



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

**RESISTENCIA A QUINOLONAS MEDIADA POR
PLÁSMIDO EN *Enterobacteriaceae***

Trabajo realizado para optar al grado de doctor por el
licenciado José Manuel Rodríguez Martínez.

Sevilla, Marzo de 2006



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

D. Álvaro Pascual Hernández, Catedrático de Microbiología de la Universidad de Sevilla y D. Luis Martínez Martínez, Jefe de Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla,

CERTIFICAN:

Que la tesis para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla que lleva por título "Resistencia a quinolonas mediada por plásmido en *Enterobacteriaceae*" ha sido realizada por D. José Manuel Rodríguez Martínez 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 1 de Marzo de 2006.

Fdo. Dr. Álvaro Pascual Hernández

Fdo. Dr. Luis Martínez Martínez



A LOS EFECTOS OPORTUNOS

Esta Tesis Doctoral se llevó a cabo parcialmente en colaboración con el Departamento de Bacteriología-Virología del Hospital de Bicetre (Universidad Paris XI, Paris, Francia) bajo la dirección del Dr. Patrice Nordmann y del Dr. Laurent Poirel.

À QUI ÇA PUISSE CONCERNER

Cette Thèse Doctorale a été partiellement réalisée en collaboration avec le Département de Bacteriologie-Virologie de l'Hôpital Bicêtre (Université Paris XI, Paris, France) sous la direction des Docteurs Patrice Nordmann et Laurent Poirel.

TO WHOM IT MAY REQUEST

This Doctoral Thesis was partially developed in collaboration with the Department of Bacteriology-Virology of the Hospital of Bicêtre (University Paris XI, Paris, France) under the supervision of Dr. Patrice Nordmann and of Dr. Laurent Poirel.

Agradecimientos

Tras varios años de trabajo y muchas horas de dedicación tanto en el laboratorio como en la preparación del presente trabajo, me gustaría reflejar mi agradecimiento con la cabeza y el corazón a todas aquellas personas que me han ayudado a superar los momentos difíciles, han colaborado de una u otra forma y/o han hecho que todo este esfuerzo tenga recompensa. A todos ellos quiero expresar mi más sincero agradecimiento.

Al Dr. Álvaro Pascual por su rigor profesional, crítica constructiva y por la confianza puesta en mí, impulsándome a continuar por un camino que creo merece la pena. Al Dr. Luis Martínez por todas sus ideas, su actitud crítica y por inculcar esos mismos valores en mí. Gracias a ambos por haberme dado la oportunidad de llevar a cabo el presente trabajo de investigación.

Al Dr. Evelio J. Perea quiero agradecerle el haberme aceptado como doctorando de este departamento, así como su apoyo e iniciativa en hacerme ver cual es el mejor camino para proseguir mi formación dentro de este mundo.

Gracias a mis compañeros que han compartido conmigo el trabajo diario en el laboratorio. Agradecer la ayuda desinteresada prestada en todo momento a la Dra. Isabel García y por todo el tiempo dedicado. Gracias a la Dra. Sofía Ballesta por todos sus consejos que no han sido pocos y a la Dra. María del Carmen Conejo por resolverme tantas y tantas dudas. Especialmente, darle las gracias a la Dra. Carmen Velasco por aportarme en todo momento su ayuda y conocimientos para resolver problemas en el laboratorio y comprender y escuchar muchos de mis problemillas.

Gracias a José Ramón por ser mi tabla de salvación en la resolución de problemas informáticos. También a Felipe, Luisa, Conce, Encarni, Juan, Juan Alcalá, Gema y Lorena porque gracias a ellos las horas pasadas en el laboratorio fueron mucho más agradables.

Al Dr. José Carlos Palomares y a la Dra. M^a José Torres por ayudarme en mis inicios sin recibir nada a cambio. No me quiero olvidar de Concha y Antonio, quienes fueron mis primeros compañeros.

Al Dr. V. J. Benedí agradecerle su excelente acogida durante mi estancia en el Instituto Mediterráneo de Estudios Avanzados (IMEDEA) (Palma de Mallorca, España). Gracias especialmente a Peque por tratarme como a un amigo de siempre y a María por su compañía.

Al grupo del Dr. Jerónimo Pachón del Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Universitario Virgen del Rocío. Sobretudo a Cristina, Menia y Fernando por su magnífica acogida durante mis visitas a su laboratorio.

Por supuesto que fue difícil decidir irme a otro país para completar los trabajos de esta Tesis Doctoral. Hoy día estoy completamente satisfecho de haber disfrutado de esa gratificante experiencia. Gracias al Dr. Patrice Nordmann del Hospital de Bicetre (Paris, Francia) por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio. Especialmente dar las gracias al Dr. Laurent Poirel por enseñarme tanto, confiar en mí y darme la oportunidad de encontrar un amigo. Gracias a todos mis compañeros y amigos en el laboratorio por hacerme sentir como un francés más a pesar de no conocer el idioma. Gracias a Claire, Delphine, Ludo, Liliana, Hassam, Frédéric, Alain, Edí, Thierry,...Especialmente gracias a Laura por ayudarme con el idioma, por su compañía y su constante ayuda.

Bien sûr que c'était difficile de décider de partir pour un autre pays a fin de compléter les travaux de ma thèse. Aujourd'hui je suis totalement satisfait d'ayant eu cette expérience magnifique. Merci au Dr. Patrice Nordmann (Hôpital de Bicêtre, Paris, France) de me donner l'occasion de travailler dans son laboratoire. Un grand merci au Dr. Laurent Poirel pour ses enseignements, sa confiance en moi et pour me donner l'occasion d'avoir trouvé un ami. Merci à tous les collègues et amis du labo, parce que je me suis senti comme un français de plus manqué me difficultés avec la langue. Merci à Claire, Delphine, Ludo, Liliana, Hassam, Frédéric, Alain, Edí, Thierry,...Essentiellement merci à Laura, de m'avoir aidé avec la langue, pour sa compagnie et son aide constant.

Gracias a la Dra. M^a Ángeles Domínguez por su ayuda con la técnica de Electroforesis en Campo Pulsante.

Gracias a los amigos de toda la vida que siempre te preguntan qué tal van las cosas y lo dicen de verdad, gracias Beni y Chelu.

A mis amigos de la facultad, aquellos que me acompañaron y me hicieron pasar unos años inolvidables mientras me formaba como biólogo y persona. En especial, gracias a Elena, Isabel, Mari Carmen y María del Mar. Gracias a Pepe, Paco, V, A. Rivas, Marga, Ángel, A. Ruíz, Carmeli, Kiko,...

También agradecer la compañía de mis fisio-compañeros, que no son pocos, por muchos buenos ratos en este Campus Macarena. Gracias a Mari Luz por su ayuda en la traducción de estos agradecimientos a francés.

Por encima de todo el mundo me gustaría agradecer en estas páginas el apoyo constante de mi familia, no sólo durante estos últimos años sino durante toda mi vida empujándome a cumplir mis ilusiones personales. Gracias a mi madre a la que debo casi la mitad de lo que soy, y gracias a mi padre al que le debo casi la otra mitad. Ellos son mi punto de referencia. Gracias a mis hermanos, Carlos y Rocío, por estar a mi lado en todo momento. También al

resto de mi familia, especialmente a aquellos a los que verme caminar por esta senda les supone un estímulo y un orgullo.

No quiero olvidarme de mi otra familia, quienes me han ayudado y se han preocupado por mí. Gracias a Mercedes y Esperanza.

Gracias a mi Bea, un espejo en el que mirarme cada día y la mujer de todas mis vidas, por apoyarme constantemente, alegrarse y sufrir conmigo en cada momento, conocerme mejor que a mi mismo, y también, a veces, aguantar al pesado de Josema después de uno de esos días complicados de trabajo cuando las cosas no salen del todo bien.

Publicaciones en revistas obtenidas de esta Tesis Doctoral.

1. **Rodríguez-Martínez José Manuel**, Pascual Álvaro, García Isabel and Martínez-Martínez Luis. 2003. Detection of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnr* among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing AmpC-type beta-lactamase. Journal Antimicrobial Chemotherapy 52:703-706.
 2. **Rodríguez-Martínez, JM.** 2005. Mecanismos de resistencia a quinolonas mediada por plásmidos. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 23(1): 25-31.
 3. **José Manuel Rodríguez**, M. Carmen Conejo, Luis Martínez-Martínez, María Eliecer Cano, Carmen Velasco, Álvaro Pascual. Evaluation of antimicrobial susceptibility of bacteria containing plasmid mediated and Fox-5 beta-lactamase by four automatic systems. Clinical Microbiology Infection. 2005. 11 (5):402-404.
 4. Laurent Poirel, **José-Manuel Rodríguez-Martínez**, Hedi Mammeri, Alain Liard, and Patrice Nordmann. Origin of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinant QnrA. Antimicrobial Agents Chemotherapy. 2005. 49(8): 3523-3525.
 5. **J.M. Rodríguez-Martínez**, C. Velasco, A. Pascual, I. García, L. Martínez-Martínez. Correlation of quinolone resistance levels and differences in basal and quinolone-induced expression from three *qnrA*-containing plasmids. Clinical Microbiology Infection. 2006. (En prensa)
 6. Laurent Poirel, Alain Liard, **José-Manuel Rodríguez-Martínez** and Patrice Nordmann. *Vibrionaceae* as a possible source of Qnr-like quinolone resistance determinants. Journal Antimicrobial Chemotherapy. 2005. 56(6): 1118-21.
 7. Laurent Poirel, Johann D. D. Pitout, Lucy Calvo, **José-Manuel Rodríguez-Martínez**, Deirdre Church, and Patrice Nordmann. In-vivo selection of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* expressing plasmid-mediated quinolone resistance and expanded-spectrum β -lactamase. Antimicrobial Agents Chemotherapy (En prensa).
-

8. **José-Manuel Rodríguez-Martínez**, Laurent Poirel, Álvaro Pascual, and Patrice Nordmann. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance in Australia. *Microbial Drug Resistance* (En prensa).

Publicaciones en revistas derivadas del trabajo en el laboratorio.

1. García Federico, Palomares José Carlos, Martínez Nora Mariela, Álvarez Marta, Suárez Sonia, García Fernando, **Rodríguez José Manuel**, Hernández-Quero José, Maroto M^a del Carmen. 2003. Study of different systems for interpreting results of genotypic antiretroviral drug resistance tests. *Antiviral Therapy*. 8: 77-78.
 2. **Rodríguez-Martínez José Manuel** y Palomares José Carlos. 2004. Resistencia genotípica del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 en pacientes con fracaso terapéutico. *Medicina Clínica* 122(5): 161-4.
 3. Cristina Pichardo, **José Manuel Rodríguez-Martínez**, María E. Pachón-Ibáñez, Carmen Conejo, José Ibáñez-Martínez, Luis Martínez-Martínez, Jerónimo Pachón, and Álvaro Pascual. The efficacy of cefepime and imipenem in experimental murine pneumonia caused by porin-deficient *Klebsiella pneumoniae* producing CMY-2 β -lactamase. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 2005. 49(8): 3311-3316.
 4. Macías J, Palomares JC, Mira JA, Torres MJ, García-García JA, **Rodríguez JM**, Vergera S, Pineda JA. Transient rebounds of HIV plasma viremia are associated with the emergence of drug resistance mutations in patients on highly active antiretroviral therapy. *Journal of Infection*. 2005. 51(3):195-200.
 5. **J.M. Rodríguez-Martínez**, L. López, I. García, A Pascual. Clinical isolate of *Haemophilus influenzae* with a high level of fluoroquinolone resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2006. 57(3):577-578.
 6. Felipe Fernández-Cuenca, **José Manuel Rodríguez-Martínez**, Luis Martínez-Martínez, Álvaro Pascual. In vivo selection of *Enterobacter aerogenes* with reduced susceptibility to cefepime and carbapenems associated with decreased expression of a 40 kDa outer membrane protein and hyperproduction of AmpC β -lactamase. *Internacional Journal of Antimicrobial Agents* (En prensa).
-

7. S. Ballesta, M. C. Conejo, I. García, **J.M. Rodríguez-Martínez**, C. Velasco, A. Pascual. Survival and resistance to imipenem of *Pseudomonas aeruginosa* on latex gloves. *J. Antimicrobial Chemother.* (En prensa).

Comunicaciones a Congresos.

1. **JM Rodríguez**, I García, L Martínez Martínez, A Pascual. 2002. Frecuencia del determinante de resistencia a quinolonas *qnr* en cepas clínicas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. X Congreso SEIMC, Sevilla (España).
 2. **JM Rodríguez**, MJ Torres, J Aznar, JC Palomares. 2002. Subtipos de VIH detectados en pacientes estudiados en el área hospitalaria de Sevilla. X Congreso SEIMC, Sevilla (España).
 3. **J.M. Rodríguez**, M.C. Palomares, J.C. Palomares. 2002. Evaluación de diferentes bases de datos de resistencia a antirretrovirales de V.I.H. X Congreso SEIMC, Sevilla (España).
 4. **JM Rodríguez**, EJ Perea, J Vázquez, JC Palomares. 2002. Evaluación de las resistencias a antirretrovirales de VIH en pacientes multitratados. X Congreso SEIMC, Sevilla (España).
 5. **JM Rodríguez**, A Pascual, I García, L Martínez-Martínez. 2002. Detection of the quinolone resistance determinant *qnr* among clinical isolates of *K. pneumoniae* (Kp) producing Amp-C type beta-lactamase (ACBL). 42nd ICAAC, San Diego, California, EE.UU.
 6. **Rodríguez JM**, Pascual A, Martín D, García I, Pachón J, Martínez-Martínez L. 2003. Bactericidal activity of fluoroquinolones (FQ) against *Klebsiella pneumoniae* containing the plasmid-mediated resistance determinant *qnr*. 13th ECCMID, Glasgow, Escocia.
-

7. **JM Rodríguez-Martínez**, I García, A Pascual, C Pichardo, L Martínez-Martínez. 2003. Prevalencia del gen de resistencia a quinolonas *qnr* en cepas clínicas de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* mediante hibridación con una sonda de ADN. XVI Reunión de la Sociedad Andaluza de Microbiología y Parasitología Clínicas, Sevilla, España.
 8. C Pichardo, **JM Rodríguez-Martínez**, ME Jiménez-Mejías, L Martínez-Martínez, ME Pachón-Ibáñez, M Herrero, A Pascual, J Pachón. 2003. Eficacia de imipenem y cefepima en la neumonía experimental causada por cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de beta-lactamasas plasmídicas tipo ampC. XVI Reunión de la Sociedad Andaluza de Microbiología y Parasitología Clínicas, Sevilla, España.
 9. C. Pichardo, **JM Rodríguez-Martínez**, M Herrero, MC Conejo, M Aguilar, L. Martínez-Martínez, J. Pachón, A. Pascual. 2004. Efficacy of cefepime and imipenem in experimental pneumonia caused by porin-deficient *Klebsiella pneumoniae* CMY-2 beta-lactamase. 14th ECCMID, Praga, República Checa.
 10. **JM Rodríguez-Martínez**, A. Pascual, I. García, E. Jiménez-Mejías, J. Pachón, L. Martínez-Martínez. 2004. Frequency and stability of mutants selected with fluoroquinolones from *Klebsiella pneumoniae* containing the plasmid mediated resistance determinant *qnr*. 14th ECCMID, Praga, República Checa.
 11. F. Fernández-Cuenca, A. Pascual, **JM Rodríguez-Martínez**, L. Martínez-Martínez. 2004. In vivo selection of *Enterobacter aerogenes* with reduced susceptibility to cefepime associated with either decrease expression of an outer membrane protein of 40 kDa or hyperproduction of AmpC beta-lactamase. 14th ECCMID, Praga, República Checa.
 12. L. López, **JM Rodríguez-Martínez**, E. Perea, A. Pascual. 2004. Caracterización de *Haemophilus influenzae* con resistencia de alto nivel a fluoroquinolonas. 11th SEIMC, Bilbao, España.
-

13. **JM Rodríguez-Martínez**, A. Pascual, I. García, C. Velasco, L. Martínez-Martínez. 2004. Descripción del entorno genético del determinante de resistencia a fluoroquinolonas *qnr* en cepas de *Klebsiella pneumoniae*. 11th SEIMC, Bilbao, España.
 14. **José Manuel Rodríguez-Martínez**, Carmen Velasco, Álvaro Pascual, Isabel García, Luis Martínez-Martínez. 2005. Factors affecting resistance to quinolones mediated by plasmids containing the *qnrA* gene. 15th ECCMID, Copenhagen, Dinamarca.
 15. **José Manuel Rodríguez-Martínez**, M. Carmen Conejo, Luis Martínez-Martínez, María Eliecer Cano, Carmen Velasco, Álvaro Pascual. 2005. Evaluation of antimicrobial susceptibility of bacteria containing the plasmid mediated *qnrA* and FOX-5 beta-lactamase by four automatic systems. 15th ECCMID, Copenhagen, Dinamarca.
 16. L. Poirel, **J. M. Rodríguez-Martínez**, J. N. Pham and P. Nordmann. 2005 Identification of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance in Australia. 45nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington.
 17. P. Nordmann, **J. M. Rodríguez-Martínez**, H. Mammeri, A. Liard, and L. Poirel. 2005 Origin of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinant QnrA. 45nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington.
 18. **J. M. Rodríguez-Martínez**, C. Pichardo, I. García, M. E. Pachón-Ibáñez, F. Docobo-Pérez, A. Pascual, J. Pachón, L. Martínez-Martínez. 2005 Activity of Quinolones in Experimental Pneumonia Caused by *Klebsiella pneumoniae* Producing the Plasmid-Mediated Quinolone-Resistance Determinant QnrA. 45nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington.
-

19. Sofía Ballesta, **José M. Rodríguez-Martínez**, Isabel García, M. Carmen Conejo and Álvaro Pascual. 2006. Penetration and Activity of Linezolid and Vancomycin in *Staphylococcus epidermidis* biofilms. 16th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Niza (Francia).

 20. M. E. Cano, **J.M. Rodríguez-Martínez**, J. Agüero, A. Pascual, J. M. García-Lobo, C. Velasco, L. Martínez-Martínez. Detection of *qnrS* in Clinical Isolates of *Enterobacter cloacae* in Spain. 16th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Niza (Francia).
-

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Quinolonas.....	1
1.1.1. Origen, estructura química y clasificación.....	1
1.1.2. Relación estructura-actividad.....	8
1.1.3. Mecanismo de acción.....	10
1.1.4. Farmacocinética y farmacodinamia.....	17
1.1.5. Espectro de actividad.....	19
1.1.6. Uso clínico de la quinolonas.....	20
1.1.7. Efectos adversos del uso de quinolonas.....	22
1.2. Mecanismos de resistencia a quinolonas.....	23
1.2.1. Modificaciones en las dianas moleculares (Topoisomerasas tipo II).....	23
1.2.2. Disminución de la permeabilidad de membrana.....	29
1.2.3. Expresión o sobreexpresión de sistemas de expulsión activa.....	30
1.2.4. Resistencia a quinolonas mediada por plásmido.....	34
1.2.5. Relación entre la resistencia a quinolonas y otros antimicrobianos.....	39

1.3. Elementos genéticos móviles implicados en resistencia a antimicrobianos.....	40
1.3.1. Plásmidos.....	40
1.3.2. Secuencias de inserción.....	41
1.3.3. Transposones.....	43
1.3.4. Integrones.....	44
1.4. Familia de las proteínas de pentapéptidos repetidos.....	47
1.4.1. Estructura y distribución de las proteínas de pentapéptidos repetidos en bacterias.....	47
1.4.2. Proteína pentapeptídica McbG.....	50
1.4.3. Proteína pentapeptídica MfpA.....	51
2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO E HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	53
3. MATERIAL.....	57
3.1. Microorganismos y vectores.....	57
3.2. Medios de cultivo.....	59
3.3. Productos químicos y microbiológicos.....	61
3.4. Reactivos para biología molecular.....	63
3.4.1. Reactivos para técnicas de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).....	63
3.4.2. Enzimas de restricción (Enzimas y Tampones).....	63
3.4.3. Reactivos para SSCP (<i>Single-Strand Conformation Polymorphism</i>).....	63
3.4.4. Reactivos para electroforesis en campo pulsante (<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE</i>).....	64
3.4.5. Reactivos para hibridación de ácidos nucleicos.....	64
3.4.6. Reactivos para clonación.....	65
3.4.7. Reactivos para extensión con cebador.....	66
3.4.8. Agarosas y tampones de electroforesis.....	66

3.5. Soluciones tampón.....	67
3.6. Antimicrobianos.....	67
3.7. Reactivos para aislamiento de ADN.....	68
3.8. Reactivos para aislamiento de ARN.....	74
4. MÉTODOS.....	75
4.1. Aislamiento de los microorganismos e identificación.....	75
4.2. Aislamiento de ADN cromosómico.....	75
4.3. Aislamiento de ADN plasmídico.....	77
4.4. Técnicas de PCR (<i>Polimerase Chain Reaction</i>).....	79
4.5. Epidemiología molecular.....	80
4.5.1. Biotipia.....	80
4.5.2. REP-PCR (<i>Repetitive Extragenic Palindromic-PCR</i>).....	81
4.5.3. PCR aleatoria de secuencias polimórficas (<i>Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD-PCR</i>).....	82
4.5.4. Electroforesis en campo pulsante (PFGE).....	84
4.6. Ensayos de movilidad horizontal (Experimentos de conjugación).....	85
4.7. Estudios de sensibilidad a antimicrobianos.....	87
4.7.1. Preparación de los antimicrobianos.....	87
4.7.2. Método de microdilución.....	90
4.7.3. Método de difusión en gradiente (Etest).....	90
4.7.4. Método de difusión en disco.....	90
4.8. Estudio de mutaciones en ADN girasa y Topoisomerasa IV.....	91
4.8.1. Amplificación de ADN girasa y Topoisomerasa IV.....	91
4.8.2. SSCP (<i>Single-Strand Conformation Polymorphism</i>).....	91
4.8.3. Secuenciación de las regiones de resistencia a quinolonas (<i>Quinolone Resistance Determining Region, QRDR</i>) de los genes <i>gyrA</i> y <i>parC</i>	92

4.9. Evaluación del número de copias del gen <i>qnrA</i>	92
4.10. Estudio de las estructuras genéticas en las que se encuentra el gen <i>qnrA</i>	94
4.10.1. Análisis por “Southern-blot”.....	94
4.10.2. “Colony-blot”.....	99
4.10.3. Clonación de las estructuras que contienen <i>qnrA</i>	99
4.10.4. Secuenciación.....	104
4.11. Análisis de la expresión del gen <i>qnrA</i>	104
4.11.1. Aislamiento y purificación de ARN.....	105
4.11.2. Análisis por “Northern-blot”.....	107
4.11.3. Determinación del punto de inicio de la transcripción y de las regiones promotoras.....	109
4.12. Evaluación de la sensibilidad antimicrobiana en cepas que contienen el gen <i>qnrA</i> con diferentes sistemas automáticos.....	116
4.13. Eficacia de fluoroquinolonas en la neumonía experimental murina por cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> productoras de QnrA.....	118
4.13.1. Cepas bacterianas, antimicrobianos y animales.....	118
4.13.2. Sensibilidad <i>in vitro</i>	118
4.13.3. Curvas de letalidad.....	119
4.13.4. Parámetros farmacocinéticos.....	119
4.13.5. Modelo de neumonía experimental en ratón.....	121
4.13.6. Tratamiento antimicrobiano.....	121
4.13.7. Selección y caracterización de mutantes resistentes.....	123
5. RESULTADOS.....	129
5.1. Estudio de la prevalencia del gen <i>qnrA</i>	129
5.2. Epidemiología molecular de aislados que contienen el gen <i>qnrA</i>	136
5.3. Movilidad del gen <i>qnrA</i>	137
5.3.1. Localización plasmídica.....	137
5.3.2. Ensayos de conjugación.....	139

5.4. Sensibilidad antimicrobiana de las cepas que presentan <i>qnrA</i>	143
5.5. Evaluación del número de copias de <i>qnrA</i>	143
5.6. Estructuras genéticas en las que se encuentra el gen <i>qnrA</i>	145
5.7. Expresión del gen <i>qnrA</i>	150
5.7.1. Niveles basales de transcripción del gen <i>qnrA</i>	150
5.7.2. Efecto de las quinolonas en la expresión del gen <i>qnrA</i>	152
5.7.3. Punto de inicio de la transcripción y regiones promotoras.....	154
5.8. Origen de la resistencia a quinolonas mediada por plásmidos.....	160
5.8.1. Origen del gen <i>qnrA</i>	160
5.8.2. Fuentes de posibles determinantes de resistencia a quinolonas tipo <i>qnr</i> (Familia <i>Vibrionaceae</i>).....	164
5.9. Estudio de la sensibilidad a quinolonas y β -lactámicos en cepas que contienen el gen <i>qnrA</i> con diferentes sistemas automáticos.....	168
5.10. Eficacia de fluoroquinolonas en la neumonía experimental murina por cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> productoras de QnrA.....	173
5.10.1. Sensibilidad <i>in vitro</i>	173
5.10.2. Curvas de letalidad.....	175
5.10.3. Estudios farmacocinéticos.....	178
5.10.4. Estudios histopatológicos.....	178
5.10.5. Eficacia terapéutica en la neumonía experimental.....	180
5.10.6. Selección y caracterización de mutantes resistentes.....	182
6. DISCUSIÓN.....	185
7. CONCLUSIONES.....	213
8. BIBLIOGRAFÍA.....	217
9. ANEXOS.....	243

LISTADO DE FIGURAS

- Figura 1.** Síntesis de ácido nalidíxico a partir de cloroquina.
- Figura 2.** Estructura del anillo bicíclico 4-oxo-1,4 dihidroquinoleína.
- Figura 3.** Estructura química de los subgrupos de quinolonas.
- Figura 4.** Quinolonas de primera generación.
- Figura 5.** Quinolonas de segunda generación.
- Figura 6.** Quinolonas de tercera generación.
- Figura 7.** Quinolonas de cuarta generación.
- Figura 8:** Representación esquemática del mecanismo de acción de las topoisomerasas tipo II.
- Figura 9.** Modelo de Shen. A: Puntos más importantes en la interacción de las quinolonas. B: Interacción quinolonas-ADN.
- Figura 10.** Ilustración del sitio de unión de las quinolonas en la interfase de las subunidades GyrA-GyrB.
- Figura 11.** Porcentaje de resistencia a ciprofloxacino en diferentes especies bacterianas.
- Figura 12.** Región que determina la resistencia a quinolonas (QRDR) en la subunidad GyrA de la ADN girasa en 9 especies bacterianas diferentes.
- Figura 13.** Miembros representativos de las cinco familias caracterizadas de sistemas de expulsión activa.
- Figura 14.** Mecanismo de acción de los sistemas de expulsión multicomponente en bacterias gramnegativas (Sistema AcrAB-TolC).
- Figura 15.** Organización de una secuencia de inserción (IS).
- Figura 16.** Estructura de los integrones de clase 1.
- Figura 17.** Modelo estructural en β -hélice de las proteínas con repeticiones pentaméricas.
- Figura 18.** Resumen de la técnica de 5'RACE usada para la determinación del punto de inicio de la transcripción.
- Figura 19.** Secuencia de los iniciadores usados en la técnica de 5'RACE.
- Figura 20.** Extracción sanguínea del plexo periorbital de los ratones anestesiados.
- Figura 21.** Manejo de los animales durante la inoculación bacteriana y posterior tratamiento.
- Figura 22.** PCR de las cepas de *K. pneumoniae* que contienen el gen *qnrA* detectadas en el estudio de prevalencia A y sus respectivos transconjugantes que contienen o no dicho gen.
- Figura 23.** Detección mediante Dot-blot del gen *qnrA* en las colecciones de cepas estudiadas (Estudio de prevalencia A).
- Figura 24.** Antibiogramas de las cepas *K. pneumoniae* K149 y *E. cloacae* Qn17.

Figura 25. Patrón de PFGE de cuatro cepas de *K. pneumoniae* aisladas en EE.UU. que contienen el gen *qnrA*.

Figura 26. Patrón de REP-PCR de las cuatro cepas de *K. pneumoniae* aisladas en EE.UU. que contienen el gen *qnrA*.

Figura 27. Perfil plasmídico de las cepas de *K. pneumoniae* detectadas en el estudio de prevalencia A que contienen el gen *qnrA* y detección mediante hibridación con sonda del plásmido hospedador de *qnrA*.

Figura 28. Antibiograma de los tranconjugantes que contienen el gen *qnrA* procedentes de las cepas *K. pneumoniae* UAB1, *K. pneumoniae* N5 y *K. pneumoniae* 1960.

Figura 29. Antibiograma de los tranconjugantes que no contienen el gen *qnrA* procedentes de las cepas *K. pneumoniae* N5, *K. pneumoniae* 1960 y *K. pneumoniae* 1132.

Figura 30. Dot-blot semicuantitativo del número de copias del gen *qnrA*.

Figura 31. Digestión con diferentes enzimas de restricción del fragmento de PCR obtenido con los cebadores que hibrida en los genes *orf513* y *sul1*.

Figura 32. Comparación de las estructuras genéticas que circundan al gen *qnrA* en los plásmidos de las cepas *K. pneumoniae* UAB1 (pMG252), *K. pneumoniae* N5, *K. pneumoniae* 1960 y *K. pneumoniae* 1132.

Figura 33. Digestión con *EcoRI* de algunos de los transformantes obtenidos al clonar ADN plasmídico digerido de la cepa *K. pneumoniae* 1132 sobre el vector pUC18.

Figura 34. Representación esquemática del integrón de clase 1 que contiene a los genes *qnrA* y *bla_{VEB-1}*.

Figura 35. Expresión basal de *qnrA* en los tranconjugantes procedentes de las cepas *K. pneumoniae* UAB1, *K. pneumoniae* N5 y *K. pneumoniae* 1960.

