	1,2
EC03	34	LAVYD	SACYE	1,0
EC03 mutante 2	28	LAVYD	SACYE	0,9
EC03 mutante 4	25	LAVYD	SACYE	11,2
EC10	32	SAVYD	SACYE	1,0
EC10 mutante 1	26	LAVYD	SACYE	6,5
EC12	31	SAVYD	SACYE	1,0
EC12 mutante 1	29	SAVYD	SACYE	0,8
EC12 mutante 2	30	SAVYD	SACYE	2,2

Cepa / mutante	D.D. CIP (mm)	Secuencia QRDR		Expresión <i>acrB</i>
		<i>gyrA</i>	<i>parC</i>	
EC13	36	SAVYD	SACYE	1,0
EC13 mutante 4	30	SAVYD	SACYE	1,2
EC13 mutante 5	33	SAVYD	SACYE	1,7
EC15	26	SAVYD	SACYE	1,0
EC15 mutante 1	21	SAVYD	SACYE	5,3
EC15 mutante 4	19	SAVYD	SACYE	5,8
EC16	28	SAVYD	SACYE	1,0
EC16 mutante 1	23	SAVYD	SACYE	3,4
EC16 mutante 2	22	SAVYD	SACYE	5,2
EC17	28	SAVYD	SACYE	1,0
EC17 mutante 1	22	SAVYD	SACYE	3,6
EC17 mutante 3	24	SAVYD	SACYE	35,0
EC19	26	SAVYD	SACYE	1,0
EC19 mutante 1	19	LAVYD	SACYE	5,7
EC20	26	LAVYD	SACYE	1,0
EC20 mutante 2	20	LAVYD	SACYE	2,6
EC20 mutante 5	22	LAVYD	SACYE	1,7
EC21	27	LAVYD	SACYE	1,0
EC21 mutante 2	20	LAVYD	SACYE	5,6
EC21 mutante 5	11	LAVYD	SACYE	3,4
EC22	27	LAVYD	SACYE	1,0
EC22 mutante 2	24	LAVYD	SACYE	0,5
EC22 mutante 5	22	LAVYD	SACYE	2,9
EC23	28	LAVYD	SACYE	1,0
EC23 mutante 1	26	LAVYD	SACYE	2,8
EC23 mutante 5	25	LAVYD	SACYE	2,2
EC24	23	LAVYD	SACYE	1,0
EC24 mutante 1	18	LAVYD	SACYE	6,2
EC24 mutante 4	22	LAVYD	SACYE	7,6

El 71% de los mutantes analizados (20) presentaron un aumento de la expresión de *acrB* de entre 2 y 35 veces con respecto a la cepa original. El incremento de expresión de esta bomba se observó incluso en cepas que presentaban una delección previa de *marR*. El mutante que presentó un mayor aumento de la expresión fue uno derivado de la cepa EC17 (Tabla 25 y Figura 25).

Figura 25. Expresión relativa de *acrB* de algunos de los mutantes recuperados en los ensayos de frecuencia de aparición de mutantes.

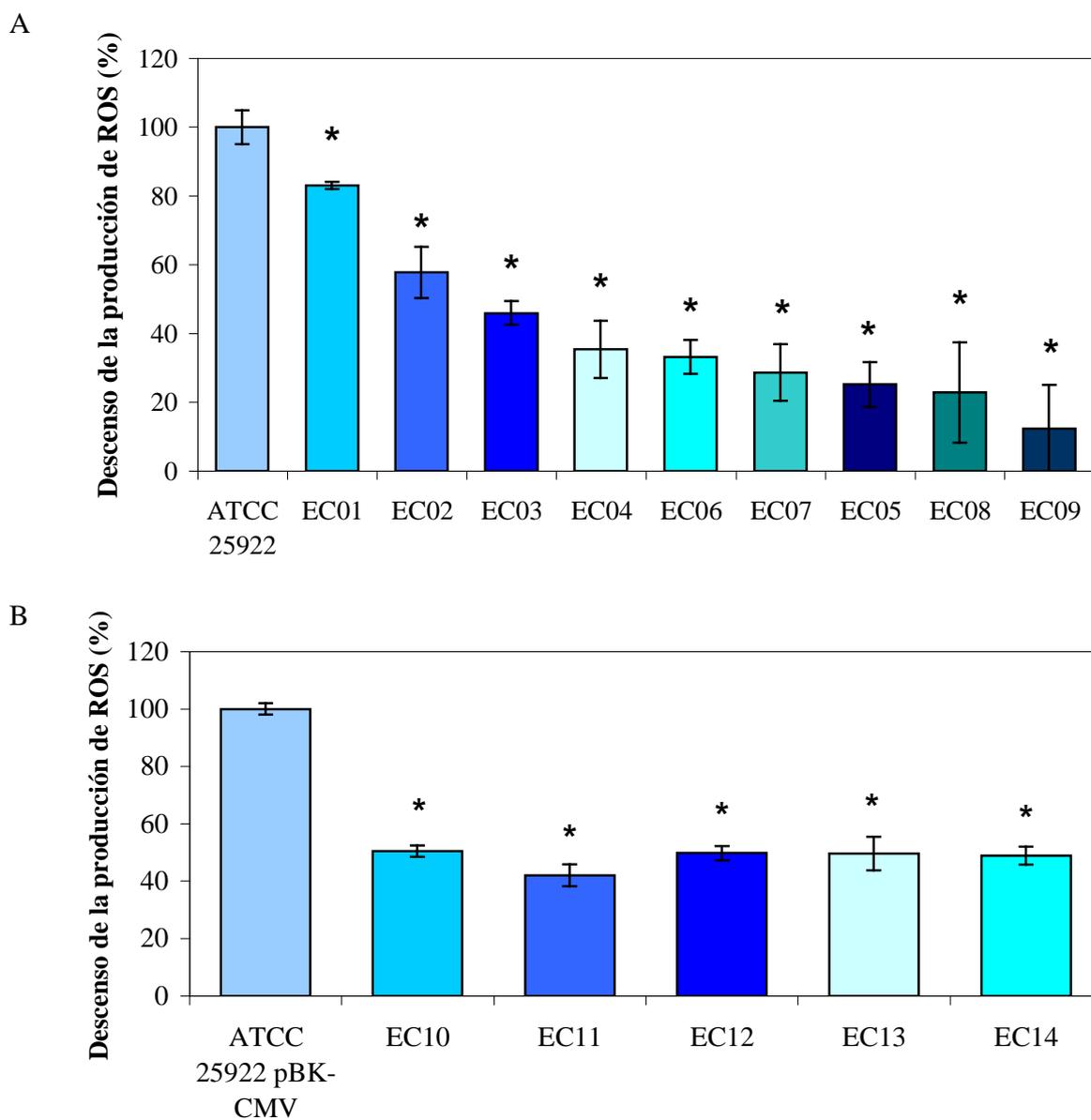


4.2.1.5. Producción de especies reactivas de oxígeno

Se estudió la correlación entre la formación de ROS y la presencia de mecanismos cromosómicos de resistencia a quinolonas en *E. coli* al tratar las diferentes cepas con 1 µg/ml de ciprofloxacino. Se halló una correlación significativa entre ambos parámetros ($r^2 = 0,98$), observándose que la producción de ROS disminuía a medida que aumentaba el número de mecanismos cromosómicos de resistencia. La presencia de una sola mutación ocasionó una reducción del 20% – 40% en la producción de ROS, la presencia de dos del 55% – 65%, tres

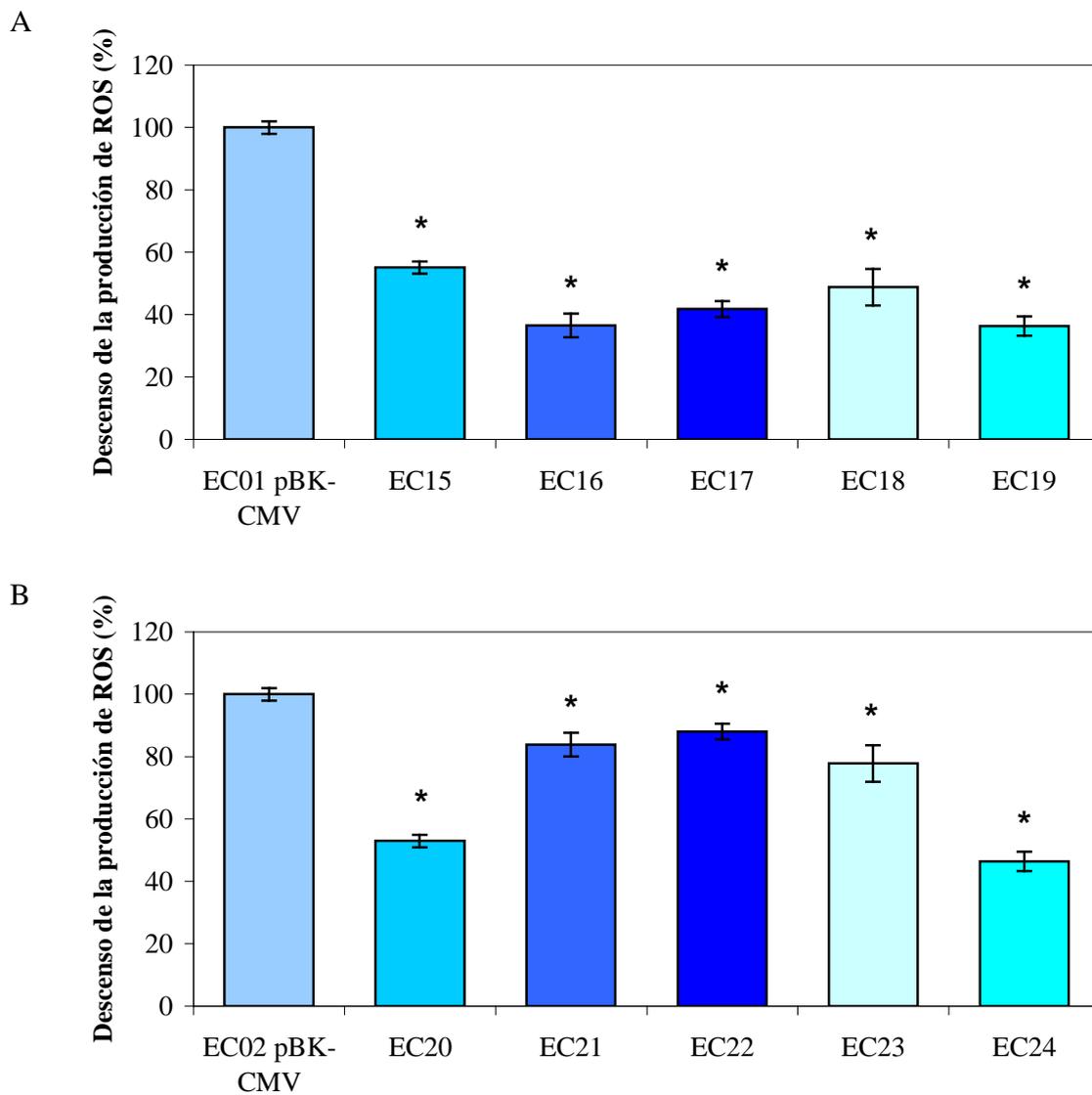
mecanismos entre el 70% y el 80%, y la presencia de 4 mutaciones cromosómicas (cepa EC09) de aproximadamente el 90% (Figura 26A). La presencia de los genes *qnr* supuso una reducción de la producción de ROS del 40% – 50% en ausencia de mecanismos cromosómicos de resistencia (Figura 26B).

Figura 26. Producción de ROS en cepas de *E. coli* isogénicas portadoras de mutaciones cromosómicas (parte A) o genes *qnr* (parte B). Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) están indicadas con asterisco.



La combinación de un gen *qnr* con la delección de *marR* o la mutación Ser83Leu en *gyrA* produjo una reducción de la producción de ROS del 45% – 65% y 10% – 55%, respectivamente, con respecto a la cepa que sólo presentaba la mutación cromosómica (Figura 27).

Figura 27. Producción de ROS en cepas de *E. coli* isogénicas portadoras de mutaciones las cromosómicas $\Delta marR$ (parte A) o Ser83Leu en *gyrA* (parte B) y genes *qnr*. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) están indicadas con asterisco.



4.2.2. Efecto de los genes *qnr* sobre el *fitness* bacteriano

4.2.2.1. Ensayos individuales: curvas de crecimiento

Se realizaron curvas de crecimiento bajo condiciones no competitivas de las cepas isogénicas portadoras de un gen *qnr* y de las que sólo presentaban mecanismos cromosómicos de resistencia a quinolonas en medio LB y medio M9. A partir de estas curvas se obtuvo la tasa máxima de crecimiento y el tiempo de generación de las diferentes cepas.

Las cepas sin mecanismos plasmídicos se compararon con la cepa *E. coli* ATCC 25922 (Tablas 26 y 27), mientras que aquellas que presentaban un gen *qnr* se compararon con la cepa *E. coli* ATCC 25922 pBK-CMV para eliminar el posible efecto del vector sobre la tasa de crecimiento (Tablas 28 y 29).

Tabla 26. Parámetros de crecimiento *in vitro* de las cepas isogénicas de *E. coli* sin mecanismos plasmídicos en medio LB. DE: desviación estándar. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) están indicadas en negrita. Ver Tabla 13 (pág. 79).

Cepa	Tasa máxima de crecimiento (h^{-1})		Tiempo de generación (min)	
	Media (DE)	p	Media (DE)	p
ATCC 25922	1,10 (0,01)	-	16,38 (0,19)	-
EC01	0,87 (0,15)	0,116	21,31 (3,92)	0,160
EC02	1,10 (0,15)	0,991	16,60 (2,36)	0,886
EC03	0,91 (0,06)	0,026	19,97 (1,28)	0,038
EC04	1,06 (0,18)	0,722	17,40 (3,25)	0,642
EC05	0,83 (0,11)	0,052	21,90 (2,89)	0,080
EC06	0,88 (0,17)	0,152	21,09 (3,90)	0,171
EC07	0,85 (0,09)	0,035	21,40 (2,16)	0,056
EC08	0,88 (0,08)	0,035	20,54 (1,78)	0,055
EC09	0,92 (0,21)	0,265	20,32 (4,25)	0,249

En ambos medios, la cepa *E. coli* ATCC 25922 fue la que presentó un menor tiempo de generación (16,4 min en LB y 52,2 min en M9) con respecto a las cepas isogénicas que

sólo poseían mutaciones cromosómicas. En medio LB el tiempo de generación de estas cepas osciló entre 16,6 y 21,9 min, presentado el 44% de las cepas isogénicas (4/9) una tasa máxima de crecimiento significativamente inferior a la cepa *E. coli* ATCC 25922 (Tabla 26). En medio M9, el tiempo de generación de las cepas isogénicas sin mecanismos plasmídicos de resistencia osciló entre 52,9 y 59,5 min, siendo el 89% (8/9) de las diferencias en la tasa máxima de crecimiento significativas (Tabla 27).

Tabla 27. Parámetros de crecimiento *in vitro* de las cepas isogénicas de *E. coli* sin mecanismos plasmídicos en medio M9. DE: desviación estándar. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) están indicadas en negrita. Ver Tabla 13 (pág. 79).

Cepa	Tasa máxima de crecimiento (h^{-1})		Tiempo de generación (min)	
	Media (DE)	p	Media (DE)	p
ATCC 25922	0,35 (0,002)	-	52,23 (0,34)	-
EC01	0,32 (0,01)	<0,001	57,14 (0,99)	<0,001
EC02	0,34 (0,01)	0,008	53,86 (0,98)	0,008
EC03	0,33 (0,02)	0,041	55,45 (2,99)	0,046
EC04	0,33 (0,01)	0,006	54,74 (1,43)	0,007
EC05	0,34 (0,003)	0,021	52,85 (0,43)	0,021
EC06	0,32 (0,02)	0,027	56,69 (3,61)	0,029
EC07	0,34 (0,01)	0,103	52,96 (0,88)	0,103
EC08	0,30 (0,02)	0,002	59,53 (3,60)	0,004
EC09	0,33 (0,01)	0,010	55,05 (1,80)	0,011

La cepa *E. coli* ATCC 25922 pBK-CMV presentó en medio LB una tasa máxima de crecimiento significativamente menor a la de la cepa *E. coli* ATCC 25922 (Tabla 28). En medio M9 la tasa máxima de crecimiento de la cepa con el vector pBK-CMV fue menor que la de la cepa *E. coli* ATCC 25922, pero la diferencia no fue estadísticamente significativa (Tabla 29).

En medio LB (Tabla 28), las cepas EC45, EC47, EC52 y EC53 fueron las que presentaron una mayor tasa de crecimiento entre las cepas con un gen *qnr*, presentando un tiempo de generación similar a la cepa control. En este medio el 36% de las cepas (18/50)

mostraron una tasa de crecimiento significativamente inferior que la cepa *E. coli* ATCC 25922 pBK-CMV.

Tabla 28. Parámetros de crecimiento *in vitro* de las cepas isogénicas de *E. coli* portadoras de un gen *qnr* en medio LB. DE: desviación estándar. La cepa ATCC 25922 pBK-CMV se comparó con *E. coli* ATCC 25922; las cepas portadoras de mecanismos plasmídicos de resistencia (EC10 – EC59) se compararon con la cepa ATCC 25922 pBK-CMV. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) están indicadas en negrita. Ver Tabla 15 (págs. 80 y 81).

Cepa	Tasa máxima de crecimiento (h^{-1})		Tiempo de generación (min)	
	Media (DE)	p	Media (DE)	p
ATCC 25922	1,10 (0,01)	-	16,38 (0,19)	-
ATCC 25922 pBK-CMV	0,99 (0,03)	0,014	18,30 (0,58)	0,020
EC10	0,79 (0,06)	0,018	22,85 (1,84)	0,041
EC11	0,89 (0,09)	0,178	20,52 (1,97)	0,184
EC12	0,82 (0,22)	0,326	22,95 (5,38)	0,273
EC13	0,77 (0,05)	0,004	23,53 (1,40)	0,013
EC14	0,69 (0,06)	0,005	26,27 (2,40)	0,024
EC15	0,81 (0,17)	0,205	23,07 (4,58)	0,211
EC16	0,67 (0,23)	0,139	29,31 (10,76)	0,218
EC17	0,79 (0,04)	0,003	22,86 (1,12)	0,008
EC18	0,95 (0,15)	0,729	19,27 (3,15)	0,648
EC19	0,75 (0,05)	0,004	24,14 (1,60)	0,016
EC20	0,65 (0,05)	0,002	27,87 (2,18)	0,012
EC21	0,89 (0,12)	0,280	20,62 (2,74)	0,278
EC22	0,80 (0,05)	0,008	22,56 (1,34)	0,019
EC23	0,57 (0,12)	0,023	32,32 (6,22)	0,059
EC24	0,93 (0,12)	0,472	19,72 (2,50)	0,429
EC25	0,73 (0,06)	0,008	25,03 (2,06)	0,023
EC26	0,96 (0,21)	0,825	19,52 (4,55)	0,689
EC27	0,55 (0,06)	0,002	32,90 (4,08)	0,023
EC28	0,77 (0,17)	0,149	24,40 (5,36)	0,186
EC29	0,64 (0,05)	0,001	28,56 (2,29)	0,012

Cepa	Tasa máxima de crecimiento (h ⁻¹)		Tiempo de generación (min)	
	Media (DE)	p	Media (DE)	p
EC30	0,71 (0,14)	0,066	25,95 (5,27)	0,127
EC31	0,63 (0,15)	0,046	29,90 (6,58)	0,091
EC32	0,71 (0,27)	0,216	27,74 (8,75)	0,202
EC33	0,91 (0,15)	0,450	20,31 (3,56)	0,433
EC34	0,83 (0,33)	0,490	24,24 (9,19)	0,379
EC35	0,75 (0,03)	0,001	24,11 (1,07)	0,003
EC36	0,91 (0,13)	0,429	20,03 (3,05)	0,430
EC37	0,97 (0,20)	0,865	19,20 (3,55)	0,704
EC38	0,68 (0,03)	<0,001	26,48 (1,21)	0,002
EC39	0,95 (0,08)	0,476	19,17 (1,54)	0,439
EC40	0,79 (0,04)	0,003	22,86 (1,08)	0,007
EC41	0,73 (0,15)	0,087	25,39 (4,66)	0,117
EC42	0,90 (0,05)	0,060	20,11 (1,04)	0,075
EC43	0,80 (0,11)	0,079	22,89 (3,08)	0,118
EC44	0,88 (0,21)	0,483	21,13 (4,42)	0,383
EC45	1,05 (0,13)	0,504	17,42 (2,04)	0,537
EC46	0,68 (0,07)	0,008	26,95 (3,03)	0,035
EC47	1,04 (0,11)	0,514	17,52 (1,76)	0,528
EC48	0,80 (0,28)	0,374	24,22 (7,15)	0,288
EC49	0,82 (0,20)	0,288	22,84 (5,43)	0,283
EC50	0,85 (0,13)	0,216	21,58 (3,30)	0,224
EC51	0,87 (0,18)	0,376	21,34 (4,04)	0,321
EC52	1,04 (0,19)	0,657	17,68 (3,19)	0,771
EC53	1,04 (0,29)	0,799	18,28 (4,62)	0,995
EC54	0,91 (0,14)	0,420	20,27 (3,40)	0,422
EC55	0,91 (0,07)	0,198	19,94 (1,66)	0,224
EC56	0,98 (0,15)	0,978	18,66 (3,13)	0,861
EC57	0,77 (0,10)	0,047	23,87 (3,24)	0,093
EC58	0,92 (0,19)	0,619	20,15 (4,41)	0,543
EC59	0,91 (0,14)	0,425	20,27 (2,96)	0,368

Tabla 29. Parámetros de crecimiento *in vitro* de las cepas isogénicas de *E. coli* portadoras de un gen *qnr* en medio M9. DE: desviación estándar. La cepa ATCC 25922 pBK-CMV se comparó con *E. coli* ATCC 25922; las cepas portadoras de mecanismos plasmídicos de resistencia (EC10 – EC59) se compararon con la cepa ATCC 25922 pBK-CMV. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) están indicadas en negrita. Ver Tabla 15 (págs. 80 y 81).