Figura 36. Northern-blot del efecto de diferentes concentraciones de ciprofloxacino sobre la expresión de *qnrA*.

Figura 37. Northern-blot de la expresión en presencia y ausencia de quinolonas del gen *bla_{FOX-5}* como control interno en los ensayos de expresión del gen *qnrA*.

Figura 38. Análisis comparativo mediante Northern-blot del incremento de la expresión de *qnrA* tras 4 horas de incubación en presencia de ciprofloxacino (CIP) o moxifloxacino (MXF) a 0.4 veces la CMI.

Figura 39. Figura esquemática de las dos estructuras en las que el gen *qnrA* presenta una colinearidad con el elemento CR1.

Figura 40. Figura esquemática de las diferentes estructuras estudiadas en las que se identificó colinearidad entre un elemento CR1 y distintos genes de resistencia a antimicrobianos.

Figura 41. Secuencia detallada de las regiones promotoras de los genes *qnrA*, *bla_{CTX-M-9}*, *dfrA10*, *bla_{CTX-M-2}* y *bla_{SPM-1}*.

Figura 42. (Panel 1) Electroforesis en campo pulsante de ADN total de *Shewanella sp.* digerido con I-Ceu-I. (Panel 2) Southern-blot realizado con una sonda específica para un fragmento de ARN ribosómico 16S-23S. (Panel 3) Southern-blot realizado con una sonda específica para un fragmento interno del gen *qnrA*.

Figura 43. Comparación de las secuencias aminoacídicas de los determinantes de tipo QnrA mediados por plásmido con las secuencias de las cepas de *Shewanella algae*.

Figura 44. Comparación de las secuencias aminoacídicas de los determinantes mediados por plásmido QnrA1, QnrB y QnrS con las proteínas cromosómicas de la familia *Vibrionaceae*.

Figura 45. Recuento de bacterias viables en los ensayos de las curvas de letalidad con ciprofloxacino (CIP), levofloxacino (LEV) y moxifloxacino (MXF) en las cepas *K. pneumoniae* C2 y *K. pneumoniae* C2(pMG252) a una concentración de 1XCMI, en comparación con un control sin antibióticos.

Figura 46. Recuento de bacterias viables en los ensayos de las curvas de letalidad con ciprofloxacino (CIP), levofloxacino (LEV) y moxifloxacino (MXF) en las cepas *K. pneumoniae* C2 y *K. pneumoniae* C2(pMG252) a una concentración de 4XCMI, en comparación con un control sin antibióticos.

Figura 47. Selección de mutantes sobre MHA a 4xCMI o en placas de gradiente.

Figura 48. SSCP de las secuencias de *gyrA* de la cepa *K. pneumoniae* C2pMG252 y mutantes en los que no se detectaron diferencias en la movilidad electroforética.

Figura 49: Distribución geográfica de genes de tipo *qnr*.

Figura 50. Comparación de la diversidad de entornos genéticos de *qnrA*.

Figura 51. Representación esquemática de las estructuras CR1-*qnrA* descritas.

Figura 52. Entorno genético de *qnrS*.

LISTADO DE TABLAS

- Tabla 1.** Clasificación de las quinolonas según su estructura química.
- Tabla 2.** Tipos de topoisomerasas bacterianas.
- Tabla 3.** Parámetros farmacocinéticos de las quinolonas más usadas en España.
- Tabla 4.** Principales mutaciones en la ADN girasa y la Topoisomerasa IV en distintas especies patógenas.
- Tabla 5.** Algunos de los principales sistemas de expulsión activa que afectan a la resistencia a fluoroquinolonas.
- Tabla 6.** Algunas proteínas que contienen repeticiones pentaméricas.
- Tabla 7.** Composición aminoacídica de las repeticiones pentapeptídicas.
- Tabla 8.** Condiciones normalmente usadas para cada reacción de PCR.
- Tabla 9.** Condiciones usadas para cada reacción de REP-PCR.
- Tabla 10.** Condiciones usadas para cada reacción de RAPD-PCR.
- Tabla 11.** Solventes y diluyentes usados para la preparación de los antimicrobianos.
- Tabla 12.** Cinética de marcaje de la sonda usando la enzima *Klenow* ADN polimerasa.
- Tabla 13.** Condiciones de PCR para el marcaje de la sonda con *Taq* ADN polimerasa.
- Tabla 14.** Condiciones para la reacción de ligación de productos de PCR.
- Tabla 15.** Condiciones de desfosforilación del vector pBK-CMV.
- Tabla 16.** Condiciones de ligación de fragmentos de ADN digeridos.
- Tabla 17.** Condiciones de desnaturalización de ARN.
- Tabla 18.** Cantidades de ARN y cebador a usar para la síntesis de ADNc.
- Tabla 19.** Condiciones de la reacción para la síntesis de ADNc.
- Tabla 20.** Condiciones para la adición de una cola de citosinas.
- Tabla 21.** Condiciones PCR1.
- Tabla 22.** Condiciones PCR2.
- Tabla 23.** Oligonucleótidos usados en esta tesis doctoral.
- Tabla 24.** Origen de los 425 aislados clínicos de *K. pneumoniae* y *E. coli* usados en el estudio de prevalencia A.
- Tabla 25.** Sensibilidad a quinolonas, β -lactámicos y otros antimicrobianos de los aislados clínicos que contienen *qnrA* y sus respectivos transconjugantes (TC) obtenidos en los estudios de prevalencia A y B.

Tabla 26. Valores del número relativo de copias de *qnrA* de las cepas *K. pneumoniae* UAB1, *K. pneumoniae* N5, *K. pneumoniae* 1960 y *K. pneumoniae* 1132 y sus respectivos transconjugantes (TC).

Tabla 27. Características y perfil de resistencia de las cepas *K. pneumoniae* UAB1, *K. pneumoniae* N5 y *K. pneumoniae* 1960 y sus transconjugantes (TC).

Tabla 28. Características de los aislados clínicos usados en este estudio que contienen un elemento CR asociado a un gen de resistencia a antimicrobianos.

Tabla 29. CMI (µg/ml) de quinolonas mediante tiras de Etest para *Vibrio vulnificus* CIP103196, *Vibrio parahaemolyticus* CIP71.2, *Shewanella algae* CIP106454 y los clones en *E. coli* TOP10 que contienen los plásmidos recombinantes pVV-1, pVP-1, pPP-1 y pSA-1 que expresan los determinantes de resistencia a quinolonas QnrVV, QnrVP, QnrPP y QnrA3, respectivamente, y la cepa de referencia *E. coli* TOP10.

Tabla 30. Porcentajes (%) de identidad aminoacídica las proteínas de tipo Qnr codificadas por cromosoma y las proteínas QnrA, QnrB y QnrS mediadas por plásmido.

Tabla 31. Comparación de las CMI (µg/ml) obtenidas por el método de referencia de microdilución y los cuatro sistemas automáticos evaluados.

Tabla 32. Errores observados en la sensibilidad o resistencia a quinolonas y β-lactámicos cometidos por los distintos sistemas automáticos cuando se comparó con el método de referencia.

Tabla 33. Sensibilidad (CMI y CMB en µg/ml) a ciprofloxacino, levofloxacino y moxifloxacino de la cepas *K. pneumoniae* C2 y *K. pneumoniae* C2. Se indican las frecuencias de aparición de mutantes *in vitro* e *in vivo* para las tres quinolonas y las CMI de éstos.

Tabla 34. Parámetros farmacodinámicos/farmacocinéticos de ciprofloxacino, levofloxacino y moxifloxacino para las cepas *K. pneumoniae* C2 (C2) y *K. pneumoniae* C2pMG252 (C2pMG252).

Tabla 35. Efecto del tratamiento sobre la tasa de supervivencia y el aclaramiento bacteriano en pulmón de ratón en el caso de la cepa *K. pneumoniae* C2.

Tabla 36. Efecto del tratamiento sobre la tasa de supervivencia y el aclaramiento bacteriano en pulmón de ratón en el caso de la cepa *K. pneumoniae* C2(pMG252).

Tabla 37. Valores publicados de sensibilidad (µg/ml) a diferentes quinolonas en cepas clínicas de *E. coli* y *K. pneumoniae* que presentan el gen *qnrA* y sus transconjugantes derivados.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Quinolonas

1.1.1. Origen, estructura química y clasificación

Origen

Las quinolonas tienen su origen sintético en la degradación de sustratos alcaloides cuando Price J.R. en 1949 obtuvo un compuesto inactivo, durante el proceso de síntesis de la cloroquina (un agente contra la malaria), al que denominó quinolona.²¹¹ En 1962, se sintetizó un derivado de las quinolonas, el ácido nalidíxico (1-etilo-1,4 dihidro-7-metilo-4-oxo-1,8 naftiridina-3-ácido carboxílico)¹²⁹ (Figura 1), activo frente a algunas bacterias gramnegativas y capaz de alcanzar una concentración alta en orina. Éste fue el primer derivado quinolónico usado en clínica. Sin embargo, su uso se limitó principalmente al tratamiento de infecciones del tracto urinario (ITUs). Posteriormente se sintetizaron otros derivados quinolónicos con características similares como el ácido oxolínico, el ácido piromídico o la flumequina. La síntesis de ácido pipemídico en 1973 produjo un notable avance, ampliando el espectro antibacteriano y las propiedades farmacocinéticas.

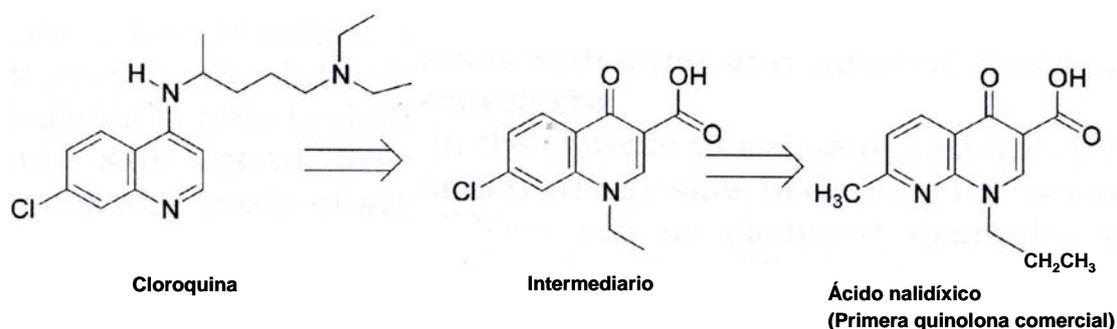


Figura 1. Síntesis de ácido nalidíxico a partir de cloroquina.

La importancia de este grupo químico radicó en las modificaciones que a partir de los años 1970 se introdujeron en el núcleo de la molécula de 4-quinolona (Figura 2) y que han originado un gran número de agentes antibacterianos. La adición de un átomo de flúor en la posición 6 y un grupo piperazinil en la posición 7 potenció en gran medida su actividad dando lugar a las fluoroquinolonas.²⁸⁴ En 1978 apareció la primera fluoroquinolona usada en clínica, norfloxacinó, que con respecto a las anteriores ofrecía mejor espectro de acción, potencia, farmacodinamia, y menor capacidad para seleccionar mutantes.²⁸⁴ Desde entonces ha continuado el desarrollo de nuevos compuestos fluorados con el objetivo de mejorar el espectro de acción, hacerlos más potentes, con una mejor farmacodinámica y con menos efectos adversos.⁸ No fue hasta fines de la década de 1980 y principios de los años 1990 cuando se introdujeron en clínica nuevas fluoroquinolonas con actividad frente a bacterias gramnegativas y a grampositivas, e incluso frente a anaerobios.²³⁸

Estructura química y clasificación

El anillo bicíclico 4-oxo-1,4 dihidroquinoleína constituye el núcleo central de la estructura de las quinolonas. (Figura 2)

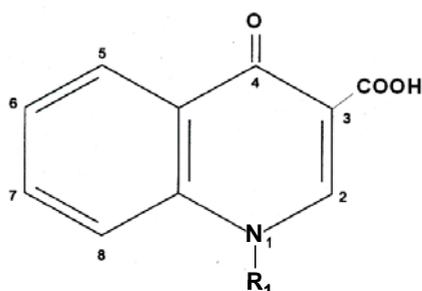


Figura 2. Estructura del anillo bicíclico 4-oxo-1,4 dihidroquinoleína.

En función de las sustituciones del núcleo fundamental de las quinolonas por átomos de nitrógeno, las quinolonas se clasifican en cuatro grupos principales: (Figura 3 y Tabla 1)

- Quinoleínas
- Cinolinas
- Naftiridinas
- Piridopirimidinas

Atendiendo al número de anillos que componen la molécula se diferencian cuatro grupos de compuestos: monocíclicos, bicíclicos, tricíclicos y tetracíclicos.²⁸

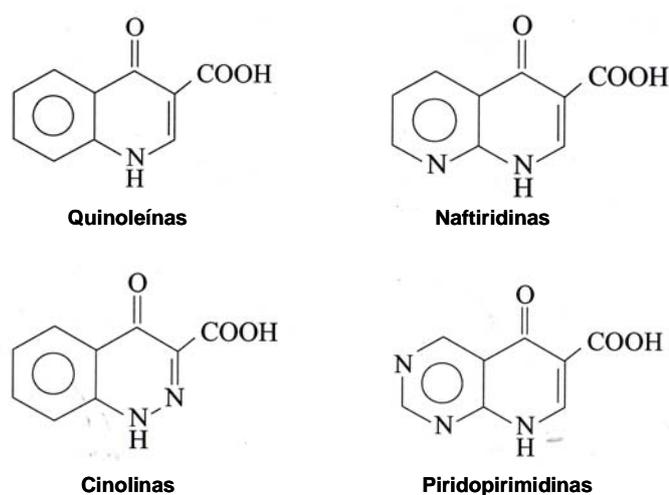


Figura 3. Estructura química de los subgrupos de quinolonas.

De un modo creciente se ha empezado a usar una nomenclatura similar a la de la cefalosporinas, mediante generaciones. Así, las de primera generación serían las históricamente más antiguas. Se caracterizan por la ausencia de un radical 6 fluorado, excepto la flumequina. Tienen un reducido espectro de actividad y son sólo útiles en ITUs (Figura 4).^{77,78,232}

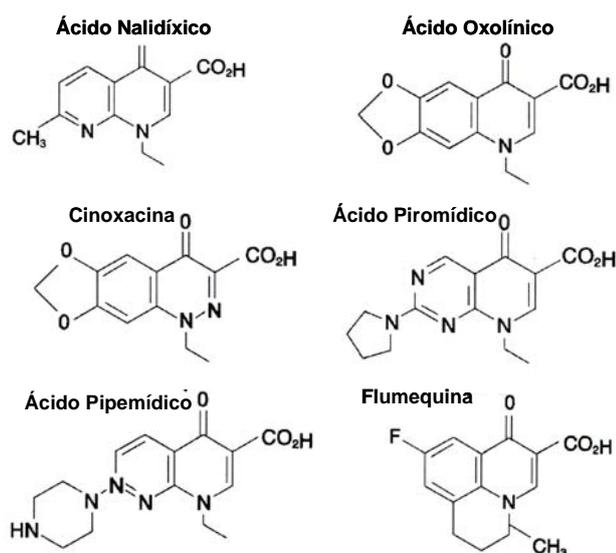


Figura 4. Quinolonas de primera generación.

Tabla 1. Clasificación de las quinolonas según su estructura química.

Derivados de la quinoleína				Derivados de la naftiridina		Derivados de la cinolina	Derivados de la piridopirimidina	
No Fluoradas	Fluoradas			No Fluoradas	Fluoradas			
	Monofluoroquinolonas	Difluoroquinolonas	Trifluoroquinolonas					
Ácido oxolínico Rosoxacino Tioxacino Droxacino Miloxacino	Flumequina							
	Norfloxacino							
	Ofloxacino							
	Ciprofloxacino							
	Perfloxacino							
			Lomefloxacino	Flerofloxacino				
			Difloxacino	Tosufloxacino	Ácido nalidíxico	Enoxacino	Cinoxacino	Ácido piromídico Ácido pipemídico
			Esparfloxacino	Trovafloxacino				
		Rufloxacino						
		Nadifloxacino						
		Grepafloxacino						
		Clinafloxacino						

Las quinolonas de segunda generación se caracterizan por la presencia constante de un átomo de flúor en la posición 6 y de piperazina o metilpiperazina en la posición 7 de la molécula. La molécula clásica es el ciprofloxacino. Se usan en infecciones graves de tejidos osteoarticulares, digestivos, tejidos blandos, infecciones respiratorias e infecciones de transmisión sexual (Figura 5).^{58,265} La actividad de las quinolonas de primera y segunda generación es moderada sobre *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) y *Streptococcus pneumoniae*, y nula sobre bacterias anaerobias.

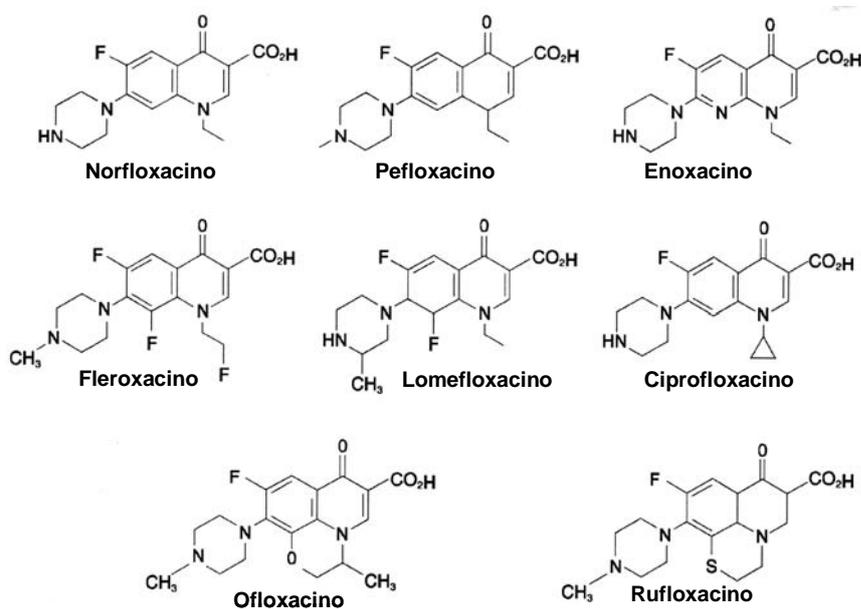


Figura 5. Quinolonas de segunda generación.

Las quinolonas de tercera generación presentan una mayor actividad frente a bacterias grampositivas y anaerobios, manteniendo su actividad frente a enterobacterias. Éstas se caracterizan químicamente por la presencia de grupos cíclicos aminados en la posición C7 (aminopirrolidinas y grupos azabicíclicos). También se encuentran sustituciones en las posiciones C5 y C8 (Figura 6).^{77,197,247} Son una importante alternativa frente a *S. pneumoniae* y estafilococos sensibles a meticilina, pero no frente a SARM.

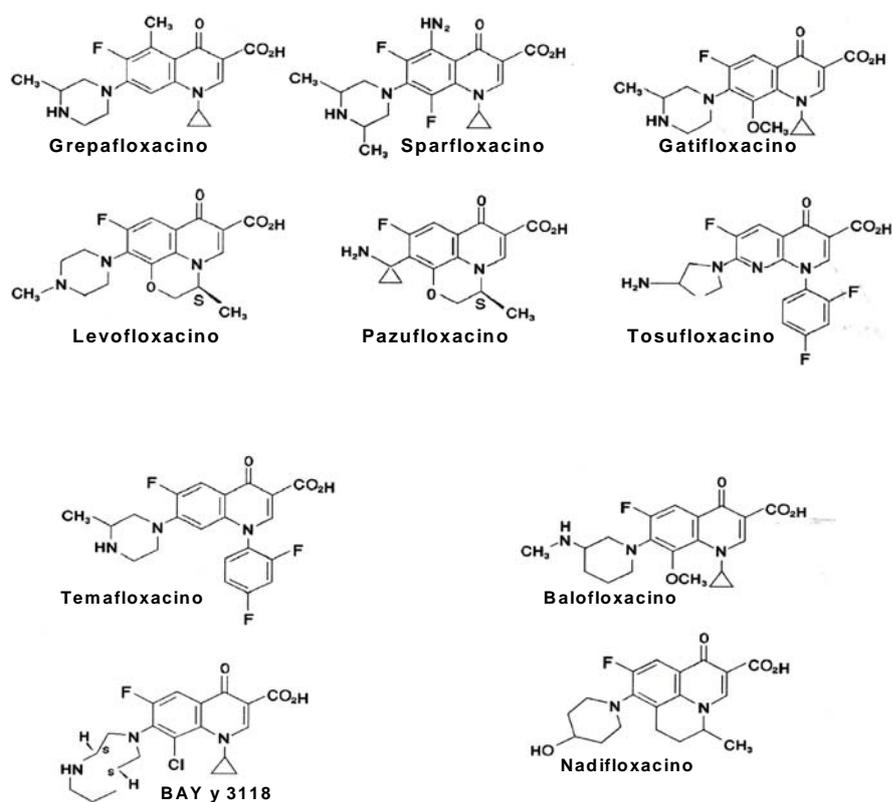


Figura 6. Quinolonas de tercera generación.

Hay autores que señalan la existencia de una cuarta generación de quinolonas que poseen muy buena actividad anti-anaerobia (Figura 7).^{77,247}

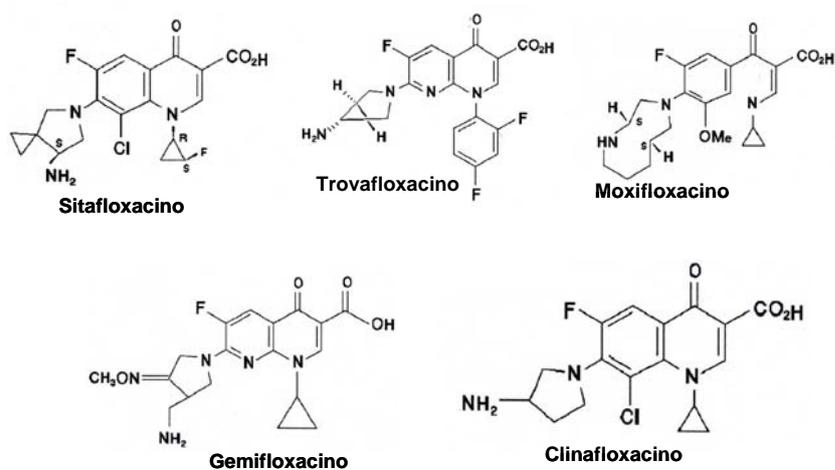


Figura 7. Quinolonas de cuarta generación.

Las nuevas quinolonas difieren entre ellas básicamente en la naturaleza de los sustituyentes unidos al nitrógeno de la posición 1 y en los sustituyentes del anillo piperazínico o pirrolidínico localizado en la posición 7 (Figuras 2-7).

1.1.2. Relación estructura-actividad

Al ser agentes sintéticos, existe un notable conocimiento sobre la estructura básica de la 4-quinolonas, sus sustituyentes (naturaleza y relaciones espaciales entre los mismos), y las propiedades microbiológicas que determinan.^{37,76,247} En base a los diferentes radicales presentes en las posiciones de la molécula base 4-quinolona (Figuras 2-7), podemos conocer la influencia de cada uno de ellos sobre su actividad.^{28,232}

- En la posición N-1 el sustituyente de mayor importancia es el grupo ciclopropil, que combina propiedades estéricas, espaciales y de interacción electrónica favorables. Ciprofloxacino es el ejemplo más importante con esta sustitución.
- En la posición C2 no se han realizado modificaciones, manteniendo el radical hidrógeno, debido a su proximidad al sitio de unión con la diana.
- Las posiciones C3 y C4 contienen los grupos carboxilo y ceto, respectivamente, que participan en la interacción con las topoisomerasas bacterianas, uniéndose al complejo ADN-Topoisomerasa.
- Las sustituciones en la posición C5 afectan a las características farmacocinéticas. Un grupo amino puede incrementar la absorción, distribución y actividad sobre especies grampositivas. Los grupos metilo favorecen las propiedades farmacocinéticas y la cobertura sobre *S. pneumoniae*.²⁶⁷ El aumento en la longitud del radical hace que disminuya la potencia.

- La presencia de un átomo de flúor en la posición C6 produce un aumento notable de la actividad bactericida. Este sustituyente aumenta tanto la unión al complejo ADN-Topoisomerasa (2-17 veces) como la penetración intracelular (1-70 veces) en relación a derivados no fluorados. Debido a este cambio se producen aumentos de hasta 10 veces en la inhibición de la ADN girasa y disminuciones de 100 veces en la CMI.
- En general, las quinolonas con grupos lineales o pequeños en posición C7 poseen menor potencia. La presencia de anillos heterocíclicos de 5 ó 6 miembros tienen buena actividad biológica (potencia, espectro de acción y farmacocinética). Las pirrolidinas y las piperazinas aumentan la potencia en bacterias gramnegativas y bacterias grampositivas, respectivamente.
- La presencia de halógenos en la posición C8, como cloro o flúor, aumenta la actividad antianaerobia y la adsorción. Sin embargo, la presencia de estos sustituyentes se ha asociado a fenómenos de fototoxicidad.

Por otro lado, al ser tanto el ADN como las topoisomerasas ópticamente activos, hay que tener en cuenta el carácter quiral de algunas fluoroquinolonas, ya que un enantiómero puede presentar mayor actividad que los demás. Levofloxacino (el isómero levógiro) es 12 veces más activo que su respectivo isómero dextrógiro. La diferencia se atribuye al modo de interacción con el complejo ADN-Topoisomerasa.¹⁵⁷

Hay que hacer notar que si bien ciertos sustituyentes pueden provocar cambios en la actividad biológica y/o química de la quinolona, las características finales son el resultado de la interacción de todos los radicales y el núcleo central de estos antimicrobianos.⁷⁸

1.1.3. Mecanismo de acción

El modo por el que las quinolonas ejercen su acción inhibitoria frente a las células bacterianas se conoció con posterioridad a su síntesis química y uso clínico. Años más tarde se demostró que la ADN girasa, una topoisomerasa tipo II desconocida previamente y esencial para la topología del ADN, era una importante diana de estos agentes.⁷⁰ Posteriormente se demostró que la ADN girasa es la principal diana de las quinolonas en bacterias gramnegativas. Mucho más tarde, en 1990, se descubrió una nueva topoisomerasa tipo II, la Topoisomerasa IV, que es la diana primaria para muchas fluoroquinolonas en bacterias grampositivas.¹¹⁸ En ciertas especies bacterianas la actividad de las quinolonas se debe a su interacción con ambas enzimas.²⁴⁴

Antes de analizar el modo en el que las quinolonas interaccionan con las topoisomerasas, detallaremos brevemente como penetran en la célula bacteriana. Al estar las dianas de las quinolonas localizadas en el citoplasma celular, éstas deben atravesar la membrana citoplasmática, la cual cumple una serie de funciones de barrera (determinada por la bicapa lipídica) importantes para prevenir la penetración de drogas como las quinolonas.¹⁶⁸ Tanto en grampositivos como en gramnegativos existe una capa externa de peptidoglucano, más delgada en caso de gramnegativos, que no interfiere con la penetración de estas drogas. En las bacterias gramnegativas, existe una membrana adicional, la membrana externa, que constituye una barrera muy eficaz, formada por una doble capa asimétrica de lipopolisacárido (LPS) y fosfolípidos. El LPS contiene un gran número de ácidos grasos saturados, que disminuyen la fluidez considerablemente con respecto a la que tendría una membrana biológica constituida sólo por fosfolípidos.¹⁶⁸

Para la penetración a través de la membrana externa de las bacterias gramnegativas, las proteínas más importantes son las porinas.^{167,172} Estas proteínas forman canales hidrofílicos implicados en la entrada de nutrientes y la salida de productos de desecho. Permiten la difusión de moléculas hidrofílicas de pequeño tamaño, que es el caso de muchos antimicrobianos, incluyendo las

quinolonas. Este proceso está determinado por el tamaño, la carga y las características hidrofílicas o lipofílicas de los sustratos.

El número de porinas y la eficacia de éstas en la membrana externa es uno de los principales factores que delimitan la permeabilidad de las especies bacterianas en gramnegativos. En especies como *Pseudomonas aeruginosa* o *Acinetobacter baumannii*, la existencia de un menor número de porinas y de un diámetro inferior a las de *E. coli* explica en parte la mayor resistencia natural de estas especies a la mayoría de agentes antimicrobianos.^{230,289}

Tras el paso a través de las porinas de membrana externa, las quinolonas difunden a través de la bicapa lipídica de la membrana citoplásmica en un proceso dependiente del potencial de Donan y del gradiente de pH.¹⁷¹

Las topoisomerasas fueron descritas por primera vez en 1971 por James Wang quien describió la Topoisomerasa I, enzima capaz de eliminar el superenrollamiento negativo del ADN bacteriano.²⁷¹ En *E. coli* existen 4 topoisomerasas diferentes que se clasifican según su mecanismo de acción (Tabla 2). Las topoisomerasas tipo I (Topoisomerasa I y Topoisomerasa III) cortan una de las cadenas del ADN bicatenario, pasan la otra cadena a través de la rotura y sellan la rotura. En contraste, las topoisomerasas de tipo II (ADN girasa y Topoisomerasa IV) rompen ambas cadenas en el ADN, pasan otro ADN bicatenario a través de la rotura y sellan ambas cadenas coordinadamente (Figura 8).¹¹⁸ En ambos casos el proceso es energéticamente desfavorable, consumiéndose ATP durante el mismo.²⁷² Estos enzimas posibilitan el superenrollamiento negativo del ADN en bacterias, fundamental para los procesos de replicación y transcripción (Tabla 2).

Las dos topoisomerasas tipo II de *E. coli* son esenciales para la vida celular, como se ha puesto de manifiesto mediante la evidencia de mutaciones letales en estos genes.¹⁸⁰ La ADN girasa es la única capaz de introducir enrollamiento negativo en el ADN, lo cual es fundamental para la densidad del mismo.

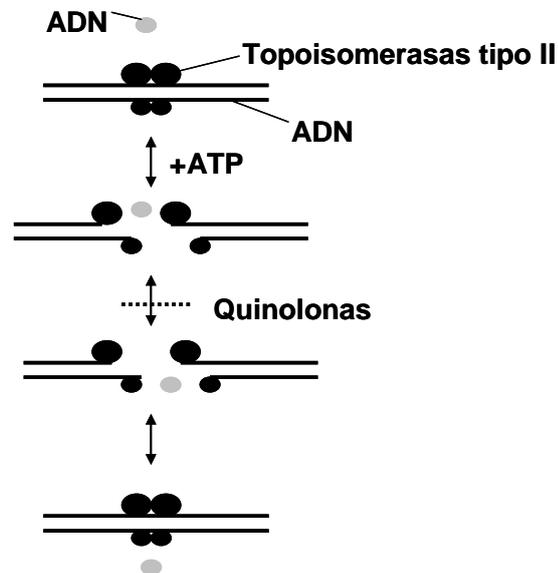


Figura 8. Representación esquemática del mecanismo de acción de las topoisomerasas tipo II.

Tabla 2. Tipos de topoisomerasas bacterianas.

Topoisomerasa	Tipo	Función principal	Genes	Año descubrimiento
Topoisomerasa I	I	Elimina superenrollamiento negativo	<i>topA</i>	1971
Topoisomerasa II (ADN girasa)	II	Introduce superenrollamiento negativo Elimina superenrollamiento positivo (y negativo) (Decatenasa)	<i>gyrA/gyrB</i>	1976
Topoisomerasa III	I	(Elimina superenrollamiento negativo) (Decatenasa)	<i>topB</i>	1989
Topoisomerasa IV	II	Elimina superenrollamiento positivo y negativo Decatenasa	<i>parC/parE</i>	1990

Las actividades entre paréntesis se han demostrado con enzima purificada *in vitro*, pero no *in vivo*.

La ADN girasa y la Topoisomerasa IV de *E. coli* presentan una estructura similar. Ambas están formadas por tetrámeros de parejas de dos tipos de subunidades. Las subunidades GyrA (875 aminoácidos) y GyrB (804 aminoácidos) de la ADN girasa (codificadas por los genes *gyrA* y *gyrB*, respectivamente) son similares en su secuencia aminoacídica a las subunidades ParC (752 aminoácidos) y ParE (630 aminoácidos) de la Topoisomerasa IV (codificadas por los genes *parC* y *parE*, respectivamente).^{118,272} Concretamente, existe una identidad aminoacídica del 36% entre ParC y GyrA, y del 40% entre ParE y GyrB. La zona más conservada corresponde a la región amino terminal del enzima en las subunidades GyrA y ParC. Esta región contiene los residuos de tirosina del sitio activo del enzima.

La ADN girasa está implicada, principalmente, en la introducción de superenrollamiento negativo en el ADN, aunque también interviene en la separación de los cromosomas hijos, en la iniciación del proceso de replicación y en la resolución de nudos superenrollados en el nucleóide bacteriano.⁹⁹ La expresión a nivel transcripcional de los genes de la ADN girasa está controlada por el estado de enrollamiento del ADN. Todas las funciones atribuidas a este enzima requieren que ambas subunidades estén unidas, aunque existen funciones que radican en cada subunidad. GyrA interviene en la rotura del ADN y posterior unión a los extremos 5' libres a través del residuo de Tyr-122. GyrB es la responsable de la hidrólisis de ATP, proporcionando la energía necesaria para que se produzca la reacción.²⁷² Las quinolonas bloquean esta reacción dependiente de ATP mediante la estabilización del complejo ADN-ADN girasa en el momento en que se ha producido la ruptura del ADN, inhibiendo la función enzimática que permite que los extremos libres vuelvan a unirse.¹⁵⁴

La Topoisomerasa IV también requiere ATP para su actividad y su función principal es actuar como decatenasa en la separación de los cromosomas hijos tras la replicación. También es capaz de eliminar superenrollamiento positivo y negativo del ADN.^{154,272}

Es importante destacar que en eucariotas existen topoisomerasas tipo II que conservan una homología con las de bacterias. Sin embargo se ha demostrado que las concentraciones necesarias para inhibir la actividad de las topoisomerasas eucariotas por parte de las quinolonas son unas 100 veces mayores que las necesarias para inhibir las topoisomerasas bacterianas y 50-100 veces mayores que las que se alcanzan en suero y tejidos. Por ello es muy poco probable la toxicidad de las quinolonas a través de esta vía.²⁸⁴

Interacción ADN-Topoisomerasas-Quinolonas

La interacción del ADN, las topoisomerasas y las quinolonas no se conoce con exactitud. Uno de los modelos más aceptado es el propuesto por Shen.²³⁵ Este modelo propone una unión cooperativa entre las quinolonas y el ADN que se basa en la inducción de un sitio de unión en el complejo ADN-ADN girasa en presencia de ATP. Las quinolonas se unirían a una hebra de ADN generada por la actividad de la ADN girasa, produciéndose un efecto cooperativo basado en la fuerte interacción de dos anillos de quinolonas adyacentes dispuestos de modo antiparalelo, así los grupos 3-carboxilo y 4-ceto formarían puentes de hidrógeno con las hebras de ADN. En este modelo los tres puntos más importantes de la quinolona serían: N-1 (que haría posible la autoasociación de las moléculas de quinolonas), 3-carboxilo y 4-ceto (que interaccionarían con el ADN) y C-7 que sería el punto de unión con la ADN girasa (Figura 9). Este modelo no es sólo consistente con todas las evidencias experimentales, sino también tiene importancia en el diseño de nuevas estructuras de quinolonas.

En un modelo alternativo ilustrado por Heddle y Maxwell, la interacción entre las quinolonas y las bases del ADN se apilan y confirma que las regiones de cadena simple son importantes.^{69,87,173} El modelo describe también un sitio de unión para una única quinolona en un bolsillo cercano a la unión de las subunidades GyrA y GyrB. En este modelo, la unión es potenciada por interacciones entre ciertos aminoácidos del enzima y los grupos fosfato del ADN (Figura 10).

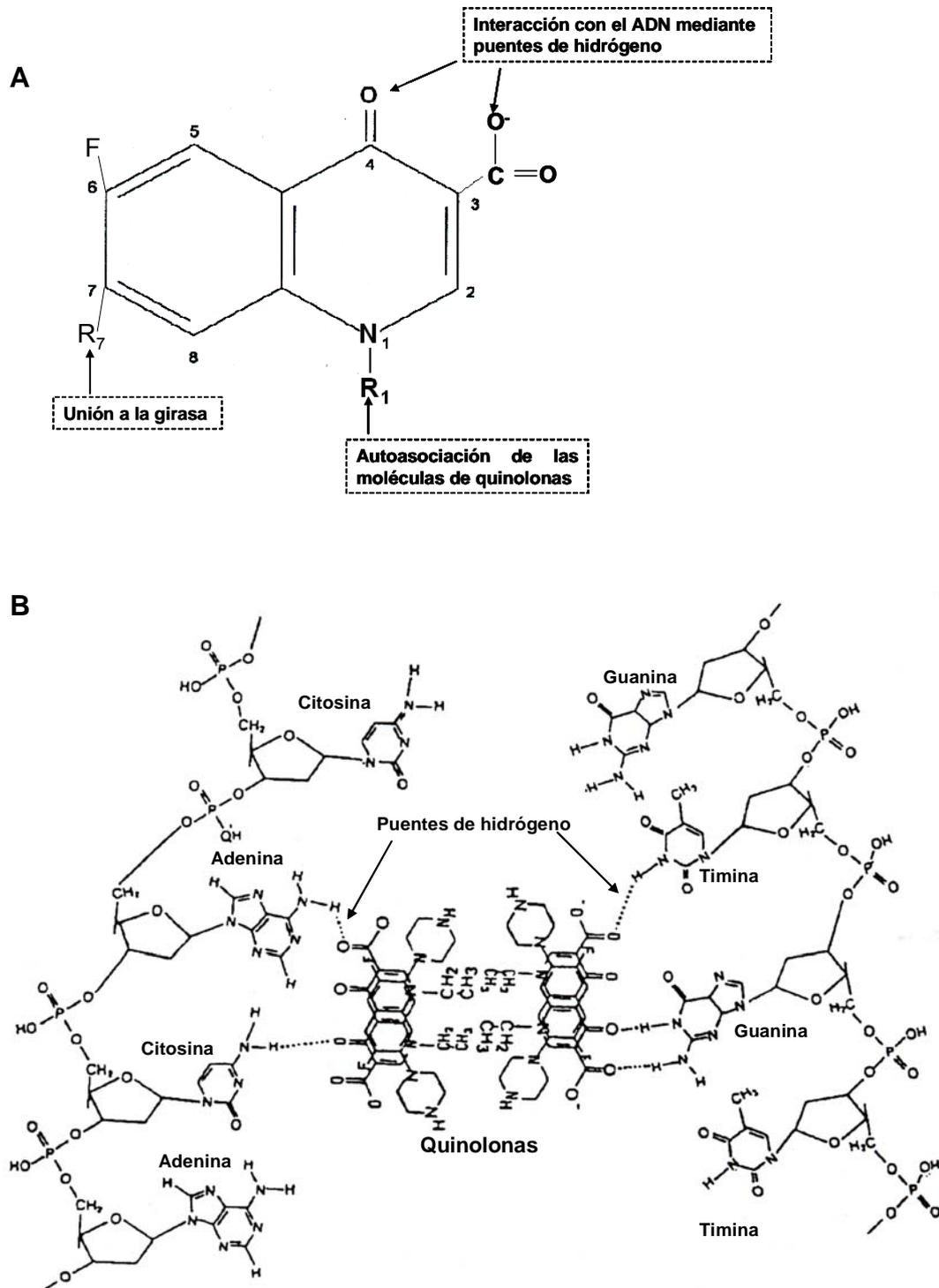


Figura 9. Modelo de Shen. A: Puntos más importantes en la interacción de las quinolonas. B: Interacción quinolona-ADN. Modificado de Mitscher LA.¹⁵⁴

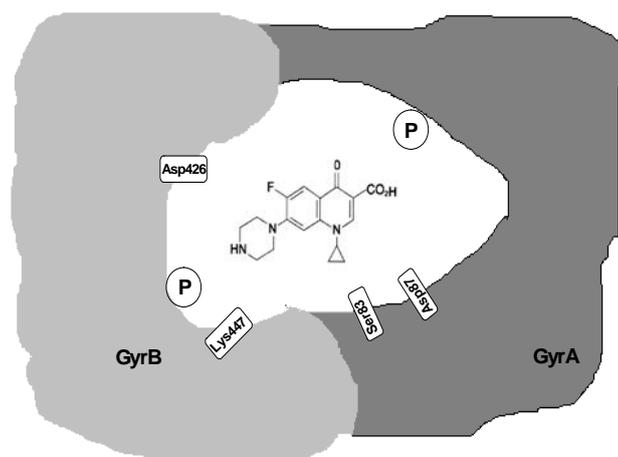


Figura 10. Ilustración del sitio de unión de las quinolonas en la interfase de las subunidades GyrA-GyrB.

Recientemente, Tuma y col. han propuesto que las quinolonas forman un “capuchón” molecular que estabiliza el complejo mediante la formación de enlaces covalentes con los extremos 5’ del ADN cortado.²⁵⁵ Sin embargo, no hay evidencias de la unión covalente entre las quinolonas y el ADN con o sin la ADN girasa como intermediaria o la presencia de extremos cortados.

Es importante señalar que la Topoisomerasa IV no ha sido estudiada con la misma profundidad que la ADN girasa, no siendo aplicable en este caso el modelo de Shen en su totalidad. La homología entre ambas topoisomerasas es del 40%. Existen diferencias en su modo de acción, y, por ejemplo, el bolsillo de unión de la Topoisomerasa IV es mayor que el de la ADN girasa.

Efectos de la quinolonas sobre las bacterias

Los efectos que se producen en las bacterias como consecuencia del tratamiento con quinolonas se puede resumir en:⁹⁹

- Disminución de la introducción de superenrollamiento negativo en el ADN debido a la inhibición de la ADN girasa.
- Los cromosomas hijos permanecen unidos tras el proceso de replicación debido a la carencia de actividad decatenasa.

- Inhibición de la síntesis de ADN mediante el bloqueo de la horquilla de replicación debido a la estabilización del complejo ADN-ADN girasa.
- Las quinolonas, al inhibir el movimiento de la horquilla de replicación originan una señal que da lugar a la activación de *recA*, la cual mediante su actividad proteasa, produce la inactivación del gen *lexA* (un represor de los genes del sistema SOS).
- Filamentación celular, en parte debida al antagonismo de la síntesis de ADN y la inducción del sistema SOS. La inducción de este sistema conlleva la expresión de *sulA*, cuyo producto antagoniza el producto del gen *sulB* necesario para la división celular. La filamentación va acompañada de la aparición de vacuolas polares y lisis celular.
- Muerte celular rápida. La muerte celular se produce inicialmente de un modo rápido, pero más tarde se enlentece y alcanza una fase de meseta. Las células que persisten en esta fase de meseta no parecen ser una subpoblación mutante, sino un estadio celular refractario a los efectos de las quinolonas. La muerte celular aumenta con la concentración de quinolonas hasta 30-60 veces la CMI. A partir de este valor la muerte se reduce, lo que se conoce como efecto Eagle o efecto paradójico, descrito previamente para β -lactámicos. Este efecto se podría explicar debido a que las quinolonas a altas concentraciones inhiben parcialmente la síntesis proteica, que es necesaria para la muerte celular.

1.1.4. Farmacocinética y farmacodinamia

Las quinolonas poseen propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas favorables.^{6,101,284} Presentan una muy buena absorción vía oral, siendo su biodisponibilidad de buena a excelente (entre el 50% a casi el 100%) (Tabla 3). La absorción se favorece por ausencia de alimentos y disminuye al interaccionar con otros fármacos que contienen cationes de tipo

calcio, magnesio, hierro o cinc, reduciéndose la concentración sérica entre un 25 y un 90%.²⁶⁸

Su distribución en el organismo es amplia, alcanzándose concentraciones intracelulares altas. Su concentración en tejido prostático, bilis, pulmón, neutrófilos y macrófagos es superior a la sérica. En líquido cefalorraquídeo suele ser inferior a la mitad de la concentración sérica. Las concentraciones en suero son muy bajas en el caso de ácido nalidíxico, ácido pipemídico y norfloxacin, y de 2-7 $\mu\text{g/ml}$ para los de la tercera y cuarta generación. La unión a proteínas plasmáticas es baja, entre el 20-40%, siendo la albúmina el principal punto de afinidad.²⁰

Tabla 3. Parámetros farmacocinéticos de las quinolonas más usadas en España.

Antimicrobiano	Dosis oral (mg)	C _{max} (mg/l)	t _{1/2} (h)	Biodisponibilidad	Vd (l/kg)	Excreción renal (%)	Metabolismo (%)
Ácido pipemídico	400	4.0	3.0	93	1.4-2.0	75	--
Norfloxacin	400	1.5	3.3	40-60	0.6	30-50	20
Ciprofloxacino	500	2.5	3.6	70-75	2.0-3.0	60-70	30
Ofloxacin	400	4.0	5.0	>95	1.2-1.4	90	3
Levofloxacin	500	5.0	7.0	>95	1.4	80	5
Moxifloxacin	400	3.0	13.0	90	3.0	40	50

* Porcentaje de la dosis acumulado en orina a las 24 horas.

C_{max}: concentración máxima en suero; t_{1/2}: semivida plasmática; Vd: volumen de distribución.

Las quinolonas pueden ser metabolizadas por el hígado, a través del citocromo P-450 mediante reacción de oxidación o desmetilación, produciéndose metabolitos que son posteriormente eliminados. En la metabolización resalta el caso de pefloxacin que varía entre el 50-85%.

La eliminación o **excreción** se produce mayoritariamente por vía renal para algunos agentes (ácido pipemídico, ofloxacin, levofloxacin), por vía no renal para otros (moxifloxacin), o por ambas (norfloxacin, ciprofloxacino). La dosis en caso de insuficiencia renal debe ajustarse dependiendo del porcentaje de eliminación renal de cada compuesto. La excreción oscila entre 40-90% y se realiza tanto por filtración glomerular como por secreción tubular. La semi-vida de eliminación varía entre 3 y 26 horas.

Las quinolonas tienen una actividad que depende de la concentración, por lo que los parámetros más importantes para predecir la respuesta antimicrobiana y el éxito clínico son el cociente entre la concentración máxima en suero y la concentración inhibitoria mínima (C_{max}/CMI) (que debe ser superior a 10 para obtener la máxima eficacia clínica y la menor selección de resistencias) y el cociente entre el área bajo la curva concentración-tiempo y la concentración inhibitoria mínima (AUC/CMI) (que debe ser mayor de 125 para bacterias gramnegativas y superiores a 30 para neumococos).^{131,145}

La concentración bactericida mínima (CMB) de las quinolonas es 1-4 veces la CMI. Presenta un efecto postantibiótico de 1-3 horas, que depende del microorganismo y de la quinolona, y que aumenta al aumentar la concentración del antimicrobiano y la duración de la exposición al mismo.

1.1.5. Espectro de actividad

Las fluoroquinolonas son más activas frente a bacterias gramnegativas que las primeras quinolonas como ácido nalidíxico o ácido pipemídico, siendo el más potente ciprofloxacino. También presentan una buena actividad frente a *P. aeruginosa* y bacterias grampositivas en diferentes grados.

Levofloxacino y, sobre todo, moxifloxacino tienen una buena actividad frente a bacterias grampositivas.⁷ Moxifloxacino es el más activo frente a neumococos, y presenta una buena actividad frente a anaerobios.⁶

Además, las quinolonas son moléculas activas frente a *Neisseria spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Vibrio spp.*, *Aeromonas spp.*, *Brucella spp.*, algunas especies de micobacterias (como *Mycobacterium tuberculosis*), etc.

1.1.6. Uso clínico de las quinolonas

Las quinolonas tienen un amplio uso tanto intrahospitalario como extrahospitalario y se utilizan en los principales tipos de infección.

Infecciones del tracto urinario

Por su gran actividad frente a enterobacterias, los principales agentes etiológicos de infecciones urinarias, y por su eliminación vía renal se han mostrado eficaces en estas infecciones. Se han considerado tratamiento de primera elección para bacilos gramnegativos, incluida *P. aeruginosa*, especialmente ciprofloxacino, en infecciones urinarias complicadas. Además, al concentrarse en tejido prostático son eficaces frente a prostatitis que tienen un difícil tratamiento.²⁸⁴

Enfermedades de transmisión sexual

La dosis única de varias fluoroquinolonas (ciprofloxacino, ofloxacino y otras) es muy eficaz para tratar uretritis y cervicitis gonocócica no complicada. La aparición y extensión de resistencia a fluoroquinolonas en *N. gonorrhoeae* está limitando su uso en algunas áreas.²¹²

También se han usado para tratamiento de la enfermedad inflamatoria pélvica, un síndrome producido por microorganismos entre los que se incluyen algunos patógenos de transmisión sexual como gonococos o *Chlamydia*.

Infecciones gastrointestinales y abdominales

Se han usado en las gastroenteritis que necesitaban un tratamiento antibiótico, pero han surgido resistencias, sobre todo en *Campylobacter*.^{54,228} Más de la mitad de cepas de *Campylobacter* que se aíslan en España son resistente a quinolonas.

En pacientes con cirrosis el uso de norfloxacino o ciprofloxacino se ha mostrado eficaz para prevenir la peritonitis bacteriana espontánea.⁷²

Infecciones óseas

La experiencia clínica y su seguridad, sobre todo ciprofloxacino, hacen de las fluoroquinolonas uno de los mejores antibióticos para el tratamiento de la osteomielitis crónica. Son de primera elección en las producidas por enterobacterias, y alternativas en las producidas por *P. aeruginosa* y *S. aureus*, debido a la aparición de resistencias.²¹⁵

Infecciones del tracto respiratorio

Las quinolonas tienen una excelente penetración en los tejidos del aparato respiratorio y alcanzan altas concentraciones tanto en el fluido epitelial como en macrófagos alveolares.²⁸² Actualmente, quinolonas como levofloxacino y, sobre todo, moxifloxacino cubren la gran mayoría de los posibles causantes de neumonía (neumococo, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, y otros atípicos como especies de *Legionella*, *Mycoplasma pneumoniae* y *C. pneumoniae*).

También han demostrado ser eficaces en la exacerbación aguda de enfermedad pulmonar obstructiva crónica, la sinusitis aguda y la otitis externa maligna causada por *P. aeruginosa*.

Infecciones sistémicas graves

En las bacteriemias, sobre todo las causadas por enterobacterias, el tratamiento con ciprofloxacino y ofloxacino ha sido eficaz. Y en menor medida en la causadas por *P. aeruginosa*.²³

En pacientes neutropénicos febriles, el uso de ciprofloxacino y tobramicina resultó al menos tan seguro y eficaz como el uso de piperacilina y tobramicina.¹⁹² Ciprofloxacino y ofloxacino son tratamiento de elección en la fiebre tifoidea, aunque se han informado casos esporádicos de resistencia en *Salmonella typhi*. Levofloxacino ha mostrado un buen resultado profiláctico en pacientes cancerosos tras el tratamiento de quimioterapia.⁴⁵

1.1.7. Efectos adversos del uso de quinolonas

Debido a que la quinolonas actúan inhibiendo la síntesis de ADN en bacterias mediante su unión al complejo ADN-Topoisomerasa, se especuló con la posibilidad de que estos fármacos pudiesen tener un efecto mutagénico (sobre el material genético) en el ser humano. Esta hipótesis no ha sido confirmada, sin embargo se conocen bien otra serie de efectos adversos durante el tratamiento con quinolonas, o ciertas quinolonas.

Las reacciones adversas más frecuentes son las alteraciones gastrointestinales (10%), que se traducen en dolor abdominal, diarreas, inapetencia y/o náuseas. Estas manifestaciones aparecen con menor frecuencia cuando las quinolonas se administran por vía parenteral.⁶⁷

Algunas quinolonas son capaces de interactuar con receptores del sistema nervioso central (SNC), como los GABA_A.⁸⁴ Se produce así un efecto neurotóxico que se manifiesta a través de mareos, insomnio, cefaleas, ansiedad e, incluso, convulsiones. Estos síntomas pueden darse en el 1-7% de los casos y el uso de quinolonas está contraindicado en personas con lesiones del sistema nervioso central. Estos efectos parecen estar relacionados con el radical de C7.

Pueden aparecer manifestaciones cutáneas que pueden ser leves (eritema) o más graves como procesos de fotosensibilización. Esta fototoxicidad se ha relacionado con el sustituyente en posición C8. Cuando el sustituyente de C8 es un halógeno y en las quinolonas con varios grupos flúor este efecto aparece con más frecuencia.^{28,130}

Por último, en estudios *in vivo* con animales y altas dosis de droga se han observado procesos de artropatía y alteraciones en cartílagos en crecimiento. El mecanismo exacto no se conoce. Además, estos efectos presentan una mínima incidencia, poca trascendencia clínica y son reversibles. Con todos estos datos, la tendencia actual es que sea el clínico quien valore su prescripción en función del balance riesgo/beneficio.¹⁷⁶

1.2. Mecanismos de resistencia a quinolonas

La resistencia a quinolonas ha sido un problema desde la introducción del ácido nalidíxico en clínica hace más de 40 años. La quinolonas son antimicrobianos potentes, lo cual permitió su éxito clínico y un amplio uso tanto profiláctico como terapéutico. Sin embargo, su uso indiscriminado ha llevado a un aumento creciente de la resistencia a estos antimicrobianos mediante diferentes mecanismos.^{108,198} En la Figura 11 se representan los porcentajes de resistencia a quinolonas de las especies patógenas más importantes (datos de hospitales de EE.UU., España y Europa). La resistencia que presentan las bacterias frente a este grupo de antimicrobianos es, en mayor o menor grado, cruzada.

1.2.1. Modificaciones en las dianas moleculares (Topoisomerasas tipo II)

La resistencia a quinolonas sucede comúnmente mediante un mecanismo de resistencia específico por aparición de mutaciones en las topoisomerasas tipo II (ADN girasa y Topoisomerasa IV). Mediante estudios de sensibilidad e interacción *in vivo* e *in vitro* entre las topoisomerasas y las quinolonas se llegó a la conclusión de que la ADN girasa es la diana primaria de las quinolonas en bacterias gramnegativas, como *E. coli* y *Neisseria gonorrhoeae*, mientras que en organismos grampositivos como *S. aureus* o *S. pneumoniae* lo es la Topoisomerasa IV.^{103,119} Otros estudios indican que la ADN girasa es la diana primaria en bacterias grampositivas para algunas quinolonas.^{96,242}

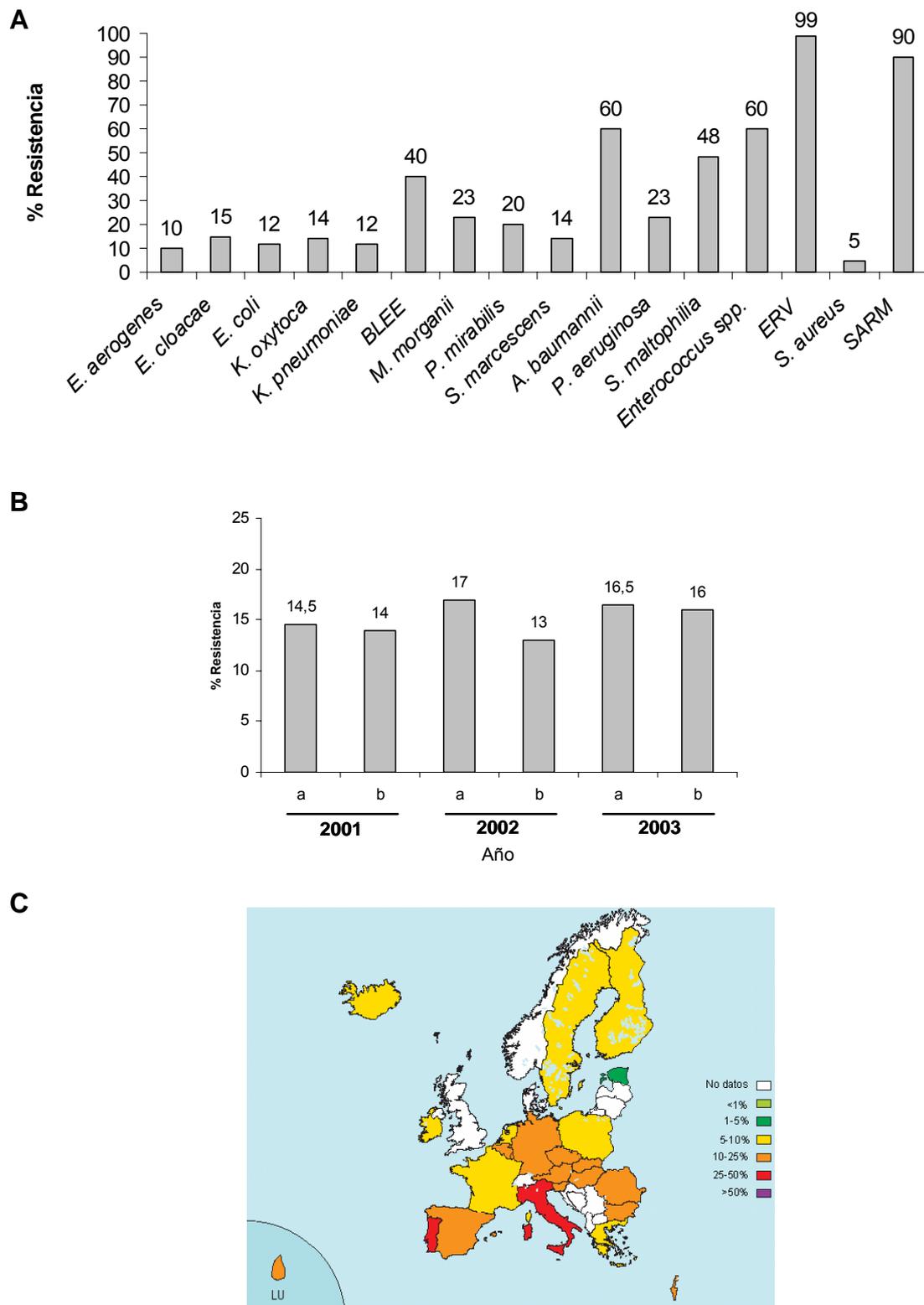


Figura 11. Porcentaje de resistencia a ciprofloxacino en diferentes especies bacterianas. A: Porcentaje de resistencia en EE.UU.¹⁰⁸ B: Porcentaje de resistencia en *E. coli* invasores adquiridos en la comunidad durante el periodo 2001-2003 en España.¹⁸¹ C: Porcentaje de resistencia de aislados invasores de *Escherichia coli* en Europa (datos de 2003 tomados de *European Antimicrobial Resistance Surveillance System*, <http://www.earss.rivm.nl/>). BLEE: productores de β -lactamasa de espectro extendido. SARM: *Staphylococcus aureus* resistentes a metilicina (o vancomicina). ERV: enterococos resistentes a vancomicina. a: enero-junio; b: julio-diciembre.

Bacterias Gramnegativas

ADN girasa

En los estudios iniciales sobre mutaciones en *gyrA* relacionadas con la resistencia a quinolonas se observó que éstas se concentran en una pequeña región cercana al extremo 5' del gen, en la zona N-terminal de la proteína, próxima al sitio activo del enzima que contiene la Tyr-122. Ésta es una región muy conservada en todos los genes *gyrA* de las distintas especies y es conocida como QRDR (*Quinolone-Resistance Determining Region*) (Figura 12).²⁸⁷ La mayoría de sustituciones en GyrA y GyrB se concentran en esta región.