Cepa	Tasa máxima de crecimiento (h^{-1})		Tiempo de generación (min)	
	Media (DE)	p	Media (DE)	p
ATCC 25922	0,35 (0,002)	-	52,23 (0,34)	-
ATCC 25922 pBK-CMV	0,34 (0,005)	0,075	52,94 (0,75)	0,073
EC10	0,33 (0,02)	0,277	54,42 (2,90)	0,276
EC11	0,29 (0,01)	<0,001	62,59 (2,08)	<0,001
EC12	0,29 (0,01)	<0,001	62,19 (2,97)	<0,001
EC13	0,32 (0,02)	0,029	56,54 (3,13)	0,036
EC14	0,32 (0,01)	0,005	55,82 (1,72)	0,007
EC15	0,29 (0,01)	<0,001	61,36 (2,14)	<0,001
EC16	0,32 (0,02)	0,062	56,35 (3,44)	0,059
EC17	0,32 (0,02)	0,026	56,60 (2,92)	0,027
EC18	0,32 (0,01)	0,022	55,90 (2,29)	0,024
EC19	0,32 (0,02)	0,017	56,60 (2,74)	0,021
EC20	0,32 (0,01)	<0,001	56,14 (1,19)	<0,001
EC21	0,32 (0,02)	0,025	57,02 (3,19)	0,025
EC22	0,33 (0,01)	0,035	54,49 (1,28)	0,034
EC23	0,33 (0,01)	0,003	55,34 (1,22)	0,003
EC24	0,33 (0,01)	0,112	54,32 (1,66)	0,107
EC25	0,32 (0,01)	0,017	56,05 (2,23)	0,017
EC26	0,33 (0,01)	0,036	55,39 (2,15)	0,038
EC27	0,31 (0,02)	0,003	59,35 (3,23)	0,004
EC28	0,33 (0,01)	0,023	55,00 (1,62)	0,026
EC29	0,32 (0,01)	0,009	57,07 (2,55)	0,009
EC30	0,33 (0,01)	0,005	54,84 (1,02)	0,005
EC31	0,29 (0,02)	0,003	61,75 (4,36)	0,004
EC32	0,32 (0,01)	0,001	55,91 (1,25)	0,001

Cepa	Tasa máxima de crecimiento (h ⁻¹)		Tiempo de generación (min)	
	Media (DE)	p	Media (DE)	p
EC33	0,31 (0,02)	0,004	58,88 (3,03)	0,004
EC34	0,34 (0,01)	0,242	53,75 (1,32)	0,230
EC35	0,25 (0,02)	<0,001	71,59 (4,65)	<0,001
EC36	0,27(0,01)	<0,001	67,90 (3,06)	<0,001
EC37	0,30 (0,01)	<0,001	61,26 (2,67)	<0,001
EC38	0,28 (0,01)	<0,001	64,22 (3,17)	<0,001
EC39	0,31 (0,005)	<0,001	58,58 (0,85)	<0,001
EC40	0,25 (0,05)	0,005	73,99 (10,88)	0,005
EC41	0,28 (0,02)	<0,001	64,34 (3,57)	<0,001
EC42	0,24 (0,02)	<0,001	74,30 (5,29)	<0,001
EC43	0,26 (0,01)	<0,001	70,27 (3,26)	<0,001
EC44	0,26 (0,01)	<0,001	70,84 (1,52)	<0,001
EC45	0,25 (0,02)	<0,001	73,39 (5,59)	<0,001
EC46	0,27 (0,01)	<0,001	66,67 (3,50)	<0,001
EC47	0,25 (0,02)	<0,001	73,23 (4,40)	<0,001
EC48	0,29 (0,03)	0,016	62,25 (7,19)	0,025
EC49	0,31 (0,02)	0,011	58,87 (4,01)	0,016
EC50	0,27 (0,02)	<0,001	66,90 (5,41)	0,001
EC51	0,28 (0,01)	<0,001	64,90 (3,33)	<0,001
EC52	0,31 (0,02)	0,012	58,80 (4,04)	0,016
EC53	0,27 (0,02)	<0,001	68,31 (4,93)	0,001
EC54	0,28 (0,01)	<0,001	64,09 (3,09)	<0,001
EC55	0,34 (0,01)	0,753	52,78 (1,06)	0,765
EC56	0,33 (0,01)	0,018	54,39 (0,98)	0,018
EC57	0,32 (0,01)	0,001	56,52 (1,52)	0,001
EC58	0,34 (0,003)	0,226	53,41 (0,45)	0,225
EC59	0,33 (0,003)	0,002	54,65 (0,46)	0,001

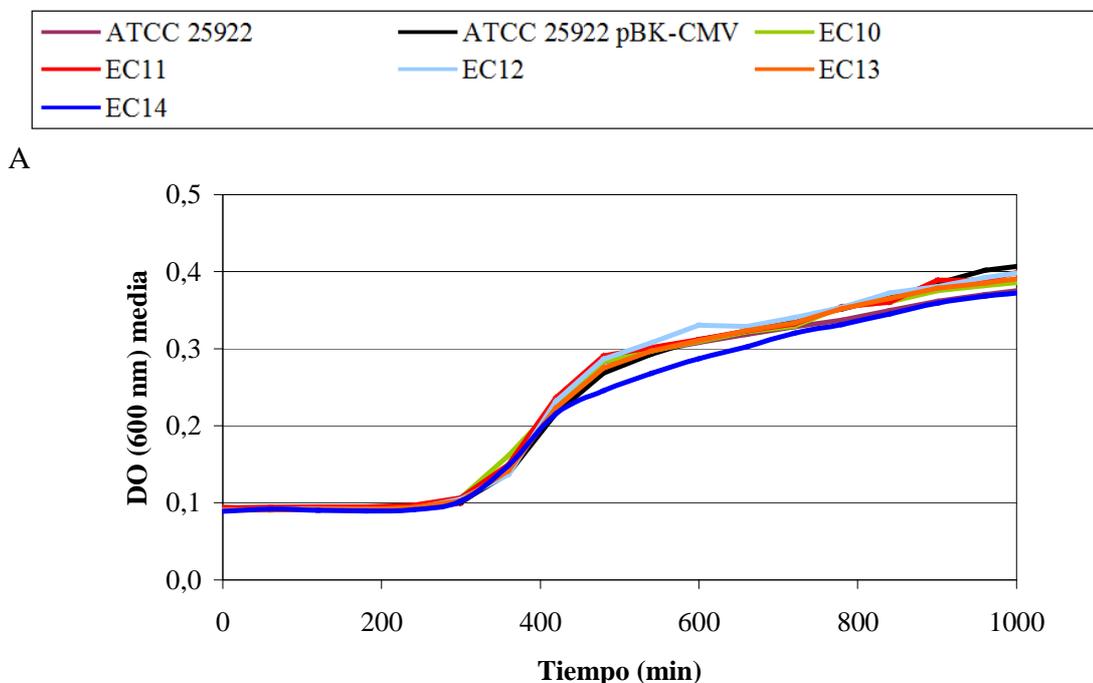
En medio M9 (Tabla 29), la cepa EC55 fue la única que presentó un tiempo de generación inferior a la cepa *E. coli* ATCC 25922 pBK-CMV. En este medio la mayoría de

las diferencias observadas en la tasa máxima de crecimiento en comparación con la cepa control fueron estadísticamente significativas (90%; 45/50).

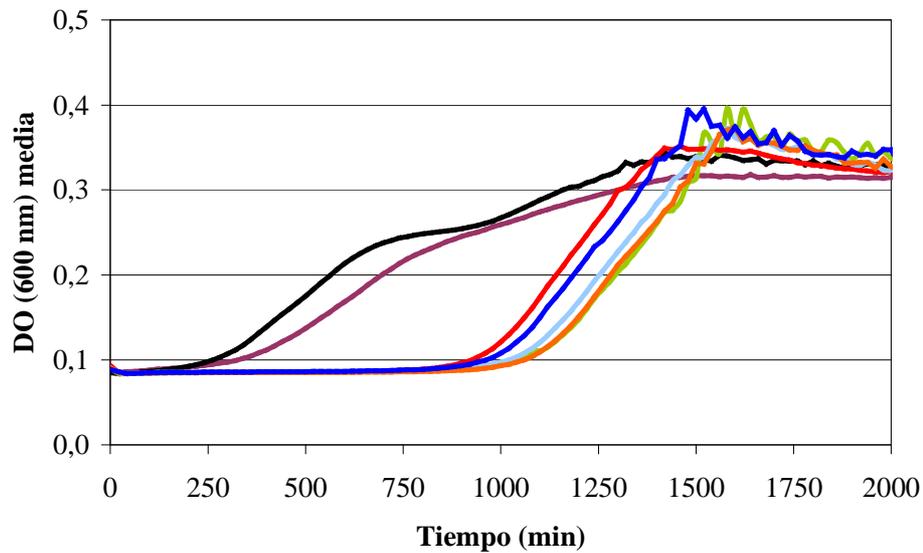
A pesar de las diferencias en las tasas máxima de crecimiento y los tiempos de generación, los patrones de las curvas de crecimiento de las diferentes cepas isogénicas portadoras de un gen *qnr* fueron similares en medio LB a los patrones de las cepas *E. coli* ATCC 25922 y *E. coli* ATCC 25922 pBK-CMV (Figura 28A).

En medio M9, las cepas isogénicas portadoras de un gen *qnr* presentaron un retraso en el inicio de la fase exponencial con respecto a las cepas *E. coli* ATCC 25922 y *E. coli* ATCC 25922 pBK-CMV (Figura 28B). El retraso ocasionado por los genes *qnr* desapareció cuando se estudió el crecimiento de estas cepas en presencia de una concentración de ciprofloxacino equivalente a la mitad de la CMI de esta quinolona para cada cepa analizada (Figura 28C), lo que refleja la ventaja selectiva que poseen estos genes en presencia de bajas concentraciones de ciprofloxacino.

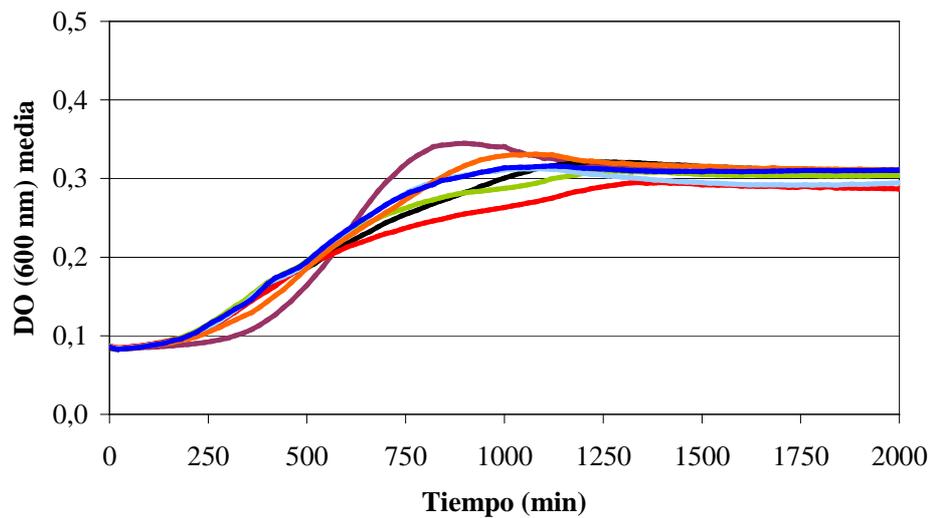
Figura 28. Curvas de crecimiento de *E. coli* ATCC 25922 y las cepas isogénicas portadoras de un gen *qnr* en medio LB (parte A), medio M9 (parte B) y medio M9 con una concentración de ciprofloxacino equivalente a la mitad de la CMI (parte C). Ver Tabla 15 (págs. 81 y 80).



B



C



4.2.2.2. Ensayos de competición

Se estudió el *fitness* relativo a la cepa *E. coli* ATCC 25922 de las cepas isogénicas portadoras de mecanismos cromosómicos de resistencia a quinolonas y/o genes *qnr* mediante el sistema $\Delta lacZ$ comentado anteriormente (Figura 29).

Ninguna de las cuatro mutaciones cromosómicas analizadas, ni las combinaciones de éstas, mostraron una reducción significativa del *fitness*. La combinación Ser83Leu en *gyrA* y Ser80Arg en *parC* produjo un incremento del *fitness* del 20% (cepa EC04) y el doble mutante

en *gyrA* (cepa EC06) del 14%. Las cepas EC01 ($\Delta marR$) y EC05 (Ser83Leu Ser80Arg $\Delta marR$) presentaron un *fitness* de 1,08 y 1,07, respectivamente (Tabla 30).

Figura 29. Ensayos de competición *in vitro*. Las colonias blancas corresponde a la cepa control (ATCC 25922 $\Delta lacZ$) y las azules a una de las cepas isogénicas de *E. coli* a evaluar.

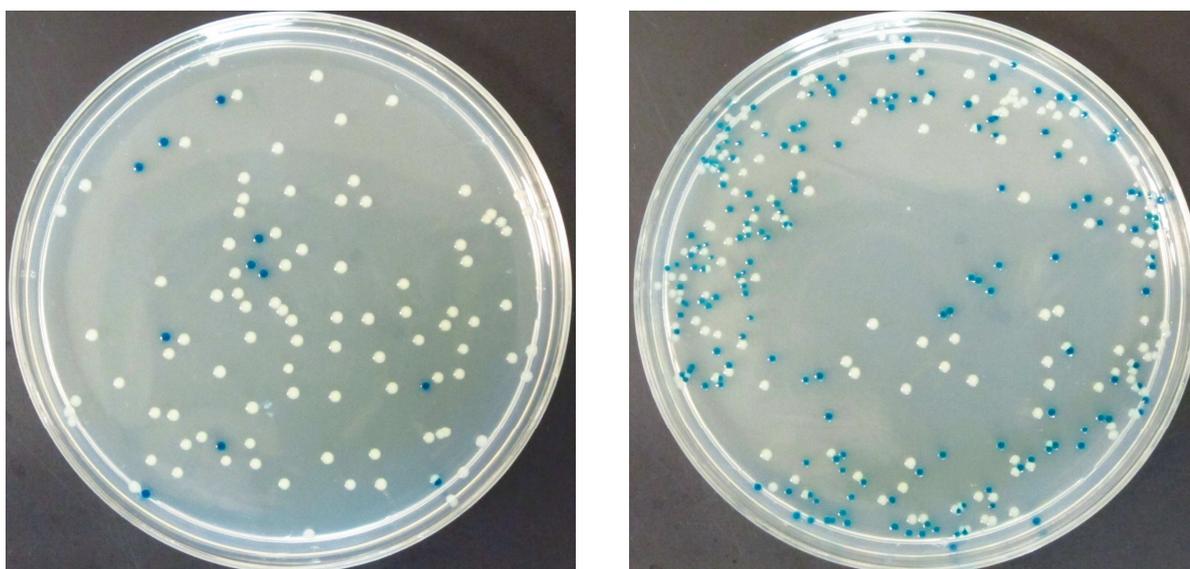


Tabla 30. *Fitness* relativo de las cepas isogénicas de *E. coli* sin mecanismos plasmídicos de resistencia. DE: desviación estándar. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) están indicadas en negrita. Ver Tabla 13 (pág. 79)

Cepa	<i>Fitness</i> medio (DE)	p	Nº de ensayos independientes
ATCC 25922	1,00 (0,08)	-	18
EC01	1,08 (0,06)	0,01	10
EC02	1,03 (0,02)	0,14	6
EC03	0,99 (0,11)	0,90	6
EC04	1,20 (0,05)	<0,001	10
EC05	1,07 (0,03)	0,005	10
EC06	1,14 (0,11)	0,006	10
EC07	1,04 (0,04)	0,15	10
EC08	1,04 (0,05)	0,20	6
EC09	1,02 (0,04)	0,53	6

Los genes *qnr*, en ausencia de mutaciones cromosómicas, no ocasionaron una reducción del *fitness* (Tabla 31); *qnrD1* y *qnrS1* ocasionaron un aumento del *fitness* del 9 y 14%, respectivamente. El efecto de estos genes sobre el *fitness* varió en función de las mutaciones cromosómicas presentes en la célula

Tabla 31. *Fitness* relativo de las cepas isogénicas de *E. coli* portadoras de un gen *qnr*. DE: desviación estándar. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) están indicadas en negrita. Ver Tabla 15 (págs. 80 y 81).

Cepa	<i>Fitness</i> medio (DE)	p	Nº de ensayos independientes
ATCC 25922	1,00 (0,08)	-	18
EC10	0,99 (0,01)	0,51	6
EC11	1,04 (0,02)	0,09	6
EC12	1,04 (0,03)	0,14	6
EC13	1,09 (0,04)	0,001	10
EC14	1,14 (0,09)	0,001	10
EC15	0,92 (0,05)	0,005	10
EC16	1,15 (0,04)	<0,001	10
EC17	1,11 (0,07)	0,004	10
EC18	1,08 (0,07)	0,03	10
EC19	1,13 (0,05)	<0,001	10
EC20	1,01 (0,02)	0,63	6
EC21	1,05 (0,04)	0,07	6
EC22	0,99 (0,11)	0,82	10
EC23	1,15 (0,07)	<0,001	10
EC24	1,21 (0,11)	<0,001	10
EC25	0,79 (0,04)	<0,001	10
EC26	0,98 (0,06)	0,54	6
EC27	0,96 (0,04)	0,16	6
EC28	1,03 (0,04)	0,32	6
EC29	0,99 (0,03)	0,56	6
EC30	0,96 (0,03)	0,15	6
EC31	0,88 (0,05)	<0,001	10

Cepa	<i>Fitness</i> medio (DE)	p	Nº de ensayos independientes
EC32	0,96 (0,08)	0,32	10
EC33	0,97 (0,03)	0,27	6
EC34	0,97 (0,02)	0,27	6
EC35	0,87 (0,08)	0,001	10
EC36	1,03 (0,02)	0,19	6
EC37	0,98 (0,01)	0,32	6
EC38	1,13 (0,04)	<0,001	10
EC39	1,06 (0,05)	0,06	6
EC40	0,84 (0,10)	<0,001	10
EC41	1,02 (0,13)	0,66	10
EC42	1,06 (0,02)	0,02	6
EC43	1,12 (0,04)	<0,001	10
EC44	1,04 (0,05)	0,17	10
EC45	0,93 (0,03)	0,01	6
EC46	1,03 (0,02)	0,23	6
EC47	1,06 (0,10)	0,18	10
EC48	1,01 (0,05)	0,64	10
EC49	1,16 (0,11)	0,003	10
EC50	0,85 (0,06)	<0,001	10
EC51	1,08 (0,07)	0,03	10
EC52	0,99 (0,02)	0,70	6
EC53	0,98 (0,07)	0,55	10
EC54	1,09 (0,09)	0,03	10
EC55	1,03 (0,14)	0,61	10
EC56	0,86 (0,06)	<0,001	10
EC57	1,01 (0,01)	0,72	6
EC58	0,99 (0,12)	0,88	10
EC59	0,87 (0,04)	<0,001	10

El gen *qnrA1* tuvo en general un coste biológico en combinación con la mayoría de las mutaciones cromosómicas analizadas, mientras que *qnrD1* y *qnrS1* produjeron un

incremento generalizado del *fitness*. *qnrB1* y *qnrC* tuvieron un efecto muy variable sobre el *fitness* según los mecanismos cromosómicos presentes en *E. coli* (Figura 30).

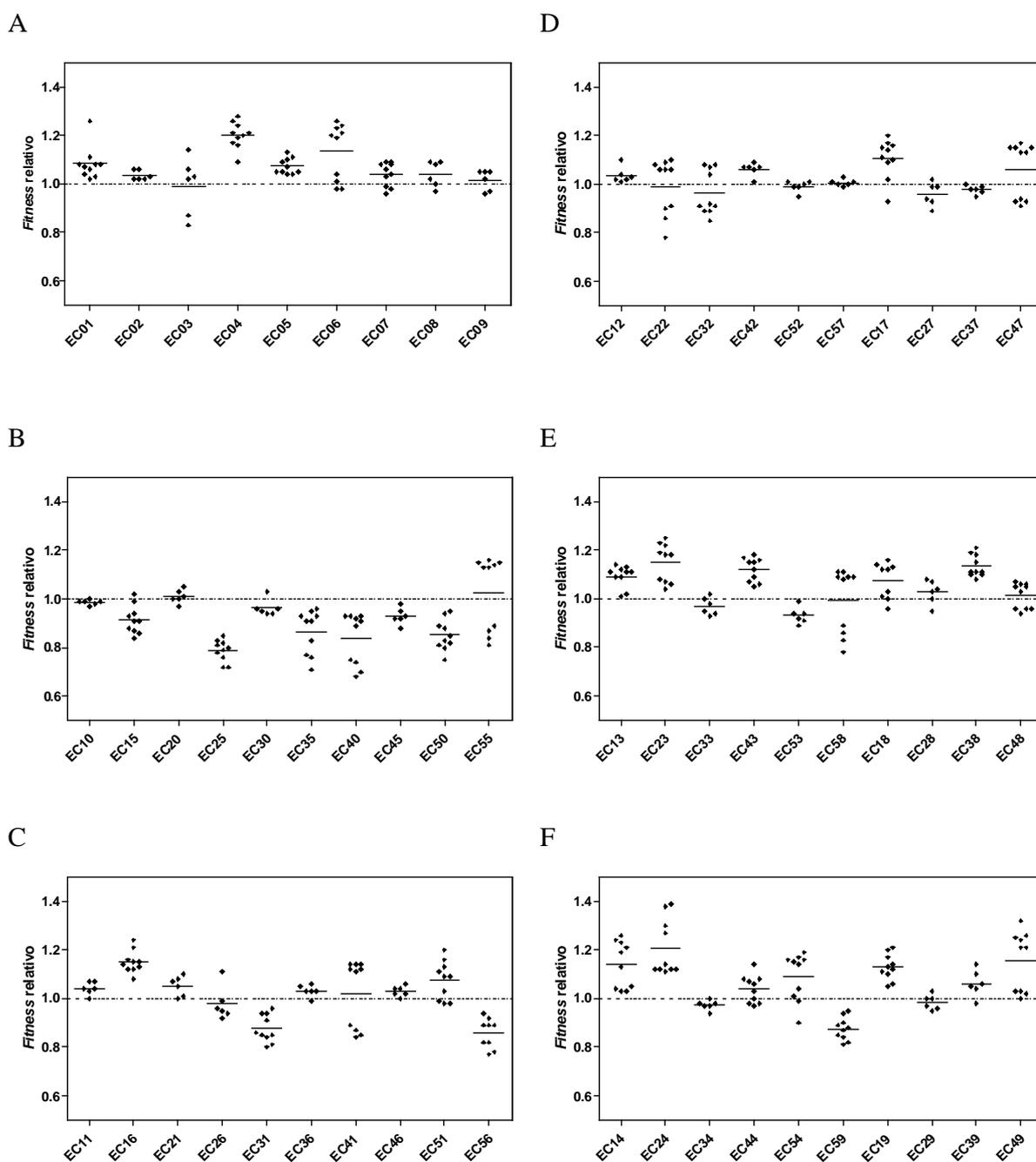
En el caso de *qnrA1* se observó una reducción significativa del *fitness* (del 7 al 21%) en presencia de las mutaciones cromosómicas $\Delta marR$ (EC15), Ser83Leu $\Delta marR$ (EC25), Ser83Leu Ser80Arg $\Delta marR$ (EC35), Ser83Leu Asp87Asn (EC40) y Ser83Leu Asp87Asn Ser80Arg (EC50).

El gen *qnrS1* ocasionó un aumento significativo del *fitness* (del 9 al 21%) en combinación con las mutaciones cromosómicas $\Delta marR$ (EC19), Ser83Leu (EC24), Ser83Leu Asp87Asn $\Delta marR$ (EC49) y Ser83Leu Asp87Asn Ser80Arg (EC54).