<i>Escherichia coli</i>	ARVVGDVIGKYHPHGD ⁸³ S ⁸³ AVYDTIVRMAQPFSRLRYMLVDGQ
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ARVVGDVIGKYHPHGD ⁸³ S ⁸³ AVYDTIVRMAQPFSRLRYMLVDGQ
<i>Klebsiella oxytoca</i>	ARVVGDVIGKYHPHGD ⁸³ T ⁸³ AVYDTIVRMAQPFSRLRYMLVDGQ
<i>Acinetobacter baumannii</i>	ARVVGDVIGKYHPHGD ⁸³ S ⁸³ AVYETIVRMAQDFSLRYLLVDGQ
<i>Salmonella typhimurium</i>	ARVVGDVIGKYHPHGD ⁸³ S ⁸³ AVYDTIVRMAQPFSRLRYMLVDGQ
<i>Campylobacter jejuni</i>	ARIVGAVIGRYHPHGD ⁸⁶ T ⁸⁶ AVYDALVRMAQDFSMRYPSITGQ
<i>Shigella dysenteriae</i>	HGD ⁸³ S ⁸³ AVYDTIVR
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ARVVGDVIGKYHPHGD ⁸³ T ⁸³ AVYDTIVRMAQPFSRLRYMLVDGQ
<i>Aeromonas salmonicida</i>	ARVVGDVIGKYHPHGD ⁸³ S ⁸³ AVYDTIVRLAQDFSMRYMLVDGQ
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	AR ⁹⁰ SVAETMGNYHPHGD ⁹⁰ A ⁹⁰ SIYDSLVRMAQPWSMRYPLVDGQ
<i>Staphylococcus aureus</i>	ARIVGDVMGKYHPHGD ⁸⁴ S ⁸⁴ SIYEAMVRMAQDFSYRYPLVDGQ
<i>Enterococcus faecalis</i>	ARIVGDVMGKYHPHGD ⁸³ S ⁸³ AIYESMVRMAQPFSYRAMLVDGH

Figura 12. Región que determina la resistencia a quinolonas (QRDR) en la subunidad GyrA de la ADN girasa en 9 especies bacterianas diferentes.

En *E. coli* la región QRDR del gen *gyrA* comprende los nucleótidos 199-318 que corresponde a los aminoácidos Ala-67 a Gln-106,²⁸⁷ mientras en *GyrB* comprende la región Asp-426 a Lys-447.²⁸⁸ Los puntos más importantes que favorecen la disminución de la sensibilidad a quinolonas recaen sobre el codón que codifica Ser en la posición 83 y el codón que codifica Asp en la posición 87 (Figura 12 y Tabla 4).^{46,90,179,182,262,287} La frecuencia de mutación *in vitro* es similar para *GyrA* y *GyrB*,¹⁶² mientras que *in vivo* esta frecuencia es mucho mayor en *GyrA*.^{56,262} También se han asociado con la resistencia otras mutaciones (Tabla 4), sin embargo, éstas se observan a una frecuencia mucho más baja.¹⁰²

En *E. coli*, la sustitución más frecuente ocurre en la posición Ser-83 con la aparición de una Leu, aunque también se ha observado el cambio a Trp, Ala o Val. Cuando se produce esta sustitución tiene lugar un cambio en el perfil hidrofóbico de la región, lo cual puede producir un cambio conformacional. Los cambios en esta posición producen una disminución de la unión de la quinolona al complejo ADN-ADN girasa de hasta 60 veces y un nivel de resistencia intermedio a fluoroquinolonas y elevado a ácido nalidíxico.^{281,287} Mutaciones adicionales, generalmente en la posición Asp87 confieren una mayor resistencia a fluoroquinolonas.^{183,224,262}

En la Tabla 4 se muestran otras mutaciones menos frecuentes asociadas a resistencia a quinolonas. Diversos estudios sugieren que no todas las mutaciones en *GyrA* o *GyrB* confieren el mismo nivel de resistencia a todas las quinolonas, siendo los cambios en Ser-83 y Asp-87 los más importantes.^{31,62,155,254,287} Además, algunos cambios en la región QRDR pueden ser más importantes para la asociación de *GyrA* y *GyrB* que para la actividad del enzima.²⁵⁴ Los cambios en la subunidad *GyrB* ocurren con menor frecuencia en asociación a la resistencia a quinolonas (Tabla 4).²⁸⁷

Tabla 4. Principales mutaciones en la ADN girasa y la Topoisomerasa IV en distintas especies patógenas.

		<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Salmonella spp.</i>	<i>S. aureus</i>
AND girasa	<i>gyrA</i>	Ala51Val Ala67Ser Gly81Cys Asp82Gly Ser83(Leu, Trp, Ala, Val) Ala84(Pro, Ala) Asp87(Asn, Gly, Tyr, His, Val) Gln106(His, Arg) Ala196Glu	Ser83(Tyr, Phe) Asp87(Gly,Asn, Ala)	Gly81Val Ser83(Leu, Trp, Phe) Ala84Pro Ala119Ser	Thr83Ile Asp87(Asn,Gly, His , Cys, Tyr)	Ala67Pro Asp72Gly Val73Ile Gly81(Cys,Ser, His, Asp) Asp82(Gly Asn) Ser83(Tyr, Phe, Ala) Asp87(Asn, Gly, Tyr, Lys) Leu98Val Ala119(Ser, Glu, Val) Ala131Gly Glu139Ala	Asp73Gly Ser84(leu, Ala, Phe) Ser84Val Ser85Pro Glu88(Gly, Lys)
	<i>gyrB</i>	Asp426Asn Lys447Glu			Ser464Phe	Tyr420Cys Arg437Leu Ser464(Tyr, Phe)	Asp437Asn Arg458Gln Pro456Ser
Topoisomerasa IV	<i>parC</i>	Ala56Thr Ser57Thr Gly78(Asp, Lys) Ser80(Arg,Ile) Ser83Leu Glu84(Gly, Lys, Val) Ala108Val	Ser80(Ile, Arg) Glu84(Gly, Lys)	Ser80Leu Glu84Lys	Ser80(Leu, Trp) Glu84Lys	Tyr57Ser Thr66Ile Gly78Aps Ser80(Arg, Ile) Glu84(Lys, Gly)	Ser80(Phe, Tyr) Ser81Pro Glu84Lys Ala116(Pro, Glu)
	<i>parE</i>	Leu416Phe Ile444Phe Leu445His Ser458Thr Glu460Asp Ile464Phe Ile529Leu				Glu453Gly Ser458Pro His461Tyr Ala498Thr Val512Gly	Asp435Asn Pro454Ser

Varios aminoácidos entre paréntesis indican que pueden ocurrir varias sustituciones diferentes asociadas a resistencia.

Como resumen, el nivel de resistencia a quinolonas guarda una relación directa con el número de mutaciones asociadas a resistencia. En bacterias gramnegativas, los cambios aparecen en primer lugar en la diana primaria (GyrA) y posteriormente en la diana secundaria (ParC).

Topoisomerasa IV

La Topoisomerasa IV es la diana secundaria de las quinolonas en bacterias gramnegativas. Las mutaciones en ParC y ParE juegan un papel importante en la adquisición de altos niveles de resistencia.^{11,119} Las mutaciones más frecuentes se muestran en la Tabla 4. La alta homología entre GyrA y ParC, y GyrB y ParE se ve reflejada en que las mutaciones asociadas a resistencia se localizan en puntos homólogos. Así las posiciones 81, 83 y 87 en GyrA equivalen a las posiciones 78, 80 y 84 de ParC.¹²³

Del mismo modo que en *E. coli*, se han encontrado mutaciones en la ADN girasa y la Topoisomerasa IV en las mismas posiciones o equivalentes en otras especies de bacterias gramnegativas como *A. baumannii*,²⁶¹ *P. aeruginosa*,¹⁵⁸ *Salmonella sp.*,⁷³ *Citrobacter freundii*¹⁶³ o *K. pneumoniae*,⁴⁷ en las cuales la ADN girasa parece ser igualmente la diana primaria.

Bacterias Grampositivas

Estudios realizados en *S. aureus* o *S. pneumoniae* han demostrado que la diana primaria en bacterias grampositivas suele ser la Topoisomerasa IV, y la ADN girasa ocupa el papel de diana secundaria. Las cepas con una resistencia intermedia a quinolonas presentan mutaciones en *parC*, mientras que cepas con alta resistencia tienen mutaciones adicionales en *gyrA*.^{57,195} La diferencia se debe a la distinta afinidad de las quinolonas sobre la Topoisomerasa IV y la ADN girasa en bacterias grampositivas.¹⁰⁰

Con independencia que las bacterias sean grampositivas o gramnegativas, parece que la determinación de la diana primaria también depende de la naturaleza de la quinolona, como apuntaron resultados de un estudio en *S. pneumoniae*, donde ciprofloxacino, norfloxacino, levofloxacino y

trovafloxacino tienen como diana primaria a la Topoisomerasa IV, mientras que sparfloxacino y gatifloxacino tienen como diana primaria la ADN girasa.^{64,185}

En este sentido se está trabajando actualmente en nuevas quinolonas que tengan la misma o similar afinidad por la ADN girasa y la Topoisomerasa IV, ya que estas quinolonas forzarían a las bacterias a presentar alteraciones en ambas enzimas para alcanzar el nivel de resistentes, hecho que ocurre a frecuencias muy bajas (10^{-14} - 10^{-16} para fluoroquinolonas).²⁴²

Por último mencionar que se ha notificado recientemente que mutantes seleccionados *in vitro* con una expresión reducida de la Topoisomerasa IV en *S. aureus* presentan un bajo nivel de resistencia a quinolonas. En este caso la viabilidad celular fue posible gracias a mutaciones compensatorias, sin reversión del fenotipo de resistencia.¹⁰⁵

1.2.2. Disminución de la permeabilidad de membrana

Se ha demostrado que la disminución de permeabilidad debido a la pérdida o reducción del número de porinas, o su alteración estructural, provoca resistencia a los antimicrobianos.^{56,245} Los mutantes en porinas que disminuyen su expresión producen resistencia de bajo nivel, la cual aumenta si el microorganismo adquiere o posee otros mecanismos como sistemas de expulsión activa o un mecanismo específico de resistencia. Se ha puesto de manifiesto que la pérdida de estas porinas, en *E. coli* las porinas OmpF y OmpC y en *K. pneumoniae* las porinas OmpK35 y OmpK36, contribuyen escasamente a la resistencia a quinolonas en cepas altamente sensibles, mientras que en cepas con alteraciones en las topoisomerasas y/o sistemas de expulsión activa producen un incremento de 2-4 veces en el nivel de resistencia.^{97,147} Además, la pérdida de porinas, al menos en *K. pneumoniae*, se puede producir como consecuencia de la interrupción del gen estructural por secuencias de inserción.⁹⁴

La alteración de sistemas reguladores puede ocasionar la reducción de la expresión de porinas que afectan a la sensibilidad a quinolonas. Uno de los

mejor caracterizados es el operón *mar* (*multiple antibiotic resistance*) de *E. coli*, y otras enterobacterias. Las alteraciones en el gen regulador *marR* producen la activación de *marA* lo cual aumenta la resistencia a tetraciclinas, cloranfenicol y fluoroquinolonas. En estos mutantes se produce un incremento de *micF*, lo que conlleva una disminución en la transcripción de *ompF*, y un aumento de la expresión del sistema de expulsión activa AcrAB-TolC.^{35,169,170}

En relación con el lipopolisacárido (LPS) de la pared celular, se han descrito algunos mutantes resistentes a quinolonas con alteraciones en los perfiles de LPS.¹⁵² Sin embargo no está clara su contribución a la resistencia a quinolonas.

1.2.3. Expresión o sobre-expresión de sistemas de expulsión activa

Los sistemas de multiresistencia (MDR, *multidrug resistance*) son transportadores capaces de expulsar de forma relativamente inespecífica sustratos no relacionados estructuralmente consumiendo, para ello, energía en forma de ATP o procedente de la fuerza protón motriz de protones. Estos sistemas están implicados tanto en resistencia intrínseca como adquirida. Además, el análisis de los genomas bacterianos secuenciados hasta ahora parece indicar que estos sistemas son ubicuos y redundantes.^{191,241}

En procariontes existen varias familias de estos transportadores MDR (Figura 13):^{190,208,292}

- Superfamilia ABC (*ATP binding compound*): Son transportadores dependientes de la hidrólisis de ATP cuyos sustratos más habituales son azúcares, fármacos, aminoácidos,...
- Superfamilia MFS (*major facilitator superfamily*): Éstos son dependientes de la fuerza motriz de protones, presentan 12 ó 14 segmentos transmembrana y varias subfamilias están implicadas en el transporte de fármacos.

- Familia SMR (*small multidrug resistance*): Son una serie de pequeñas proteínas que contienen 4 segmentos transmembrana que, acoplados al potencial de membrana, expulsan antimicrobianos y detergentes.
- Familia MATE (*multidrug and toxic compound extrusion*): Sus proteínas contienen 12 segmentos transmembrana y funcionan intercambiando moléculas de sustrato por iones Na^+ .
- Familia RND (*resistance-nodulation-division*): La mayoría de los transportadores MDR de gramnegativos caracterizados hasta ahora pertenecen a esta familia, contribuyendo tanto a la resistencia intrínseca como a la adquirida mediante su sobreexpresión.⁴⁹ Se caracterizan por poseer 12 segmentos transmembrana y estar acoplados al potencial de membrana.^{208,227}

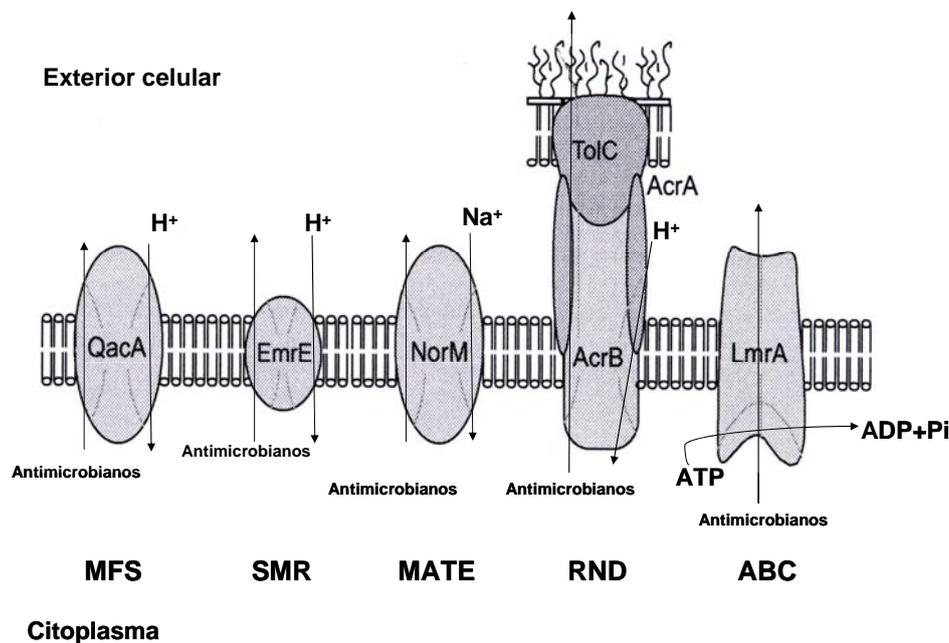


Figura 13. Miembros representativos de las cinco familias caracterizadas de sistemas de expulsión activa. H^+ : protones; ATP: adenosil trifosfato; ADP+Pi: adenosil difosfato más un grupo fosfato. Ilustración modificada de la referencia.¹⁹⁰

Sistemas de Expulsión Activa RND

La regulación de los principales sistemas de bombeo caracterizados en gramnegativos (AcrAB-TolC, Mtr-CDE, MexAB-OprM,...) es similar.⁸⁰ Normalmente, su expresión está regulada por la acción de una proteína represora local, y la aparición de un fenotipo de multirresistencia se debe a mutaciones en los genes reguladores locales.^{1,210,293} Recientemente se ha demostrado que estos sistemas pueden estar también regulados por activadores globales como Rob o SoxS.⁷⁹ También se han caracterizado sistemas MDR regulados por activadores locales¹²² y por sistemas de transducción de señales de doble componente.¹²

En gramnegativos la existencia de una membrana externa condiciona la estructura de estos sistemas RND, ya que es necesario atravesar la membrana citoplasmática, el espacio periplásmico y la membrana externa. Estos sistemas suelen estar constituidos por tres proteínas: una proteína transportadora localizada en la membrana interna que está acoplada al potencial de membrana, una proteína de fusión de membranas y una proteína que forma un canal en la membrana externa (Figura 14).²⁰⁷ Estas proteínas suelen estar codificadas por genes adyacentes que forman un operón. Sin embargo, en ocasiones el canal de expulsión puede transcribirse de modo independiente y asociarse a más de un sistema de bombeo, como es el caso de TolC de *E. coli*,¹⁶¹ OprM de *P. aeruginosa*²⁰⁹ o MtrE de *N. gonorrhoeae*.²³³

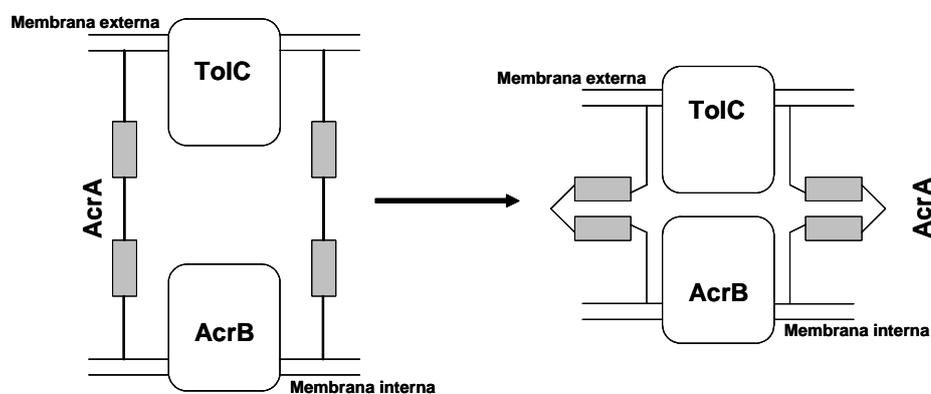


Figura 14. Mecanismo de acción de los sistemas de expulsión multicomponente en bacterias gramnegativas (Sistema AcrAB-TolC). A la izquierda posición de reposo. A la derecha disposición del sistema durante el transporte. En este modelo, la proteína de fusión de membrana (AcrA) tendría como función poner en contacto las proteínas de la membrana interna (AcrB) y externa (TolC).²²⁷

En la Tabla 5 se muestran los principales sistemas de expulsión activa que afectan a fluoroquinolonas. En *E. coli*, el sistema de expulsión activo AcrAB-TolC juega un papel fundamental en la eliminación de quinolonas y está regulado a varios niveles. Las mutaciones en *acrR* (un represor local de *acrAB*) incrementan su actividad.²⁷⁰ Por una vía diferente, las mutaciones que inactivan *marR* activan la expresión de *acrAB* y *tolC*, al tiempo que disminuye la de *ompF*, disminuyendo la entrada de quinolonas y aumentando su expulsión.^{3,39} Otras bacterias entéricas parecen estar equipadas de modo similar.⁴⁰ *P. aeruginosa* posee al menos 6 sistemas de expulsión activa capaces de expulsar quinolonas y otros antimicrobianos. En *S. maltophilia* y *A. baumannii* también existen sistemas similares.^{5,141} Al ser sistemas no específicos para la eliminación de quinolonas, su activación se puede producir por otros compuestos como antimicrobianos diferentes a las quinolonas, antisépticos o detergentes.²

Tabla 5. Algunos de los principales sistemas de expulsión activa que afectan a la resistencia a fluoroquinolonas.²⁰⁸

Sistema de expulsión activa	Familia	Antimicrobiano	Organismo
Grampositivos			
NorA	MFS	NOR, CIP	<i>S. aureus</i>
NorB	MFS	NOR, CIP, MXF, SPX	<i>S. aureus</i>
EmeA	MFS	NOR, CIP	<i>E. faecalis</i>
LfrA	MFS	FQ	<i>M. smegmatis</i>
LmrA	ABC	CIP, OFX	<i>L. lactis</i>
Gramnegativos			
MexAB-OprM MexCD-OprJ MexEF-OprN MexXY-OprM	RND	FQ	<i>P. aeruginosa</i>
AcrAB-TolC	RND	FQ	<i>E. coli</i> <i>Enterobacter spp.</i> <i>Klebsiella spp.</i> <i>S. enterica</i> (Typhimurium, Enteritidis)
AcrEF-TolC	RND	FQ	<i>E. coli</i> <i>S. enterica</i> Typhimurium
AcrAB-TolC	RND	CIP	<i>P. mirabilis</i>
MdfA	MFS	FQ	<i>E. coli</i>

NOR: norfloxacin; CIP: ciprofloxacino; MXF: moxifloxacino; SPX: esparfloxacino; OFX: ofloxacino, FQ: fluoroquinolonas.

En bacterias grampositivas, la resistencia a quinolonas de *S. aureus* está asociada al aumento en la expresión de *norA*, un transportador MFS. Situaciones similares se encuentran en *S. pneumoniae* y otras bacterias grampositivas.¹⁰⁸

La alteración de las dianas de las quinolonas (topoisomerasas tipo II) y la activación de los sistemas de expulsión activa se encuentran a menudo unidas en cepas clínicas resistentes. De este modo, en *E. coli*, las mutaciones en *gyrA* no aumentan tanto la CMI de quinolonas en ausencia de AcrAB.¹⁷⁸ Incluso con este sistema funcional, una única mutación en *gyrA* sólo produce un modesto incremento en la resistencia (CMI de ciprofloxacino es $\leq 1\mu\text{g/ml}$, categoría sensible). Sólo con una segunda mutación en *gyrA* o una mutación en *parC* se alcanza el nivel de resistencia (CMI de ciprofloxacino es $\geq 4\mu\text{g/ml}$, categoría clínica de resistente, según el CLSI).^{38,47,91}

1.2.4. Resistencia a quinolonas mediada por plásmido

Durante un largo periodo de tiempo se pensó que la resistencia a quinolonas mediada por plásmidos transferibles no tenía lugar, al menos con una frecuencia detectable, mientras que la resistencia plasmídica a otros antimicrobianos había aparecido en periodos más cortos.²⁹ En 1987 se notificó una cepa de *Shigella dysenteriae* tipo 1 capaz de transferir resistencia a ácido nalidíxico a través de plásmido,¹⁵⁹ que más tarde fue desechada debido a posibles problemas de aparición de mutantes resistentes a ácido nalidíxico durante la selección de los transconjugantes. Diversos trabajos han cuestionado la ausencia o presencia de resistencia a quinolonas mediada por plásmidos,⁴³ debido en parte a su naturaleza sintética, aunque es conocida la existencia de otros inhibidores naturales de las topoisomerasas tipo II desde hace tiempo,¹⁹⁹ e incluso la existencia de quinolonas naturales producidas por algunas bacterias como *P. aeruginosa* participando en las vías de señalización del *quorum sensing*.^{194,266}

Posteriormente, se han llevado a cabo intentos para demostrar la posibilidad de resistencia a quinolonas mediada por plásmidos mediante

distintos modelos. Uno de ellos consistió en aumentar la cantidad de diana de ADN girasa silvestre mediante su sobreexpresión en un vector plasmídico, mientras otros intentos consistieron en la expresión del gen *gyrA* con mutaciones de resistencia también desde un plásmido artificial. Ambos modelos no han podido ser encontrados en cepas clínicas, y además, en muchas especies, la presencia de una topoisomerasa mutada es recesiva frente a la topoisomerasa silvestre original del microorganismo.⁷⁵

La primera proteína codificada por plásmido que confiere resistencia a quinolonas fue identificada en una *K. pneumoniae* aislada de una muestra de orina en 1994 en Birmingham, Alabama (EE.UU.).¹⁵¹ Al gen que codifica esta proteína se le denominó *qnr* (quinolone resistance) y, posteriormente, *qnrA*. Este hallazgo ha abierto una nueva era en el estudio de la resistencia a quinolonas.

Diseminación de los genes *qnr*

El gen *qnrA* (y otros relacionados como veremos posteriormente) ha sido identificado en especies de enterobacterias de áreas no relacionadas de América, Europa y Asia.

En un primer estudio, en 2003, *qnrA* fue detectado en el 1.4% de 350 aislados en bacterias gramnegativas de 18 países y 24 estados de EE.UU.¹⁰⁹ Un estudio posterior reveló una prevalencia del 11% en cepas de *K. pneumoniae* de seis estados de EE.UU. resistentes a ciprofloxacino.²⁷³ *qnrA* se ha identificado más recientemente en 7 de 17 *E. cloacae* de sensibilidad variable a quinolonas y en 2 de 20 *K. pneumoniae* sensibles a quinolonas en cinco estados de EE.UU.²¹⁶

En Asia *qnrA* se ha detectado en aislados de *E. coli* resistentes a ciprofloxacino en Shanghai, China, con una prevalencia del 7.7%²⁷⁵ y en cepas de enterobacterias (*E. coli*, *K. pneumoniae* y *E. sakazakii*) que contenían el gen *bla*_{VEB-1} desde Bangkok, Tailandia, con una prevalencia del 48%.²⁰⁶

También se ha identificado *qnrA* en cepas de *E. coli* en Korea y *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis en Hong Kong, China.^{36,112}

El gen *qnrA* se ha identificado también en Europa en dos aislados de enterobacterias (*E. coli* y *E. cloacae*) de un total de 449 resistentes a ácido nalidíxico (0.5%) en Paris, Francia.¹⁴⁴ Otras identificaciones han tenido lugar en Alemania (*Enterobacter spp.* y *C. freundii*), y Holanda (*E. coli*, *Enterobacter amnigenus*, *C. freundii*, *K. pneumoniae* y *E. cloacae*).^{114,184} En Turquía y Egipto también se ha identificado *qnrA*.^{164,279} Recientemente, se ha informado en España por primera vez de cepas de enterobacterias en la que se ha detectado el gen *qnrA*.^{32,258}

Como veremos posteriormente se han identificado otras proteínas pentapeptídicas que confieren resistencia a quinolonas como son QnrS en Japón y QnrB en la India y EE.UU.^{85,110} Muy recientemente se han identificado las primeras cepas que contiene *qnrS* en España.³³

Todas las especies en las que se han identificado determinantes tipo *qnr* han sido enterobacterias, a pesar que se han estudiado en otras bacterias gramnegativas como *P. aeruginosa* y *A. baumannii*. Sin embargo, se ha demostrado que la resistencia a quinolonas mediada por plásmidos que contiene el gen *qnrA* puede transferirse, al menos en el laboratorio, a *P. aeruginosa* mediante conjugación.¹⁵¹

Asociación de *qnr* con resistencia a β -lactámicos

La presencia de genes *qnr* se ha relacionado con la existencia de β -lactamasas de espectro extendido (BLEEs) en el mismo plásmido como SHV-5, SHV-7 y VEB-1.^{144,164,275} De este modo, por ejemplo, se ha visto que existe una mayor prevalencia de *qnrA* en cepas resistentes a ceftazidima (24%)²¹⁶ o en cepas que contienen *bla*_{VEB-1} (48%).²⁰⁶ También se ha relacionado la presencia de *qnrA* con la de cefalosporinas plasmídicas tales como *bla*_{FOX-5} en *K. pneumoniae* aisladas en EE.UU.¹⁵¹ Además, QnrB también se ha asociado con SHV-12 y CTX-M-15.¹¹⁰ Esta correlación puede explicar en parte

la alta corresponsión que existe a fluoroquinolonas y cefalosporinas de espectro extendido en enterobacterias.¹⁸⁹

Proteínas de la familia Qnr

La proteína QnrA es un polipéptido de 218 aminoácidos que protege a la ADN girasa y a la Topoisomerasa IV de la acción de la quinolonas.²⁵⁰⁻²⁵² Pertenece a la familia de los pentapéptidos repetidos que se caracteriza por la presencia de repeticiones en tandem de la secuencia A(D/N)LXX, donde X es cualquier aminoácido, y presenta una estructura idónea para la interacción entre proteínas.¹⁵ En el caso de QnrA la secuencia consenso que se repite sería A/CD/NL/FXX.²⁵⁰ Se ha descrito un segundo alelo de *qnrA*, denominado QnrA2, identificado en una cepa de *K. oxytoca* en China (número de acceso en GeneBank AY675584) que se diferencia en cuatro aminoácidos con la secuencia de la proteína QnrA1.

Recientemente se han descrito dos nuevas proteínas Qnr relacionadas con QnrA. QnrB se ha identificado en *C. koseri*, *E. coli*, *E. cloacae* y *K. pneumoniae* en EE.UU. y la India. En alguno de estos aislados se detectó al mismo tiempo la presencia de QnrA.¹¹⁰ Otro representante es QnrS identificado en una cepa de *S. flexneri* de Japón.⁸⁵ QnrB y QnrS son también pentapéptidos y comparten un 41% y un 60% de identidad aminoacídica con QnrA, respectivamente.

Respecto al modo de acción de estas proteínas Qnr, sólo se ha estudiado el caso de QnrA. Con los datos actuales parece que QnrA es capaz de unirse a las subunidades GyrA y GyrB de la ADN girasa en una fase temprana en la interacción entre ADN y ADN girasa. Esto disminuye la cantidad de ADN girasa que es capaz de unirse al ADN, de modo que QnrA es capaz de reducir la cantidad de holoenzima-ADN que es la diana de las quinolonas.^{250,252} Su acción sobre la Topoisomerasa IV sería similar.²⁵¹ Otras proteínas pentapépticas, como veremos posteriormente, con las que Qnr comparte cierta homología son McbG (19.6%) y MfpA (18.9%).