La adición de mecanismos de resistencia (cromosómicos o plasmídicos) produjo un incremento de la CMI de ciprofloxacino y el resto de quinolonas, pero el efecto sobre el *fitness* fue variable. Las cepas EC54 (Ser83Leu Asp87Asn Ser80Arg *qnrS1*) y EC55 (Ser83Leu Asp87Asn Ser80Arg $\Delta marR$ *qnrA1*) mostraron valores similares de CMI de ciprofloxacino que los encontrados en aislados clínicos resistentes (4 – 8 $\mu\text{g/ml}$), pero la primera produjo un incremento significativo del *fitness* respecto a la cepa *E. coli* ATCC 25922, mientras que la segunda no presentó una variación del *fitness* significativa (Figura 30B y 30F). Estos resultados indicarían que es posible la aparición de cepas con un elevado nivel de resistencia sin coste biológico asociado mediante la combinación de mecanismos cromosómicos y plasmídicos de resistencia.

Las cepas que poseen un mecanismo de resistencia presentaron valores de *fitness* relativo de 0,99 – 1,14; las cepas que presentaron dos mecanismos valores entre 0,92 y 1,21 (sólo una cepa presentó una reducción significativa del *fitness*). La presencia de tres y cuatro mecanismos de resistencia dieron valores de *fitness* de 0,79 – 1,12 y 0,85 – 1,16, respectivamente (Figura 31). Finalmente, las cepas con 5 mecanismos de resistencia presentaron valores de *fitness* entre 0,86 y 1,03. Por tanto, el *fitness* no se modifica de forma proporcional con el número de mecanismos de resistencia, sino que depende de la naturaleza del mecanismo de resistencia.

Figura 30. *Fitness* bacteriano en ensayos de competición *in vitro* para las cepas isogénicas de *E. coli* no portadoras de genes *qnr* (parte A), portadoras de *qnrA1* (parte B), *qnrB1* (parte C), *qnrC* (parte D), *qnrD1* (parte E) y *qnrS1* (parte F). Los puntos indican el *fitness* relativo de cada ensayo de competición. Las líneas continuas horizontales indican el valor medio del *fitness* de cada cepa. La línea discontinua horizontal indica el *fitness* de la cepa *E. coli* ATCC 25922.



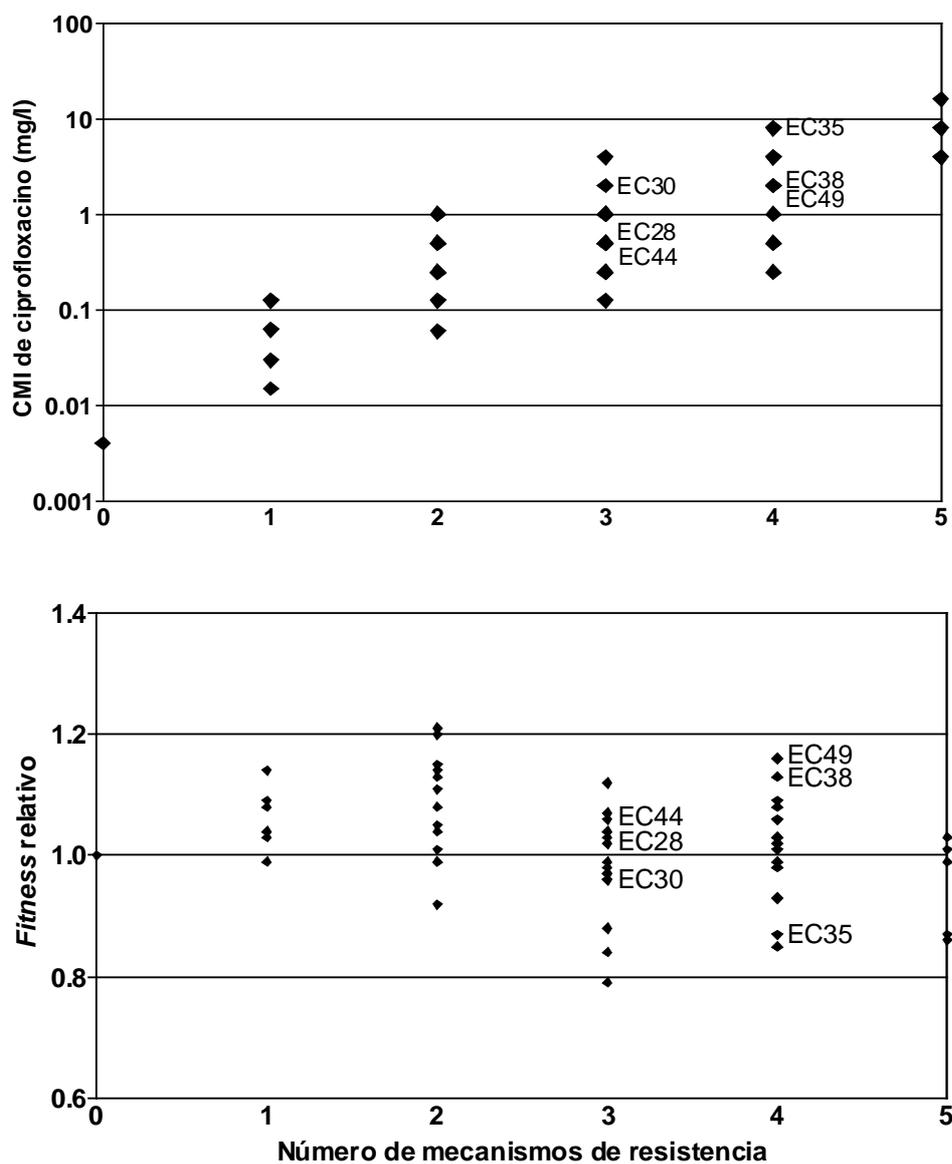
Existen combinaciones de mecanismos de resistencia que ocasionan a la vez un incremento de los niveles de CMI de fluoroquinolonas y un aumento del *fitness* (Figura 31 y Tabla 32). Las cepas EC28 y EC38 difieren genéticamente en la presencia de la mutación Ser80Arg en *parC* en la cepa EC38. Esta mutación adicional provocó un aumento de la CMI de ciprofloxacino de 0,5 a 2 µg/ml y un incremento del 10% *fitness* bacteriano. Algo similar sucedió con las cepas EC44 y EC49, las cuales difieren sólo en la presencia de la delección de *marR* en EC49. En el lado opuesto se encontraron las cepas EC30 y EC35, cepas que se diferencian sólo en la presencia de la delección del gen *marR* en la cepa EC35, lo que ocasionó un incremento de la CMI de ciprofloxacino de 2 a 8 µg/ml a costa de una reducción del 9% del *fitness* bacteriano. En los tres casos la variación del *fitness* fue estadísticamente significativa.

Tabla 32. Selección de mutaciones simples que reducen la sensibilidad a quinolonas y modifican el *fitness* bacteriano. CMI CIP: CMI de ciprofloxacino (µg/ml). DE: desviación estándar. p: diferencias estadísticas de *fitness* de las cepas incluidas en cada par. Las diferencias significativas ($p < 0,05$) aparecen en negrita.

Cepa	<i>gyrA1</i>	<i>gyrA2</i>	<i>parC</i>	<i>marR</i>	<i>qnr</i>	CMI CIP	<i>Fitness</i> medio (DE)	p
EC28	S83L	-	-	Δ	pBK- <i>qnrD1</i>	0,5	1,03 (0,04)	0,002
EC38	S83L	-	S80R	Δ	pBK- <i>qnrD1</i>	2	1,13 (0,04)	-
EC30	S83L	-	S80R	-	pBK- <i>qnrA1</i>	2	0,96 (0,03)	0,01
EC35	S83L	-	S80R	Δ	pBK- <i>qnrA1</i>	8	0,87 (0,08)	-
EC44	S83L	D87N	-	-	pBK- <i>qnrS1</i>	0,5	1,04 (0,05)	0,016
EC49	S83L	D87N	-	Δ	pBK- <i>qnrS1</i>	2	1,16 (0,11)	-

Estos resultados indican que la adición de un mecanismo de resistencia, sobre cepas que ya presentan algunos mecanismos, puede incrementar la CMI de ciprofloxacino hasta niveles que rebasan los puntos de corte de sensibilidad del CLSI a la vez que ocasionan una variación del *fitness* en torno al 10%.

Figura 31. CMI de ciprofloxacino y *fitness* relativo de *E. coli* ATCC 25922 y las cepas isogénicas en función del número de mecanismos de resistencia (mutaciones cromosómicas y mecanismos plasmídicos). Cada diamante representa una cepa isogénica (en algunos casos, más de un símbolo ocupan el mismo espacio). Aparecen indicadas cepas con especial interés (ver Tabla 32).

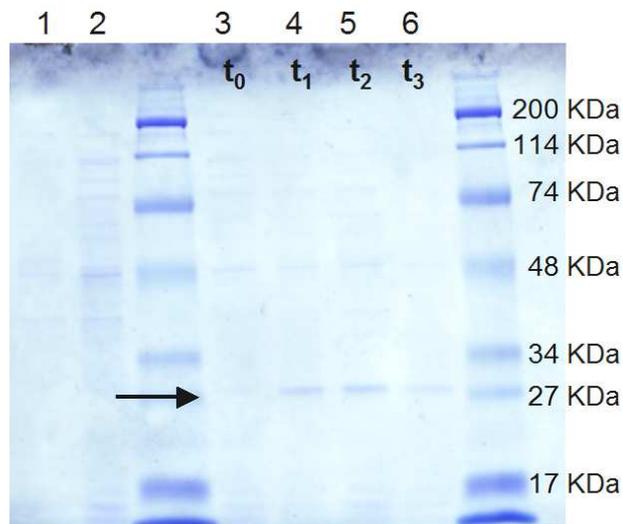


4.2.3. Efecto citotóxico de los genes *qnr* sobre las células bacterianas

Para estudiar el posible efecto citotóxico de los genes *qnr*, estos genes se clonaron sin su promotor natural en el vector pET29a bajo el control del promotor del operón *lac*. La expresión de este operón es inducible por IPTG. Estas construcciones se clonaron en la cepa *E. coli* BL21, cepa deficiente en proteasas, lo que permitió la hiperproducción de las proteínas Qnr.

Para conocer el tiempo óptimo de inducción con IPTG (0,2 mM), se procedió a inducir los cultivos bacterianos de las cepas BL21 portadoras de los diferentes genes *qnr* y recoger muestras cada hora. Los extractos crudos de estas muestras se corrieron en geles de acrilamida, determinándose que el tiempo óptimo de inducción de las diferentes proteínas era 2 horas (Figura 32).

Figura 32. Gel representativo de proteínas con extracto crudo de cultivo de las cepas *E. coli* BL21 (1), *E. coli* BL21 pET29a (2) y *E. coli* BL21 pET29a-*qnrB1*(3 – 6). Los cultivos se indujeron a diferentes tiempos: t_0 sin inducir, $t_1 - t_3$ alícuotas recogidas entre las horas 1 y 3 de inducción. De las dos primeras cepas se cargó la muestra recogida a las 3 horas. La flecha señala la altura de la proteína inducida (QnrB1 \approx 25 KDa).



4.2.3.1. Ensayos de viabilidad celular

Se utilizó como control negativo de los ensayos de viabilidad celular la cepa *E. coli* BL21 pET29a para descartar el efecto citotóxico del vector. Se utilizó como control positivo la cepa BL21 con el gen de la proteína EfsQnr clonado en el vector pET29a. La sobreexpresión de esta proteína ocasiona una pérdida de viabilidad en torno al 98% en *E. coli* BL21⁷⁶. La hiperproducción de las proteínas Qnr ocasionó una pérdida de viabilidad del 77 – 97% (Tabla 33), siendo QnrS1 la proteína con mayor efecto citotóxico. EfsQnr provocó una pérdida de viabilidad celular superior al 97%.

Tabla 33. Pérdida de viabilidad celular de las cepas isogénicas de *E. coli* BL21 portadoras de genes *qnr* tras inducción del cultivo con IPTG 0,2 mM durante 2 horas.

Cepa	Pérdida viabilidad celular
BL21 pET29a	0%
BL21 pET29a-EfsQnr	97,4%
BL21 pET29a-QnrA1	86,7%
BL21 pET29a-QnrB1	77%
BL21 pET29a-QnrC	93%
BL21 pET29a-QnrD1	95%
BL21 pET29a-QnrS1	97%

4.2.3.2. Estudio por microscopía electrónica de transmisión

Las imágenes de microscopía electrónica tomadas a los cultivos inducidos con IPTG 0,2 mM de la cepa *E. coli* BL21, con y sin el vector pET29a, no mostraron daños celulares en estas cepas, salvo en una pequeña proporción de la población bacteriana (2 – 3%). Además, no se observó filamentación (Figura 33).

En el caso de *E. coli* BL21 pET29a-EfsQnr, la hiperproducción de la proteína EfsQnr ocasionó un gran daño celular. En las imágenes obtenidas por microscopía (Figura 34A y

34D) se observó que la pared celular y la membrana externa de las bacterias estaba intacta, pero en el 44% de la población se observaron cambios morfológicos. Estos cambios consisten en la retracción del contenido citosólico, apareciendo zonas electron-claras, las cuales indican ausencia de contenido intracelular. Además, se produjo filamentación celular, apareciendo células que presentaban entre 5 y 6 veces la longitud de las células de *E. coli* BL21 y *E. coli* BL21 pET29a (9 – 11 μm de longitud en el caso de *E. coli* BL21 pET29a-EfsQnr frente a los 2 μm de las cepas control).

Figura 33. Microscopía electrónica de transmisión de *E. coli* BL21 (A y B) y *E. coli* BL21 pET29a (C y D) tras dos horas de inducción con IPTG 0,2 mM.

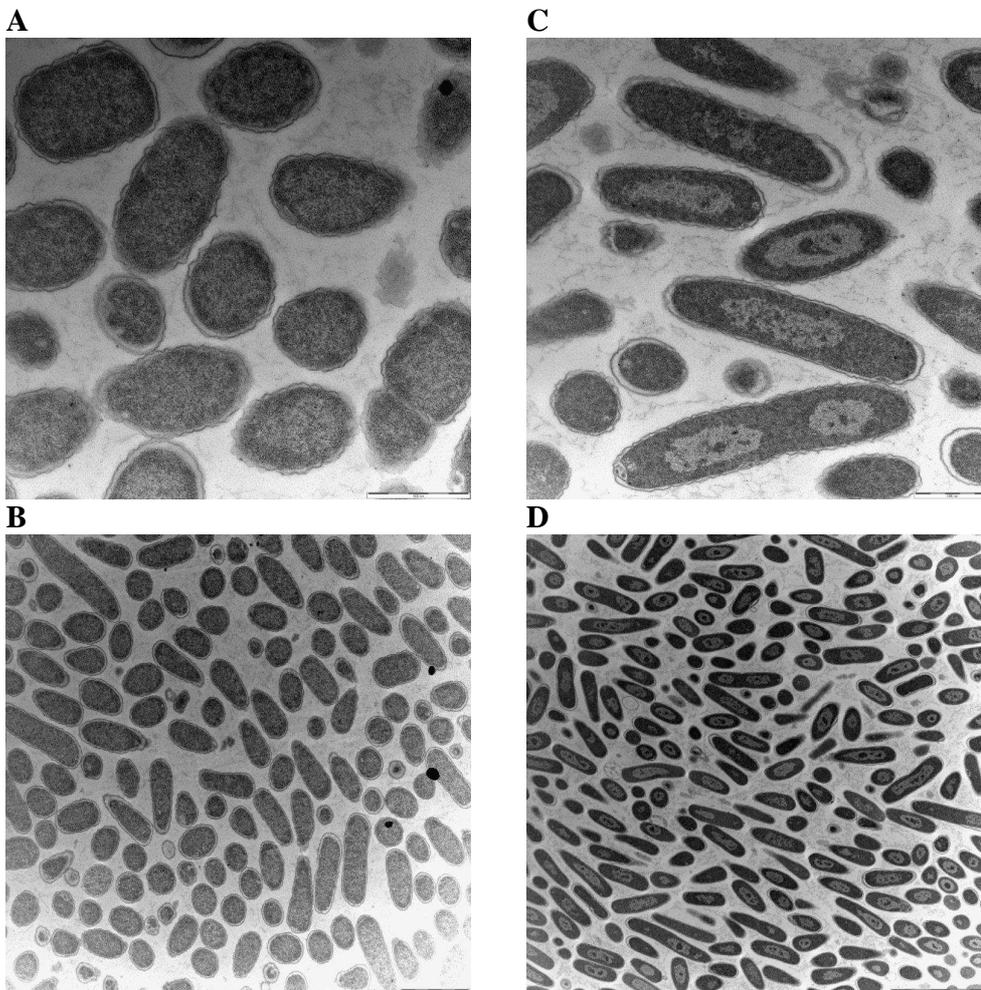


Figura 34. Microscopía electrónica de transmisión de *E. coli* BL21 pET29a-EfsQnr (A y D), *E. coli* BL21 pET29a-QnrA1 (B y E) y *E. coli* BL21 pET29a-QnrB1 (C y F) tras dos horas de inducción con IPTG 0,2 mM. Las flechas indican las zonas de retracción citoplasmática.

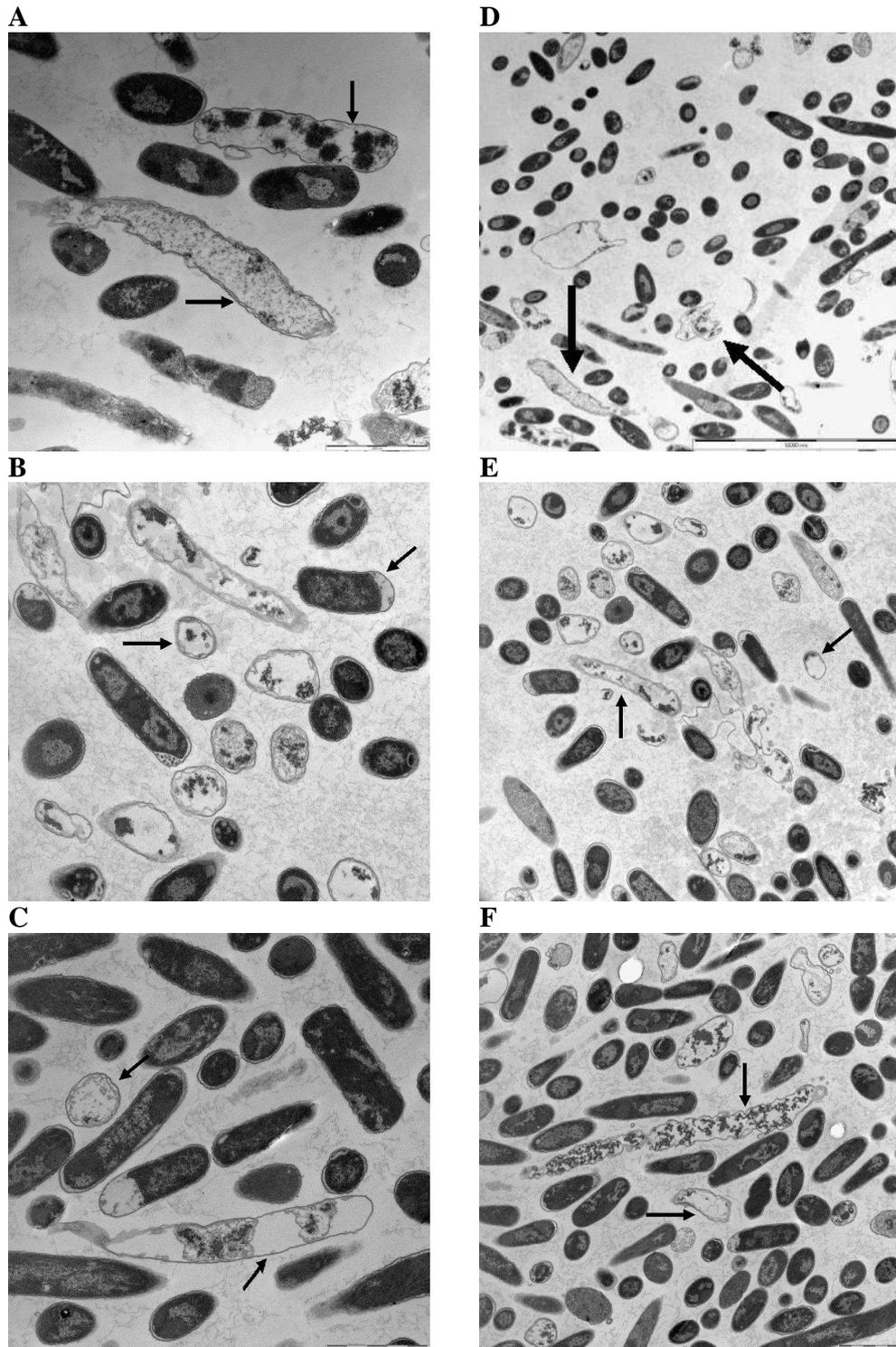
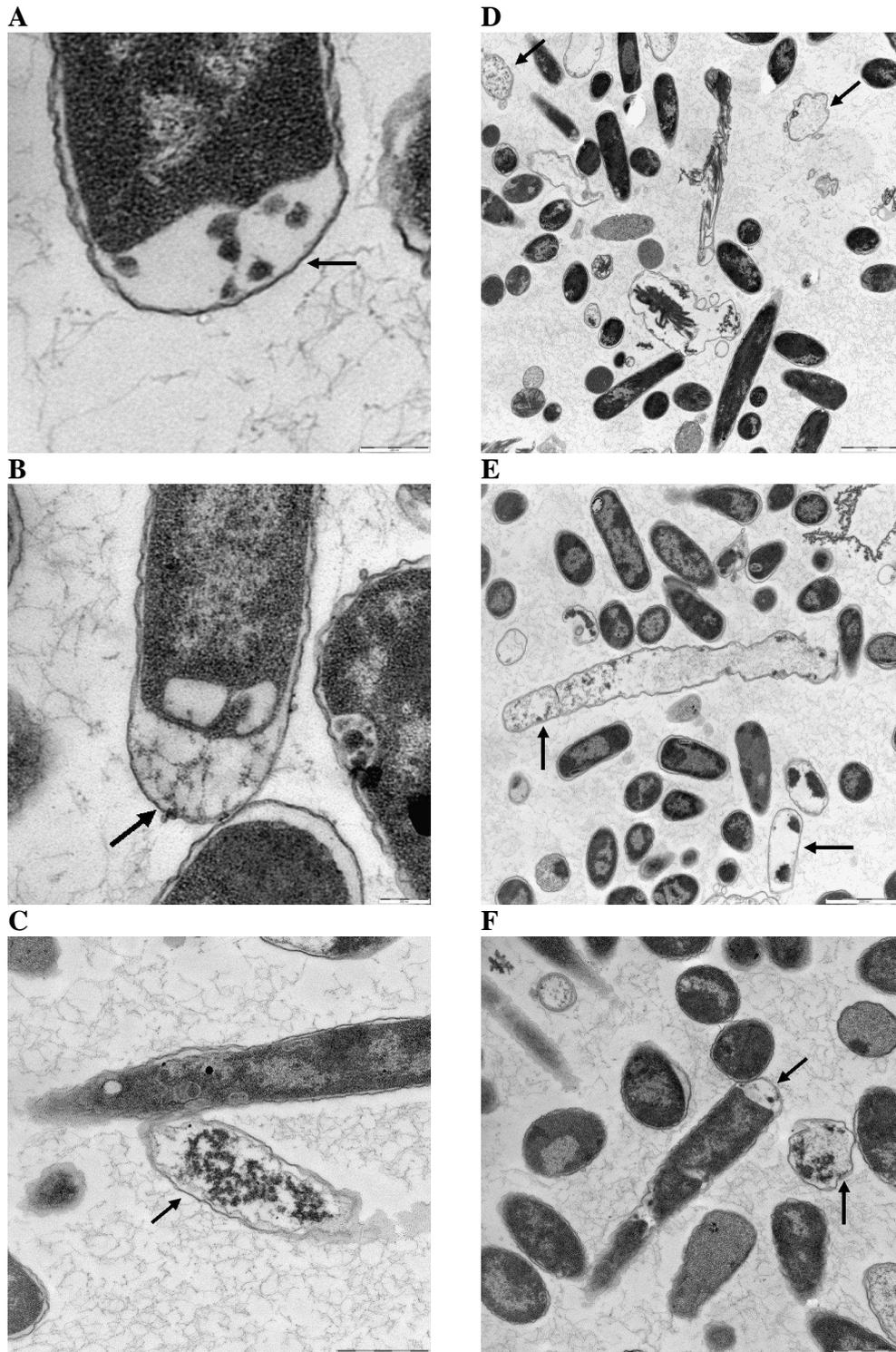


Figura 35. Microscopía electrónica de transmisión de *E. coli* BL21 pET29a-QnrC (A y D), *E. coli* BL21 pET29a-QnrD1 (B y E) y *E. coli* BL21 pET29a-QnrS1 (C y F) tras dos horas de inducción con IPTG 0,2 mM. Las flechas indican las zonas de retracción citoplasmática.