Nivel de resistencia conferido por Qnr

QnrA por sí solo confiere resistencia a ácido nalidíxico, pero no a fluoroquinolonas de acuerdo a las normas del CLSI.²⁷⁴ Los transconjugantes en *E. coli* J53 que contienen *qnrA*, presentan una CMI de fluoroquinolonas entre 0.125-2 µg/ml, produciéndose un incremento de hasta 250 veces respecto a la del receptor sin plásmido.

Por otro lado, se ha descrito un efecto aditivo de la resistencia ocasionada por QnrA y otros mecanismos como mutaciones en las topoisomerasas, ausencia de porinas o expresión de sistemas de expulsión activa.¹⁴⁹ Así, la expresión de *qnrA* en una cepa deficiente en porinas produce un aumento en la resistencia a ciprofloxacino, levofloxacino y moxifloxacino de de 8 a 32 veces, alcanzándose CMIs de 4-8 µg/ml.¹⁴⁹ Otro hecho importante es que la expresión de *qnrA* potencia la selección de resistencia a quinolonas al disminuir la sensibilidad.

Del mismo modo que QnrA, QnrB y QnrS proporcionan resistencia a ácido nalidíxico pero no a fluoroquinolonas.^{85,110}

Movilidad genética

El gen *qnrA* se ha localizado en plásmidos conjugativos que varían entre 54kb y más de 180kb. Los plásmidos que codifican *qnrA* suelen conferir resistencia a β-lactámicos, aminoglucósidos, cloranfenicol, rifampicina, sulfamidas, tetraciclina o trimetoprim.^{109,144,151,206,216,273,275}

A parte de su movilidad plasmídica, *qnrA* se ha encontrado en integrones de clase 1 tipo In6-In7. *qnrA* se ha localizado corriente abajo del gen *orf513* que constituye un elemento CR1 con su correspondiente sitio de recombinación. Además, *qnrA* carece de elemento de 59pb o sitio *attC*.^{144,250,273,275}

El entorno genético de *qnrB* es actualmente desconocido. El gen *qnrS* descrito no forma parte de un integrón de clase 1. Se encuentra adyacente a un transposón Tn3 que contiene el gen de la β -lactamasa *bla*_{TEM-1}.⁸⁵

Señalar que recientemente se ha notificado la descripción de un plásmido de multirresistencia a antimicrobianos aislado de bacterias de la comunidad de una planta de tratamiento de aguas residuales que contiene diversos determinantes de resistencia, entre ellos un sistema de transporte multidroga capaz de conferir resistencia a ácido nalidíxico y a bajas concentraciones de norfloxacin.²⁴³ Hasta la fecha no se han publicado datos sobre la relevancia clínica de este mecanismo.

Por último, a finales de 2005 se ha publicado la modificación de una acetiltransferasa de aminoglucósidos (AAC(6')-Ib) capaz de afectar la actividad de ciprofloxacino mediante N-acetilación del nitrógeno del grupo piperazinil. El gen de este enzima se ha localizado en plásmidos, al igual que *qnrA*, y confiere bajo nivel de resistencia a quinolonas (un aumento de la CMI de ciprofloxacino de 3 veces).²¹⁷

1.2.5. Relación entre la resistencia a quinolonas y otros antimicrobianos

Existen numerosos trabajos en los que se pone de manifiesto la relación estadística entre resistencia a quinolonas y β -lactámicos.^{126,248} En enterobacterias, *E. coli* y *K. pneumoniae*, las cepas resistentes a β -lactámicos productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) son tratadas eficazmente con quinolonas.¹¹⁷ Sin embargo, estudios recientes han demostrado que el 40-45% de estos aislados resistentes a β -lactámicos lo son también a quinolonas.^{106,280} Los factores microbiológicos y clínicos/epidemiológicos que determinan esta asociación son poco conocidos. Martínez-Martínez L. y col. observaron que en cepas clínicas de *K. pneumoniae* la pérdida de porinas y la sobreexpresión de sistemas de expulsión activa ocurría con mayor frecuencia en cepas productoras de BLEE.¹⁴⁸ Lautenbach E. y col. realizaron un estudio en el que analizó la epidemiología

de la resistencia a quinolonas en cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEE. Encontraron tres factores de riesgos principales asociados a la resistencia a quinolonas: el uso de quinolonas, residencia en el hospital largo tiempo y uso de aminoglucósidos. Según estos resultados el uso de quinolonas (como era de esperar) y de aminoglucósidos favorecen la aparición de resistencia a quinolonas.¹²⁷ A parte de la selección de resistencia en tratamiento con quinolonas sobre cepas resistentes a β -lactámicos poco se sabe del vínculo genético de la resistencia a los dos principales grupos de antimicrobianos de uso terapéutico, las quinolonas y los β -lactámicos. En un trabajo reciente se vincula el tratamiento con fluoroquinolonas como factor de riesgo en la infección o colonización con cepas productoras de β -lactamasas de tipo SHV o TEM.²¹⁸

1.3. Elementos genéticos móviles implicados en resistencia a antimicrobianos

1.3.1. Plásmidos

Los plásmidos son importantes agentes para la diseminación de genes entre bacterias. Aunque la información genética entre bacterias pueden transferirse mediante procesos naturales de transformación (tras la liberación del ADN por lisis del hospedador) o transducción (por empaquetamiento del ADN sobre partículas de bacteriofagos), muchos plásmidos (denominados autotransmisibles o conjugativos) son capaces de transferir esta información mediante el proceso de conjugación, en el que la maquinaria necesaria es aportada por el propio plásmido. Algunos plásmidos, denominados movilizables no se transfieren por sí mismos, pero pueden hacerlo aprovechando la maquinaria de los plásmidos conjugativos que puedan existir en el mismo organismo.

Un porcentaje importante de la resistencia antibiótica en cepas clínicas se debe a plásmidos de resistencia (plásmidos-R),¹³³ llamados así porque contienen uno o más determinantes específicos para la resistencia a antimicrobianos. Obviamente, estos plásmidos existen desde la era pre-

antibiótica como reservorio en pequeñas poblaciones, pero han emergido en relativamente poco tiempo tras la introducción en clínica de los agentes antimicrobianos. Un claro ejemplo es la resistencia a β -lactámicos en bacterias gramnegativas, donde el principal mecanismo de resistencia son las β -lactamasas que hidrolizan en anillo β -lactámico. Aunque los genes *bla* de las β -lactamasas pueden tener una localización cromosómica, son mucho más frecuentes en plásmidos conjugativos.¹⁴

Otra característica importante de los plásmidos conjugativos es su promiscuidad de especie, su transferencia no está confinada únicamente dentro de la misma especie o en especies cercanas.^{27,153,231,253}

1.3.2. Secuencias de inserción

Las secuencias de inserción (IS) bacterianas fueron inicialmente identificadas durante estudios de sistemas genéticos por su capacidad para generar mutaciones como resultado de su actividad de translocación. Su implicación en resistencia antibiótica y su localización en plásmidos transmisibles horizontalmente ponen de manifiesto su importancia en la diseminación y adquisición de genes de resistencia. Además, ciertas familias de IS que flanquean un ADN pueden actuar conjuntamente en la movilización de esta región constituyendo un Transposón Compuesto.¹⁹ Se ha demostrado la asociación de las IS y diversas actividades patogénicas y de virulencia en diferentes géneros bacterianos como *Bacillus*, *Bordetella*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Haemophilus*, *Neisseria*, *Vibrio*, *Yersinia*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, etc. Son elementos importantes para la adquisición de funciones accesorias, procesos de reordenamiento cromosómico o integración plasmídica.^{137,138}

En cuanto a su estructura, además de ser pequeñas son genéticamente compactas (Figura 15). Aunque existen algunas excepciones, la mayoría de ISs exhiben en sus extremos cortas repeticiones terminales invertidas (IR) de entre 10-40 pb. Estas IR presentan una región de unión a la transposasa y otra que incluye los nucleótidos implicados en la rotura del ADN durante la

transposición.^{48,113,143} Los promotores endógenos para la transposasa suelen localizarse parcialmente dentro de la IR corriente arriba del gen de la transposasa. Esta organización se cree que proporciona un mecanismo de autorregulación para la expresión de la propia transposasa.¹⁴²

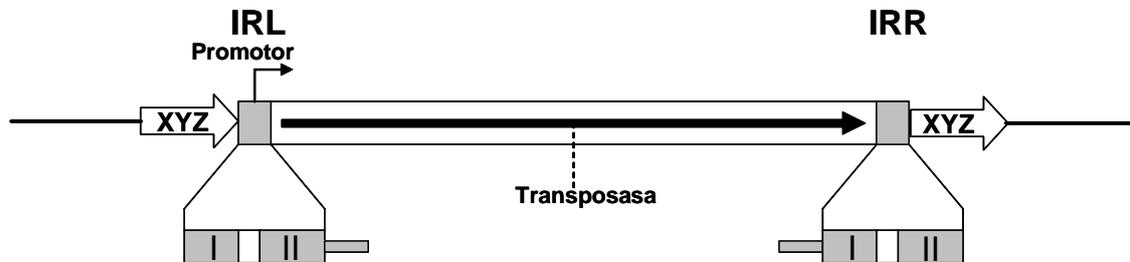


Figura 15. Organización de una secuencia de inserción (IS). Las repeticiones invertidas se representan mediante cajas grises. XYZ representa la repeticiones directas originadas en la secuencia diana tras el mecanismo de inserción. Dominio I: diana de acción de la transposasa. Dominio II: secuencia de unión de la transposasa.

La transposasa, localizada entre ambas IRs, presenta el dominio de unión al ADN en su región N-terminal, mientras que el dominio catalítico se encuentra cercano al extremo C-terminal.^{140,291} La interpretación funcional de este ordenamiento es que es posible la interacción de la proteína naciente con su secuencia diana sobre la IS, acoplándose expresión y actividad, además de favorecer la actividad de la proteína en *cis*.¹¹¹

Otra característica de las ISs es que, tras su inserción, la mayoría de ellas generan secuencias de repetición directa (DR) de la diana de ADN que flanquea la IS (Figura 15). Su longitud es de 2-14 pb y es característica de cada IS en particular. De este modo es posible determinar movimientos de estos elementos.

Por último debe destacarse que, aparte de su implicación en la adquisición y diseminación de genes, las ISs pueden activar la expresión de genes externos vecinos. Los elementos IS1, IS2 e IS5 poseen en las IRs una caja -35, de modo que si tras el proceso de transposición se encuentra en el sentido y la distancia correcta a una caja -10 previa se pueden formar nuevos

promotores que dirigen la expresión de genes adyacentes.^{128,136} También existen ejemplos de ISs que interrumpen genes estructurales o reguladores, promoviendo de este modo un cambio de fenotipo como el incremento de resistencia a un grupo antimicrobiano.⁹⁴

La actividad de transposición se mantiene generalmente a bajo nivel. Se cree que ello es debido a que una alta actividad tendría un efecto mutagénico negativo de reordenamiento del genoma, que iría en detrimento del hospedador.⁵¹ Por este mismo hecho, los promotores para la transposasa son débiles y están localizados en las IRs, posibilitando la regulación de la expresión por la propia unión de la transposasa.

1.3.3. Transposones

Los transposones compuestos son elementos genéticos capaces de movilizarse por sí mismos de un punto a otro del cromosoma bacteriano o a plásmidos. Este movimiento lo realizan mediante un tipo de recombinación específica denominado transposición en el que puede quedar una copia del transposón en el sitio original (mediante una replicación previa) o no. Estos elementos conllevan reordenaciones en los genomas como inversiones o deleciones. Hay que señalar que estos elementos no son, normalmente, replicativos por sí mismos sino que son integrantes de los genomas, aportando plasticidad genética sobre la que actúan mecanismos evolutivos.¹⁹

Los transposones compuestos presentan un tamaño bastante mayor que las ISs, de entre 2-50 kb. Normalmente están flanqueados por sendas copias de ISs casi idénticas o de la misma familia. La movilidad es debida a las transposasas de estas ISs. En la región central del transposón se sitúa los genes movilizados por esta estructura y que no están implicados en el mecanismo de transposición (como, por ejemplo, genes de resistencia a medicamentos, genes de virulencia, etc.). En estos elementos las ISs pueden presentar la misma orientación o una orientación inversa.¹²¹

Existe un tipo especial de transposones, denominados transposones conjugativos, que combinan las características de los transposones, plásmidos y bacteriófagos. Estos pueden escindirse e integrarse en el ADN aunque por un mecanismo diferente al que lo hacen transposones clásicos como Tn5 o Tn10. La transposición la realizan a través de un intermediario circular covalentemente cerrado formado mediante la acción de una integrasa y una escisionasa. Este ADN es capaz de transferirse por sí mismo de una célula a otra por un proceso similar al de los plásmidos conjugativos. Al final del proceso tanto el donador como el receptor poseen una copia de este elemento completo.³⁰

Existe una gran variedad de estos elementos implicados en resistencia a antimicrobianos tanto en bacterias grampositivas como bacterias gramnegativas, que incluyen resistencia a β -lactámicos, glucopéptidos, tetraciclinas, macrólidos, cloranfenicol, sulfamidas, etc.³⁰

1.3.4. Integrones

Los integrones se definen como elementos genéticos dinámicos, en los que por un mecanismo de recombinación específica de sitio se acumulan una combinación de genes estructurales organizados como un operón. Estos genes son mayoritariamente genes de resistencia a antimicrobianos. Este dinamismo se refiere a la capacidad de los genes estructurales para escindirse en forma de círculos autónomos no replicativos y la capacidad al mismo tiempo de éstos para incorporarse en un integrón diferente.

Los integrones se han diseminado ampliamente dentro de la familia de las *Enterobacterias* y otras bacterias gramnegativas, como *Vibrio cholerae* o *Pseudomonas aeruginosa*.^{220,221,278} Recientemente también se han identificado en bacterias grampositivas (*Corynebacterium glutamicum*).¹⁶⁶

La actividad de los integrones está dirigida por la integrasa. Esta enzima cataliza la recombinación específica de sitio entre dos secuencia cortas de ADN que son las dianas *attI* y *attC*, o bien dos sitios *attC*. Los integrones

relacionados con resistencia antimicrobiana se definen según la secuencia de su integrasa en cuatro clases diferentes, aunque los más comunes son los de clase 1 en aislamientos de tipo clínico.^{213,223} Estructuralmente, los integrones se dividen en tres regiones: una región constante en el extremo 5' (5'CS) que contiene la integrasa y los promotores de ésta (P_{int}) y de los genes estructurales (P_{ant} , y eventualmente P_2); una región central variable que contiene los genes estructurales (normalmente de 1 a 4) y separada de 5'CS por el sitio de recombinación *attI* (de unos 65 pb). Los genes estructurales están separados unos de otros por el *elemento de 59pb* (cuya longitud es variable), el cual proporciona la diana *attC* para el proceso de recombinación específica de sitio llevado a cabo por la integrasa en la escisión o adquisición de genes estructurales; y finalmente existe una región constante en el extremo 3' (3'CS) que consiste de un gen de resistencia a sulfamidas (*sul1*) y un fragmento de un gen de resistencia a compuestos de amonio cuaternario (*qacEΔ1*) (Figura 16).²²²

Los genes estructurales, generalmente, no contienen promotores propios y se transcriben usando el promotor proporcionado por el integrón como un ARN mensajero policistrónico. Los genes más distales al promotor muestran una menor tasa de transcripción.⁴¹ Muchos integrones se han localizado dentro de otros elementos genéticos como plásmidos^{9,259} o transposones.¹⁸⁷

Aunque la mayoría de integrones de clase 1 tienen esta estructura, se han descrito integrones inusuales pertenecientes a esta clase como son los de tipo In6 e In7.⁸³ A estos integrones se les ha denominado integrones compuestos, porque contienen una segunda copia de la región 3'CS. Estos integrones contienen una región común localizada entre las dos repeticiones 3'CS que incluye una proteína con presumible actividad recombinasa (Orf513). En la Figura 16 se representan esquemáticamente distintas estructuras de integrones de clase 1 y la adquisición de genes estructurales por parte de éstos.

Otra estructura relacionada con los integrones es la de los super-integrones. Éstos se localizan normalmente a nivel del cromosoma bacteriano y codifican genes con una amplia variedad de funciones (pueden contener más de 100 genes). Son estructuras muy antiguas y se especula con la posibilidad que en ellos este el origen de los actuales integrones asociados casi exclusivamente a resistencia antimicrobiana.^{60,82}

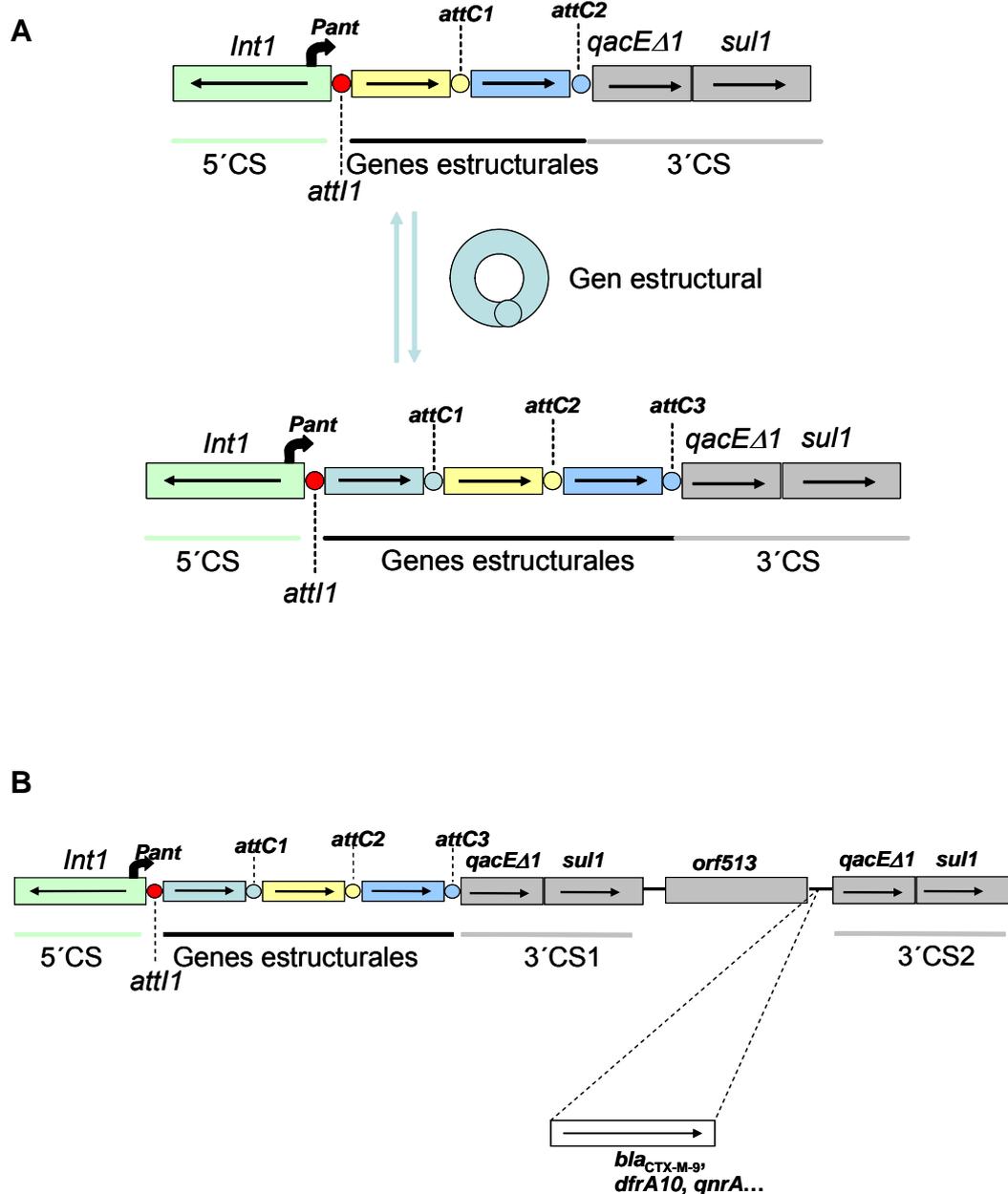


Figura 16. Estructura de los integrones de clase 1. A: Se representa esquemáticamente el proceso de adquisición o escisión de genes de resistencia. B: Se representa la estructura de un integrón de clase 1 compuesto caracterizado por la repetición de dos regiones conservadas 3'-CS y la incorporación de un elemento CR (*orf513*).

Los genes de resistencia a antimicrobianos encontrados en integrones abarcan genes de resistencia a aminoglucósidos (*aadA*, *aadB*,...), genes de resistencia a β -lactámicos (oxacilinasas y carbapenemasas), resistencia a cloranfenicol (*cat*, *cmlA*), resistencia a trimetoprim (*dfrA*, *dfrB*), resistencia a estreptomicina, rifampicina, eritromicina.²²² Y, por supuesto, la resistencia a quinolonas mediada por plásmido (*qnrA*).

1.4. Familia de las proteínas de pentapéptidos repetidos

1.4.1. Estructura y distribución de las proteínas de pentapéptidos repetidos en bacterias

La primera proteína con repeticiones pentapeptídicas descrita fue HgIK de *Cyanobacterium anabaena*²¹. De la secuencia completa de la cepa PCC6803 de *Cyanobacterium synechocystis*¹¹⁶ se obtuvieron 16 proteínas diferentes con un alto número de repeticiones pentapeptídicas. La característica más importante de estas repeticiones es su regularidad. Las repeticiones se encuentran de 13 a 60 copias en la secuencia de la proteína (Tabla 6), y, normalmente, no existen interrupciones de su periodicidad.¹⁵

Al alinear 352 repeticiones pentapeptídicas individuales se pudo obtener la frecuencia de cada aminoácido en cada una de las 5 posiciones del pentapéptido (Tabla 7). Estas posiciones no están completamente conservadas, pero la secuencia consenso se puede expresar como A(N/D)L*X, donde X es cualquier aminoácido, el asterisco denota un aminoácido polar y la segunda posición puede ser asparagina o ácido aspártico.¹⁵ Nunca aparece una prolina en las posiciones 1-3, lo cual sugiere que estos residuos pueden estar implicados en la formación de puentes de hidrógeno.

Existen diferentes predicciones sobre la estructura tridimensional de estas proteínas. Todos ellos coinciden en una estructura superhelicoidal. Uno de estos modelos consistiría en que las repeticiones pentapeptídicas formarían β -hélices paralelas. Cada pentapéptido forma una cadena β y tres pentapéptidos constituyen un giro en la β -hélice. En la Figura 17 se muestra una representación de la estructura en β -hélice esperada para los

pentapéptidos repetidos, donde cada triángulo forma un lado de la sección triangular de la hélice.¹⁵

Tabla 6. Algunas proteínas que contienen repeticiones pentaméricas.

Nombre del gen	Longitud en aminoácidos	Nº de repeticiones ^a	Nº de acceso*
SLR0516	166	22(66%)	Q55837
SLR0719	388	19(24%)	Q55201
SLR0967	150	19(63%)	P72857
SLR1152	331	44(66%)	P74221
SLL0183	259	18(35%)	Q55773
SLL0274	196	20(51%)	P74392
SLL0301	169	20(65%)	Q55531
SLL0414	286	24(42%)	Q55112
SLL0577	169	22(65%)	Q74725
yisX	212	35(83%)	Q06733
YYBG_BACSU	279	22(40%)	P37497
YJCF_ECOLI	430	42(49%)	P32704
MCBG_ECOLI	187	29(78%)	P05530
Q52118	295	43(73%)	Q52118

^a Entre paréntesis se expresa el porcentaje de aminoácidos que forman parte de las repeticiones pentapeptídicas respecto al total de la proteína.

* En la base de datos de TrEMBL (<http://www.expasy.org/sprot/>)

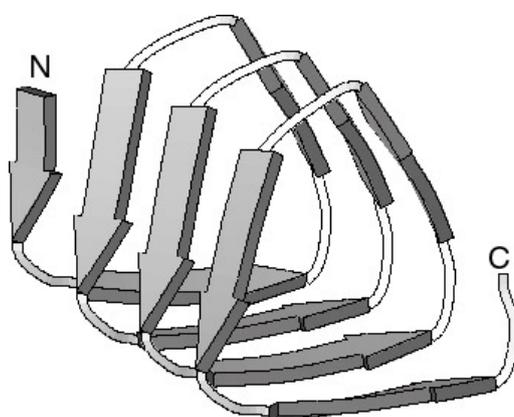


Figura 17. Modelo estructural en β -hélice de las proteínas con repeticiones pentaméricas.

Tabla 7. Composición aminoacídica de las repeticiones pentapeptídicas.

Aminoácido	Posición				
	1	2	3	4	5
A	68.5	0.9	2.0	5.1	3.4
C	2.3	0.9	1.4	0.6	0
D	0	27.8	0	2.8	6.8
E	0.3	2.3	0	6.5	10.5
F	0.6	2.6	13.4	1.4	1.7
G	1.1	0	0.3	2.6	36.4
H	0	1.1	0	2.3	2.6
I	2.6	4.3	1.4	4.5	0
K	0.3	3.7	0	4.5	5.1
L	1.1	3.4	75.0	1.4	1.4
M	0.6	0.3	4.2	1.4	0
N	0	38.4	0	5.4	7.1
P	0	0	0	0.6	0.3
Q	0.3	1.1	0	6.8	5.4
R	0.6	3.4	0	14.2	11.6
S	6.0	3.4	0	17.3	2.6
T	8.0	2.8	0.6	16.2	0.3
V	8.0	1.4	1.7	3.1	0
W	0	0	0	0.6	1.7
Y	0	2.2	0	2.5	3.1

Se muestra el porcentaje de cada aminoácido en cada una de las cinco posiciones del pentapéptido. Los residuos más comunes (>5%) se muestran en negrita.

Función y localización subcelular de las proteínas de pentapéptidos repetidos.

No está clara la función de estas proteínas. Sin embargo, el gran número de las mismas en *Cyanobacteriaceae* sugiere que podrían estar implicadas en funciones metabólicas específicas de estas bacterias, tales como la fijación de nitrógeno o la fotosíntesis. Dado la regularidad de las repeticiones pentapeptídicas y su probable carencia de asas extendidas, es poco probable que tengan una función enzimática. ^{15,98,285}

1.4.2. Proteína pentapeptídica McbG

Las microcinas son antibióticos de bajo peso molecular producidas y excretadas por enterobacterias.¹⁰ La microcina B17 es un péptido de 3.1-kDa modificado postranscripcionalmente producido por las cepas de *E. coli* que contienen un operón plasmídico formado por 7 genes (*mcbABCDEFG*),⁷¹ el primero de los cuales está implicado en la síntesis de la microcina B17.²⁸⁶ Las proteínas McbBCD producen modificaciones postraduccionales en las serinas y cisteínas de McbA, mientras que las proteínas McbEFG están implicadas en el transporte e inmunidad frente a la microcina.⁶⁸ El efecto de la microcina B17 sobre las cepas sensibles de *E. coli* incluye inhibición del crecimiento, disminución de la replicación de ADN e inducción de la respuesta SOS.⁹⁵ Heddle J.G. y col.⁸⁸ han demostrado que la microcina B17 es un inhibidor natural de la ADN girasa; aunque la microcina B17 no tiene un efecto detectable en el enrollamiento y relajación del ADN por parte de la ADN girasa *in vitro* y es incapaz de estabilizar el complejo ADN-ADN girasa en ausencia de nucleótidos. En presencia de ATP esta toxina estabiliza dicho complejo de modo similar a las quinolonas. Prueba de ello es que ciertos cambios en la ADN girasa que confieren resistencia a quinolonas producen resistencia cruzada a microcina B17.

La inmunidad se produce gracias a 3 genes: *mcbE* y *mcbF* que sintetizan un transportador capaz de expulsar a la microcina B17 de la célula, y *mcbG* que codifica un componente que protege a las bacterias que sintetizan microcina B17 de su propia acción, bloqueando la inhibición de la ADN girasa.⁶⁸ Además, un plásmido que lleve el operón completo o un vector que exprese sólo el gen *mcbG* produce una disminución en la sensibilidad a quinolonas de 2-8 veces.^{135,250}

En un trabajo publicado recientemente, se muestra que la acción de la microcina B17 sobre la ADN girasa requiere que ésta esté unida a un fragmento de ADN de al menos 150 pb. Estos autores proponen que el modo de acción de la microcina B17 requiere de un ADN lo suficientemente largo para permitir el transporte de un segmento de ADN a través del hueco creado

en el ADN por el enzima. En este modelo se propone que la microcina B17 se uniría al dominio carboxilo terminal de la subunidad GyrB.¹⁹⁹

En relación con la activación del sistema SOS por parte de la microcina B17, se ha publicado que quinolonas como ciprofloxacino inducen dicho sistema, lo cual parece que promueve la diseminación horizontal de genes de resistencia a antimicrobianos.¹⁷

1.4.3. Proteína pentapeptídica MfpA

A través de estudios de identificación de bombas de expulsión activa en *Mycobacterium smegmatis* que confiriesen resistencia fluoroquinolonas hidrofóbicas, se descubrió la existencia en esta especie de una proteína pentapeptídica, similar a McbG, que confiere sensibilidad disminuida a fluoroquinolonas como ciprofloxacino o esparfloxacino y a la que se denominó MfpA.¹⁵⁶ Esta proteína, sin embargo, no confiere resistencia a ácido nalidíxico u otros antimicrobianos transportados por bombas de expulsión activa. No se conoce por qué MfpA no afecta a la sensibilidad a ácido nalidíxico. Los plásmidos que codifican MfpA incrementan la resistencia a ciprofloxacino hasta 4 veces, mientras que la inactivación de dicho gen del cromosoma de *M. smegmatis* hace disminuir la CMI de ciprofloxacino 4 veces. El mecanismo a través del cual MfpA ejerce este efecto no está claro, pero se ha demostrado mediante ensayos de acumulación de ciprofloxacino marcado con ¹⁴C que no está implicado en un mecanismo de expulsión activa.¹⁵⁶ Recientemente, la determinación de la estructura tridimensional de MfpA ha revelado que esta proteína exhibe un tamaño, curvatura y características electrostáticas similares a la forma B del ADN.⁸⁹ De este modo, la mimetización del ADN explicaría tanto la inhibición de la ADN girasa como la resistencia a fluoroquinolonas resultante de la expresión de la proteína *in vivo*.

Estas dos proteína pentapeptídicas, McbG y MfpA, comparten 19.6% y 18.9% de homología en su secuencia proteica con QnrA, lo que da idea de la variabilidad de las secuencias proteicas dentro de esta familia.

2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO E HIPÓTESIS DE TRABAJO

Las quinolonas se usan ampliamente en la práctica clínica y forman uno de los grupos de antimicrobianos con mayor espectro de acción, además de poseer características farmacocinéticas y de tolerancia muy favorables. Las quinolonas son antimicrobianos potentes, lo cual ha permitido su éxito clínico y un amplio uso tanto profiláctico como terapéutico. Sin embargo, su empleo indiscriminado ha traído consigo un aumento creciente de la resistencia frente a estos antimicrobianos mediante diferentes mecanismos desde su introducción en la práctica clínica.

La multirresistencia en la familia *Enterobacteriaceae* es un fenómeno en expansión en todo el mundo y está incrementado tanto en humanos como en el ámbito veterinario, alcanzándose tasas del 15-20% para ácido nalidíxico y e incluso superiores al 10% en el caso de las fluoroquinolonas.

Hasta hace pocos años, los principales mecanismos implicados en este tipo de resistencia han sido dos (ambos mediados por elementos cromosómicos): alteraciones en las dianas de las quinolonas y disminución en la acumulación del antimicrobiano en el interior bacteriano por

impermeabilización de la membrana o por expresión de sistemas de expulsión activa.

En 1998, se describió por primera vez resistencia a quinolonas transmisible horizontalmente mediante un plásmido conjugativo. La diseminación horizontal de mecanismos de resistencia a fluoroquinolonas abre la posibilidad de una rápida expansión de la resistencia a estos antimicrobianos, tanto en patógenos de animales como humanos, más aún con el extenso uso que se hace de las mismas.

El trabajo de investigación recogido en la presente Tesis Doctoral tiene como finalidad determinar la relevancia clínica de la aparición de este nuevo mecanismo de resistencia a quinolonas. Para conseguir estos resultados se establecieron los siguientes objetivos:

- Evaluación de la prevalencia de los genes implicados en la resistencia a quinolonas mediada por plásmido en cepas clínicas de la familia *Enterobacteriaceae*.
- Estudio de la relación epidemiológica entre las cepas aisladas que expresan resistencia a quinolonas mediada por plásmidos mediante la utilización de pruebas genotípicas como REP-PCR o PFGE.
- Estudio de la movilidad genética (transferencia horizontal de la información) de los genes de resistencia a quinolonas mediada por plásmido mediante ensayos de conjugación.
- Determinación de la sensibilidad a quinolonas y a otros antimicrobianos tanto en las cepas clínicas que contienen este mecanismo de resistencia como en los transconjugantes obtenidos a partir de ellas.
- Análisis de las estructuras genéticas que albergan los genes responsables de este mecanismo de resistencia.

- Estudio del efecto de los niveles de expresión del gen *qnrA* sobre los niveles de sensibilidad a diferentes quinolonas (ciprofloxacino y moxifloxacino).
- Determinación de los reservorios naturales para este mecanismo de resistencia mediante el análisis de diferentes familias de bacterias gramnegativas.
- Evaluación del impacto de este mecanismo de resistencia mediado por *qnrA* en la detección de resistencia a quinolonas mediante distintos sistemas automáticos de sensibilidad antimicrobiana.
- Estudiar en un modelo de neumonía experimental en ratones la actividad de ciprofloxacino, levofloxacino y moxifloxacino frente a dos cepas isogénicas de *Klebsiella pneumoniae* productora y no productora de QnrA.

3. MATERIAL

3.1. Microorganismos y vectores

Se estudiaron diversas colecciones de aislados clínicos de enterobacterias para establecer la prevalencia de genes *qnr* que incluyeron especies de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter agglomerans*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii* y *Citrobacter youngae*, procedentes de diferentes estudios de vigilancia de resistencias, aislados en distintas regiones de Europa, América y Australia. Los aislados con mayor probabilidad de albergar este gen son cepas resistentes o con sensibilidad intermedia a quinolonas, y resistentes a β -lactámicos con fenotipo de presencia de una β -lactamasa de espectro extendido (BLEE) o una de tipo AmpC plasmídica (pACBL).

Además, se usaron cepas de las familias *Aeromonadaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Xanthomonadaceae*, *Moraxellaceae* y *Shewanellaceae* para establecer el origen del gen *qnrA*.

Cepas de laboratorio:

***E. coli* Dh5 α** (F⁻ ϕ 80d/lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 *recA1 endA1 hsdR17*(r_k⁻, m_k⁺) *phoA supE44 λ thi-1 gyrA96 relA1*)

***E. coli* TOP10** (F⁻ *mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC)* ϕ 80/lacZ Δ M15 Δ lacX74 *recA1 ara Δ 139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG*)

***E. coli* INV α F'** (F' *endA1 recA1 hsdR17* (r_k⁻, m_k⁺) *supE44 thi-1 gyrA96 relA1 ϕ 80/lacZ Δ M15 Δ lacZYA-argF*)U169)

***E. coli* DH10B** (F⁻ *mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC)* ϕ 80/lacZ Δ M15 Δ lacX74 *recA1 endA1 ara Δ 139 Δ (ara, leu)7697 galU galK λ - rpsL (Str^R) nupG*)

***E. coli* J53 Az^R** (F⁻, *met*⁻, *pro*⁻, resistente a azida sódica)

***E. coli* J53Rif^R** (F⁻, *met*⁻, *pro*⁻, resistente a rifampicina)

***Shewanella algae* CIP106454T** (cepa de la colección del Instituto Pasteur, Paris, Francia)

***S. putrefaciens* CIP8040** (cepa de la colección del Instituto Pasteur, Paris, Francia)

***Vibrio vulnificus* CIP103196** (cepa de la colección del Instituto Pasteur, Paris, Francia)

***V. parahaemolyticus* CIP71.2** (cepa de la colección del Instituto Pasteur, Paris, Francia)

***Photobacterium profundum* CIP106289** (cepa de la colección del Instituto Pasteur, Paris, Francia)

***Escherichia coli* ATCC 25922**

***Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853**

***Staphylococcus epidermidis* ATCC 27626**

***Staphylococcus aureus* NCTC 8325**

Vectores de clonación/expresión usados en procariotas:

pUC18 (confiere resistencia a ampicilina)

pBK-CMV (Stratagene, Cedar Creek, Texas, EE.UU) (confiere resistencia a kanamicina)

pPCRBluntII-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, Canadá) (confiere resistencia a kanamicina)

pCR[®]2.1 (Invitrogen, Carlsbad, Canadá) (confiere resistencia a kanamicina y ampicilina)

3.2. Medios de cultivo

- **MHA** (Agar de Mueller-Hinton): peptona 17.5 g/L, sólidos de infusión de carne 4.0 g/L, almidón 1.5 g/L, agar-agar 15.0 g/L, pH 7.4. Medio ampliamente recomendado para ensayos de sensibilidad a antimicrobianos. (Difco, Sparks, MD, EE.UU.)
- **MHB** (Caldo de Mueller-Hinton): peptona 17.5 g/L, sólidos de infusión de carne 4.0 g/L, almidón 1.5 g/L, pH 7.4. Versión líquida del agar anterior, recomendado para el estudio de la CMI de antimicrobianos. (Difco, Sparks, MD, EE.UU.)
- **Agar sangre**: peptona de caseína 12 g/L, peptona de carne 11 g/L, almidón 1.5 g/L, cloruro sódico 5 g/L, agar-agar 15 g/L, sangre desfibrinada al 5%. Medio especialmente rico en peptonas. (Soria-Greiner, Madrid, España)
- **LB** y **Agar LB** (Medio Luria Bertani): triptona 10g/L, extracto de levadura 5 g/L, cloruro sódico 10 g/L, pH 7.0. Medio rico en nutrientes.

- **TSB** (Caldo de triptona y soja): peptona de caseína 17.0 g/L, peptona de soja 3.0 g/L, cloruro sódico 5.0 g/L, fosfato monopotásico 2.5 g/L, dextrosa 2.5 g/L, pH 7.3. Medio líquido altamente nutritivo de uso general (Difco, Sparks, MD, EE.UU.). Con glicerol al 10%, indicado para la congelación a -70°C de microorganismos.
- **TSA** (Medio sólido de triptona y soja): peptona de caseína 17.0 g/L, peptona de soja 3.0 g/L, cloruro sódico 5.0 g/L, fosfato monopotásico 2.5 g/L, dextrosa 2.5 g/L, agar-agar 15.0 g/L, pH 7.3. Versión sólida del medio anterior. En algunos de los casos de las especies de *Shewanellaceae* y *Vibrionaceae* fue necesaria la adición de cloruro sódico al 5% para su crecimiento. Además, para obtener un crecimiento significativo de *Photobacterium profundum*, la incubación se realizó a una temperatura de 10°C durante 72 horas.
- **SOC**: Tryptona 20 g/L, extracto de levadura 5 g/L, cloruro sódico 0.5g/L, 10ml de cloruro potásico (250 mM). Esterilizar en autoclave. Añadir 5ml de cloruro magnésico (2M) y 20 ml de glucosa (1M) estériles. Condiciones para 1L. Medio muy rico usado en ensayos de transformación.
- Medio Prueba Coagulasa: Las concentraciones pueden variar. Esencialmente contiene infusión cerebro-corazón, TSA, manitol, púrpura de bromocresol y suero humano.
- API 20 E Médium (BioMérieux, Marcy-IÉtoile, FR)

3.3. Productos químicos y microbiológicos

- Acetato de sodio (Merck, Madrid, España. 6568)
- Ácido bórico (Pharmacia Biotech, Piscataway, EE.UU. 17-1322-01)
- Ácido clorhídrico concentrado (Panreac, Barcelona, España.181345)
- Ácido acético glacial (Difco, Sparks, MD, EE.UU. A-6283)
- Ácido maleico (Panreac, Barcelona, España.141882)
- Agar-agar (Difco, Sparks, MD, EE.UU. 0140-01)
- Agarosa D-1 baja EEO (Pronadisa, Madrid, España. 8014)
- Agarosa para PFGE (Bio-Rad, Hercules, Canada. 162-0137)
- Alcohol isoamílico (Merck, Madrid, España. 979)
- Agua milliQ
- ARNasa (Promega, Madison, EE.UU. 0890)
- Azul de bromofenol (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, EE.UU. 17-1329-01)
- Azul de metileno (Difco, Sparks, MD, EE.UU. D195-13)
- Bacto-Agar (Difco, Sparks, MD, EE.UU. 0140-01)
- Bacto-Peptona (Difco, Sparks, MD, EE.UU. 211677)
- β -mercaptoetanol (Sigma, St. Louis, EE.UU. M-7154)
- Bromuro de etidio (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania. 200 271)
- Citrato sódico (Sigma, St. Louis, EE.UU. S-4641)
- Cloroformo (Merck, Madrid, España. 1445)
- Cloruro de litio (Sigma, St. Louis, EE.UU. L-9650)
- Cloruro de magnesio (Sigma, St. Louis, EE.UU. M-2393)
- Cloruro de sodio (Panreac, Barcelona, España.131659)
- CTAB o Bromuro de-Cetil-N,N,N-trimetilamonio (Sigma, St. Louis, EE.UU)
- DEPC (Di-etil pirocarbonato) ($C_6H_{10}O_5$) (Sigma, St. Louis, EE.UU. D-5758)
- Dimetil Sulfóxido (Panreac, Barcelona, España)
- EDTA Na_2 Ácido etilendiaminotetracético disódico (Sigma, St. Louis, EE.UU. E-5134)
- Etanol absoluto 98% (Scharlau, Barcelona, España. ET0005)

- Extracto de levadura (Scharlau, Barcelona, España. 07-079)
- Extracto de carne (Difco, Sparks, MD, EE.UU. 0126-01)
- Fenol (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, EE.UU. 75829)
- Fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (Sigma, St. Louis, EE.UU. P-3803)
- Fosfato dipotásico (Sigma, St. Louis, EE.UU. P-3786)
- Fosfato disódico hidratado (Na_2HPO_4) (Sigma, St. Louis, EE.UU.)
- Fosfato potásico dihidratado (KH_2PO_4) (Merck, Madrid, España. 104873)
- Glicerol (Panreac, Barcelona, España.141339)
- Glioxal (Etanedial) (Sigma, St. Louis, EE.UU. G-3140)
- Glucosa (Panreac, Barcelona, España.141341)
- Hidróxido sódico (Panreac, Barcelona, España.131687)
- Isopropil-thio-bD-galactopiranosido (IPTG) (Promega, Madison, EE.UU.)
- Isopropanol (Scharlau, Barcelona, España. AL-1312)
- Lisozima clorhídrica (USB, Cleveland, EE.UU.)
- N-lauril sarcosina ($\text{C}_{15}\text{H}_{28}\text{NO}_3\text{Na}$) (Sigma, St. Louis, EE.UU. L-5125)
- Proteasa peptona (Scharlau, Barcelona, España. 07-213)
- Proteinasa K (Sigma, St. Louis, EE.UU.)
- SDS (lauril sulfato sódico) (Sigma, St. Louis, EE.UU. L-3771)
- Sulfato de magnesio (Sigma, St. Louis, EE.UU. M-7899)
- Tiocianato de guanidina ($\text{CH}_5\text{N}_3\cdot\text{HSNC}$) (Sigma, St. Louis, EE.UU. G-7297)
- Trizma base o Tris Base (Sigma, St. Louis, EE.UU. T-8404)
- Tris-clorhídrico (Sigma, St. Louis, EE.UU. T-3253)
- Tween® 20 (Polyoxyetilenesorbitan monolaurate) (Sigma, St. Louis, EE.UU. P-1379)
- 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-Gal) (Sigma, St. Louis, EE.UU.)

3.4. Reactivos para biología molecular

3.4.1. Reactivos para técnicas de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

- Desoxinucleótidos trifosfato (Amersham Pharmacia, Piscataway, EE.UU.)
- Tampón de PCR 10x (Invitrogen, Barcelona, España)
- $MgCl_2$ (Invitrogen, Barcelona, España)
- *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen, Barcelona, España)
- Iniciadores específicos (cebadores)
- Agua milliQ

3.4.2. Enzimas de restricción (Enzimas y Tampones)

Los siguientes enzimas de restricción se han usado en diferentes técnicas empleando los tampones y condiciones del fabricante:

- *Bpml*, *EcoRI*, *HindIII*, *PstI*, *PvuII* (Amersham Pharmacia, Piscataway, EE.UU.)
- *BamHI*, *SacI*, *NdeI*, *XbaI* (Roche, Mannheim, Alemania)

3.4.3. Reactivos para SSCP (*Single-Strand Conformation Polymorphism*)

- *Sephaglas BandPrep Kit* (Amersham Pharmacia, Piscataway, EE.UU.) (Sistema de purificación de ADN)
- Solución de formamida (95% formamida, 20mM EDTA, 0.05% azul de bromofenol, 0.05% xileno cianol) (Amersham Pharmacia, Piscataway, EE.UU.)
- Geles de poliacrilamida de *GeneGel Excel[®] 12.5/24 Kit* (Amersham Pharmacia, Piscataway, EE.UU.)
- Sistema de tinción *DNA Plus Silver Staining* (Amersham Pharmacia, Piscataway, EE.UU.)

3.4.4. Reactivos para PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*)

- Tampón TE: 10 mM Tris-HCl (pH8.0), 1mM EDTA (pH8.0).
- Tampón PIV: 0.01 mM Tris-HCl (pH8.0), 1 M NaCl.
- Tampón CE: 6 mM Tris-HCl (pH8.0), 1 M NaCl, 0.1 M EDTA (pH8.0), 0.2% deoxicolato sódico, 0.5% sarcosil, 50 µg/ml ARNasa A, 100 µg/ml lisozima.
- Tampón SE: 0.5 M EDTA (pH9.0), 1% sarcosil.
- TBE (0.5x) (pH8.5): 50 mM Tris-base, 50 mM ácido bórico, 0.2 mM EDTA.
- Lisozima: Preparada como solución concentrada a 10 mg/ml (Sigma, St. Louis, EE.UU.).
- ARNasa A: Preparada como solución concentrada a 10 mg/ml en 10 mM de Tris-HCl (pH7.5), 15 mM NaCl (Sigma, St. Louis, EE.UU.).

3.4.5. Reactivos para hibridación de ácidos nucleicos

Se utilizó el sistema de la casa comercial Roche (Mannheim, Alemania) “*DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II*” para el marcaje y detección de ácidos nucleicos.

Como soporte del material genético se usaron las membranas de nylon *Hybond-N+* (Amersham Pharmacia, Piscataway, EE.UU.). El revelado se realizó sobre las películas fotográficas de la casa comercial Roche (Mannheim, Alemania) “*Lumi-Film Chemiluminiscent Detection*”.

Alternativamente, para obtener una cantidad mayor de sonda marcada se usó el sistema de marcaje de sonda de Roche (Mannheim, Alemania) “*PCR DIG Labeling Mix^{plus}*”.

Las soluciones no proporcionadas por los sistemas comerciales usados se detallan a continuación:

1. Soluciones de transferencia:

- Solución de depurinación (HCl 0.25N)
Diluir 20.7 ml de HCl 37% en 1 L de agua destilada.
- Solución de desnaturalización (NaOH 0.5N+ NaCl 1.5M)
Disolver 82 g de NaCl y 20 g de NaOH en 1 L de agua destilada.
- Solución de neutralización (Tris 1M + NaCl 2M)
Disolver 121.1 g de Tris-base y 116 g de NaCl en 1 L de agua destilada. Ajustar pH 7.5.
- Solución de transferencia (SSC20x)
Disolver 175 g de NaCl y 88.2 g de Citrato sódico dihidratado en 1 L de agua destilada. Ajustar pH 7.0.

2. Soluciones para la detección inmunológica:

- Tampón de ácido maleico (0.1M Ácido maleico + NaCl 0.15M).
Disolver 11.6 g de ácido maleico, 8.75 g de NaCl y 7 g NaOH en 1 L de agua destilada. Ajustar pH 7.5.
- Tampón de lavado (0.1M Ácido maleico + NaCl 0.15M + 0.3% (v/v) Tween 20).
Añadir 0.6 ml de Tween 20 a 200 ml de tampón de ácido maleico.
- Tampón de detección (0.1M Tris-HCl, 0.1M NaCl)
Disolver 3.16 g de Tris-HCl y 1.16 g de NaCl en 200 ml de agua destilada. Ajustar a pH 9.5.

3.4.6. Reactivos para clonación

- Enzimas de restricción (detallado anteriormente)
- Fosfatasa alcalina (Roche, Mannheim, Alemania)
- T4 DNA Ligasa (Roche, Mannheim, Alemania)

3.4.7. Reactivos para extensión con cebador

En los experimentos de determinación de punto de inicio de la transcripción y regiones promotoras derivadas se utilizó el sistema de Invitrogen (Barcelona, España) “5´RACE System for Rapid amplification of cDNA End, Versión 2.0”.

3.4.8. Agarosas y tampones de electroforesis

- TBE 10x
 - Tris base.....108 g
 - Ácido bórico.....55 g
 - EDTA 0.5M pH8.0.....40 mlDisolver en 1 L de agua destilada.

- TAE 50x
 - Tris base.....242 g
 - Ácido acético glacial.....57.1 ml
 - Na₂EDTA dihidratado.....37.2 gDisolver en 1 L de agua destilada.

- Agarosas
 - Agarosa Grado Biología Molecular (Promega, Madison, EE.UU.)
 - Agarosa D-1 baja EEO (Pronadisa, Madrid, España.)
 - Agarosa Seaplaque GTG (FMC BioProducts)

3.5. Soluciones tampón

- PBS

- KH_2PO_4 0.144 g
- Na_2HPO_4 heptahidratado1.775 g
- NaCl 8.5 g

Disolver en 1 L de agua y comprobar pH 7.2. Autoclavar.

- Solución salina

- NaCl 8.5 g

Disolver en 2 L de agua destilada y esterilizar. Almacenar a 4°C.

3.6. Antimicrobianos

- Quinolonas

- Ácido nalidíxico (Sigma, St. Louis, EE.UU.)
- Ciprofloxacino (Bayer, Barcelona, España)
- Levofloxacino (Roussel Uclaf, Romainville Cedex, Francia)
- Moxifloxacino (Bayer, Barcelona, España)
- Clinafloxacino (Parke-Davis, New cork, EE.UU.)
- Norfloxacino (Sigma, St. Louis, EE.UU.)
- Ofloxacino (Roussel Uclaf, Romainville Cedex, Francia)
- Trovafloxacino (Pfizer, Madrid, España)
- Esparfloxacino (Rhone-Poulenc Sante, Toulouse, Francia)

- β -lactámicos

- Ampicilina (Sigma, St. Louis, EE.UU.)
- Amoxicilina (Sigma, St. Louis, EE.UU.)
- Piperacilina (Sigma, St. Louis, EE.UU.)
- Cefoxitina (Sigma, St. Louis, EE.UU.)
- Cefotaxima (Sigma, St. Louis, EE.UU.)
- Ceftazidima (GlaxoWellcome, Madrid, España)

- Cefepima (Bristol-Myers Squibb)
- Aztreonam (Bristol-Myers Squibb, Nueva York, EE.UU.)
- Imipenem (Merck, Madrid, España)
- Meropenem (Zeneca, Madrid, España)

- Inhibidores de β -lactamasas
 - Ácido clavulánico (SmithKline Beecham)
 - Sulbactam (Pfizer, Madrid, España)
 - Tazobactam (Sigma, St. Louis, EE.UU.)

- Aminoglucósidos
 - Amicacina (Sigma, St. Louis, EE.UU.)
 - Tobramicina (Sigma, St. Louis, EE.UU.)
 - Gentamicina (Sigma, St. Louis, EE.UU.)

- Otros
 - Cloranfenicol (Sigma, St. Louis, EE.UU.)
 - Tetraciclina (Sigma, St. Louis, EE.UU.)

3.7. Reactivos para aislamiento de ADN

3.7.1. Soluciones para la extracción de ADN cromosómico

Se usaron dos métodos diferentes basados en el uso de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico:

Soluciones Método A:

- Solución Tris-HCl 1 M, a pH 8.0:
 - Tris base.....121.1 g
 - Agua destilada.....800 ml

Ajustar con HCl concentrado (37%) a pH8.0. Esterilizar en autoclave 20 minutos a 126 C° y 1 atm. de presión. Almacenar a temperatura ambiente.

- Solución EDTA Na₂ 0.5M a pH 8.0:
 - EDTA Na₂.....18.61 g
 - Hidróxido sódico.....2 g
 - Agua destilada.....80 ml

Disolver el EDTA Na₂ a 60 C° en agitación en agua destilada. Ajustar el pH añadiendo hidróxido sódico. Esterilizar en autoclave a 121C° durante 20 minutos. Almacenar a temperatura ambiente.

- Tampón Tris-EDTA (TE) 10x, pH 8.0:
 - Tris-HCl 1 M pH 8.0.....10 ml
 - EDTA Na₂, 0.5 M, pH8.0.....2 ml
 - Agua destilada.....88 ml

Autoclavar y guardar a temperatura ambiente. Diluir el tampón TE 10x a 1/10 para obtener TE 1x.

- Solución de lisozima (10mg/ml):
 - Lisozima.....10 mg
 - Agua destilada esteril.....1 ml

Guardar en alícuotas de 50-100 µl a -20 °C.

- Solución de Lauril Sulfato Sódico (SDS) al 10%:
 - SDS.....10 g
 - Agua destilada..... 100 ml

Agitar suavemente durante 20 minutos a 65 °C para ayudar a disolver el SDS. Almacenar a temperatura ambiente.

- Solución de proteinasa K (10 mg/ml):
 - Proteinasa K.....10 mg
 - Agua destilada estéril.....1ml

Guardar en alícuotas de 50-100 µl a -20 °C

- Solución de cloruro sódico (NaCl) 5M:
 - NaCl.....29.2 g
 - Agua destilada.....100 ml

Disolver, autoclavar y almacenar a temperatura ambiente.

- Solución de 10% CTAB /0.7 M NaCl:
 - CTAB.....10 g
 - NaCl.....4.1 g
 - Agua destilada.....100 ml

Disolver el NaCl en 80 ml de agua destilada, calentar a 65 °C y en agitación añadir lentamente el CTAB para disolverlo. Ajustar el volumen hasta 100 ml con agua destilada. Almacenar a temperatura ambiente.

- Solución de cloroformo/alcohol isoamílico 24:1 (v/v):
 - Cloroformo.....24 ml
 - Alcohol isoamílico.....1 ml

Almacenar en nevera a 4°C.

- Solución fenol/cloroformo/alcohol isoamílico 24:24:1 (v/v) (Sigma, St. Louis, EE.UU.)
- Solución ARNasa A: Preparada como solución concentrada a 10 mg/ml en 10 mM de Tris-HCl (pH7.5), 15 mM NaCl (Sigma, St. Louis, EE.UU.)
- Solución etanol al 70% (v/v):
 - Etanol absoluto 98%.....70 ml
 - Agua destilada.....30 ml

Guardar en frío a -20°C

Soluciones Método B:

- Solución SET:
 - EDTA Na₂ (25mM).....750 µl de solución concentrada 5M
 - NaCl (75mM).....2.5 ml de solución concentrada 0.5M
 - Tris pH 7.5 (20mM).....500 µl de solución concentrada 2M
 - Agua destilada.....Hasta 50 ml

Disolver y esterilizar en autoclave a 121C° durante 20 minutos.
Almacenar a temperatura ambiente.

- Solución de cloruro sódico (NaCl) 5M:
 - NaCl.....29.2 g
 - Agua destilada.....100 ml

Disolver, autoclavar y almacenar a temperatura ambiente.

- Solución de lisozima (50mg/ml):
 - Lisozima.....50 mg
 - Agua destilada esteril.....1 ml

Guardar en alícuotas de 50-100 µl a -20 °C.

- Solución de cloroformo/alcohol isoamílico 24:1 (v/v):
 - Cloroformo.....24 ml
 - Alcohol isoamílico.....1 ml

Almacenar en nevera a 4°C.

- Solución etanol al 70% (v/v):
 - Etanol absoluto 98%.....70 ml
 - Agua destilada.....30 ml

Guardar en frío a -20°C

Soluciones Método C:

Aislamiento de ADN cromosómico mediante el sistema comercial *Microbial Genomic DNA Isolation* (Ultraclean).

3.7.2. Soluciones para la extracción de ADN plasmídico

Método clásico de la lisis alcalina

- Solución I
 - Glucosa 50 mM
 - Tris-HCl pH8.0 25 mM
 - EDTA pH8.0 10 mM

Se prepara desde soluciones concentradas en un volumen de 100 ml. Autoclavar y almacenar a 4°C.

- Solución II
 - NaOH 0.2N (diluida fresca desde solución concentrada 10N)
 - SDS 1% (peso/volumen)

Preparar la solución II fresca (justo antes de usar) y utilizar a temperatura ambiente.

- Solución III
 - Acetato potásico (3M).....60 ml de solución 5M
 - Ácido acético glacial.....11.5 ml
 - Agua destilada.....28.5 ml

Almacenar a 4°C y usar en frío.

Método de KIESER¹²⁰

- Solución de Kieser
 - Sacarosa (0.3M).....10.2 g
 - Tris-HCl (25mM, pH8.0).....2.5 ml Tris-HCl 1M
 - EDTA-Na₂ (25 mM, pH8.0).....10 ml EDTA-Na₂ 250mM
 - Verde de bromocresol (0.02%).....20 mg
 - Agua destilada estéril.....Hasta 100 ml

Conservar a temperatura ambiente.

- Solución de lisis
 - NaOH (0.3N).....1.5 ml NaOH 2N
(8g/100 ml)
 - Agua destilada estéril.....6.5 ml
 - SDS (2%).....2 ml SDS 10%

Prepara justo antes de usar.

- Solución fenol-cloroformo ácido
 - Fenol.....50 g
 - Cloroformo.....50 ml
 - Agua destilada estéril.....10 ml
 - 8-Hidroxiquinoleína.....50 mg

Conservar a temperatura ambiente. Proteger de la luz.

Preparación de ADN plasmídico desde grandes volúmenes de cultivo (Maxi/MidiPrep)

El sistema comercial de Qiagen *QIAGEN Plasmid Midi Kit* se usó para la obtención de cantidades mayores de ADN plasmídico.

3.8. Reactivos para aislamiento de ARN

Se usaron dos sistemas comerciales diferentes para la obtención de ARN. En ambos casos se aisló ARN total de las muestras. Los protocolos se detallan en la sección de Métodos.

Método A:

High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Mannheim, Alemania)

Método B:

RNeasy[®] Midi Kit (Qiagen, EE.UU.)

Los dos principales sistemas de centrifugación usados fueron *Biofuge fresco* (Heraeus, Madrid, España) y *Varifuge 3.0R* (Heraeus, Madrid, España).

4. MÉTODOS

4.1. Aislamiento de los microorganismos e identificación

La obtención de muestras y los aislamientos primarios se realizó mediante la utilización de métodos microbiológicos convencionales.

La conservación de los microorganismos se realizó a -80°C en TSB con glicerol al 10% realizando una suspensión densa de un cultivo crecido durante 18-20 horas.

Cuando fue necesario, se llevó a cabo la identificación de los microorganismos mediante el sistema API20 (BioMérieux).

4.2. Aislamiento de ADN cromosómico

Método A

1. Centrifugar 3 ml de un cultivo crecido toda la noche en medio LB (un número total de 10^9 células, aproximadamente) a 10.000 rpm durante 5 minutos.
2. Aspirar sobrenadante y resuspender en 500 μl de tampón TE.