El efecto citotóxico provocado por la hipreproducción de las proteínas Qnr fue similar al producido por EfsQnr, observándose cambios morfológicos en el 30 – 40% de la población, así como un grado algo inferior de filamentación (7 – 9 μm de longitud). En las Figuras 34 y 35 aparece el efecto ocasionado por los genes *qnr*. Las células mantuvieron su capacidad de división, pero las células hijas parecieron perder parte de su contenido celular, sobre todo en los septos de división, y quedar conectadas a través de los extremos. El interior celular no presentó granulos ni acumulaciones de material fibroso inusuales. Estos cambios morfológicos se correlacionaron con la pérdida de viabilidad anteriormente descrita.

4.3. Efecto del gen *qepA2* sobre la sensibilidad a quinolonas, *fitness* bacteriano y toxicidad celular

4.3.1. Efecto del gen *qepA2* sobre la actividad de quinolonas

Al igual que en el caso de los genes *qnr*, se estudió la actividad de diferentes quinolonas frente a cepas portadoras del gen *qepA2* en combinación con diversas mutaciones cromosómicas.

4.3.1.1. Efectos sobre la CMI y la CMB

Se determinó la CMI de ácido nalidíxico y las cinco fluoroquinolonas evaluadas anteriormente, así como de cloranfenicol, de las 10 cepas isogénicas portadoras del gen *qepA2*. A su vez, se calculó la CMB de ciprofloxacino de dichas cepas (Tabla 34).

La presencia de *qepA2* incrementó la CMI de ciprofloxacino entre 4 y 8 veces, independientemente de las mutaciones cromosómicas presentes en *E. coli* (Tablas 18 y 34), algo similar a lo ocurrido con el norfloxacino. En el caso del levofloxacino, moxifloxacino y ofloxacino el aumento fue de dos veces como máximo. El efecto sobre la CMI de ácido nalidíxico fue similar al de los genes *qnr*.

Los valores de CMB de ciprofloxacino de las diez cepas isogénicas estudiadas fueron iguales a los de CMI o difirieron en una dilución.

Tabla 34. CMI ($\mu\text{g/ml}$) y CMB ($\mu\text{g/ml}$) de ácido nalidíxico (NA), ciprofloxacino (CIP), levofloxacino (LVX), moxifloxacino (MXF), norfloxacino (NFX), ofloxacino (OFX) y cloranfenicol (CLR) de las cepas isogénicas de *E. coli* portadoras del gen *qepA2*. Ver Tabla 17 (pág. 82).

Cepa	CMI							CMB CIP
	NA	CIP	LVX	MXF	NFX	OFX	CLR	
ATCC 25922	1	0,004	0,008	0,004	0,03	0,06	2	0,004
ATCC 25922 pBK-CMV	1	0,004	0,008	0,004	0,03	0,06	2	0,004
EC60	2	0,016	0,016	0,008	0,25	0,06	2	0,016
EC61	4	0,06	0,03	0,03	0,5	0,06	8	0,06
EC62	>256	0,25	0,25	0,125	2	0,5	2	0,25
EC63	>256	0,5	0,5	0,25	4	0,5	8	0,5
EC64	>256	1	0,5	0,25	8	1	2	1
EC65	>256	2	1	0,5	16	2	8	2
EC66	>256	0,25	0,25	0,125	2	0,5	2	0,5
EC67	>256	0,5	0,5	0,25	4	0,5	8	0,5
EC68	>256	4	2	2	16	4	2	4
EC69	>256	16	4	4	32	8	8	32

4.3.1.2. Discrepancias entre CLSI y EUCAST

La presencia del gen *qepA2* en ausencia de mutaciones cromosómicas de resistencia a quinolonas no ocasionó discrepancias en las categorías clínicas establecidas por el CLSI y EUCAST para las fluoroquinolonas evaluadas (Tabla 35).

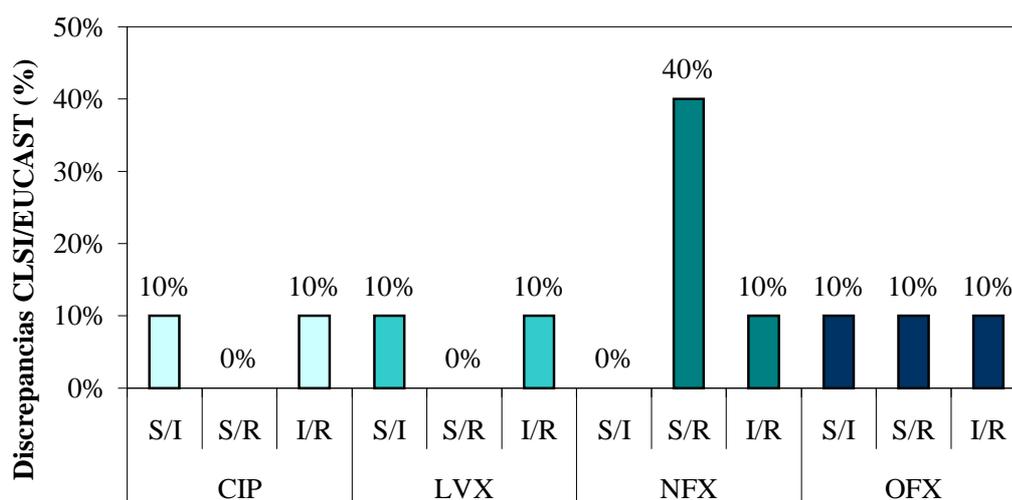
Tampoco se produjeron discrepancias cuando este mecanismo plasmídico se combinó con la delección del gen *marR*, existiendo discrepancias en el resto de las cepas (Tabla 35).

Se observó una tasa de discrepancia del 20%, 20%, 50% y 30% para ciprofloxacino, levofloxacino, norfloxacino y ofloxacino, respectivamente. En el caso de norfloxacino, el antimicrobiano con mayores discrepancias, el 40% de las determinaciones de este antimicrobiano fueron catalogadas como resistente por el EUCAST y sensible por CLSI (Figura 36).

Tabla 35. Comparación de los valores de CMI ($\mu\text{g/ml}$) obtenidos para las cepas isogénicas de *E. coli* portadoras del gen *qepA2* en relación a las categorías clínicas determinadas por el CLSI y el EUCAST. Marcados en negrita los valores de CMI clasificados en distintas categorías clínicas por ambos comités. S, sensible; I, intermedio; R, resistente. Ver Tabla 17 (pág. 82).

Cepa	CMI / CLSI / EUCAST			
	CIP	LVX	NFX	OFX
ATCC 25922	0,004/S/S	0,008/S/S	0,03/S/S	0,06/S/S
EC60	0,016/S/S	0,016/S/S	0,25/S/S	0,06/S/S
EC61	0,06/S/S	0,03/S/S	0,5/S/S	0,06/S/S
EC62	0,25/S/S	0,25/S/S	2/S/R	0,5/S/S
EC63	0,5/S/S	0,5/S/S	4/S/R	0,5/S/S
EC64	1/S/I	0,5/S/S	8/I/R	1/S/I
EC65	2/I/R	1/S/S	16/R/R	2/S/R
EC66	0,25/S/S	0,25/S/S	2/S/R	0,5/S/S
EC67	0,5/S/S	0,5/S/S	4/S/R	0,5/S/S
EC68	4/R/R	2/S/I	16/R/R	4/I/R
EC69	16/R/R	4/I/R	32/R/R	8/RR

Figura 36. Discrepancias entre CLSI y EUCAST en función de la fluoroquinolona evaluada de las cepas isogénicas de *E. coli* portadoras del gen *qepA2*.



4.3.1.3. Efecto sobre la CPM

Se analizó la CPM de ciprofloxacino y levofloxacino de las cepas isogénicas portadoras del gen *qepA* en ausencia de mutaciones cromosómicas y en combinación con las mutaciones Ser83Leu en *gyrA* y Ser80Arg en *parC*. Estas cepas presentaban valores de CMI de ciprofloxacino y levofloxacino entre 0,016 y 1 µg/ml.

La presencia del gen *qepA2* en ausencia de mutaciones cromosómicas incrementó la CPM de ciprofloxacino y levofloxacino 4 y 2 veces, respectivamente. En presencia de la mutación Ser83Leu, la adición de *qepA2* incrementó la CPM de ciprofloxacino hasta 64 µg/ml y la de levofloxacino a 8 µg/ml, es decir, este gen aumentó la CPM de ciprofloxacino y levofloxacino 8 y 2 veces, respectivamente (Tabla 36).

La combinación de las mutaciones Ser83Leu y Ser80Arg con el gen *qepA2* incrementó la CPM de ciprofloxacino 16 veces (128 µg/ml) en comparación con la cepa que no presentaba el mecanismo plasmídico, y 4 veces en el caso del levofloxacino (32 µg/ml).

A diferencia de lo sucedido con los genes *qnr*, hubo cepas isogénicas portadoras de *qepA2* que igualaron la VSM de la cepa *E. coli* ATCC 25922. En estas cepas este parámetro osciló entre 128 y 256 para ciprofloxacino, mientras que en el caso del levofloxacino varió entre 32 y 256 (Tabla 36).

Tabla 36. CMI (µg/ml), CPM (µg/ml), VSM y tiempo de aparición de mutantes de ciprofloxacino (CIP) y levofloxacino (LVX) de las cepas isogénicas de *E. coli* analizadas. Ver Tablas 13 y 17 (págs. 79 y 82).

Cepa	CMI (µg/ml)		CPM (µg/ml)		VSM (CPM/CMI)		Tiempo de aparición de mutantes (h)	
	CIP	LVX	CIP	LVX	CIP	LVX	CIP	LVX
ATCC 25922	0,004	0,008	1	2	256	256	48	48
EC60	0,016	0,016	4	4	256	256	48	48
EC02	0,06	0,125	4	4	64	32	24	24
EC62	0,25	0,25	64	8	256	32	72	24
EC04	0,25	0,25	8	8	32	32	48	48
EC64	1	0,5	128	32	128	64	72	96

4.3.2. Efecto del gen *qepA2* sobre el *fitness* bacteriano

4.3.2.1. Ensayos individuales: curvas de crecimiento

Se realizaron las curvas de crecimiento de las cepas isogénicas portadoras del gen *qepA2* bajo condiciones no competitivas en medio rico LB y medio deficiente en nutrientes M9. Al igual que se realizó con las cepas isogénicas sin mecanismos plasmídicos de resistencia a quinolonas y las que poseían un gen *qnr*, se calculó la tasa máxima de crecimiento y el tiempo de generación de estas 10 cepas isogénicas. Estos parámetros se compararon con los obtenidos para las cepas *E. coli* ATCC 25922 y *E. coli* ATCC 25922 pBK-CMV.

Tabla 37. Parámetros de crecimiento *in vitro* de las cepas isogénicas de *E. coli* portadoras del gen *qepA2* en medio LB. DE: desviación estándar. La cepa ATCC 25922 pBK-CMV se comparó con *E. coli* ATCC 25922; las cepas portadoras de mecanismos plasmídicos de resistencia (EC60 – EC69) se compararon con la cepa ATCC 25922 pBK-CMV. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) están indicadas en negrita. Ver Tabla 17 (pág. 82).

Cepa	Tasa máxima de crecimiento (h^{-1})		Tiempo de generación (min)	
	Media (DE)	p	Media (DE)	p
ATCC 25922	1,10 (0,01)	-	16,38 (0,19)	-
ATCC 25922 pBK-CMV	0,99 (0,03)	0,014	18,30 (0,58)	0,020
EC60	0,95 (0,06)	0,709	18,99 (1,07)	0,817
EC61	0,84 (0,19)	0,321	22,39 (5,09)	0,333
EC62	0,88 (0,1)	0,357	20,62 (2,22)	0,390
EC63	0,74 (0,31)	0,291	27,43 (10,80)	0,287
EC64	0,76 (0,35)	0,366	27,18 (10,94)	0,302
EC65	0,73 (0,16)	0,108	25,43 (5,2)	0,134
EC66	0,78 (0,23)	0,204	25,68 (7,59)	0,239
EC67	0,53 (0,04)	0,026	34,07 (2,71)	0,003
EC68	0,86 (0,20)	0,429	21,83 (5,74)	0,441
EC69	0,81 (0,28)	0,380	24,04 (6,97)	0,305

En medio LB, todas las cepas isogénicas portadoras del gen *qepA2* presentaron un tiempo de generación mayor que la cepa *E. coli* ATCC 25922 pBK-CMV, oscilando este parámetro entre 18 y 34 minutos. De las 10 cepas analizadas, sólo la cepa que poseía las mutaciones Ser83Leu, Asp87Asn y $\Delta marR$ en combinación con el gen *qepA2* (EC67), presentó una tasa máxima de crecimiento significativamente inferior a la cepa control (Tabla 37).

Tabla 38. Parámetros de crecimiento *in vitro* de las cepas isogénicas de *E. coli* portadoras del gen *qepA2* en medio M9. DE: desviación estándar. La cepa ATCC 25922 pBK-CMV se comparó con *E. coli* ATCC 25922; las cepas portadoras de mecanismos plasmídicos de resistencia (EC60 – EC69) se compararon con la cepa ATCC 25922 pBK-CMV. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) están indicadas en negrita. Ver Tabla 17 (pág. 82).

Cepa	Tasa máxima de crecimiento (h^{-1})		Tiempo de generación (min)	
	Media (DE)	p	Media (DE)	p
ATCC 25922	0,35 (0,002)	-	52,23 (0,34)	-
ATCC 25922 pBK-CMV	0,34 (0,005)	0,075	52,94 (0,75)	0,073
EC60	0,34 (0,004)	0,012	52,46 (0,63)	0,013
EC61	0,33 (0,003)	0,595	55,08 (0,55)	0,618
EC62	0,34 (0,003)	0,035	52,95 (0,49)	0,034
EC63	0,31 (0,016)	0,039	58,08 (2,85)	0,036
EC64	0,34 (0,005)	0,028	52,80 (0,84)	0,027
EC65	0,33 (0,010)	0,996	54,75 (1,66)	0,990
EC66	0,33 (0,004)	0,339	54,01 (0,60)	0,316
EC67	0,33 (0,003)	0,979	54,69 (0,48)	0,940
EC68	0,34 (0,005)	0,016	52,59 (0,69)	0,016
EC69	0,34 (0,008)	0,228	53,65 (1,34)	0,220

En medio M9 (Tabla 38), todas las cepas isogénicas portadoras del gen *qepA2* presentaron un tiempo de generación similar al de la cepa *E. coli* ATCC 25922 pBK-CMV (53 min), oscilando este parámetro entre 52 y 58 minutos. Hubo dos cepas que presentaron un tiempo de generación inferior a la cepa control: EC60 (cepa sin mutaciones

cromosómicas) y EC68 (cepa con las mutaciones Ser83Leu, Asp87Asn y Ser80Arg), siendo esta diferencia estadísticamente significativa. En el resto de cepas el tiempo de generación fue superior al de la cepa control.

4.3.2.2. Ensayos de competición

Se estudió el *fitness* relativo de las 10 cepas isogénicas portadoras del gen *qepA2* con respecto a la cepa *E. coli* ATCC 25922 al igual que se realizó para las cepas isogénicas portadoras de un gen *qnr* o que presentaban sólo mutaciones cromosómicas.

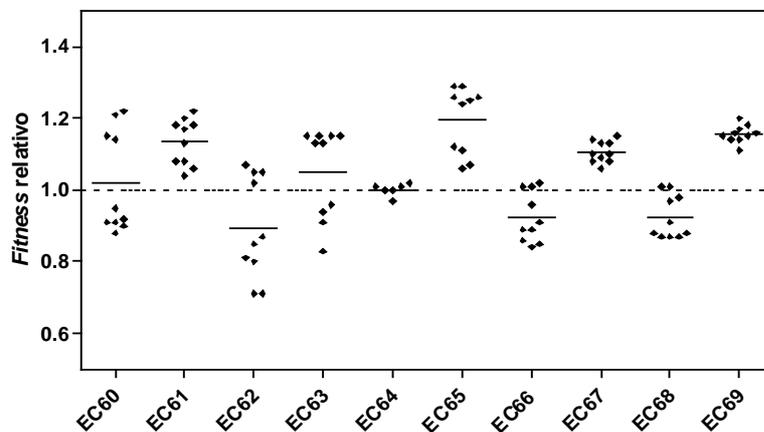
El gen *qepA2* en ausencia de mutaciones cromosómicas en *E. coli* no ocasionó coste biológico (Tabla 39 y Figura 37). La combinación de este gen con las mutaciones estudiadas en el QRDR de *gyrA* y *parC* ocasionó una reducción generalizada del *fitness* con respecto a la cepa control, oscilando este parámetro en dichas cepas entre 0,89 y 1.

Tabla 39. *Fitness* relativo de las cepas isogénicas de *E. coli* portadoras del gen *qepA2*. DE: desviación estándar. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) están indicadas en negrita. Ver Tabla 17 (pág. 82)

Cepa	<i>Fitness</i> medio (DE)	p	Nº de ensayos independientes
ATCC 25922	1,00 (0,08)	-	18
EC60	1,02 (0,13)	0,71	10
EC61	1,14 (0,06)	<0,001	10
EC62	0,89 (0,13)	0,06	10
EC63	1,05 (0,12)	0,28	10
EC64	1,00 (0,019)	0,97	6
EC65	1,23 (0,11)	<0,001	10
EC66	0,92 (0,06)	0,02	10
EC67	1,11 (0,03)	<0,001	10
EC68	0,93 (0,05)	0,01	10
EC69	1,16 (0,02)	<0,001	10

La combinación de *qepA2* y la delección de *marR*, independientemente de la presencia de mutaciones adicionales en el QRDR de los genes de las topoisomerasas tipo II, generó un aumento del *fitness*, siendo este incremento estadísticamente significativo en el 80% de las cepas (4/5). Las cepas que combinaban ambos mecanismos de resistencia a quinolonas presentaron valores de *fitness* relativo entre 1,05 y 1,23.

Figura 37. *Fitness* bacteriano en ensayos de competición *in vitro* para las cepas isogénicas de *E. coli* portadoras del gen *qepA2*. Las cepas EC61, EC63, EC65, EC67 y EC69 poseen la delección de *marR*. Los puntos indican el *fitness* relativo de cada ensayo de competición. Las líneas continuas horizontales indican el valor medio del *fitness* de cada cepa. La línea discontinua horizontal indica el *fitness* de la cepa *E. coli* ATCC 25922.



4.3.3. Efecto citotóxico del genes *qepA* sobre las células bacterianas

El posible efecto citotóxico del gen *qepA2* se estudió mediante su clonación en el vector pET29a, sin su promotor natural, bajo el control del promotor del operón *lac*, al igual que se realizó para los genes *qnr*. Esta construcción se electroporó en *E. coli* BL21 para poder estudiar el posible efecto citotóxico provocado por la sobreexpresión de QepA2.

Al igual que se realizó para las proteínas Qnr, se estudió el tiempo óptimo de inducción con IPTG (0,2 mM), concluyéndose que el tiempo óptimo era de dos horas.

4.3.3.1. Ensayos de viabilidad celular

Para los ensayos de viabilidad celular se utilizaron los mismos controles que en los experimentos realizados con las proteínas Qnr: *E. coli* BL21 pET29a se utilizó como control negativo y *E. coli* BL21 pET29a-EfsQnr como control positivo. La sobreexpresión de la proteína EfsQnr ocasionó una pérdida de viabilidad similar a la descrita anteriormente, mientras que a diferencia de lo ocurrido con las proteínas Qnr, la sobreexpresión de la proteína QepA2 no ocasionó pérdida de viabilidad celular en *E. coli* BL21.

5. Discusión

Desde la introducción de las quinolonas en la práctica clínica en los años 60, la resistencia a estos antimicrobianos en bacterias patógenas, principalmente en enterobacterias, ha aumentado de manera relevante. La resistencia a quinolonas en *E. coli* se relaciona principalmente con mutaciones cromosómicas de dos clases. Por un lado modificaciones en los genes codificantes de la ADN girasa y la topoisomerasa IV, principalmente en la región QRDR de los genes *gyrA* y *parC*, requiriéndose habitualmente varias mutaciones para el desarrollo de resistencia clínica. Y por otro lado, mutaciones que conducen a una reducción de la concentración intracelular de las quinolonas, bien en genes estructurales o reguladores que provoquen una pérdida o alteración de las porinas o la sobreexpresión de bombas de expulsión activa.