3. Centrifugar y repetir el paso 2.
4. Centrifugar, aspirar sobrenadante y resuspender completamente en 480 μ l de tampón TE.
5. Añadir 60 μ l de SDS 10% y 60 μ l de proteinasa K 2.5 mg/ml. Agitar suavemente e incubar 1 hora a 37°C.
6. Pasar la muestra 6-8 veces por una jeringuilla de aguja 0.6-0.8 mm y 1 ml de volumen para lisar las células.
7. Añadir 100 μ l de NaCl 5M y mezclar suavemente (esta concentración de sales evita la precipitación del ADN).
8. Añadir 80 μ l de 10% CTAB/0.7M NaCl precalentado a 65°C. Incubar 10 minutos a 65°C.
9. Añadir 1 volumen de cloroformo-alcohol isoamílico, agitar 2-5 minutos y centrifugar a máxima velocidad (13.000 rpm) durante 5 minutos.
10. Recoger la fase acuosa superior y añadir 1 volumen de fenol. Agitar 2-5 minutos y centrifugar a máxima velocidad durante 5 minutos.
11. Recoger la fase acuosa superior y añadir 6 μ l de ARNasa 10mg/ml. Incubar 15 minutos a 37°C.
12. Tratar con 1 volumen de fenol-cloroformo-isomalíco. Agitar 2-5 minutos y centrifugar a máxima velocidad (13.000 rpm) durante 5 minutos.
13. Recoger la fase acuosa superior y añadir 1 volumen de cloroformo-alcohol isoamílico. Agitar 2-5 minutos y centrifugar a máxima velocidad (13.000 rpm) durante 5 minutos.
14. Repetir el paso 13.
15. Precipitar el ADN con 2 volúmenes de etanol absoluto toda la noche a -20°C.
16. Centrifugar 10 minutos a máxima velocidad (13.000 rpm), retirar sobrenadante y lavar con 500 μ l de etanol al 70% centrifugando 3 minutos a máxima velocidad (13.000 rpm).
17. Retirar el sobrenadante, secar y resuspender en 100 μ l de agua milliQ estéril.

El ADN está listo para ser usado en posteriores aplicaciones.

Método B

1. Centrifugar 3 ml de un cultivo crecido toda la noche en medio LB (un número total de 10^9 células, aproximadamente) a 7.000 rpm durante 10 minutos.
 2. Retirar el sobrenadante y resuspender en 1 ml de agua destilada estéril. Centrifugar a 7.000 rpm durante 10 minutos.
 3. Retirar el sobrenadante y resuspender en 0.5 ml de tampón SET.
 4. Añadir 25 μ l de SDS al 20%.
 5. Añadir 1 μ l de lisozima 50 mg/ml e incubar 1 hora a 37°C.
 6. Añadir 220 μ l de NaCl 5M.
 7. Añadir 700 μ l de cloroformo-alcohol isoamílico y agitar vigorosamente.
 8. Centrifugar 10 minutos a 10.000 rpm.
 9. Recuperar la fase superior acuosa a otro tubo y añadir 700 μ l de isopropanol frío (-20°C).
 10. Incubar 1 hora a -20°C
 11. Centrifugar 10 minutos a 10.000 rpm.
 12. Retirar el isopropanol y añadir 800 μ l de etanol frío al 70%.
 13. Centrifugar 5 minutos a 10.000 rpm.
 14. Retirar el etanol, secar y resuspender en 100 μ l de agua milliQ estéril.
- El ADN esta listo para ser usado en posteriores aplicaciones.

4.3. Aislamiento de ADN plasmídico**Método clásico de lisis alcalina**

1. Centrifugar 1.5 ml de un cultivo crecido toda la noche en medio LB (un número total de 10^9 células, aproximadamente) a 10.000 rpm durante 5 minutos.
2. Retirar sobrenadante y resuspender en 100 μ l de solución I.
3. Añadir 200 μ l de solución II y mezclar por inversión suavemente.
4. Mantener 5 minutos a temperatura ambiente.
5. Añadir 150 μ l de solución III y mezclar por inversión suavemente.
6. Mantener en hielo 10 minutos y centrifugar a máxima velocidad (13.000 rpm) durante 10 minutos.

7. Recuperar el sobrenadante (450 μ l aproximadamente) y añadir 1 volumen de fenol-cloroformo. Agitar vigorosamente y centrifugar a máxima velocidad (13.000 rpm) durante 10 minutos.
 8. Recuperar la fase superior acuosa y añadir 2 volúmenes de etanol frío al 100%.
 9. Precipitar al menos 1 hora a -20°C.
 10. Centrifugar a máxima velocidad durante 10 minutos. Retirar el etanol y lavar el precipitado con 200 μ l de etanol al 70%.
 11. Centrifugar a máxima velocidad (13.000 rpm) durante 5 minutos.
 12. Retirar el etanol, secar y resuspender en 25-50 μ l de agua milliQ.
- El ADN esta listo para ser usado en posteriores aplicaciones.

Método de KIESER¹²⁰

1. De una placa fresca de MHA recoger media asa de biomasa y resuspender completamente en 500 μ l de solución de Kieser.
2. Añadir 250 μ l de solución de lisis y mezclar suavemente.
3. Incubar 30 minutos a 55°C.
4. Enfriar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
5. Añadir 250 μ l de fenol-cloroformo ácido y agitar suavemente.
6. Centrifugar a 12.000 rpm durante 12 minutos a 4°C.
7. Recuperar 200 μ l de la fase superior.

El ADN esta listo para ser usado.

8. Preparar gel de agarosa al 0.7% en TBE 1x.
9. Cargar 20-40 μ l de ADN y correr durante 6 horas a 90V.
10. Teñir el gel en 400 ml de agua destilada que contiene 20 μ l de bromuro de etidio a 10 mg/ml durante 30 minutos.
11. Lavar con agua destilada durante 15 minutos.
12. Visualizar.

4.4. Técnicas de PCR (*Polimerase Chain Reaction*)

Se usó una técnica de PCR convencional tanto para el estudio de prevalencia de genes en colecciones bacterianas como en la aplicación de diferentes protocolos que se describen con posterioridad. En la Tabla 8 se indican las condiciones usadas en cada reacción de PCR.

Tabla 8. Condiciones normalmente usadas para cada reacción de PCR.

Componente	Volumen (μ l)	Concentración final
Agua estéril destilada	26.8	
Tampón de PCR 10x	5.0	1x
MgCl ₂ 50mM	2.0	2 mM
Mezcla de dNTP 5 mM	8.0	800 μ M
Iniciador1 (10 μ M)	2.5	0.5 μ M
Iniciador2 (10 μ M)	2.5	0.5 μ M
Taq ADN polimerasa	0.2	1U/reacción
Volumen final	48	

La reacción se completa con 2 μ l de la solución que contiene el ADN a analizar. El ADN puede ser obtenido de distintas formas:

- Directamente a partir de colonias frescas crecidas en medio de cultivo:
 - Resuspender media colonia (la menor cantidad visible) en 100 μ l de agua estéril destilada.
 - Hervir durante 10 minutos (en bloque térmico o termociclador).
 - Tras una centrifugación de 10 minutos a 10.000 rpm se añaden los 2 μ l de volumen.

- Siguiendo alguno de los métodos de purificación de ADN detallados anteriormente.

El programa básico para fragmentos de menos de 1kb seguido para la amplificación es el siguiente:

5 min.....	94°C.....	1 ciclo
1 min.....	94°C	35 ciclos
1min.....	55°C	
1min.....	72°C	
7 min.....	72°C.....	1 ciclo
Indefinidamente.....	4°C	

Para fragmentos mayores de 1kb se amplió el tiempo de elongación a 1 minuto/kb de ADN amplificado. De igual modo, las unidades de ADN *Taq* polimerasa se incrementaron atendiendo al tiempo de elongación.

4.5. Epidemiología molecular

4.5.1. Biotipia

La biotipia se basó en el uso de la prueba de la ureasa. Esta identificación bioquímica se basa en que la enzima ureasa forma amoníaco a partir de urea produciendo un cambio de pH y de color (debido al rojo fenol que contiene).

Esta técnica se usó para diferenciar las colonias de transconjugantes verdaderos en los experimentos de conjugación (colonias de *E. coli* ureasa negativos) de las colonias de donadores mutantes (*K. pneumoniae* ureasa positivos).

4.5.2. REP-PCR (*Repetitive Extragenic Palindromic-PCR*)

La REP-PCR usa oligonucleótidos diseñados a partir de secuencias palindrómicas altamente conservadas y que se repiten a lo largo de genoma.²³⁹ El diseño general de estos cebadores ha sido previamente descrito en detalle por Versalovic J y col.²⁶⁰ La técnica se basa en la idea de que este tipo de secuencias se encuentran dispersas en el cromosoma, presentando orientaciones diferentes y separadas por distancias variables. Típicamente, se usan dos cebadores distintos en la aplicación de esta técnica:

REP-1 5'IIIGCGCCGICATCAGGC3'

REP-2 5'ACGTCTTATCAGGCCTAC3'

En nuestro laboratorio el cebador empleado fue REP-1. El ADN bacteriano se obtuvo a partir de colonias crecidas en medio de cultivo (Tabla 9).

Tabla 9. Condiciones usadas para cada reacción de REP-PCR.

Componente	Volumen (μ l)	Concentración final
Cebador REP-1 (50 μ M)	1	1 μ M
Tampón PCR 10x	5	1x
MgCl ₂ (50mM)	3	3mM
Nucleótidos (5mM)	4 (de cada)	400 μ M
<i>Taq</i> ADN polimerasa	0.5	2.5 u/reacción
ADN	24.5	
Volumen final	50	

El programa seguido para la amplificación es el siguiente:

3 min.....	94°C.....	1 ciclo
1 min.....	94°C	30 ciclos
1min.....	40°C	
8min.....	65°C	
16 min.....	65°C.....	1 ciclo
Indefinidamente.....	4°C	

La duración aproximada es de 6 horas y 40 minutos.

Se analizan 20 µl de los 50 µl de volumen final de reacción mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (p/v) que contiene 0.5 mg/L de bromuro de etidio en TBE 0.5x

4.5.3. PCR aleatoria de secuencias polimórficas (*Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD-PCR*)

Existen técnicas de epidemiología molecular que usan como cebadores en la reacción de amplificación secuencias cortas aleatorias que no van dirigidos al reconocimiento de regiones concretas en el ADN. Este es el caso de la RAPD-PCR, la cual usa cebadores de pequeño tamaño de 9 a 10 bases de longitud, los cuales tienen suficiente afinidad para hibridar con el ADN cromosómico a baja temperatura.^{13,269} Cuando la diana de los cebadores se encuentra a la distancia adecuada y en la orientación correcta se producen los fragmentos amplificados generándose un patrón de bandas específico.

Los cebadores usados en los ensayos de RAPD-PCR fueron:

A3 5'AGT CAG CCA C3'²⁷⁷

272 5'AGC GGG CCA A3'²⁷⁷

El ADN bacteriano se obtuvo a partir de colonias como se detalló para la PCR convencional (Tabla 10).

Tabla 10. Condiciones usadas para cada reacción de RAPD-PCR.

Componente	Volumen (μ l)	Concentración final
Cebador A3 (50 μ M)	3	3 μ M
Cebador 272 (50 μ M)	3	3 μ M
Tampón PCR 10x	5	1x
MgCl ₂ (25mM)	4	2 mM
Mezcla de nucleótidos (10mM)	3	600 μ M
<i>Taq</i>	0.5	2.5 u/reacción
Agua para PCR	29.5	
ADN	2	
Volumen final	50	

El programa seguido para la amplificación fue el siguiente:

3 min.....94°C.....	1 ciclo
1 min.....94°C	45 ciclos
1 min.....36°C	
2 min.....72°C	
10 min.....72°C.....	1 ciclo
Indefinidamente.....	4°C

Se analizan 5-20 μ l de los 50 μ l de volumen final de reacción mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (p/v) que contenía 0.5 mg/L de bromuro de etidio en TAE 1x.

4.5.4. Electroforesis en campo pulsante (PFGE)

El PFGE es la técnica de referencia en la caracterización clonal. La metodología se adaptó para el PFGE en enterobacterias. Se prepararon bloques de agarosa solidificada mezclando en proporción 1:1 bacterias (suspensión a $DO_{520}=0.9$) y agarosa al 2%.

La electroforesis se realizó a 14°C con voltaje de 6V/cm² durante 24 horas usando el sistema CHEF-DR II (Bio-Rad, Madrid, España). Los pulsos iniciales y finales fueron 5 y 30 segundos. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (1 µg/mL, Roche, Mannheim, Alemania), se lavaron con agua durante 20-30 minutos y se fotografiaron usando el sistema digital 1D Image Analysis software (Kodak, Rochester, N.Y., EE.UU.).

Como marcador se usó ADN de *S. aureus* NCTC 8325 digerido con *Sma*I o el marcador de pesos moleculares comercial Lambda DNA-PFGE (Pharmacia Biotech, Piscataway, EE.UU.).

La diferenciación de los patrones de bandas obtenidos en *K. pneumoniae* se realiza en función del número de bandas de ADN observado en los geles de PFGE. Una banda de diferencia se interpreta como relación clonal, dos bandas de diferencia como posiblemente relacionados y un número mayor de tres bandas de diferencias se interpreta como aislados no relacionados clonalmente.²⁴⁶

Técnica de la endonucleasa I-Ceu-I

Esta técnica se usa para determinar la localización cromosómica o plasmídica de genes. Consiste en la realización de electroforesis en campo pulsante de ADN total previamente digerido con el enzima de restricción I-Ceu-I. Este enzima tiene la característica que solo reconoce y corta en una región de 26 pb localizada en los genes *rrl* que codifican el ARN ribosómico 23S.



De este modo, y tras la electroforesis, se procede a la hibridación del gen con dos sondas diferentes: una de un fragmento de ADN que codifica el ARN ribosómico 23S y otra de un fragmento de nuestro gen en estudio. Así, si la señal obtenida con nuestro gen coincide con la señal al hibridar con un fragmento de ADN ribosómico sabremos que nuestro gen tiene una localización cromosómica.

4.6. Ensayos de movilidad horizontal (Experimentos de conjugación)

Se usaron dos protocolos diferentes en los ensayos de conjugación:

Protocolo A: Ensayo de Conjugación en medio líquido

1. Inocular 4 ml de medio líquido (LB o MHB) de la cepa receptora. Incubar en condiciones de agitación a 37°C durante 18-20h.

Los receptores usados fueron: *E. coli* J53Rif^R (F⁻, *met*⁻, *pro*⁻, Rif^R)

E. coli J53Az^R (F⁻, *met*⁻, *pro*⁻, Az^R)

(Ver descripción detallada en la Sección de Materiales)

2. Inocular 4 ml de medio líquido (LB o MHB) de la cepa donadora. Incubar como en el paso 1.
3. Preparar las siguientes mezclas:
 - a. Mezcla problema: 0.5 ml de cepa receptora + 0.5 ml de cepa donadora + 4 ml de medio líquido estéril.
 - b. Control receptor: 0.5 ml de cepa receptora + 4.5 ml de medio líquido estéril.
 - c. Control donadora: 0.5 ml de cepa donadora + 4.5 ml de medio líquido estéril.

Los volúmenes pueden ser modificados en función de las cepas usadas.

4. Incubar SIN AGITACIÓN a 37°C de 4h a toda la noche.
5. Inocular las placas que contienen los medios selectivos con 100 µl de diluciones 10^0 , 10^{-1} y 10^{-2} de las mezclas de conjugación y los controles.
6. Incubar las placas a 37°C durante 24-48h.
7. Seleccionar las colonias de transconjugantes y darle pase a medio con el antimicrobiano correspondiente de selección.

Protocolo B: Ensayo de Conjugación 3 en 1

1. Inocular 1 ml de TSB en tubos diferentes con las cepas donadora y receptora.
2. Crecer en agitación lenta durante 3h aproximadamente a 37°C.
3. En un tubo nuevo, mezclar (con una punta de boca ancha) 200 µl de receptor con 800 µl de donador (respetar la proporción 1:4).
4. Crecer en agitación lenta durante otras 3h a 37°C.
5. Sembrar 200 µl sobre los medios de selección.
6. Añadir 2 ml de TSB al resto del volumen y crecer SIN AGITACIÓN durante una noche a 37°C.
7. Sembrar diluciones sobre medios de selección.
8. Reservar 200 µl y depositarlos sobre el centro de un filtro estéril colocado en una placa de medio MHA sin antibiótico e incubar toda la noche a 37°C.
9. Recuperar las bacterias crecidas sobre el filtro con una torunda estéril y resuspender en solución salina estéril.
10. Sembrar en las placas con medio de selección.

Con este protocolo se obtienen transconjugantes desde los pasos 5, 7, 10, cada vez con una mayor eficiencia. Esto es importante cuando no conocemos las frecuencias de conjugación, de modo que en alguno de los tres pasos obtendremos placas con un número adecuado de colonias para establecer dicha frecuencia de conjugación y un número suficiente de transconjugantes para posteriores estudios.

La frecuencia de conjugación se define como:

$$\text{Frecuencia de conjugación} = \frac{\text{número de transconjugantes}}{\text{número de bacterias donadoras}}$$

La selección se realizó sobre medios que contenían azida sódica (100-200 $\mu\text{g/ml}$) o rifampicina (100 $\mu\text{g/ml}$) y estreptomina (50 $\mu\text{g/ml}$), ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$), ceftazidima (4-8 $\mu\text{g/ml}$), amoxicilina (50-100 $\mu\text{g/ml}$) o cloranfenicol (30 $\mu\text{g/ml}$).

4.7. Estudios de sensibilidad a antimicrobianos

4.7.1. Preparación de los antimicrobianos

La preparación de los antimicrobianos se realizó siguiendo la normativa del CLSI.³⁸

Los agentes antimicrobianos usados en este trabajo se obtuvieron de los fabricantes o compañías farmacéuticas detallados en la sección de Materiales. No se usaron preparaciones clínicas en las determinaciones de sensibilidad.

Las soluciones concentradas se prepararon normalmente a 4096 $\mu\text{g/ml}$. Una vez preparados, pueden ser almacenados a -70°C .

En la Tabla 11 se muestra la lista de los solventes y diluyentes usados para la preparación de los antimicrobianos.

Tabla 11. Solventes y diluyentes usados para la preparación de los antimicrobianos.

Antimicrobiano	Solvente	Diluyente
Quinolonas		
Ácido nalidíxico	½ de volumen de agua y añadir NaOH 1M hasta disolver	Agua
Ciprofloxacino	Agua	Agua
Levofloxacino	½ de volumen de agua y añadir NaOH 1M hasta disolver	Agua
Moxifloxacino	Agua	Agua
Clinafloxacino	Agua	Agua
Norfloxacino	½ de volumen de agua y añadir NaOH 1M hasta disolver	Agua
Ofloxacino	½ de volumen de agua y añadir NaOH 1M hasta disolver	Agua
Trovafloxacino	Agua	Agua
Esparfloxacino	Agua	Agua

Tabla 11 (Continuación). Solventes y diluyentes usados para la preparación de los antimicrobianos.

Antimicrobiano	Solvente	Diluyente
β-lactámicos		
Ampicilina	Tampón Fosfato, pH8, 0.1M	Tampón Fosfato pH6, 0.1M
Amoxicilina	Tampón Fosfato, pH8, 0.1M	Tampón Fosfato pH6, 0.1M
Piperacilina	Agua	Agua
Cefoxitina	Agua	Agua
Cefotaxima	Agua	Agua
Ceftazidima	Carbonato sódico	Agua
Cefepima	Tampón Fosfato, pH6, 0.1M	Tampón Fosfato pH6, 0.1M
Aztreonam	Solución saturada de CO_3HNa	Agua
Imipenem	Tampón Fosfato, pH7.2, 0.01M	Tampón Fosfato pH7.2,0.01M
Meropenem	Agua	Agua
Inhibidores		
Ácido clavulánico	Tampón Fosfato, pH6, 0.1M	Tampón Fosfato pH6, 0.1M
Sulbactam	Agua	Agua
Tazobactam	Agua	Agua
Aminoglucósidos		
Amikacina	Agua	Agua
Tobramicina	Agua	Agua
Gentamicina	Agua	Agua
Otros		
Cloranfenicol	Etanol 95%	Agua
Tetraciclina	Agua	Agua

4.7.2. Método de microdilución

El método de microdilución en medio líquido se realizó de acuerdo a las recomendaciones del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).³⁸ Se utilizaron placas de microdilución de poliestrieno de 96 pocillos con fondo en U (Francisco Soria Melguizo, S.A., Madrid, España).

El protocolo se realiza bajo las siguientes condiciones:

- Los rangos de concentraciones usados variaron en función del tipo de antimicrobiano. Las concentraciones máximas y mínimas fueron 512 µg/ml y 0.008 µg/ml, respectivamente.
- El inóculo se preparó a partir de placa de MHA crecida durante 18-24h (cultivo fresco). Las placas de microdilución preparadas se incubaron durante 20h a 37°C cubiertas con una tapa estéril.
- Se establecieron controles de crecimiento y esterilidad para los distintos medios usados.
- Las cepas control usadas fueron: *Escherichia coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853.

La concentración mínima inhibitoria (CMI) se estableció en la concentración de antimicrobiano más baja capaz de inhibir completamente el crecimiento visible del microorganismo tras el periodo de incubación. Los criterios de sensibilidad y resistencia se basaron en las recomendaciones del CLSI.³⁸

4.7.3. Método de difusión en gradiente (Etest)

Se usó el sistema comercial Etest[®] (AB BIODISK) para determinar la sensibilidad antimicrobiana. Los valores obtenidos se adaptaron a una escala log₂ cuando fue necesario.

4.7.4. Método de difusión en disco

Los discos de difusión se usaron de acuerdo a las especificaciones del CLSI.³⁸

4.8. Estudio de mutaciones en ADN girasa y Topoisomerasa IV

4.8.1. Amplificación de ADN girasa y Topoisomerasa IV

La amplificación se realizó mediante PCR convencional a partir de ADN genómico obtenido desde colonias bacterianas para la identificación de mutaciones en *gyrA* y *parC*. Los cebadores usados fueron: GyrA-1, GyrA-2, ParC-A y ParC-B (Tabla 23). Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% y TBE 0.5X que contenía 0.5mg/L de bromuro de etidio. Posteriormente, se purificaron usando el sistema Sephaglas™ BrandPrep Kit (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), y se secuenciaron como se detalla posteriormente.

4.8.2. SSCP (*Single-Strand Conformation Polymorphism*)

La técnica de SSCP se basa en la diferente movilidad electroforética de las moléculas de ADN monocatenario de pequeño tamaño debido a cambios en la secuencia en condiciones desnaturalizantes. Esta prueba tiene valor en la detección rápida de mutaciones puntuales.

Se analizaron los productos de ADN amplificado por PCR de los genes *gyrA* y *parC*. Este material amplificado se purificó desde gel de agarosa con el sistema comercial *Sephaglas BandPrep Kit* siguiendo las recomendaciones del fabricante (Amersham Pharmacia).

El ADN purificado se mezcla con una solución desnaturalizante de formamida en una proporción 1:1 y se somete a 96°C durante 10 minutos. Tras la desnaturalización las muestras son mantenidas a 4°C en hielo antes de ser cargadas.

La electroforesis se realizó con el sistema GenePhor (Amersham Pharmacia) en geles de poliacrilamida *GeneGel Excel 12.5/24* de la misma casa comercial. La carrera se realiza a 15°C durante 90 minutos con un voltaje constante de 400V. Se usó el sistema *DNA Plus Silver Staining* (Amersham Pharmacia) para teñir el ADN mediante tinción de plata.

4.8.3. Secuenciación de las regiones QRDR de los genes *gyrA* y *parC*

Las secuencias genéticas se determinaron en el servicio de secuenciación de ADN del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC, Madrid), o bien en la empresa Genome Express (Francia). La secuenciación se llevó a cabo mediante la técnica de Sanger mediante nucleótidos terminadores. Las muestras se analizaron con el secuenciador automático Abi Prims 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer).

4.9. Evaluación del número de copias del gen *qnrA*

Se puede realizar una estimación semicuantitativa del número de copias de una secuencia diana mediante técnicas de inmovilización de ácidos nucleicos sobre un soporte sólido (normalmente membranas de nylon cargadas).

La cantidad relativa de secuencia diana es estimada por comparación de la intensidad de señal emitida por la muestra con otras de concentraciones conocidas o por las intensidades relativas de unas muestras respecto de otras. Éstas son medidas mediante densitometría. Para una cuantificación fiable y reproducible son necesarios también controles negativos que reflejen la posible intensidad de fondo emitida por una muestra de ácido nucleico que no contiene la diana en estudio.

Tanto en el caso de ADN plasmídico como de ADN total el protocolo que se siguió fue el de la técnica de "Slot-blot" o "Dot-blot".

Protocolo "Dot-blot"

1. Tras la purificación del material genético, como se detalló en la sección correspondiente, el primer paso es la cuantificación de la concentración de ADN de nuestra muestra.

Esta cuantificación se realiza mediante espectrofotometría (GeneQuant pro spectrophotometer, Amersham Pharmacia Biotech) bajo los siguientes parámetros:

$$DO_{260nm}=1.....50 \mu\text{g/ml para ADN de doble cadena}$$

Donde la pureza de la muestra fue examinada mediante la razón:

$$\frac{DO_{260nm}}{DO_{280nm}} = 1.8 \longrightarrow 100\% \text{ de pureza de ADN de doble cadena}$$

Valores por encima y por debajo de esta razón indican que la muestra contiene proteínas u otros ácidos nucleicos (ARN o ADN de cadena simple).

2. En cada experimento las muestras fueron cuantificadas y se analizaron cantidades idénticas según el diseño del mismo.
3. La inmovilización del ADN sobre la membrana de nylon se realizó con el sistema *PR 648 Slot Blot Filtration Manifolds* (Amersham Pharmacia Biotech), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este sistema permite cargar hasta 48 muestras diferentes en una misma membrana y se encuentra conectado a una bomba de vacío, lo que permite la adhesión inicial de la muestra a través de la membrana de nylon.
Se colocan de 3 a 5 fragmentos de papel whatman (Whatman[®], Reino Unido) debajo de la membrana de nylon. Previamente todo ha sido humedecido en una solución de 2xSSC. La filtración se realiza durante 10 minutos.
Siempre que fue posible se cargó el mismo volumen en cada pocillo (100µl).
4. Fijación de los ácidos nucleicos a la membrana de nylon.
Se usó el sistema UVC500 Crosslinker (Hoefer) de acuerdo a las condiciones del fabricante más media hora de incubación a 80°C o 2 horas a 60°C.
5. Desnaturalización del ADN fijado.
 - a. Depositar la membrana sobre una bandeja que contiene la solución de desnaturalización (0.5M NaOH+1.5M NaCl) durante 5 minutos en agitación.

- b. Eliminar el exceso de solución desnaturizante con papel de filtro.
- c. Depositar la membrana sobre una bandeja que contiene la solución de neutralización (0.5M Tris pH7.5+1.5M NaCl) durante 5 minutos en agitación.
- d. Pasar por baño con 2xSSC durante 5 minutos y dejar secar sobre papel de filtro.

Las membranas se pueden almacenar a temperatura ambiente en papel de filtro o usar directamente para hibridación. El protocolo de hibridación y detección fue el mismo que el que se detalla en el apartado *Análisis por "Southern-blot"*.

4.10. Estudio de las estructuras genéticas en las que se encuentra el gen *qnrA*

4.10.1. Análisis por "Southern-blot"

La técnica de "Southern-blot" se puede usar para estudiar como los genes se organizan en los genomas mediante el uso de enzimas que reconocen sitios de restricción y sondas que reconocen dianas específicas (Southern-RFLP). Estimando el tamaño de los fragmentos obtenidos, el número de fragmentos y combinaciones de enzimas de restricción es posible determinar la localización del ADN diana dentro de un contexto de dianas de restricción. **Protocolo:**

Marcaje de la sonda

Se usaron dos métodos de marcaje diferentes. Uno basado en la enzima *Klenow* ADN polimerasa y otro en la enzima *Taq* ADN polimerasa. El método basado en la *Taq* ADN polimerasa consigue obtener una mayor cantidad de ADN marcado basándose en la técnica de PCR.

Método A: Marcaje mediante *Klenow* ADN polimerasa.

A partir de producto de PCR específico de la diana que queremos marcar, añadir 400 ng de molde en un volumen final de 16 μ l en agua MilliQ autoclavada, a continuación:

1. Desnaturalizar el ADN hirviendo 10 minutos y enfriar en hielo durante 5 minutos.
2. Mezclar el reactivo *DIG-High Prime* (contiene la *Klenow* ADN polimerasa, ver Sección de Materiales) (*DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II*) ampliamente y añadir 4 μ l al ADN desnaturalizado. Mezclar y centrifugar brevemente.
3. Incubar toda la noche a 37°C.
4. Parar la reacción añadiendo 2 μ l de EDTA (pH8.0) y calentando después a 65°C durante 10 minutos.

La cinética de marcaje se obtiene según los valores de la Tabla 12.

Tabla 12. Cinética de marcaje de la sonda usando la enzima *Klenow* ADN polimerasa.

Molde de ADN (ng)	Marcaje 1 hora (ng)	Marcaje 20 horas (ng)
10	45	600
30	130	1050
100	270	1500
300	450	2000
1000	850	2300
3000	1350	2650

Método B: Marcaje con *Taq* ADN polimerasa (*PCR DIG Labelling Mix^{plus}*)

1. A partir de ADN purificado se realiza una reacción de PCR específica para nuestra diana bajo las siguientes condiciones indicadas en la Tabla 13.

Tabla 13. Condiciones de PCR para el marcaje de la sonda con *Taq* ADN polimerasa.