A pesar de tratarse inicialmente de antimicrobianos de origen sintéticos, en 1998 se describió el primer mecanismo plasmídico de resistencia a quinolonas: *qnrA*⁵¹. Tras el descubrimiento de este gen se describieron nuevas familias de proteínas Qnr (QnrB, QnrC, QnrD, QnrS y QnrVC), así como bombas de expulsión (OqxAB y QepA) y enzimas modificantes de fluoroquinolonas (Aac(6')Ib-cr) de codificación plasmídica que confieren bajo nivel de resistencia a dichos antimicrobianos⁸¹. Al mismo tiempo se han descrito múltiples alelos para la mayoría de estos genes. Estos mecanismos plasmídicos se han descrito principalmente en enterobacterias, aunque también en otros microorganismos de importancia clínica, y presentan una distribución mundial, variando su prevalencia según la zona geográfica y el microorganismo estudiado^{80,81,165,166}. Actualmente no existen métodos fenotípicos que permiten la fácil detección de las bacterias portadoras de mecanismos plasmídicos de resistencia a quinolonas, debido a que estos mecanismos no causan resistencia de nivel clínico en ausencia de mecanismos cromosómicos, pudiendo aparecer en bacterias sensibles y resistentes, lo que probablemente ha hecho que se subestime la prevalencia de los

mecanismos plasmídicos. Sin embargo, estos mecanismos son capaces de favorecer la selección de mutantes resistentes según los puntos de corte establecidos por el CLSI y el EUCAST, lo que puede conducir a fracaso terapéutico durante el tratamiento con quinolonas^{26,94}.

Debido al frecuente uso de las quinolonas en la práctica clínica, así como al aumento de la prevalencia de los mecanismos plasmídicos de resistencia observado en enterobacterias^{80,81}, la comprensión de las bases del *fitness* bacteriano asociado a la resistencia a estos antimicrobianos es importante. El conocimiento profundo del proceso de desarrollo de resistencia antimicrobiana es necesario para el diseño de medidas eficaces destinadas a la reducción de las tasas de resistencia. El abordaje de este tema es complicado debido a la multitud de factores genéticos que pueden afectar al resultado final. Por ello, el primer objetivo planteado en este proyecto fue la construcción de una colección de cepas isogénicas, a partir de la cepa de referencia *E. coli* ATCC 25922, en la que se combinaran mecanismos plasmídicos y cromosómicos de resistencia a quinolonas. Al trabajar con una colección de 89 cepas isogénicas de *E. coli* bien caracterizadas a nivel molecular y analizadas bajo las mismas condiciones, los resultados reflejan de manera precisa la relación entre la acumulación de mecanismos de resistencia a fluoroquinolonas, la sensibilidad a estos fármacos y el *fitness* bacteriano. Otro aspecto importante de la colección radica en el hecho de que las mutaciones en el QRDR de *gyrA* y *parC* estudiadas en este proyecto son clínicamente relevantes, encontrándose entre las más comunes de las halladas en los aislados clínicos de *E. coli* resistentes a fluoroquinolonas^{44,153,167}.

En los últimos años se han publicado algunos estudios realizados con colecciones isogénicas en los que se estudiaba el efecto de los mecanismos plasmídicos de resistencia a quinolonas en combinación con mecanismos cromosómicos sobre la sensibilidad a estos fármacos^{36,91,93}; así como diversos estudios donde se analizaba bien el efecto de mecanismos cromosómicos o bien de mecanismos plasmídicos que confieren resistencia a quinolonas sobre el *fitness* bacteriano^{37,144,156}. Este es el primer estudio donde se analiza el efecto que tiene la combinación de ambos tipos de mecanismos, no sólo sobre la sensibilidad a quinolonas, sino sobre el *fitness* bacteriano, además de estudiar el posible efecto citotóxico que tienen los mecanismos plasmídicos de resistencia a quinolonas en *E. coli*.

El segundo objetivo planteado en este trabajo fue el de analizar la contribución de los genes *qnr* y *qepA2*, sólo o en combinación con mecanismos cromosómicos, sobre la actividad de las quinolonas frente a la cepa *E. coli* ATCC 25922. La expresión de los mecanismos plasmídicos analizados como único mecanismo de resistencia a quinolonas (cepas EC10 – EC15 y EC60) no produjo niveles de resistencia clínica según los puntos de corte establecidos por el CLSI, obteniéndose valores similares a los obtenidos por la cepa portadora de la delección de *marR* (EC01) en el caso del gen *qepA2*, o la cepa portadora de la mutación Ser83Leu (EC02) en el caso de los genes *qnr*. Independientemente de las mutaciones cromosómicas presentes, los genes *qnr* ocasionaron un incremento de la CMI de ciprofloxacino de 2 – 32 veces, dependiendo del gen *qnr* expresado. Estos resultados concuerdan por los publicados previamente por otros autores^{91,95,168}. El gen *qnrS1* fue el gen *qnr* que provocó un mayor aumento de la CMI de las fluoroquinolonas, siendo *qnrD1* el que tuvo un menor efecto sobre este parámetro. La presencia de *qnrC* y *qnrD1* produjo un incremento en la CMI de las fluoroquinolonas inferior al descrito por otros autores^{54,55}. La coexpresión de los genes *qnr* en *E. coli* no presentó efecto sinérgico como ya había sido publicado previamente^{78,79,169}. La presencia del gen *qepA2* provoca un incremento de la CMI de ciprofloxacino de entre 4 y 8 veces, efecto similar al publicado previamente⁸⁷.

Los datos de sensibilidad a quinolonas obtenidos para las cepas portadoras de modificaciones cromosómicas concuerdan con los publicados previamente por diferentes autores^{38,39}. En este trabajo se obtuvieron valores de CMI de ciprofloxacino menores para las cepas portadoras de mecanismos cromosómicos que los obtenidos por Marcusson y colaboradores debido a que la cepa *E. coli* ATCC 25922 tiene una CMI de ciprofloxacino menor (0,004 µg/ml) que la cepa *E. coli* MG1655 (0,016 µg/ml). A pesar de ello, el incremento ocasionado por las diferentes mutaciones cromosómicas fue similar³⁷. El papel de la delección de *marR* sobre la sensibilidad a quinolonas fue muy leve, incrementando la CMI de ciprofloxacino sólo dos veces. La presencia de la segunda mutación en *gyrA* (Asp87Asn), en ausencia de mutaciones en *parC*, no tuvo ningún efecto sobre la actividad de las quinolonas. Todos estos datos concuerdan con los publicados anteriormente en la literatura³⁷.

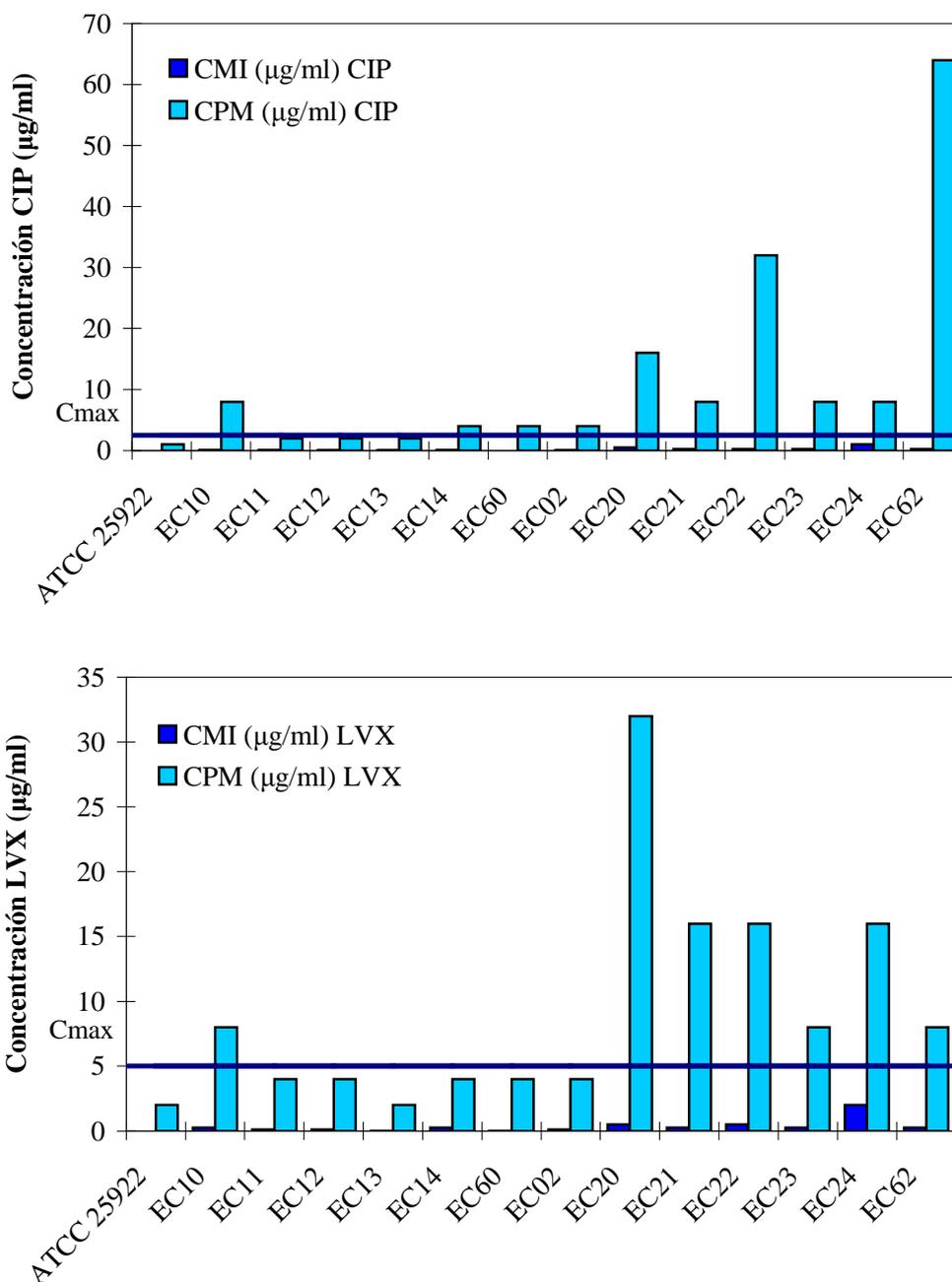
Dos conceptos importantes a la hora de instaurar la terapia antimicrobiana son los de concentración preventiva de mutantes (CPM) y ventana de selección de mutantes (VSM). El primero hace referencia, como se ha mencionado anteriormente, a la concentración del

antimicrobiano que impide la aparición de mutantes resistentes de un solo paso¹⁵, mientras que el segundo indica el intervalo de concentración que va desde la CMI a la CPM, de modo que si la concentración del antimicrobiano se encuentra dentro de la VSM se seleccionarán subpoblaciones bacterianas resistentes al fármaco, conduciendo a un fracaso terapéutico. En estudios previos se había demostrado que los mecanismos plasmídicos de resistencia a quinolonas aunque no generaran resistencia de nivel clínico a las fluoroquinolonas, si incrementaban la CPM de éstas⁸¹. Los resultados obtenidos en este proyecto coinciden con los publicado anteriormente, siendo *qepA2* el mecanismo que genera una mayor CPM de ciprofloxacino y levofloxacino. Las cepas portadoras de este mecanismo plasmídico alcanzaron valores de VSM similares a los alcanzados por la cepa *E. coli* ATCC 25922. Dentro de los genes *qnr*, el efecto sobre este parámetro fue variable, dependiendo de las mutaciones cromosómicas presentes en las cepas y el gen *qnr* analizado.

En los últimos años se han introducidos los parámetros farmacocinéticos en la práctica clínica, lo que ha cambiado la forma de administración de los antimicrobianos¹⁷⁰⁻¹⁷². Las fluoroquinolonas son antimicrobianos concentración-dependiente, siendo los parámetros farmacocinéticos que mejor definen su eficacia el cociente entre la concentración máxima alcanzada en el sitio de la infección (Cmax) y la CMI (Cmax/CMI), así como el cociente entre el área bajo la curva (AUC) y la CMI (AUC/CMI). Se considera óptimo que el cociente Cmax/CMI sea superior a 10 y el cociente AUC/CMI superior a 125^{173,174}. Según estos parámetros, aunque los mecanismos plasmídicos analizados ocasionen un leve aumento de la CMI de fluoroquinolonas, estos mecanismos disminuyen de forma importante la eficacia de estos fármacos, facilitando la posibilidad de fallo terapéutico en las infecciones por microorganismos portadores de genes *qnr* o *qepA2* sensibles a quinolonas.

Para evitar un fallo terapéutico, la concentración máxima del antimicrobiano alcanzada en el punto de la infección debería ser superior a la CPM, evitando de este modo la selección de microorganismos resistentes o tolerantes. La presencia adicional de un gen *qnr* o de *qepA2* en cepas con o sin mutaciones cromosómicas puede llevar los valores de CPM de ciprofloxacino y levofloxacino por encima de los valores de Cmax publicados en la guía de terapia antimicrobiana de 2014^{173,175}.

Figura 38. Representación de los valores de CMI y CPM de 16 cepas isogénicas con o sin mutación en *gyrA* y portadoras o no de genes *qnr* o *qepA2* de ciprofloxacino (parte A) y levofloxacino (parte B). La línea azul intensa representa la Cmax de cada fluoroquinolona: 2,5 µg/ml de ciprofloxacino (CIP) y 5 µg/ml de levofloxacino (LVX)¹⁷³. Ver tablas 13, 15 y 17 (págs. 79 – 82).



Este hecho ya había sido comprobado previamente para *qnrA1*, *qnrB1* y *qnrS1*⁹¹. En el caso del levofloxacino el efecto de los mecanismos plasmídicos es muy claro en la cepa de *E. coli* portadora de la mutación Ser83Leu en *gyrA* (EC02). El gen *qnrA1* es el único capaz de elevar los valores de CPM de las dos fluoroquinolonas por encima de la Cmax en ausencia de mutaciones cromosómicas. Por tanto, aunque son mecanismos que confieren bajo nivel de resistencia a quinolonas, pueden ser críticos para el éxito del tratamiento antimicrobiano.

Se ha publicado la existencia de una fuerte correlación entre la resistencia a quinolonas y el incremento de la tasa de mutaciones¹⁵³, de modo que los aislados clínicos resistentes muestran una mayor tasa de mutación que los sensibles. En los ensayos de mutagénesis realizados en este proyecto con rifampicina no se observó este fenómeno, quizás debido a que sólo se analizaron cepas sensibles, aunque con mecanismos de bajo nivel de resistencia.

EUCAST (www.eucast.org) ha establecido el punto de corte epidemiológico de ciprofloxacino en *E. coli* en 0,032 µg/ml. Según este parámetro, las cepas con una CMI de ciprofloxacino igual o inferior a este valor no presentarían ningún mecanismo de resistencia a quinolonas, considerándose la población salvaje. La definición de cepa salvaje es difícil debido a la posible expresión de mecanismos de bajo nivel de resistencia desconocidos¹⁷⁶. En este proyecto se pone de manifiesto la existencia de cepas de laboratorio portadoras de mecanismos de bajo nivel de resistencia (la delección de *marR* en la cepa EC01, *qnrD1* en la cepa EC13 y *qepA2* en la cepa EC60) que utilizando este valor de punto de corte epidemiológico quedarían englobadas dentro de la población salvaje a pesar de presentar mecanismos de resistencia a quinolonas, lo que indica que habría que revisar el valor de este parámetro.

Las discrepancias encontradas en las categorías clínicas de las cepas de la colección para las fluoroquinolonas estudiadas usando los criterios del EUCAST o el CLSI reflejan las divergencias entre ambos comités. De acuerdo con los datos obtenidos en este proyecto, utilizando los puntos de corte establecidos por el CLSI¹⁶¹ es necesaria la presencia de al menos cuatro mecanismos de resistencia: tres mecanismos cromosómicos (incluyendo siempre las modificaciones Ser83Leu en *gyrA* y Ser80Arg en *parC*) y la presencia de un mecanismo plasmídico para obtener cepas resistentes a ciprofloxacino (CMI de ciprofloxacino superior a 2 µg/ml). Sin embargo, al utilizar los puntos de corte establecidos

por EUCAST (www.eucast.org) basta con tres mecanismos de resistencia para producir resistencia clínica (CMI de ciprofloxacino mayor de 1 µg/ml): tres modificaciones en los genes codificantes de las subunidades A de las topoisomerasas tipo II o la combinación de la mutación Ser83Leu en *gyrA*, la delección de *marR* y la expresión de un mecanismo plasmídico.

En estudios previos se ha observado que los mutantes resistentes a fluoroquinolonas obtenidos *in vitro* a partir de cepas sensibles de *E. coli* a quinolonas presentaban en la mayoría de los casos mutaciones adicionales en el QRDR de *gyrA* y *parC*^{91,177}, presentándose sólo en un 30% de dichos mutantes una sobreexpresión de la bomba de expulsión activa AcrAB¹⁷⁷. Estos datos contrastan con los observados en este trabajo. Un porcentaje relevante (71%) de los mutantes derivados de cepas con bajo nivel de resistencia a quinolonas, tras ser tratadas con ciprofloxacino a dosis superiores a su CMI, sobreexpresaban la bomba AcrAB, lo que ocasiona mayores niveles de resistencia. Sólo el 7% de dichos mutantes presentaban mutaciones adicionales en el QRDR de *gyrA*.

En este sentido, recientemente, se ha sugerido un papel importante de la sobreexpresión de *acrAB*, dependiente o no de *marR*, en el desarrollo de resistencia en *E. coli*¹⁷⁸. Singh y colaboradores defienden que durante el desarrollo de la resistencia a quinolonas inicialmente surgen mutaciones que provocan la sobreexpresión de bombas de expulsión activa, surgiendo posteriormente las mutaciones en el QRDR de los genes de la ADN girasa y la topoisomerasa IV. Con la aparición de estas últimas mutaciones, la expresión de las bombas de expulsión vuelve a sus niveles basales. Por tanto, la sobreexpresión de las bombas de expulsión sería transitoria según esta teoría.

Las mutaciones que ocasionan la sobreexpresión de las bombas de expulsión son muy importantes en la evolución de la resistencia al incrementar la tasa de mutación unas cien veces más que las mutaciones en los genes de las topoisomerasas¹⁵³. Por tanto, y como muestran los resultados obtenidos en este proyecto, aunque las mutaciones que afectan a las bombas de expulsión activa contribuyen relativamente poco al incremento de la resistencia, ocurrirían con una alta frecuencia durante los pasos iniciales del desarrollo de la resistencia a quinolonas, aún cuando se observan en un porcentaje relativamente bajo de los aislados clínicos resistentes. Esto último se debe a que en estas cepas ya aparecen mutaciones en el

QRDR de *gyrA* y *parC*, situación en que la sobreexpresión de AcrAB no presentaría una ventaja adaptativa.

Sólo se analizó el QRDR de *gyrA* y *parC*, por lo que no se puede descartar la existencia de mutaciones adicionales en los genes *gyrB* y *parE* que contribuyeran al incremento de la resistencia a quinolonas, aunque como han indicado estudios previos¹⁷⁹⁻¹⁸², las mutaciones en estos dos genes no son comunes en los bacilos Gramnegativos, siendo la presencia de mutaciones iniciales en el QRDR de *gyrA* lo más común.

En la última década diferentes autores han sostenido que las especies reactivas de oxígeno (ROS) tienen un papel clave en el efecto bactericida de las quinolonas, así como en la mutagénesis provocada por tratamientos con dosis subletales con estos antimicrobianos^{102,105,108,109,116,183}. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran una fuerte correlación entre la presencia de mecanismos cromosómicos de resistencia a quinolonas, y en consecuencia de las variaciones en la CMI de estos antimicrobianos y/o en la frecuencia de aparición de mutantes de las cepas isogénicas estudiadas ocasionados por la presencia de estos mecanismos, y la formación de ROS. La producción de ROS se reduce de forma proporcional de acuerdo al número de modificaciones cromosómicas. Esta correlación tras el tratamiento con antimicrobianos bactericidas, en nuestro caso 1 µg/ml de ciprofloxacino, sugiere que las ROS podrían contribuir activamente a la actividad bactericida del ciprofloxacino en las cepas sensibles sin mecanismos de resistencia, y conducir a la mutagénesis inducida por este antimicrobiano en cepas que presenten bajo nivel de resistencia a quinolonas (por ejemplo las cepas portadoras de la mutación Ser83Leu en *gyrA*), en concordancia con los datos previamente publicados.

Recientemente, diversos autores han mostrado su desacuerdo en la teoría que sostiene que el efecto bactericida de las quinolonas y otros antimicrobianos bactericidas se debe sólo a las ROS^{111,112}. Según estos autores, la toxicidad de ciertos antimicrobianos bactericidas no estaría totalmente mediada por ROS debido a que se mantiene en condiciones de anaerobiosis y a que estos fármacos tienen un efecto leve sobre la aceleración de la respiración celular y la formación de ROS, concretamente radical hidroxilo. Además postulan que la metodología utilizada para medir la formación de ROS no es adecuada, ya que han comprobado que la oxidación de DCFH-DA puede deberse al ión férrico liberado de reacciones Fenton, y no al radical hidroxilo, siendo estas reacciones más numerosas en las células tratadas con

antimicrobianos, donde se produce una alteración metabólica¹¹¹. Sería interesante repetir los ensayos de formación de ROS en condiciones anaeróbicas, para comprobar si estos radicales se relacionan o no con la mutagénesis asociada a los tratamientos con quinolonas o si este efecto mutagénico se debe también a otras rutas metabólicas.

El tercer objetivo de este proyecto aborda la cuestión principal planteada en este trabajo: conocer si la acumulación de mecanismos de resistencia (cromosómicos o plasmídicos), algo que se encuentra frecuentemente en los aislados clínicos, podría modificar progresivamente el *fitness* bacteriano, de modo que existieran combinaciones de mecanismos de resistencia con un elevado *fitness* y que confieran resistencia a nivel clínico. Esta cuestión fue inicialmente abordada mediante ensayos individuales para calcular la tasa máxima de crecimiento. Sin embargo esta aproximación es bastante limitada, ya que además de sólo discriminar diferencias de al menos el 5% en el tiempo de generación, únicamente tiene en cuenta la fase exponencial de crecimiento¹²³, fase en la que los microorganismos en condiciones naturales se encuentran durante un breve periodo de tiempo, predominando en la naturaleza la fase estacionaria. Por tanto, los resultados obtenidos de estos ensayos son poco concluyentes. Los resultados obtenidos muestran que la cepa control *E. coli* ATCC 25922 es la que presenta un menor tiempo de generación en las distintas condiciones ensayadas.

Los ensayos de competición tienen en cuenta todas las fases del ciclo celular, y permiten discernir diferencias de *fitness* en torno al 1%, siendo una metodología más útil para estudiar el coste biológico asociado a los diferentes mecanismos de resistencia. Recientemente, Gullberg y colaboradores han desarrollado un nuevo método con mayor poder discriminatorio que el usado en este trabajo¹⁸⁴. Este método, basado en citometría de flujo, permite discriminar diferencias de *fitness* del 0,2% por generación en ensayos de competición.

Al aumentar el número de mecanismos de resistencia, tanto plasmídicos como cromosómicos, se produce un aumento de la CMI de fluoroquinolonas, mientras que el efecto sobre el *fitness* es variable, hecho ya observado previamente por Marcusson y colaboradores³⁷. La relación entre resistencia y *fitness* bacteriano es compleja, encontrando en nuestra colección tres posibilidades: 1) combinaciones que tienen poco o ningún coste biológico; 2) combinaciones que presentan un elevado coste biológico; y 3) combinaciones que provocan una reducción del coste biológico a la vez que un aumento del nivel de

resistencia. Por ejemplo, la combinación de la mutación Ser83Leu en *gyrA* con la mutación Ser80Arg en *parC* (EC04) incrementan el *fitness* bacteriano en comparación con la cepa *E. coli* ATCC 25922 y el mutante que sólo contiene la mutación Ser83Leu en *gyrA* (EC02), además de conferir un mayor nivel de resistencia a fluoroquinolonas. Este efecto compensatorio de la mutación Ser80Arg en *parC* no fue observado por Marcusson y colaboradores en *E. coli* MG1655³⁷. Aunque se ha descrito que la delección del gen *marR* lleva asociado un coste biológico en *E. coli* MG1655³⁷, en *E. coli* ATCC 25922 sin embargo se observa que esta modificación ocasiona un incremento del *fitness*. Por tanto, el efecto sobre el *fitness* bacteriano de los diferentes mecanismos cromosómicos que confieren resistencia a quinolonas puede ser un fenómeno cepa-dependiente.

En el caso de los genes *qnr*, sólo *qnrD1* y *qnrS1* afectan al *fitness* bacteriano en ausencia de mecanismos cromosómicos, provocando un incremento del *fitness*. La mayoría de las combinaciones que portan *qnrA1* tienen una reducción significativa del *fitness*, mientras que las cepas que llevan *qnrS1* tienen un incremento significativo de este parámetro. Estos datos concuerdan con la prevalencia encontrada en *E. coli* para las proteínas QnrA y QnrS. En esta enterobacteria *qnrS* se encuentra con elevada frecuencia en relación al resto de determinantes *qnr*, mientras que la prevalencia de *qnrA*, a pesar de haber sido el primer mecanismo plasmídico descrito, es muy baja^{81,185,186}.

Previamente, Sánchez y Martínez habían comprobado que diferentes proteínas Qnr o tipo Qnr, como QnrA o SmQnr, presentaban un coste biológico asociado diferente¹⁴⁴. Los resultados obtenidos por estos autores, junto con los hallados en este trabajo, indican que el *fitness* asociado a diferentes proteínas de repeticiones pentapeptídicas, a pesar de presentar estructuras y/o mecanismos de acción similares, puede variar significativamente, siendo estas variaciones debidas a pequeños cambios en la fisiología bacteriana, más que a un cambio del metabolismo global de la célula.

La presencia del gen *qepA2* en ausencia de mecanismos cromosómicos o en combinación con modificaciones en el QRDR de los genes *gyrA* y *parC* provoca un descenso del *fitness*. Esta reducción es compensada por la presencia adicional de la delección de *marR*, lo que indica que modificaciones en el cromosoma pueden afectar a los mecanismos plasmídicos. Se desconoce la causa mecánica de este fenómeno.

Se desconoce si las modificaciones de GyrA y ParC podrían afectar a la unión de las proteínas Qnr a las topoisomerasas tipo II y modificar la actividad de estas enzimas u otras proteínas relacionadas, así como a la función de QepA2. En general se acepta que la adquisición de mecanismos plasmídicos de resistencia conlleva un coste biológico. Sin embargo, los resultados aquí mostrados indican que este coste biológico podría ser específico de cada determinante plasmídico, de modo que dependería de la compatibilidad epigenética de los determinantes plasmídicos y los cromosómicos. Recientemente se ha publicado que los efectos epistáticos son esenciales en la adquisición de resistencia y en la evolución de la población bacteriana^{187,188}, datos en concordancia con los resultados presentados en este trabajo.

En este trabajo se observa que los genes *qnr* ocasionan un retraso del inicio de la fase exponencial en el medio deficiente en nutrientes M9. Sin embargo, este retraso desaparece en presencia de concentraciones subinhibitorias de ciprofloxacino. La expresión de ciertos genes *qnr* está regulada por ciprofloxacino; la expresión de *qnrB1* y *qnrD1* es inducida por quinolonas por una vía dependiente de SOS^{65,66,189}, mientras que *qnrS1* es inducido por una vía no dependiente de SOS¹⁹⁰. De este modo, en presencia de concentraciones subinhibitorias de fluoroquinolonas se induce la expresión de estas proteínas Qnr, adquiriendo las cepas portadoras de estos mecanismos plasmídicos una ventaja adaptativa. A este respecto, en las últimas décadas se ha comprobado que la resistencia a glucopéptidos de tipo Van-A en *S. aureus* tiene un alto coste biológico, pero la expresión de este mecanismo plasmídico de resistencia sólo se induce en presencia de glucopéptidos, de modo que esta regulación permite que las cepas resistentes no se extingan en ausencia de glucopéptidos^{191,192}. De este modo, la expresión de los genes *qnr* seguiría una dinámica similar a la del operón *vanA* en *S. aureus*, siendo su expresión inducida por la presencia de fluoroquinolonas.

En el caso de QepA2 no se vio que su presencia ocasionara un retraso del inicio de la fase exponencial en ausencia de ciprofloxacino, siendo el patrón de las curvas de crecimiento en medio M9 con y sin ciprofloxacino similar.

Hay cepas con dos mecanismos de resistencia que presentan un mayor *fitness* que cepas con un mecanismo, algo que también sucede al comparar cepas con cuatro y tres mecanismos de resistencia. Por tanto, en ciertas situaciones, la adquisición de un nuevo

mecanismo de resistencia, además de incrementar la CMI de ciprofloxacino, puede reducir el coste biológico en función de la naturaleza de dicho mecanismo.

Estos resultados obtenidos con los mecanismos plasmídicos y cromosómicos apoyan un fenómeno similar observado con mecanismos cromosómicos³⁷. Marcusson y colaboradores demostraron en un modelo en la cepa *E. coli* MG1655 que aunque la delección del gen *marR* tenía coste biológico, la aparición de nuevas mutaciones compensatorias en *gyrA* y/o *parC* podría incrementar el *fitness* y la resistencia a fluoroquinolonas, sugiriendo que un mayor nivel de resistencia podría ser seleccionado en ausencia de exposición antibiótica³⁷. Michon y colaboradores han publicado que la presencia del alelo *qnrA3* incrementa el *fitness* de *E. coli*¹⁵⁶, mientras que en nuestro caso la presencia de un alelo de la misma familia no tuvo coste biológico en ausencia de mutaciones cromosómicas; en el estudio mencionado la interacción del gen plasmídico con otros mecanismos de resistencia no fue analizada. Esta correlación positiva observada entre incremento del *fitness* y aumento de la resistencia podría tener un importante significado biológico, ya que según estos datos, combinaciones específicas de mecanismos de resistencia podrían ser seleccionadas al reducir el coste biológico de las cepas resistentes incluso en ausencia de fluoroquinolonas^{37,123,193}. De este modo, se promovería el desarrollo de una mayor tasa de resistencia a quinolonas incluso en ausencia de estos antimicrobianos. Por ejemplo, la presencia de ciertos genes *qnr*, particularmente *qnrS1*, podría conducir a la selección de mecanismos adicionales de resistencia con un incremento del *fitness* bacterianos en ausencia de presión antibiótica.

Existen ejemplos similares de la relación positiva entre reducción del coste biológico y el incremento de la resistencia a quinolonas en otras especies de microorganismos como *Salmonella* spp., *Neisseria gonorrhoeae*, *Campylobacter jejuni* o *S. pneumoniae*^{126,154,194,195}, así como en el caso de otros antimicrobianos¹⁹⁶. En la mayoría de estos estudios se ha comprobado que ciertas mutaciones en el QRDR de *gyrA* y *parC* suponen un incremento de los niveles de resistencia y llevan asociada una mejora del *fitness* bacteriano. Estas mutaciones aparecen en *gyrA* en el caso de bacterias Gramnegativas (Ser83Phe Asp87Asn en *Salmonella* spp., Ser91Phe Asp95Asn en *N. gonorrhoeae*, y Thr86Ile en *C. jejuni*) y en *parC* en las bacterias Grampositivas (Asp83Tyr en *S. pneumoniae*), datos que concuerdan con el hecho de que la diana primaria de las quinolonas en ambos tipos de bacterias sea distinta. Estos resultados refutan el dogma mantenido durante mucho tiempo de que los mecanismos,

cromosómicos y/o plasmídicos, de resistencia conllevan un coste biológico que hace que las bacterias resistentes tengan una desventaja adaptativa en ausencia de los antimicrobianos. De acuerdo con estos resultados, las estrategias diseñadas para la reducción de las tasas de resistencia deberían tener en consideración el *fitness* de las cepas resistentes, no siendo suficiente con la reducción del uso de los antimicrobianos.

Las proteínas Qnr se unen a las topoisomerasas tipo II protegiéndolas de la acción de las quinolonas^{67,68}. Aunque parece que las proteínas Qnr no suelen interferir con la actividad de la ADN girasa de *E. coli in vitro* a concentraciones fisiológicas^{68,81,197}, se ha puesto en evidencia que las proteínas tipo Qnr pueden inhibir la actividad catalítica de las topoisomerasas de sus hospedadores naturales^{197,198}. Estudios cristalográficos de la estructura de proteínas de repeticiones pentapeptídicas tipo Qnr como MfpA (*M. tuberculosis*), EfsQnr (*E. faecalis*) y AhQnr (*A. hydrophila*), revelan que estas proteínas tienen una estructura en hélice β dextrógira que simula la estructura de doble hélice del ADN^{61,75,76}. Esta similitud estructural podría tener consecuencias en el ciclo celular y en la replicación bacteriana. Esto podría explicar el impacto diferencial sobre el *fitness* de estas proteínas, pudiendo ser específico de la secuencia aminoacídica de las diferentes proteínas Qnr.

La sobreexpresión de los genes *qnr* en *E. coli* produce signos visibles de citotoxicidad y cambios morfológicos en las células que sobreexpresan estos mecanismos plasmídicos. La imágenes obtenidas por microscopía electrónica de transmisión sugieren que las células con sobreexpresión de un gen *qnr* son capaces de dividirse pero no de separarse, quedando conectadas las células hijas entre sí, como se ha descrito previamente para *Efsqnr*⁷⁶. Los principales cambios morfológicos debidos a la sobreexpresión de los genes *qnr* en *E. coli* son la existencia de áreas de baja densidad en los extremos de las células así como una retracción del contenido citoplasmático. En este trabajo se ha demostrado que la sobreexpresión de proteínas Qnr de distintas familias tienen un efecto citotóxico generalizado en *E. coli*, variando la magnitud de dicho efecto, lo que indica que el *fitness* asociado a diferentes proteínas Qnr, a pesar de presentar estructuras y mecanismos de acción similares, puede variar enormemente. QnrS1 demostró ser la proteína con mayor efecto citotóxico, mientras que QnrB1 fue la que ocasionó una menor reducción de la viabilidad celular. Este hecho se podría correlacionar con que los determinantes de la familia QnrB fueran los más prevalentes en la naturaleza, así como que esta familia fuera la que presentara un mayor número de

alelos¹⁹⁹, presentando el resto de familias de proteínas Qnr una menor divergencia evolutiva. Estos resultados apoyarían que los genes *qnr* sólo ocasionen un bajo nivel de resistencia a quinolonas. En condiciones naturales no se sobreexpresan estos genes debido a su citotoxicidad, lo que limitaría los niveles de resistencia que pueden provocar.

Estos datos podrían indicar una posible interacción competitiva entre las proteínas de repeticiones pentapeptídicas y el ADN por unirse a la ADN girasa. De este modo, cuando la concentración de proteínas Qnr es demasiado elevada, esta topoisomerasa es prácticamente secuestrada por las proteínas Qnr, no pudiendo llevar a cabo su función fisiológica, lo que ocasiona una reducción de la viabilidad celular. Probablemente la sobreexpresión de las proteínas Qnr, aparte de la inhibición de la ADN girasa, inhiba procesos celulares adicionales aún desconocidos, posiblemente los pasos finales en la división celular que conducen a la separación de las células hijas. Estos resultados abren la puerta al estudio del uso de las proteínas Qnr y tipo Qnr como péptidos antimicrobianos.

La sobreexpresión de QepA2, a diferencia de lo ocurrido con las proteínas Qnr, no tuvo efecto citotóxico sobre *E. coli*, algo que probablemente se deba a la estructura y mecanismo de acción de esta proteína.

Hasta donde sabemos, no hay actualmente una explicación clara al hecho de que algunos genes *qnr* se aislen con mayor frecuencia en un determinado género bacteriano, mientras que otros apenas se detectan en un microorganismo específico. La identificación de las diferencias en el impacto generado por la expresión de los diferentes genes *qnr* en distintos miembros de la familia *Enterobacteriaceae* podría ayudarnos a la comprensión de por qué algunos de estos genes tienen una mayor prevalencia en unos bacilos Gramnegativos que en otros. Mientras que la mayoría de los genes *qnr* se han encontrado en enterobacterias, prácticamente no se han encontrado en *P. aeruginosa* o *Acinetobacter* spp.^{81,200}. Los genes *qnr* son más prevalentes en *E. cloacae* y *K. pneumoniae* que en *E. coli*; *qnrB* es el determinante más prevalente en *E. cloacae* y *K. pneumoniae*, mientras que en *S. enterica* es *qnrS*^{80,81,185,186}. De este modo, el comportamiento de los determinantes *qnr* podría variar de unas especies de enterobacterias a otras, pudiendo ser esta la causa o una de las causas de las diferencias en las tasas de prevalencia de los distintos determinantes en las diferentes especies. Por tanto, sería interesante repetir parte de los experimentos mostrados en este

trabajo con otras especies de enterobacterias, lo cual nos ayudaría a entender la preferencia de los determinantes *qnr* por una determinada especie bacteriana.

La principal limitación de este estudio radica en el hecho de que se han utilizado construcciones plasmídicas artificiales que sólo portan un gen de resistencia (*qepA2* o algún gen *qnr*), mientras que en la naturaleza muchos de los plásmidos que portan mecanismos plasmídicos de resistencia a quinolonas llevan otros determinantes de resistencia, como por ejemplo genes codificantes de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) o de enzimas modificantes de aminoglucósidos⁹⁹. Por tanto, el *fitness* o coste biológico asociado a estos plásmidos no dependerá sólo de los genes que codifican mecanismos plasmídicos de resistencia a quinolonas, estando influenciada las tasas de resistencia a quinolonas por mecanismos de resistencia a otros antimicrobianos.

En resumen, los resultados obtenidos en este trabajo proporcionan una idea de la interacción entre el *fitness* bacteriano y la sensibilidad a quinolonas provocada por diferentes mecanismos de resistencia. Cómo evoluciona la resistencia a quinolonas (cromosómica o mediada por plásmidos) en la naturaleza dependerá del ambiente selectivo y del genotipo que sea seleccionado, pero podría haber etapas críticas en el desarrollo de resistencia, lo que significa que algunos mutantes con bajos niveles de resistencia y difíciles de detectar en laboratorios clínicos, podrían evolucionar hacia cepas clínicamente resistentes con la adquisición de una o dos mutaciones que confieran un incremento del *fitness* en ausencia de exposición al fármaco.

Teniendo en cuenta que los distintos determinantes *qnr* confieren diferentes niveles de resistencia a fluoroquinolonas y que protegen a la ADN girasa de la inhibición de las quinolonas de forma desigual, es comprensible que diferentes variantes *qnr* tengan un efecto diferencial sobre la fisiología bacteriana y que este efecto pueda ser especie específico

6. Conclusiones

De los resultados obtenidos en los trabajos expuestos en este proyecto de Tesis Doctoral se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. En nuestras condiciones experimentales se observa una relación entre la combinación de mecanismos de resistencia a quinolonas, plasmídicos y cromosómicos, con la sensibilidad a las mismas, la categoría clínica derivada y el *fitness* bacteriano en *E. coli*.
2. La presencia de mecanismos plasmídicos de resistencia en cepas de *E. coli* con al menos dos mutaciones cromosómicas determina aumentos de la CMI de quinolonas por encima de los puntos de corte establecidos para cepas sensibles por las agencias internacionales.
3. La expresión de algunos mecanismos cromosómicos (deleción de *marR*) o plasmídicos (*qnrD1* o *qepA2*) puede determinar en *E. coli* valores de CMI de fluoroquinolonas menores que los establecidos para el denominado punto de corte epidemiológico, por debajo del cual se presupone que no existen mecanismos de resistencia.
4. La acumulación de mecanismos de resistencia a quinolonas, cromosómicos y plasmídicos, disminuye la producción de especies reactivas de oxígeno, lo que se correlaciona con una pérdida de la actividad bactericida de las mismas.
5. En ausencia de mecanismos plasmídicos de resistencia a quinolonas, la presencia de mecanismos cromosómicos no disminuye el *fitness* bacteriano. Sin embargo,

algunos mecanismos cromosómicos, solos o en combinación, aumentan el *fitness* bacteriano.

6. El efecto de los genes *qnr* sobre el *fitness* bacteriano es variable. En nuestras condiciones experimentales, la presencia del gen *qnrA1* reduce el *fitness* bacteriano y los genes *qnrD1* y *qnrS1* lo incrementan.
7. La adquisición del gen *qepA2* tiene coste biológico en *E. coli* en presencia de un gen *marR* funcional, mientras que este coste biológico es compensado e incluso se convierte en una condición favorable para el crecimiento bacteriano en presencia de una delección en este mismo gen.
8. La sobreexpresión de los genes *qnr* en *E. coli* tiene un efecto citotóxico.
9. La sobreexpresión del gen *qepA2* en *E. coli* no tiene un efecto citotóxico.

7. Bibliografía

1. Leshner GY, Froelich EJ, Gruett MD, Bailey JH, Brundage RP. 1,8-naphthyridine derivatives. a new class of chemotherapeutic agents. *J Med Pharm Chem.* 1962;91:1063-1065.
2. Tillotson GS. Quinolones: Structure-activity relationships and future predictions. *J Med Microbiol.* 1996;44(5):320-324.
3. Peterson LR. Quinolone molecular structure-activity relationships: What we have learned about improving antimicrobial activity. *Clin Infect Dis.* 2001;33 Suppl 3:S180-6.
4. Naber KG, Adam D. Classification of fluoroquinolones. *Int J Antimicrob Agents.* 1998;10(4):255-257.
5. Alos JJ. Quinolones. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2009;27(5):290-297.
6. Owens RC,Jr, Ambrose PG. Clinical use of the fluoroquinolones. *Med Clin North Am.* 2000;84(6):1447-1469.
7. Sugino A, Peebles CL, Kreuzer KN, Cozzarelli NR. Mechanism of action of nalidixic acid: Purification of escherichia coli nalA gene product and its relationship to DNA gyrase and a novel nicking-closing enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977;74(11):4767-4771.
8. Wang JC. DNA topoisomerases: Why so many? *J Biol Chem.* 1991;266(11):6659-6662.
9. Champoux JJ. DNA topoisomerases: Structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem.* 2001;70:369-413.
10. Piton J, Petrella S, Delarue M, et al. Structural insights into the quinolone resistance mechanism of mycobacterium tuberculosis DNA gyrase. *PLoS One.* 2010;5(8):e12245.

-
11. Kramlinger VM, Hiasa H. The "GyrA-box" is required for the ability of DNA gyrase to wrap DNA and catalyze the supercoiling reaction. *J Biol Chem.* 2006;281(6):3738-3742.
 12. Higgins NP, Peebles CL, Sugino A, Cozzarelli NR. Purification of subunits of escherichia coli DNA gyrase and reconstitution of enzymatic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1978;75(4):1773-1777.
 13. Drlica K. Mechanism of fluoroquinolone action. *Curr Opin Microbiol.* 1999;2(5):504-508.
 14. Collin F, Karkare S, Maxwell A. Exploiting bacterial DNA gyrase as a drug target: Current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011;92(3):479-497.
 15. Drlica K, Hiasa H, Kerns R, Malik M, Mustaev A, Zhao X. Quinolones: Action and resistance updated. *Curr Top Med Chem.* 2009;9(11):981-998.
 16. 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.
 17. Barnard FM, Maxwell A. Interaction between DNA gyrase and quinolones: Effects of alanine mutations at GyrA subunit residues ser(83) and asp(87). *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(7):1994-2000.
 18. Newmark KG, O'Reilly EK, Pohlhaus JR, Kreuzer KN. Genetic analysis of the requirements for SOS induction by nalidixic acid in escherichia coli. *Gene.* 2005;356:69-76.
 19. Pohlhaus JR, Kreuzer KN. Norfloxacin-induced DNA gyrase cleavage complexes block escherichia coli replication forks, causing double-stranded breaks in vivo. *Mol Microbiol.* 2005;56(6):1416-1429.
 20. Lusetti SL, Cox MM. The bacterial RecA protein and the recombinational DNA repair of stalled replication forks. *Annu Rev Biochem.* 2002;71:71-100.
 21. Malik M, Hussain S, Drlica K. Effect of anaerobic growth on quinolone lethality with escherichia coli. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(1):28-34.
 22. Webber MA, Ricci V, Whitehead R, et al. Clinically relevant mutant DNA gyrase alters supercoiling, changes the transcriptome, and confers multidrug resistance. *MBio.* 2013;4(4):10.1128/mBio.00273-13.
-

-
23. Ikeda H, Shiraishi K, Ogata Y. Illegitimate recombination mediated by double-strand break and end-joining in escherichia coli. *Adv Biophys.* 2004;38(Complete):3-20.
 24. Kolodkin-Gal I, Engelberg-Kulka H. Induction of escherichia coli chromosomal mazEF by stressful conditions causes an irreversible loss of viability. *J Bacteriol.* 2006;188(9):3420-3423.
 25. Kolodkin-Gal I, Sat B, Keshet A, Engelberg-Kulka H. The communication factor EDF and the toxin-antitoxin module mazEF determine the mode of action of antibiotics. *PLoS Biol.* 2008;6(12):e319.
 26. Poirel L, Pitout JD, Calvo L, Rodriguez-Martinez JM, Church D, Nordmann P. In vivo selection of fluoroquinolone-resistant escherichia coli isolates expressing plasmid-mediated quinolone resistance and expanded-spectrum beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(4):1525-1527.
 27. Vickers AA, O'Neill AJ, Chopra I. Emergence and maintenance of resistance to fluoroquinolones and coumarins in staphylococcus aureus: Predictions from in vitro studies. *J Antimicrob Chemother.* 2007;60(2):269-273.
 28. Michea-Hamzehpour M, Furet YX, Pechere JC. Role of protein D2 and lipopolysaccharide in diffusion of quinolones through the outer membrane of pseudomonas aeruginosa. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991;35(10):2091-2097.
 29. Lee JH, Lee KL, Yeo WS, Park SJ, Roe JH. SoxRS-mediated lipopolysaccharide modification enhances resistance against multiple drugs in escherichia coli. *J Bacteriol.* 2009;191(13):4441-4450.
 30. Cullen ME, Wyke AW, Kuroda R, Fisher LM. Cloning and characterization of a DNA gyrase A gene from escherichia coli that confers clinical resistance to 4-quinolones. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989;33(6):886-894.
 31. Zhao X, Xu C, Domagala J, Drlica K. DNA topoisomerase targets of the fluoroquinolones: A strategy for avoiding bacterial resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(25):13991-13996.
 32. Heisig P, Tschorny R. Characterization of fluoroquinolone-resistant mutants of escherichia coli selected in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994;38(6):1284-1291.
-

-
33. Oram M, Howells AJ, Maxwell A, Pato ML. A biochemical analysis of the interaction of DNA gyrase with the bacteriophage mu, pSC101 and pBR322 strong gyrase sites: The role of DNA sequence in modulating gyrase supercoiling and biological activity. *Mol Microbiol.* 2003;50(1):333-347.
 34. Morais Cabral JH, Jackson AP, Smith CV, Shikotra N, Maxwell A, Liddington RC. Crystal structure of the breakage-reunion domain of DNA gyrase. *Nature.* 1997;388(6645):903-906.
 35. Bast DJ, Low DE, Duncan CL, et al. Fluoroquinolone resistance in clinical isolates of streptococcus pneumoniae: Contributions of type II topoisomerase mutations and efflux to levels of resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(11):3049-3054.
 36. Morgan-Linnell SK, Zechiedrich L. Contributions of the combined effects of topoisomerase mutations toward fluoroquinolone resistance in escherichia coli. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(11):4205-4208.
 37. Marcusson LL, Frimodt-Moller N, Hughes D. Interplay in the selection of fluoroquinolone resistance and bacterial fitness. *PLoS Pathog.* 2009;5(8):e1000541.
 38. Hopkins KL, Davies RH, Threlfall EJ. Mechanisms of quinolone resistance in escherichia coli and salmonella: Recent developments. *Int J Antimicrob Agents.* 2005;25(5):358-373.
 39. Yoshida H, Bogaki M, Nakamura M, Nakamura S. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase gyrA gene of escherichia coli. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990;34(6):1271-1272.
 40. Ng EY, Trucksis M, Hooper DC. Quinolone resistance mutations in topoisomerase IV: Relationship to the flqA locus and genetic evidence that topoisomerase IV is the primary target and DNA gyrase is the secondary target of fluoroquinolones in staphylococcus aureus. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40(8):1881-1888.
 41. Kumagai Y, Kato JI, Hoshino K, Akasaka T, Sato K, Ikeda H. Quinolone-resistant mutants of escherichia coli DNA topoisomerase IV parC gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40(3):710-714.
 42. Oteo J, Campos J. Quinolone use and resistance. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2004;22(4):201-203.
-

-
43. Poole K. Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(9):2233-2241.
 44. Jacoby GA. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis.* 2005;41 Suppl 2:S120-6.
 45. Piddock LJ. Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. *Nat Rev Microbiol.* 2006;4(8):629-636.
 46. Alekshun MN, Levy SB. Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: The mar regulon. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41(10):2067-2075.
 47. Cohen SP, McMurry LM, Hooper DC, Wolfson JS, Levy SB. Cross-resistance to fluoroquinolones in multiple-antibiotic-resistant (mar) escherichia coli selected by tetracycline or chloramphenicol: Decreased drug accumulation associated with membrane changes in addition to OmpF reduction. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989;33(8):1318-1325.
 48. Chapman JS, Georgopapadakou NH. Routes of quinolone permeation in escherichia coli. *Antimicrob Agents Chemother.* 1988;32(4):438-442.
 49. Hirai K, Aoyama H, Irikura T, Iyobe S, Mitsuhashi S. Differences in susceptibility to quinolones of outer membrane mutants of salmonella typhimurium and escherichia coli. *Antimicrob Agents Chemother.* 1986;29(3):535-538.
 50. Martinez-Martinez L, Hernandez-Alles S, Alberti S, Tomas JM, Benedi VJ, Jacoby GA. In vivo selection of porin-deficient mutants of klebsiella pneumoniae with increased resistance to cefoxitin and expanded-spectrum-cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40(2):342-348.
 51. Martinez-Martinez L, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet.* 1998;351(9105):797-799.
 52. Hata M, Suzuki M, Matsumoto M, et al. Cloning of a novel gene for quinolone resistance from a transferable plasmid in shigella flexneri 2b. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(2):801-803.
 53. Jacoby GA, Walsh KE, Mills DM, et al. qnrB, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(4):1178-1182.
-

-
54. Wang M, Guo Q, Xu X, et al. New plasmid-mediated quinolone resistance gene, qnrC, found in a clinical isolate of proteus mirabilis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(5):1892-1897.
 55. Cavaco LM, Hasman H, Xia S, Aarestrup FM. qnrD, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in salmonella enterica serovar kentucky and bovismorbificans strains of human origin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(2):603-608.
 56. Fonseca EL, Dos Santos Freitas F, Vieira VV, Vicente AC. New qnr gene cassettes associated with superintegron repeats in vibrio cholerae O1. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(7):1129-1131.
 57. Fonseca EL, Vicente AC. Epidemiology of qnrVC alleles and emergence out of the vibrionaceae family. *J Med Microbiol.* 2013;62(Pt 10):1628-1630.
 58. Vetting MW, Hegde SS, Fajardo JE, et al. Pentapeptide repeat proteins. *Biochemistry.* 2006;45(1):1-10.
 59. Jacoby G, Cattoir V, Hooper D, et al. Qnr gene nomenclature. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(7):2297-2299.
 60. Montero C, Mateu G, Rodriguez R, Takiff H. Intrinsic resistance of mycobacterium smegmatis to fluoroquinolones may be influenced by new pentapeptide protein MfpA. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(12):3387-3392.
 61. Hegde SS, Vetting MW, Roderick SL, et al. A fluoroquinolone resistance protein from mycobacterium tuberculosis that mimics DNA. *Science.* 2005;308(5727):1480-1483.
 62. Heddle JG, Blance SJ, Zamble DB, et al. The antibiotic microcin B17 is a DNA gyrase poison: Characterisation of the mode of inhibition. *J Mol Biol.* 2001;307(5):1223-1234.
 63. Ellington MJ, Woodford N. Fluoroquinolone resistance and plasmid addiction systems: Self-imposed selection pressure? *J Antimicrob Chemother.* 2006;57(6):1026-1029.
 64. Chatterji M, Nagaraja V. GyrI: A counter-defensive strategy against proteinaceous inhibitors of DNA gyrase. *EMBO Rep.* 2002;3(3):261-267.
 65. Briales A, Rodriguez-Martinez JM, Velasco C, et al. Exposure to diverse antimicrobials induces the expression of qnrB1, qnrD and smaqr genes by SOS-dependent regulation. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(12):2854-2859.
-

-
66. Wang M, Jacoby GA, Mills DM, Hooper DC. SOS regulation of qnrB expression. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(2):821-823.
 67. Tran JH, Jacoby GA, Hooper DC. Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein QnrA with escherichia coli topoisomerase IV. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(7):3050-3052.
 68. Tran JH, Jacoby GA, Hooper DC. Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein qnr with escherichia coli DNA gyrase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(1):118-125.
 69. Poirel L, Rodriguez-Martinez JM, Mammeri H, Liard A, Nordmann P. Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrA. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(8):3523-3525.
 70. Cattoir V, Poirel L, Mazel D, Soussy CJ, Nordmann P. *Vibrio splendidus* as the source of plasmid-mediated QnrS-like quinolone resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(7):2650-2651.
 71. Poirel L, Liard A, Rodriguez-Martinez JM, Nordmann P. Vibrionaceae as a possible source of qnr-like quinolone resistance determinants. *J Antimicrob Chemother.* 2005;56(6):1118-1121.
 72. Sanchez MB, Hernandez A, Rodriguez-Martinez JM, Martinez-Martinez L, Martinez JL. Predictive analysis of transmissible quinolone resistance indicates *Stenotrophomonas maltophilia* as a potential source of a novel family of qnr determinants. *BMC Microbiol.* 2008;8:148-2180-8-148.
 73. Velasco C, Rodriguez-Martinez JM, Briales A, Diaz de Alba P, Calvo J, Pascual A. Smaqnr, a new chromosome-encoded quinolone resistance determinant in *Serratia marcescens*. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(2):239-242.
 74. Rodriguez-Martinez JM, Velasco C, Briales A, Garcia I, Conejo MC, Pascual A. Qnr-like pentapeptide repeat proteins in gram-positive bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 2008;61(6):1240-1243.
 75. Xiong X, Bromley EH, Oelschlaeger P, Woolfson DN, Spencer J. Structural insights into quinolone antibiotic resistance mediated by pentapeptide repeat proteins: Conserved surface loops direct the activity of a qnr protein from a gram-negative bacterium. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(9):3917-3927.
-

-
76. Hegde SS, Vetting MW, Mitchenall LA, Maxwell A, Blanchard JS. Structural and biochemical analysis of the pentapeptide repeat protein EfsQnr, a potent DNA gyrase inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(1):110-117.
 77. Park KS, Lee JH, Jeong da U, et al. Determination of pentapeptide repeat units in qnr proteins by the structure-based alignment approach. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(9):4475-4478.
 78. Cattoir V, Poirel L, Nordmann P. Plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrB4 identified in france in an enterobacter cloacae clinical isolate coexpressing a QnrS1 determinant. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(7):2652-2653.
 79. Hu FP, Xu XG, Zhu DM, Wang MG. Coexistence of qnrB4 and qnrS1 in a clinical strain of klebsiella pneumoniae. *Acta Pharmacol Sin.* 2008;29(3):320-324.
 80. Rodriguez-Martinez JM, Cano ME, Velasco C, Martinez-Martinez L, Pascual A. Plasmid-mediated quinolone resistance: An update. *J Infect Chemother.* 2011;17(2):149-182.
 81. Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A. Plasmid-mediated quinolone resistance: A multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(4):664-689.
 82. Cattoir V, Nordmann P. Plasmid-mediated quinolone resistance in gram-negative bacterial species: An update. *Curr Med Chem.* 2009;16(8):1028-1046.
 83. Da Fonseca EL, Vicente AC. Functional characterization of a cassette-specific promoter in the class 1 integron-associated qnrVC1 gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(6):3392-3394.
 84. Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, et al. Fluoroquinolone-modifying enzyme: A new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med.* 2006;12(1):83-88.
 85. Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Arakawa Y. Plasmid-mediated qepA gene among escherichia coli clinical isolates from japan. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(4):1564-1566.
 86. Perichon B, Courvalin P, Galimand M. Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by QepA-mediated efflux in escherichia coli. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(7):2464-2469.
-

-
87. Cattoir V, Poirel L, Nordmann P. Plasmid-mediated quinolone resistance pump QepA2 in an escherichia coli isolate from france. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(10):3801-3804.
 88. Hansen LH, Johannesen E, Burmolle M, Sorensen AH, Sorensen SJ. Plasmid-encoded multidrug efflux pump conferring resistance to olaquinox in escherichia coli. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(9):3332-3337.
 89. Fouts DE, Tyler HL, DeBoy RT, et al. Complete genome sequence of the N2-fixing broad host range endophyte klebsiella pneumoniae 342 and virulence predictions verified in mice. *PLoS Genet.* 2008;4(7):e1000141.
 90. Yamane K, Wachino J, Suzuki S, et al. New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an escherichia coli clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(9):3354-3360.
 91. Briales A, Rodriguez-Martinez JM, Velasco C, et al. In vitro effect of qnrA1, qnrB1, and qnrS1 genes on fluoroquinolone activity against isogenic escherichia coli isolates with mutations in gyrA and parC. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(3):1266-1269.
 92. Rodriguez-Martinez JM, Briales A, Velasco C, Conejo MC, Martinez-Martinez L, Pascual A. Mutational analysis of quinolone resistance in the plasmid-encoded pentapeptide repeat proteins QnrA, QnrB and QnrS. *J Antimicrob Chemother.* 2009;63(6):1128-1134.
 93. Dominguez-Herrera J, Velasco C, Docobo-Perez F, et al. Impact of qnrA1, qnrB1 and qnrS1 on the efficacy of ciprofloxacin and levofloxacin in an experimental pneumonia model caused by escherichia coli with or without the GyrA mutation Ser83Leu. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(7):1609-1615.
 94. Rodriguez-Martinez JM, Pichardo C, Garcia I, et al. Activity of ciprofloxacin and levofloxacin in experimental pneumonia caused by klebsiella pneumoniae deficient in porins, expressing active efflux and producing QnrA1. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(7):691-697.
 95. Allou N, Cambau E, Massias L, Chau F, Fantin B. Impact of low-level resistance to fluoroquinolones due to qnrA1 and qnrS1 genes or a gyrA mutation on ciprofloxacin
-

-
- bactericidal activity in a murine model of escherichia coli urinary tract infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(10):4292-4297.
96. Jakobsen L, Cattoir V, Jensen KS, Hammerum AM, Nordmann P, Frimodt-Moller N. Impact of low-level fluoroquinolone resistance genes qnrA1, qnrB19 and qnrS1 on ciprofloxacin treatment of isogenic escherichia coli strains in a murine urinary tract infection model. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(10):2438-2444.
97. Rodriguez-Martinez JM, Velasco C, Garcia I, Cano ME, Martinez-Martinez L, Pascual A. Mutant prevention concentrations of fluoroquinolones for enterobacteriaceae expressing the plasmid-carried quinolone resistance determinant qnrA1. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(6):2236-2239.
98. Hansen LH, Jensen LB, Sorensen HI, Sorensen SJ. Substrate specificity of the OqxAB multidrug resistance pump in escherichia coli and selected enteric bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 2007;60(1):145-147.
99. Corkill JE, Anson JJ, Hart CA. High prevalence of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant qnrA in multidrug-resistant enterobacteriaceae from blood cultures in liverpool, UK. *J Antimicrob Chemother.* 2005;56(6):1115-1117.
100. Veldman K, Cavaco LM, Mevius D, et al. International collaborative study on the occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance in salmonella enterica and escherichia coli isolated from animals, humans, food and the environment in 13 european countries. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(6):1278-1286.
101. Imlay JA. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu Rev Biochem.* 2008;77:755-776.
102. Imlay JA. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: Lessons from a model bacterium. *Nat Rev Microbiol.* 2013;11(7):443-454.
103. Korshunov S, Imlay JA. Detection and quantification of superoxide formed within the periplasm of escherichia coli. *J Bacteriol.* 2006;188(17):6326-6334.
104. Pomposiello PJ, Demple B. Redox-operated genetic switches: The SoxR and OxyR transcription factors. *Trends Biotechnol.* 2001;19(3):109-114.
105. Dwyer DJ, Kohanski MA, Collins JJ. Role of reactive oxygen species in antibiotic action and resistance. *Curr Opin Microbiol.* 2009;12(5):482-489.
-

-
106. Imlay JA, Chin SM, Linn S. Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the fenton reaction in vivo and in vitro. *Science*. 1988;240(4852):640-642.
 107. Imlay JA. Pathways of oxidative damage. *Annu Rev Microbiol*. 2003;57:395-418.
 108. Kohanski MA, Dwyer DJ, Hayete B, Lawrence CA, Collins JJ. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell*. 2007;130(5):797-810.
 109. Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ. How antibiotics kill bacteria: From targets to networks. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(6):423-435.
 110. Wang X, Zhao X. Contribution of oxidative damage to antimicrobial lethality. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(4):1395-1402.
 111. Liu Y, Imlay JA. Cell death from antibiotics without the involvement of reactive oxygen species. *Science*. 2013;339(6124):1210-1213.
 112. Keren I, Wu Y, Inocencio J, Mulcahy LR, Lewis K. Killing by bactericidal antibiotics does not depend on reactive oxygen species. *Science*. 2013;339(6124):1213-1216.
 113. Lopez E, Elez M, Matic I, Blazquez J. Antibiotic-mediated recombination: Ciprofloxacin stimulates SOS-independent recombination of divergent sequences in escherichia coli. *Mol Microbiol*. 2007;64(1):83-93.
 114. Drlica K, Zhao X. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1997;61(3):377-392.
 115. Friedberg E, Walker G, Siede W, Wood R, Schultz R, Ellenberger T. *DNA repair and mutagenesis*. 2nd ed. Washington DC: ASM Press; 2006.
 116. Kohanski MA, DePristo MA, Collins JJ. Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis. *Mol Cell*. 2010;37(3):311-320.
 117. Foti JJ, Devadoss B, Winkler JA, Collins JJ, Walker GC. Oxidation of the guanine nucleotide pool underlies cell death by bactericidal antibiotics. *Science*. 2012;336(6079):315-319.
 118. Cunningham RP. DNA glycosylases. *Mutat Res*. 1997;383(3):189-196.
 119. McCullough AK, Dodson ML, Lloyd RS. Initiation of base excision repair: Glycosylase mechanisms and structures. *Annu Rev Biochem*. 1999;68:255-285.
 120. Loeb LA, Preston BD. Mutagenesis by apurinic/apyrimidinic sites. *Annu Rev Genet*. 1986;20:201-230.
-

-
121. Loeb LA, Preston BD, Snow ET, Schaaper RM. Apurinic sites as common intermediates in mutagenesis. *Basic Life Sci.* 1986;38:341-347.
 122. Bryskier A. *Antimicrobial agents: Antibacterials and antifungals.* Washington, D.C.: ASM Press; 2005.
 123. Andersson DI, Hughes D. Antibiotic resistance and its cost: Is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(4):260-271.
 124. Giraud E, Cloeckert A, Baucheron S, Mouline C, Chaslus-Dancla E. Fitness cost of fluoroquinolone resistance in salmonella enterica serovar typhimurium. *J Med Microbiol.* 2003;52(Pt 8):697-703.
 125. Ender M, McCallum N, Adhikari R, Berger-Bachi B. Fitness cost of SCCmec and methicillin resistance levels in staphylococcus aureus. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(6):2295-2297.
 126. Luo N, Pereira S, Sahin O, et al. Enhanced in vivo fitness of fluoroquinolone-resistant campylobacter jejuni in the absence of antibiotic selection pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(3):541-546.
 127. Dahlberg C, Chao L. Amelioration of the cost of conjugative plasmid carriage in escherichia coli K12. *Genetics.* 2003;165(4):1641-1649.
 128. Levin BR, Lipsitch M, Perrot V, et al. The population genetics of antibiotic resistance. *Clin Infect Dis.* 1997;24 Suppl 1:S9-16.
 129. Andersson DI, Levin BR. The biological cost of antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol.* 1999;2(5):489-493.
 130. Andersson DI. Persistence of antibiotic resistant bacteria. *Curr Opin Microbiol.* 2003;6(5):452-456.
 131. Levin BR. Minimizing potential resistance: A population dynamics view. *Clin Infect Dis.* 2001;33 Suppl 3:S161-9.
 132. Macvanin M, Hughes D. Hyper-susceptibility of a fusidic acid-resistant mutant of salmonella to different classes of antibiotics. *FEMS Microbiol Lett.* 2005;247(2):215-220.
 133. Linares JF, Lopez JA, Camafeita E, Albar JP, Rojo F, Martinez JL. Overexpression of the multidrug efflux pumps MexCD-OprJ and MexEF-OprN is associated with a
-

- reduction of type III secretion in *pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 2005;187(4):1384-1391.
134. Bjorkman J, Hughes D, Andersson DI. Virulence of antibiotic-resistant salmonella typhimurium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(7):3949-3953.
135. Binet R, Maurelli AT. Fitness cost due to mutations in the 16S rRNA associated with spectinomycin resistance in *chlamydia psittaci* 6BC. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(11):4455-4464.
136. Kugelberg E, Lofmark S, Wretling B, Andersson DI. Reduction of the fitness burden of quinolone resistance in *pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother.* 2005;55(1):22-30.
137. Macvanin M, Bjorkman J, Eriksson S, Rhen M, Andersson DI, Hughes D. Fusidic acid-resistant mutants of salmonella enterica serovar typhimurium with low fitness in vivo are defective in RpoS induction. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(12):3743-3749.
138. Bjorkman J, Nagaev I, Berg OG, Hughes D, Andersson DI. Effects of environment on compensatory mutations to ameliorate costs of antibiotic resistance. *Science.* 2000;287(5457):1479-1482.
139. Bergman M, Huikko S, Pihlajamaki M, et al. Effect of macrolide consumption on erythromycin resistance in streptococcus pyogenes in finland in 1997-2001. *Clin Infect Dis.* 2004;38(9):1251-1256.
140. Bergman M, Nyberg ST, Huovinen P, Paakkari P, Hakanen AJ, Finnish Study Group for Antimicrobial Resistance. Association between antimicrobial consumption and resistance in escherichia coli. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(3):912-917.
141. Tubulekas I, Hughes D. Suppression of rpsL phenotypes by tuf mutations reveals a unique relationship between translation elongation and growth rate. *Mol Microbiol.* 1993;7(2):275-284.
142. De Gelder L, Ponciano JM, Abdo Z, Joyce P, Forney LJ, Top EM. Combining mathematical models and statistical methods to understand and predict the dynamics of antibiotic-sensitive mutants in a population of resistant bacteria during experimental evolution. *Genetics.* 2004;168(3):1131-1144.

-
143. Schrag SJ, Perrot V, Levin BR. Adaptation to the fitness costs of antibiotic resistance in escherichia coli. *Proc Biol Sci.* 1997;264(1386):1287-1291.
 144. Sanchez MB, Martinez JL. Differential epigenetic compatibility of qnr antibiotic resistance determinants with the chromosome of escherichia coli. *PLoS One.* 2012;7(5):e35149.
 145. Wolter N, Smith AM, Farrell DJ, Klugman KP. Heterogeneous macrolide resistance and gene conversion in the pneumococcus. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(1):359-361.
 146. Meka VG, Gold HS, Cooke A, et al. Reversion to susceptibility in a linezolid-resistant clinical isolate of staphylococcus aureus. *J Antimicrob Chemother.* 2004;54(4):818-820.
 147. Meka VG, Pillai SK, Sakoulas G, et al. Linezolid resistance in sequential staphylococcus aureus isolates associated with a T2500A mutation in the 23S rRNA gene and loss of a single copy of rRNA. *J Infect Dis.* 2004;190(2):311-317.
 148. Nilsson AI, Zorzet A, Kanth A, Dahlstrom S, Berg OG, Andersson DI. Reducing the fitness cost of antibiotic resistance by amplification of initiator tRNA genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(18):6976-6981.
 149. Reynolds MG. Compensatory evolution in rifampin-resistant escherichia coli. *Genetics.* 2000;156(4):1471-1481.
 150. Sherman DR, Mdluli K, Hickey MJ, et al. Compensatory ahpC gene expression in isoniazid-resistant mycobacterium tuberculosis. *Science.* 1996;272(5268):1641-1643.
 151. Bjorkman J, Samuelsson P, Andersson DI, Hughes D. Novel ribosomal mutations affecting translational accuracy, antibiotic resistance and virulence of salmonella typhimurium. *Mol Microbiol.* 1999;31(1):53-58.
 152. Arthur M, Molinas C, Courvalin P. Sequence of the vanY gene required for production of a vancomycin-inducible D,D-carboxypeptidase in enterococcus faecium BM4147. *Gene.* 1992;120(1):111-114.
 153. Komp Lindgren P, Karlsson A, Hughes D. Mutation rate and evolution of fluoroquinolone resistance in escherichia coli isolates from patients with urinary tract infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(10):3222-3232.
-

-
154. Baker S, Duy PT, Nga TV, et al. Fitness benefits in fluoroquinolone-resistant salmonella typhi in the absence of antimicrobial pressure. *Elife*. 2013;2:e01229.
 155. Morosini MI, Ayala JA, Baquero F, Martinez JL, Blazquez J. Biological cost of AmpC production for salmonella enterica serotype typhimurium. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(11):3137-3143.
 156. Michon A, Allou N, Chau F, Podglajen I, Fantin B, Cambau E. Plasmidic qnrA3 enhances escherichia coli fitness in absence of antibiotic exposure. *PLoS One*. 2011;6(9):e24552.
 157. Enne VI, Bennett PM, Livermore DM, Hall LM. Enhancement of host fitness by the sul2-coding plasmid p9123 in the absence of selective pressure. *J Antimicrob Chemother*. 2004;53(6):958-963.
 158. Posfai G, Kolisnychenko V, Bereczki Z, Blattner FR. Markerless gene replacement in escherichia coli stimulated by a double-strand break in the chromosome. *Nucleic Acids Res*. 1999;27(22):4409-4415.
 159. Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in escherichia coli K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(12):6640-6645.
 160. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(9):e45.
 161. Clinical and laboratory standards institute. performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-second informational supplement M100-S24. . 2014.
 162. Drlica K. The mutant selection window and antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother*. 2003;52(1):11-17.
 163. Marcusson LL, Olofsson SK, Komp Lindgren P, Cars O, Hughes D. Mutant prevention concentrations of ciprofloxacin for urinary tract infection isolates of escherichia coli. *J Antimicrob Chemother*. 2005;55(6):938-943.
 164. Liu A, Fong A, Becket E, et al. Selective advantage of resistant strains at trace levels of antibiotics: A simple and ultrasensitive color test for detection of antibiotics and genotoxic agents. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(3):1204-1210.
 165. Cattoir V, Poirel L, Aubert C, Soussy CJ, Nordmann P. Unexpected occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in environmental aeromonas spp. *Emerg Infect Dis*. 2008;14(2):231-237.
-

-
166. Ahmed AM, Motoi Y, Sato M, et al. Zoo animals as reservoirs of gram-negative bacteria harboring integrons and antimicrobial resistance genes. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(20):6686-6690.
 167. Hooper DC. Mechanisms of action of antimicrobials: Focus on fluoroquinolones. *Clin Infect Dis.* 2001;32 Suppl 1:S9-S15.
 168. Cavaco LM, Aarestrup FM. Evaluation of quinolones for use in detection of determinants of acquired quinolone resistance, including the new transmissible resistance mechanisms qnrA, qnrB, qnrS, and aac(6')ib-cr, in escherichia coli and salmonella enterica and determinations of wild-type distributions. *J Clin Microbiol.* 2009;47(9):2751-2758.
 169. Flach CF, Boulund F, Kristiansson E, Larsson DJ. Functional verification of computationally predicted qnr genes. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2013;12:34-0711-12-34.
 170. Mouton JW, Vinks AA. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling of antibacterials in vitro and in vivo using bacterial growth and kill kinetics: The minimum inhibitory concentration versus stationary concentration. *Clin Pharmacokinet.* 2005;44(2):201-210.
 171. Roberts JA, Kruger P, Paterson DL, Lipman J. Antibiotic resistance-what's dosing got to do with it? *Crit Care Med.* 2008;36(8):2433-2440.
 172. Tam VH, Louie A, Deziel MR, Liu W, Leary R, Drusano GL. Bacterial-population responses to drug-selective pressure: Examination of garenoxacin's effect on pseudomonas aeruginosa. *J Infect Dis.* 2005;192(3):420-428.
 173. Mensa J, Gatell JM, García-Sánchez JE, Letang E, López-Suñé E, Marco F. *Guía de terapéutica antimicrobiana 2014.* Antares; 2014.
 174. Turnidge J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of fluoroquinolones. *Drugs.* 1999;58 Suppl 2:29-36.
 175. Hooper DC, Strahilevitz J. Quinolones. In: Mandell GA, Bennet JE, Dolin R, eds. *Mandell, douglas, and bennett's principles and practice of infectious diseases.* 7th ed. ed. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone Elsevier; 2009:487-510.
-

-
176. Tamae C, Liu A, Kim K, et al. Determination of antibiotic hypersensitivity among 4,000 single-gene-knockout mutants of escherichia coli. *J Bacteriol.* 2008;190(17):5981-5988.
 177. Morgan-Linnell SK, Becnel Boyd L, Steffen D, Zechiedrich L. Mechanisms accounting for fluoroquinolone resistance in escherichia coli clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(1):235-241.
 178. Singh R, Swick MC, Ledesma KR, et al. Temporal interplay between efflux pumps and target mutations in development of antibiotic resistance in escherichia coli. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(4):1680-1685.
 179. Vila J, Ruiz J, Marco F, et al. Association between double mutation in gyrA gene of ciprofloxacin-resistant clinical isolates of escherichia coli and MICs. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994;38(10):2477-2479.
 180. Breines DM, Ouabdesselam S, Ng EY, et al. Quinolone resistance locus nfxD of escherichia coli is a mutant allele of the parE gene encoding a subunit of topoisomerase IV. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41(1):175-179.
 181. Fabrega A, Madurga S, Giralt E, Vila J. Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Microb Biotechnol.* 2009;2(1):40-61.
 182. Nakamura S, Nakamura M, Kojima T, Yoshida H. gyrA and gyrB mutations in quinolone-resistant strains of escherichia coli. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989;33(2):254-255.
 183. Dwyer DJ, Kohanski MA, Hayete B, Collins JJ. Gyrase inhibitors induce an oxidative damage cellular death pathway in escherichia coli. *Mol Syst Biol.* 2007;3:91.
 184. Gullberg E, Cao S, Berg OG, et al. Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *PLoS Pathog.* 2011;7(7):e1002158.
 185. Jones-Dias D, Manageiro V, Francisco AP, et al. Assessing the molecular basis of transferable quinolone resistance in escherichia coli and salmonella spp. from food-producing animals and food products. *Vet Microbiol.* 2013;167(3-4):523-531.
 186. Jlili N, Rejiba S, Smaoui H, et al. Trend of plasmid-mediated quinolone resistance genes at the children's hospital in tunisia. *J Med Microbiol.* 2014;63(Pt 2):195-202.
-

-
187. Khan AI, Dinh DM, Schneider D, Lenski RE, Cooper TF. Negative epistasis between beneficial mutations in an evolving bacterial population. *Science*. 2011;332(6034):1193-1196.
 188. Trindade S, Sousa A, Xavier KB, Dionisio F, Ferreira MG, Gordo I. Positive epistasis drives the acquisition of multidrug resistance. *PLoS Genet*. 2009;5(7):e1000578.
 189. Da Re S, Garnier F, Guerin E, Campoy S, Denis F, Ploy MC. The SOS response promotes qnrB quinolone-resistance determinant expression. *EMBO Rep*. 2009;10(8):929-933.
 190. Okumura R, Liao CH, Gavin M, Jacoby GA, Hooper DC. Quinolone induction of qnrVS1 in vibrio splendidus and plasmid-carried qnrS1 in escherichia coli, a mechanism independent of the SOS system. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(12):5942-5945.
 191. Arthur M, Molinas C, Courvalin P. The VanS-VanR two-component regulatory system controls synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in enterococcus faecium BM4147. *J Bacteriol*. 1992;174(8):2582-2591.
 192. Foucault ML, Courvalin P, Grillot-Courvalin C. Fitness cost of VanA-type vancomycin resistance in methicillin-resistant staphylococcus aureus. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(6):2354-2359.
 193. Andersson DI, Hughes D. Evolution of antibiotic resistance at non-lethal drug concentrations. *Drug Resist Updat*. 2012;15(3):162-172.
 194. Kunz AN, Begum AA, Wu H, et al. Impact of fluoroquinolone resistance mutations on gonococcal fitness and in vivo selection for compensatory mutations. *J Infect Dis*. 2012;205(12):1821-1829.
 195. Rozen DE, McGee L, Levin BR, Klugman KP. Fitness costs of fluoroquinolone resistance in streptococcus pneumoniae. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(2):412-416.
 196. Kassen R, Bataillon T. Distribution of fitness effects among beneficial mutations before selection in experimental populations of bacteria. *Nat Genet*. 2006;38(4):484-488.
-

197. Merens A, Matrat S, Aubry A, et al. The pentapeptide repeat proteins MfpAMt and QnrB4 exhibit opposite effects on DNA gyrase catalytic reactions and on the ternary gyrase-DNA-quinolone complex. *J Bacteriol.* 2009;191(5):1587-1594.
198. Arsene S, Leclercq R. Role of a qnr-like gene in the intrinsic resistance of enterococcus faecalis to fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(9):3254-3258.
199. Vetting MW, Hegde SS, Wang M, Jacoby GA, Hooper DC, Blanchard JS. Structure of QnrB1, a plasmid-mediated fluoroquinolone resistance factor. *J Biol Chem.* 2011;286(28):25265-25273.
200. Tran QT, Nawaz MS, Deck J, Nguyen KT, Cerniglia CE. Plasmid-mediated quinolone resistance in pseudomonas putida isolates from imported shrimp. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77(5):1885-1887.
201. Chaverroche MK, Ghigo JM, d'Enfert C. A rapid method for efficient gene replacement in the filamentous fungus aspergillus nidulans. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(22):E97.
202. Cattoir V, Poirel L, Rotimi V, Soussy CJ, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance qnr genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *J Antimicrob Chemother.* 2007;60(2):394-397.
203. Kim HB, Park CH, Kim CJ, Kim EC, Jacoby GA, Hooper DC. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants over a 9-year period. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(2):639-645.
204. Rodriguez-Martinez JM, Velasco C, Pascual A, Garcia I, Martinez-Martinez L. Correlation of quinolone resistance levels and differences in basal and quinolone-induced expression from three qnrA-containing plasmids. *Clin Microbiol Infect.* 2006;12(5):440-445.

8. Anexos

Anexo 1. Cebadores utilizados durante el desarrollo de este proyecto

Reemplazamiento genético		
GyrAS83L-Fw ⁹¹	5' CCATGGTGACCTGGCGGTCTATG 3'	Mutagénesis de <i>gyrA</i> (S83L)
GyrAS83L-Rv ⁹¹	5' CATAGACCGCCAGGTCACCATGG 3'	
ParCS80R-Fw ⁹¹	5' CCGCACGGCGATCGCGCCTGTTATGAAGC 3'	Mutagénesis de <i>parC</i> (S80R)
ParCS80R-Rv ⁹¹	5' GCTTCATAACAGGCGCGATCGCCGTGCGG 3'	
GyrAS83L-D87N-Fw	5' CCATGGTGACCTGGCGGTCTATAACACGATCGTC 3'	Mutagénesis de <i>gyrA</i> (S83L D87N)
GyrAS83L-D87N-Rv	5' GACGATCGTGTTATAGACCGCCAGGTCACCATGG 3'	
Pre- <i>gyrAS83</i> ⁹¹	5' CGGGATCCCGAGCGATCTCTTCGTGGTCTACG 3'	Amplificación parcial de <i>gyrA</i>
Post- <i>gyrAS83</i> ⁹¹	5' CGGGATCCCGCCTGATACGGAATTCGTGGAC 3'	
Pre- <i>parCS80</i> ⁹¹	5' CGGGATCCCGGACCGCGATAGCGTTGTCTTCCG 3'	Amplificación parcial de <i>parC</i>
Post- <i>parCS80</i> ⁹¹	5' CGGGATCCCGCAGATCGGTGGTAGCGAAGAGGTG 3'	

Inactivación cromosómica

K1 ¹⁵⁹	5' CAGTCATAGCCGAATAGCCT 3'
K2 ¹⁵⁹	5' CGGTGCCCTGAATGAACTGC 3'
Kt ¹⁵⁹	5' CGGCCACAGTCGATGAATCC 3'

Detección pKOBEG

EBGHe-5 ²⁰¹	5' CCCGCTAGCGAAAAGATGTTTCGTGAAGC 3'
EBGh3-3 ²⁰¹	5' GGGAAGCTTATTATCGTGAGGATGCGTCA 3'

Inactivación cromosómica

Inactivación *marR*

H1-marR-P1	5' AGCGATCTGTTCAATGAAATTATCCATTGGGTCGCTTAATCCA TATGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC 3'
H2-marR-P2	5' AAGCAAATACTCAAGTGTTGCCACTTCGTCCGCCGTCAGGTTTT TTGTATGGGAATTAGCCATGGTCC 3'
Pre-H1 marR	5' CACTCTTTAGCTAGCCTTGCAT 3'
Post-H2 marR	5' CATCCGTTGCAGGTGCCATTTGG 3'

Inactivación *lacZ*

H1-lacZ-P1	5' ACGGATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAA CCCTGGCGTTACCCAAGTGTTAGGCTGGAGCTGCTTC 3'
H2-lacZ-P2	5' CAACTGGTAATGGTAGCGACCGGCGCTCAGCTGGAATTCCGCCG ATACTGACGGGCTCCAATGGGAATTAGCCATGGTCC 3'
Pre-H1-LacZ	5' CAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGA 3'
Post-H2-LacZ	5' GTTGATGTCATGTAGCCAAATCG 3'

Detección de los genes *qnr* y *qepA2*

QnrAm-Fw ²⁰²	5' AGAGGATTTCTCACGCCAGG 3'
QnrAm-Rv ²⁰²	5' TGCCAGGCACAGATCTTGAC 3'
QnrBm-Fw ²⁰²	5' GGMATHGAAATTCGCCACTG 3'
QnrBm-Rv ²⁰²	5' TTTGCYGYCYGCCAGTCGAA 3'
QnrC-Fw ²⁰³	5' GGGTTGTACATTTATTGAATCG 3'
QnrC-Rv ²⁰³	5' CACCTACCCATTTATTTTCA 3'
QnrD-Fw ⁵⁵	5' CGAGATCAATTTACGGGGAATA 3'
QnrD-Rv ⁵⁵	5' AACAAGCTGAAGCGCCTG 3'
QnrSm-Fw ²⁰²	5' GCAAGTTCATTGAACAGGGT 3'
QnrSm-Rv ²⁰²	5' TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG 3'
QepA-Fw ⁸⁵	5' GCAGGTCCAGCAGCGGGTAG 3'
QepA-Rv ⁸⁵	5' CTTCTGCCCGAGTATCGTG 3'
Efsqnr-Fw	5' CGAGTGACTTTCCTTCGTTGC 3'
Efsqnr-Rv	5' CCAAGGGCACTTGCCAAATA 3'

Clonación de los genes *qnr* y *qepA2* en pBK-CMV

PreQnrA1-BamHI ⁹¹	5' CGGGATCCCGCGGCAGTTAAAATTGGGGCT 3'
PostQnrA1-BamHI ⁹¹	5' CGGGATCCCGACGCCGAGTCCCGACCAGACTGC 3'
PreQnrB1-BamHI ⁹¹	5' CGGGATCCCGCTTGGTCGCCCTGGCCAACC 3'
PostQnrB1-BamHI ⁹¹	5' CGGGATCCCGGCAAACCAGCTTACAGCAGGC 3'
PreQnrC-BamHI ⁵⁴	5' CGCGGATCCGCGGTTTAAACAACCGTCGGCT 3'
PostQnrC-BamHI ⁵⁴	5' CGCGGATCCGCGGCCTTGAAGATGATTCGCT 3'
PreQnrD1-BamHI	5' CGCGGATCCGCGGTGGGGATGAACGGGCGGTTT 3'
PostQnrD1-BamHI ⁵⁵	5' CGCGGATCCGCGTTTGATTAGTACCACATTGG 3'
PreQnrS1-BamHI ⁹¹	5' CGGGATCCCGCCACTTAAAACAGGTAAATTG 3'
PostQnrS1-BamHI ⁹¹	5' CGGGATCCCGTACATGGTTGTCCCTATGTC 3'
PreQepA2-BglII	5' GGAAGATCTTCCGGTCGATGTTTGATGTTATGGAG 3'
PostQepA2-BglII	5' GGAAGATCTTCCAGAGCCGCCTGAGGCCATGCGAC 3'

Clonación de los genes *qnr* y *qepA2* en pET29a

QnrA1-pET-Nde	5' GGAATTCATATGGATATTATTGATAAAGTTTTTCAG 3'
QnrA1-pET-Xho	5' CCGCTCGAGATCCGGCAGCACTATTACTCCCA 3'
QnrB1-pET-Nde	5' GGAATTCATATGACTCTGGCGTTAGTTGGCGAAA 3'
QnrB1-pET-Xho	5' CCGCTCGAGACCCATGACAGCGATACCAAGAC 3'
QnrS1-pET-Nde	5' GGAATTCATATGGAAACCTACAATCATACATATCG 3'
QnrS1-pET-Xho	5' CCGCTCGAGGTCAGGATAAACAACAATACCCA 3'
QnrC-pET-Nde	5' GGAATTCATATGAATTATCCCATAAAACGTACGA 3'
QnrC-pET-Xho	5' CCGCTCGAGAAACACTTTGTCTGGAATAACAA 3'
QnrD1-pET-Nde	5' GGAATTCATATGGAAAAGCACTTTATCAATGAAAAG 3'
QnrD1-pET-Xho	5' CCGCTCGAGTCGGTGAACAATAACACCTAAAC 3'
EfsQnr-pET-Nde	5' GGAATTCATATGAAAATAACTTATCCCTTGCCACCA 3'
EfsQnr-pET-Xho	5' CCGCTCGAGGGTAATCACCAAACCAAGGGCAC 3'
QepA2-pET-Nde	5' GGAATTCATATGTCCGCCACGCTCCACGACACCGCA 3'
QepA2-pET-Xho	5' CCGCTCGAGACCAGATGCGAGCGCTGGGCGCTT 3'

Caracterización de mutantes

Secuenciación QRDR

GyrA-1 ²⁰⁴	5' AAATCTGCCCGTGTTCGTTGGT 3'	Amplificación y secuenciación QRDR <i>gyrA</i>
GyrA-2 ²⁰⁴	5' GCCATACCTACGGCGATACC 3'	
ParC-B ²⁰⁴	5' GCGAACGATTTCCGGATCG 3'	Amplificación y secuenciación QRDR <i>parC</i>
ParC-A ²⁰⁴	5' CTGAATGCCAGCGCCAAATT 3'	

Ensayos RT-PCR

Mdh-RT-Fw ⁶⁶	5' CTGCGTAACATCCAGGACACTAACG 3'	Amplificación gen <i>mdh</i>
Mdh-RT-Rv ⁶⁶	5' CGACGGTTGGGGTATAAATAACAGG 3'	
AcrB-RT-Fw	5' GTGGTACGCCCGCGGTGAAA 3'	Amplificación gen <i>acrB</i>
AcrB-RT-Rv	5' GCACCGGTCGCCAGCTTGAT 3'	

Secuenciación de vectores de clonación

T3	5' AATTAACCCTCACTAAAGGG 3'
T7	5' GTAATACGACTCACTATAGGGC 3'
T7-Ter	5' GCTAGTTATTGCTCAGCGG 3'
M13F	5' GTAAAACGACGGCCAG 3'
M13R	5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'
pACYC-EcoR ⁹⁷	5' AGACCGTTCAGCTGGATATTACG 3'

Anexo 2. Producción científica

Publicaciones en revistas derivadas del trabajo en el laboratorio

1. Briales A, Rodríguez-Martínez JM, Velasco C, **Machuca J**, Díaz de Alba P, Blázquez J, Pascual A. Exposure to diverse antimicrobials induces the expression of qnrB1, qnrD and smaqr genes by SOS-dependent regulation. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(12):2854-2859.
2. Rodríguez-Martínez JM, Díaz de Alba P, Briales A, **Machuca J**, Lossa M, Fernández-Cuenca F, Rodríguez-Baño J, Martínez-Martínez L, Pascual A. Contribution of OqxAB efflux pumps to quinolone resistance in extended-spectrum-beta-lactamase-producing klebsiella pneumoniae. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(1):68-73.

Comunicaciones a Congresos

1. A Briales, JM Rodríguez-Martínez, P Díaz de Alba, C Velasco, **J Machuca**, J Blázquez, A Pascual. Beta-lactams and trimethoprim induce the expression of qnrB and smaqr genes by SOS depending regulation. 22nd ECCMID, Londres, Reino Unido.
2. JM Rodríguez-Martínez, P Díaz de Alba, **J Machuca**, A Briales, J Rodríguez-Baño, L Martínez-Martínez, A Pascual. High prevalence of fluoroquinolone efflux pump OqxAB in ESBL-producing Klebsiella pneumoniae in Spain. 22nd ECCMID, Londres, Reino Unido.

-
3. **J Machuca**, A Briales, P Díaz de Alba, L Martínez-Martínez, JM Rodríguez-Martínez, A Pascual. Interplay among plasmid-mediated fluoroquinolone resistance. chromosomal-mediated fluoroquinolone resistance and bacterial fitness in *Escherichia coli*. 23rd ECCMID, Berlín, Alemania.
 4. A Gibello, P Díaz de Alba, M Mar Blanco, **J Machuca**, T Cutuli, JM Rodríguez-Martínez. *Lactococcus garvieae* carries a chromosomally encoded pentapeptide repeat protein, conferring reduced susceptibility to quinolones in *E. coli*. 23rd ECCMID, Berlín, Alemania.
 5. **J Machuca**, A Briales, P Díaz de Alba, L Martínez-Martínez, A Pascual, JM Rodríguez-Martínez. The interplay between plasmid and chromosomal-mediated fluoroquinolone resistance mechanisms increases Mutant Prevention Concentrations (MPC) selecting *acrB* overexpression in *Escherichia coli*. 53rd ICAAC, Denver, EE.UU.
 6. **J Machuca**, P Díaz de Alba, A Briales, JM Rodríguez-Martínez, A Pascual. Efecto de la coexpresión de diferentes genes *qnr* sobre la sensibilidad a quinolonas en *Escherichia coli*. XXVI Reunión SAMPAC, Cádiz, España.
 7. **J Machuca**, A Briales, P Diaz de Alba, L Martínez-Martínez, A. Pascual, JM Rodríguez-Martínez. Interacción de QepA y mecanismos cromosómicos de resistencia a quinolonas en *Escherichia coli* y su efecto en la resistencia y el *fitness* bacteriano. XVIII Congreso SEIMC, Valencia, España.