Componente	Volumen (μ l)	Concentración final
Agua estéril	18.5	
<i>PCR DIG Labelling Mix^{plus}</i>	5	200 μ M
Cebadores	5	250 nM de cada
<i>Taq</i> (1 U/ μ l)	1.5	1.5 U
Uracil DNA glicosilasa (1 U/ μ l)	2	2 U
Tampón de PCR	5	1x
MgCl ₂ 25 mM	3	1.5 mM
ADN molde	10	
Volumen reacción		50 μ l

En ambos métodos, durante la reacción de polimerización se produce la incorporación de digoxigenina-11-dUTP, eventualmente, en lugar de dTTP. Las moléculas de digoxigenina serán detectadas posteriormente mediante anticuerpos específicos.

Electroforesis

Tras la purificación del material genético como se detalló en la sección correspondiente, es conveniente la cuantificación de la concentración de ADN de nuestra muestra.

El ADN examinado se somete a electroforesis bajo las siguientes condiciones:

- Gel de agarosa al 1% en tampón TAE 1x
- 100 voltios
- 3-4 horas de carrera

Transferencia del ADN y fijación

La transferencia del ADN se realiza a temperatura ambiente bajo las siguientes condiciones:

- Baño en solución de depurinación durante 15 minutos (solo si los fragmentos a transferir son mayores de 10kb)
- Baño en solución de desnaturalización durante 15 minutos
- Baño en solución de neutralización durante 15 minutos
- Baño en solución SSC 20x durante 20 minutos

La transferencia se realiza por capilaridad sobre membranas de nylon (cargadas positivamente) en tampón SSC 10x o 20x, siguiendo los protocolos publicados previamente.²²⁶ La fijación del ADN a la membrana de nylon se realiza como se detalla en la sección sobre “Dot-blot”.

Hibridación de la sonda

1. Precaentar 30 ml de *DIG Easy Hyb (DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II)* a la temperatura de hibridación (42°C)
2. Prehibridar en agitación la membrana con 20 ml de *DIG Easy Hyb* precalentado durante al menos 1 hora (puede estar toda la noche) a 42°C
3. Desnaturalizar de 4 a 20 µl de la sonda (unos 400 ng es suficiente), 10 minutos a 100°C, y enfriar 5 minutos en hielo
4. Añadir la sonda a 10 ml de *DIG Easy Hyb* precalentado
5. Retirar la solución de prehibridación y sustituir por esta última. Incubar toda la noche en agitación a 42°C

Eliminación del exceso de sonda

1. Lavar la membrana 2 veces durante 5 minutos en agitación con 2xSSC+0.1%SDS a temperatura ambiente (15-25°C)
2. Lavar la membrana 2 veces durante 5 minutos en agitación con 0.5xSSC+0.1%SDS a 68°C

Detección inmunológica

En esta fase la membrana debería estar siempre entre 20-30°C.

1. Sumergir ampliamente la membrana en tampón de lavado, 1-5 minutos
2. Incubar 30 minutos en 170 ml de solución de bloqueo 1x (*DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II*)
3. Incubar 30 minutos en 30 ml de solución de anticuerpo anti-digoxigenina-AP 1 (*DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II*) (concentración de anticuerpos durante la detección 75 U/ml)
4. Lavar dos veces durante 15 minutos en 100ml de tampón de lavado

Revelado

1. Equilibrar 2-5 minutos en tampón de detección
2. Localizar la membrana en una bolsa de bocadillos transparente y cubrir con 1 ml de CSPD *ready to use* (*DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II*), e incubar 5 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.
3. Eliminar el exceso de CSPD e incubar 10 minutos a 37°C en oscuridad
4. Exponer la membrana a una película fotográfica "*Lumi-Film Chemiluminiscent Detection*" a distintos tiempos hasta alcanzar la intensidad optima para el análisis posterior.

Opcionalmente, la sonda puede ser eliminada de las membranas para una segunda hibridación con una sonda diferente. Para ello:

1. Lavar la membrana ampliamente con agua destilada estéril.
2. Lavar 2 veces durante 15 minutos a 37°C con 0.2 M NaOH+0.1%SDS para eliminar la sonda marcada.
3. Lavar ampliamente con 2xSSC

Almacenar las membranas a -20°C para una próxima hibridación.

4.10.2. “Colony-blot”

La detección de genes directamente a partir de colonias crecidas sobre placas de medio de cultivo consiste en transferir dichas colonias a una membrana de nylon. Posteriormente las células se lisan y el ADN es fijado a la membrana. El resto del protocolo es similar al detallado para “Southern-blot”.

4.10.3. Clonación de las estructuras genéticas que contienen *qnrA*

Los experimentos de clonación se usaron para lograr una información más detallada sobre las secuencias adyacentes al gen de resistencia a quinolonas mediada por plásmidos *qnrA*.

Los enzimas de restricción y vectores plasmídicos se detallan en *Materiales*. Además, se realizaron diferentes protocolos de clonación dependiendo de si el ADN a clonar fue producto de PCR o ADN cromosómico/plasmídico digerido con enzimas de restricción.

Protocolo A: Clonación de productos de PCR (*TA Cloning Kit*, Invitrogen)

Se basa en el hecho de que la *Taq* ADN polimerasa añade una adenina en el extremo 3´ terminal del producto de PCR y que el vector usado (pCR®2.1) lleva una timina en su extremo 3´terminal, lo que favorece el proceso de ligación. Cuando se usó el enzima *Platinum PFX* DNA polimerasa (Invitrogen) para evitar errores en la amplificación, el producto de PCR se incubó 10 minutos a 72°C en presencia de *Taq* ADN polimerasa para la adición de las adeninas terminales. **Protocolo:**

1. La cuantificación de la cantidad de ADN necesario en la ligación sigue la siguiente fórmula:

$$X \text{ ng producto PCR} = \frac{(Y \text{ pb producto PCR}) (50 \text{ ng pCR}^{\circledast}2.1)}{(\text{tamaño pCR}^{\circledast}2.1=3900\text{pb})}$$

2. La reacción de ligación se realiza bajo las condiciones mostradas en la Tabla 14.

Tabla 14. Condiciones para la reacción de ligación de productos de PCR.

Componente	Volumen (μ l)
Producto PCR	X
Tampón ligación 10x	1
pCR [®] 2.1 (25 ng/ μ l)	2
Agua estéril	Hasta 9 μ l
T4 DNA ligasa (1 U/ μ l)	1
Volumen final	10

La relación de producto PCR/vector se aproxima a 1:1.

La reacción se incubó a 14°C toda la noche (opcionalmente se puede realizar a 4°C).

3. Transformación

Se realizó sobre células *E. coli* INV α F'.

- Añadir 2 μ l de productos de ligación y mezclar sobre un vial que contiene 50 μ l de células competentes localizada en hielo.
- Incubar 30 minutos en hielo.
- Realizar el choque térmico colocando el vial en un baño a 42°C durante 30 segundos exactos y colocar de nuevo en hielo.
- Añadir 250 μ l de medio SOC a temperatura ambiente.
- Crece en agitación durante 1 hora a 37°C y 225 rpm.
- Inocular diferentes alícuotas en los medios de selección. Normalmente los medios fueron LB agar que contenían X-Gal e IPTG (para realizar una sección blanco/azul), y 50 μ g/ml de kanamicina (o 100 μ g/ml de ampicilina).

Las colonias seleccionadas se analizaron mediante restricción para comprobar el tamaño del inserto, y posteriormente se secuenció el fragmento clonado.

Protocolo B: Clonación de fragmentos de ADN total o plasmídico

En estos ensayos se usó el vector pBK-CMV (Stratagene). El ADN del vector se obtuvo a partir de una cepa *E. coli* DH10B que contenía dicho vector mediante el protocolo de purificación de ADN plasmídico detallado anteriormente. El ADN plasmídico o total también se obtuvo por los protocolos detallados anteriormente. En todos los casos el ADN fue cuantificado por espectrofotometría.

Tras cada reacción (restricción, desfosforilación, ligación), las enzimas se inactivaron mediante calor según el caso.

1. Preparación del vector pBK-CMV

- a. El vector es digerido con la enzima de restricción seleccionada, normalmente a 37°C toda la noche y siguiendo las condiciones del fabricante.
- b. La digestión se verificó mediante gel de electroforesis cargando 5µl.
- c. Posteriormente el vector es desfosforilado durante 60-90 minutos a 37°C (para favorecer la posterior reacción de ligación) bajo las siguientes condiciones de la Tabla 15.

Tabla 15. Condiciones de desfosforilación del vector pBK-CMV.

<u>Componente</u>	<u>Volumen (µl)</u>
pBK-CMV lineal	25.4
Fosfatasa alcalina (1 U/µl)	1.6
Tampón desfosforilación 10x	3
<u>Volumen final</u>	<u>30</u>

2. Preparación de las muestras

El ADN se digiere con los correspondientes enzimas de restricción y el grado de digestión es estimado mediante electroforesis en gel.

3. Ligación (Tabla 16)

Tabla 16. Condiciones de ligación de fragmentos de ADN digeridos.

Componente	Volumen (μ l)
ADN muestra digerido	4-6
pBK-CMV lineal desfosforilado	1-2
Tampón ligación 10x	2
T4 ADN ligasa(1 U/ μ l)	1
Agua estéril	Hasta 20
Volumen final	20

Las cantidades de ADN oscilaron para obtener una relación óptima vector/inserto. El producto de ligación se precipitó mediante etanol para concentrar el ADN y obtener una mayor eficiencia de electroporación.

4. Preparación de células electrocompetentes

Las células de *E. coli* DH10B se prepararon y usaron habitualmente para estos ensayos con el siguiente protocolo (fundamental trabajar siempre en hielo):

- a. Inocular una colonia de *E. coli* DH10B en 5 ml de LB y crecer toda la noche a 37°C en agitación.
- b. Inocular los 5 ml de medio crecido en 500 ml de LB estéril. Crecer a 37°C en agitación (300 rpm) hasta alcanzar una $DO_{600}=0.5-0.7$, coincidiendo con la fase logarítmica de crecimiento (aproximadamente 3 horas).
- c. Enfriar el cultivo en hielo durante 15-20 minutos (para detener el crecimiento).
- d. Centrifugar las células a 4200 rpm y 4°C durante 20 minutos.
- e. Eliminar el sobrenadante y resuspender en 500 ml de agua estéril fría. Mezclar bien.

-
- f. Centrifugar las células a 4200 rpm y 4°C durante 20 minutos.
 - g. Tirar el sobrenadante y resuspender en 500 ml de agua estéril fría. Mezclar bien.
 - h. Centrifugar las células a 4200 rpm y 4°C durante 20 minutos.
 - i. Tirar el sobrenadante y resuspender en 40 ml de glicerol al 10% frío. Mezclar bien.
 - j. Centrifugar las células a 4200 rpm y 4°C durante 20 minutos.
 - k. Tirar el sobrenadante y resuspender en 200 µl de glicerol al 10% frío. Hacer alícuotas de 45 µl (una por electroporación).
5. Electroporación y selección
- a. Se mezcla 1-2 µl de producto de ligación precipitado en una alícuota de células competentes (45 µl) situada en hielo.
 - b. La electroporación se realizó con el sistema *Micropulser* (BioRad). Se aplican pulsos de 2.5 kV y 25 µF.
 - c. Inmediatamente después del pulso, se añade 1 ml de medio SOC a temperatura ambiente, se mezcla bien y las células se crecen 1 hora a 37°C en agitación.
 - d. Inocular diferentes alícuotas en los medios de selección. Habitualmente los medios fueron LB agar que contenían X-Gal (para realizar una sección blanco/azul), y 30 µg/ml de kanamicina más otros antibióticos dependiendo del gen de resistencia a seleccionar. En nuestro caso:
qnrA: 4 µg/ml de ácido nalidíxico
Resistencia a β-lactámicos: 50 µg/ml de amoxicilina

Las colonias seleccionadas se analizan mediante restricción para comprobar el tamaño del inserto. El patrón de resistencia a antibióticos se examinó mediante discos de difusión y los clones más interesantes fueron posteriormente secuenciados.

4.10.4. Secuenciación

Para la secuenciación se usaron cebadores internos de secuencias conocidas, y cebadores externos localizados en los vectores. Mediante Paseo Cromosómico se determinó el resto de las secuencias, usando nuevos cebadores a partir de las nuevas secuencias obtenidas. Los cebadores externos usados fueron (Tabla 23):

pUC18, pCR[®]2.1 (Invitrogen) y pPCRBluntII-TOPO (Invitrogen):

M13F 5'GTAAAACGACGGCCAG3'

M13R 5'CAGGAAACAGCTATGAC3'

pBK-CMV (Stratagene):

T3 5'AATTAACCCTCACTAAAGGG3'

T7 5'GTAATACGACTCACTATAGGGC3'

4.11. Análisis de la expresión del gen *qnrA*

El ARN es un ácido nucleico mucho más inestable y lábil que el ADN, de modo que se degrada muy rápidamente por la acción de ARNasas tanto endógenas como exógenas. La inactivación de estas enzimas es fundamental. Por ello, la mayoría de protocolos llevan soluciones tratadas con DEPC que es altamente reactivo y capaz de modificar el sitio activo de las ARNasas inactivándolas. También, las sales de guanidina son potentes inhibidores proteicos capaces de inactivar las ARNasas sin afectar a la integridad del ARN.

4.11.1. Aislamiento y purificación de ARN

Método A: *High Pure RNA Isolation Kit (Roche)*

1. Centrifugar 1 ml de un cultivo crecido toda la noche en medio LB (un número total de 10^9 células, aproximadamente) a 5000 rpm durante 5 minutos.
2. Resuspender el precipitado en 200 μ l de Tris 10 mM pH8.0 estéril.
3. Añadir 4 μ l de lisozima (de solución concentrada de 50 mg/ml), e incubar 10 minutos a 37°C para romper la pared celular.
4. Añadir 400 μ l de tampón de lisis y mezclar bien. Esta solución contiene guanidina, así además de romper las células, se inactiva la totalidad de ARNasas presentes.
5. Depositar la muestra sobre las columnas de afinidad de sílica provistas por el sistema comercial, y centrifugar entre 15 segundos y 1 minuto a 10.000 rpm. Descartar el sobrenadante. En este momento el ARN se encuentra unido en la columna.
6. Mezclar 90 μ l de tampón de DNasa y 10 μ l de DNasa I (de solución 18 U/ μ l) y añadir a la columna. Incubar 60 minutos a 15-25°C.
7. Añadir 500 μ l de solución de lavado 1 y centrifugar entre 15 segundos y 1 minuto a 10.000 rpm. Descartar el sobrenadante.
8. Añadir 500 μ l de solución de lavado 2 y centrifugar como en el paso 7. Descartar el sobrenadante.
9. Añadir 200 μ l de solución de lavado 2 y centrifugar 2 minutos a 13.000 rpm para eliminar el líquido residual.
10. Depositar la columna en tubos nuevos y eluir con 50-100 μ l agua estéril tratada con DEPC centrifugando 1 minuto a 10.000 rpm.

El ARN esta listo para ser usado en posteriores aplicaciones.

Método B: *RNeasy*[®] *Midi Kit* (Qiagen)

1. Centrifugar hasta 10 ml de un cultivo crecido toda la noche en medio LB (un número máximo de 10^{10} células, aproximadamente) a 5000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Tirar el sobrenadante.
2. Resuspender en 1 ml de tampón TE pH8.0 que contiene 1 mg/ml de lisozima. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
3. Añadir 4 ml de tampón RTL más β -mercaptoetanol (10 μ l por 1 ml de RTL) y mezclar vigorosa y ampliamente.
4. Centrifugar las bacterias lisadas a 5.000 rpm durante 5 minutos. Transferir el sobrenadante a un tubo de 15 ml y usar en los siguientes pasos.
5. Añadir 2.8 ml de etanol al 100% y mezclar.
6. Aplicar la muestra a una de las columnas de sílica dadas por el sistema comercial y centrifugar a 5.000 rpm durante 5 minutos. Tirar el sobrenadante. Es necesario hacerlo en dos pasos sucesivos debido al volumen de la columna.
7. Añadir 4 ml de tampón RW1 y centrifugar a 5.000 rpm durante 5 minutos. Tirar el sobrenadante.
8. Añadir 2.5 ml de tampón RPE y centrifugar a 5.000 rpm durante 2 minutos. Tirar el sobrenadante.
9. Añadir 2.5 ml de tampón RPE y centrifugar a 5.000 rpm durante 5 minutos. Tirar el sobrenadante.
10. Eluir el ARN de la columna con 200 μ l de agua estéril destilada tratada con DEPC.

El ARN esta listo para ser usado en posteriores aplicaciones.

4.11.2. Análisis por “Northern-blot”

El “Northern-blot” es una técnica usada ampliamente en la medición del tamaño y cantidad de ARNm de un determinado gen en un solo paso en estudios de expresión génica.

Las bacterias se crecieron siempre en LB con 100 µg/ml de ampicilina para asegurar el mantenimiento de los plásmidos en estudio. El ARN total se extrajo como se detalló anteriormente con el sistema *High Pure RNA Isolation kit* (Roche).

La cuantificación y análisis de la calidad del ARN se realizó como sigue. La cuantificación se realizó mediante espectrofotometría (*GeneQuant pro spectrophotometer*, Amersham Pharmacia Biotech) bajo los siguientes parámetros:

$DO_{260nm} = 1 \dots \dots \dots 38 \text{ µg/ml}$ para ARN de cadena simple

Donde la pureza de la muestra fue examinada mediante la razón:

$$\frac{DO_{260nm}}{DO_{280nm}} = 2.0 \longrightarrow 100\% \text{ de pureza de ARN de cadena simple}$$

Valores por encima y por debajo de esta razón indican que las muestras contienen proteínas u otros ácidos nucleicos (ADN cromosómico).

Se usaron 10 o 20 µg de ARN total para cada muestra en cada ensayo de “Northern-blot”. Se siguió un protocolo de separación de ARN por tamaño (Electroforesis de ARN Glioxilado en Gel de Agarosa) (Modificado de la referencia ²²⁶).

Protocolo:

1. El ARN se desnaturaliza bajo las siguientes condiciones indicadas en la Tabla 17.

Tabla 17. Condiciones de desnaturalización de ARN.

Componente	Volumen (μ l)
ARN (10-20 μ l)	X
Glioxal 40%	10
DMSO 100%	20
Agua tratada con DEPC	Hasta 50
Volumen final	50

Esta mezcla se mantuvo a 65°C durante 15 minutos o alternativamente a 55°C durante 1 hora.

2. El ARN desnaturalizado se carga en gel de agarosa al 1.2% usando como tampón de electroforesis 10 mM de $\text{Na}_x\text{H}_x\text{PO}_4$ (10 mM NaH_2PO_4 , 10mM Na_2HPO_4 , pH 7.1), y se corre a 5V/cm a 4°C con recirculación hasta que el tampón de carga migre aproximadamente 8 cm.
3. La transferencia del gel se realiza tras un baño de 20 minutos en 10xSSC como se detalla para el protocolo de "Southern-blot".
4. Tras la transferencia, la membrana se tiñe con azul de metileno para visualizar la cantidad y calidad de los ARN ribosómicos, posteriormente se destiñe con etanol al 20%. Esta medida se usa para verificar la carga de ARN de cada muestra y como referencia para estimar el tamaño de los transcritos posteriormente.
5. El resto del protocolo de hibridación y detección es idéntico al detallado para "Southern-blot".

La cuantificación de las intensidades de señal se realizó con el sistema informático *1D Image Analysis software* (Kodak, Rochester, N.Y., EE.UU.). Los ensayos se repitieron en triplicado en experimentos independientes.

4.11.3. Determinación del punto de inicio de la transcripción y de las regiones promotoras

La técnica usada para la determinación del punto de inicio de la transcripción, denominada 5'RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*), se basa en la amplificación de secuencias de ácidos nucleicos entre una secuencia interna definida y una secuencia desconocida localizada en el extremo 5' del ARN diana, desde una muestra de ARN mensajero (ARNm) o total que sirve de molde.⁶³

A partir de la muestra de ARN se realiza una reacción de retrotranscripción, en la que el cebador es una secuencia interna específica de nuestra molécula diana (cebador GSP1). Esto permite la conversión del ARN mensajero específico en ADN complementario (ADNc). Este ADNc purificado se pone en presencia de una transferasa terminal, añadiéndose un homopolímero de citosinas al extremo 3' del ADNc. Ahora es posible realizar una PCR convencional en la que se usan como cebadores una secuencia interna específica localizada en la región 3' de GSP1 (GSP2) y otro cebador capaz de hibridar con la cola de citosinas. De este modo es posible amplificar secuencias desconocidas entre GSP2 y el extremo 5' del ARNm diana. En la Figura 18 se muestran los pasos a seguir para la realización de la técnica.

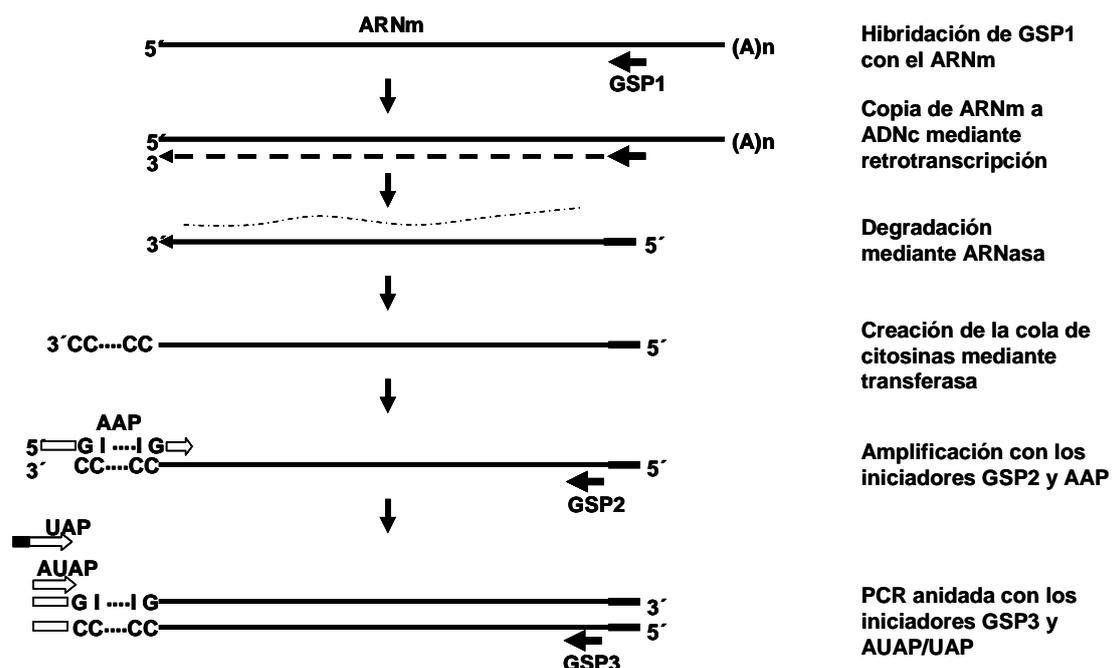


Figura 18. Resumen de la técnica de 5'RACE usada para la determinación del punto de inicio de la transcripción.

La elección de los cebadores resulta fundamental para el éxito de la técnica. Éstos deben cumplir una serie de condiciones, además de las de cualquier otro cebador. Las condiciones del cebador GSP1 deben ser:

- Presentar una T_m baja. Esto está en relación con la temperatura (42°C) a la que se produce la reacción de retrotranscripción.
- Longitud de 16 a 20 nucleótidos (para facilitar la separación del cebador del producto de ADNc)
- El producto obtenido debe ser de al menos unos 300 pb.

Las condiciones del cebador GSP2 y GSP3 (si se realiza una PCR anidada posterior) deben ser:

- Presentar un extremo 3' inestable ($\Delta G > -9$ kcal/mol), lo cual proporciona mayor especificidad. Esto se obtiene incluyendo no más de dos G o C en las 5 últimas bases del extremo 3'.
- La T_m debería estar entre 55°C y 70°C .

Protocolo: (Trabajar siempre en hielo a 4°C)

Todos los reactivos vienen suministrados por el sistema “5'RACE System for Rapid amplification of cDNA End, Versión 2.0” (Invitrogen).

1. Aislamiento de ARN total

El método empleado para la purificación de ARN ha sido detallado previamente (*RNeasy[®] Midi Kit* (Qiagen)).

2. Síntesis de ADNc

En este paso se sintetiza el ADNc específico de la molécula de ARN codificada por el gen en estudio.

Se añade en un tubo estéril de 0.5-ml o en un tubo de 0.2-ml (si usamos un termociclador) los siguientes componentes indicados en la Tabla 18.

Tabla 18. Cantidades de ARN y cebador a usar para la síntesis de ADNc.

Componente	Cantidad
GSP1	2.5 pmoles (10-25 ng)
Muestra de ARN	1-5 µg
Agua tratada con DEPC	Hasta un volumen de 15.5 µl

Incubar esta mezcla a 70°C durante 10 minutos para desnaturalizar el ARN. Enfriar durante 1 minuto en hielo. Realizar una centrifugación corta. Añadir los siguientes componentes indicados en la Tabla 19.

Tabla 19. Condiciones de la reacción para la síntesis de ADNc.

Componente	Volumen (µl)
Tampón de reacción a 10x	2.5
MgCl ₂ 25 mM	2.5
Mezcla de nucleótidos 10mM	1
DTT (ditiotreitól) 0.1 M	2.5
Volumen final	8.5

El volumen al final de este paso es de 24 µl. Mezclar y realizar una centrifugación corta. Localizar a 42°C durante 1 minuto. Añadir 1 µl de retrotranscriptasa (*SuperScript™ II RT*, Invitrogen) e incubar a 42°C durante 50 minutos.

La composición final es: 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 100 nM ADNc de GSP1, 400 µM de cada nucleótido (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1-5 µg (40 ng/µl) ARN, 200 unidades de *SuperScript™ II RT*.

Incubar a 70°C durante 10 minutos para inactivar la retrotranscriptasa. Realizar una centrifugación corta y colocar a 37°C. Añadir 1 µl de ARNasa (para eliminar

todo el ARN), mezclar e incubar a 37°C durante 30 minutos. Realizar centrifugación corta y colocar en hielo.

3. Purificación de ADNc

Se realiza para eliminar todos los restos de nucleótidos, ARN degradado y demás componentes. Por cada muestra a purificar hay que calentar 100 µl de agua estéril destilada a una temperatura de 65°C.

- a) Añadir 120 µl de solución de unión (6 M) al producto del paso 2 y mezclar.
- b) Localizar sobre una columna de purificación S.N.A.P. y centrifugar 20 segundos a 13.000 rpm.
- c) Descartar el sobrenadante. Añadir 400 µl de tampón de lavado 1x a 4°C y centrifugar 20 segundos a 13.000 rpm. Repetir un total de cuatro veces.
- d) Realizar la misma operación de lavado con etanol 70% a 4°C dos veces.
- e) Centrifugar 1 minuto a máxima velocidad para eliminar los restos de etanol.
- f) Transferir la columna a un tubo limpio y eluir el ADNc añadiendo 50 µl de agua destilada estéril (precalentada a 65°C). Centrifugar 1 minuto a 13.000 rpm.

4. Adición de la cola de citosinas al ADNc mediante una transferasa terminal
Diferentes cantidades de ADNc pueden ser usadas en este paso con buenos resultados. Habitualmente se usaron las concentraciones indicadas en la Tabla 20.

Tabla 20. Condiciones para la adición de una cola de citosinas.

<u>Componente</u>	<u>Volumen (µl)</u>
Agua tratada con DEPC	6.5
Tampón de la transferasa 5x	5.0
dCTP 2mM	2.5
ADNc purificado	10
Volumen final	24

Incubar 2-3 minutos a 94°C. Enfriar 1 minuto en hielo. Realizar una breve centrifugación y localizar en hielo. Entonces, añadir 1 µl de transferasa terminal e incubar 10 minutos a 37°C.

La concentración final de cada componente en la reacción es: 10 mM de Tris-HCl (pH 8.4), 25 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM dCTP, ADNc y transferasa terminal.

Calentar durante 10 minutos a 65°C para inactivar la transferasa.

5. PCR 1

Añadir los componentes indicados en la Tabla 21 en un tubo 0.2-ml de PCR localizado en hielo.

Tabla 21. Condiciones PCR1.

Componente	Volumen (µl)
Agua estéril destilada	31.5
Tampón de PCR 10x	5.0
MgCl ₂ 25mM	3.0
Mezcla de dNTP 10 mM	1.0
GSP2 10 µM	2.0
Cebador AAP 10µM	2.0
ADNc + cola de citosina	5.0
Volumen final	49.5

Añadir 0.5 µl de *Taq* ADN polimerasa (5 unidades/µl) y mezclar.

Composición final de la reacción: 20 mM de Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 400 nM GSP2, 400 nM AAP, 200 µM de cada nucleótido (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), ADNc + cola de citosina y 2.5 unidades de *Taq* ADN polimerasa.

Transferir al termociclador y realizar el siguiente programa:

4 min.....	94°C.....	1 ciclo
1 min.....	94°C	35 ciclos
1 min.....	55°C	
1 min.....	72°C	
7 min.....	72°C.....	1 ciclo
Indefinidamente.....	4°C	

Visualizar los productos (5-20 μ l) en gel de agarosa (TAE 1x) con bromuro de etidio 0.5 mg/L.

6. PCR 2 (PCR Anidada)

Para obtener suficiente producto para clonar y secuenciar suele ser necesaria una segunda ronda de amplificaciones.

Diluir 5 μ l de producto de la PCR 1 en 495 μ l de agua destilada estéril (dilución 1:100). Añadir en un tubo de 0.2-ml de PCR los componentes indicados en la Tabla 22.

Tabla 22. Condiciones PCR2.

Componentes	Volumen (μ l)
Agua estéril destilada	33.5
Tampón de PCR 10x	5.0
MgCl ₂ 25 mM	3.0
Mezcla de dNTP 10 mM	1.0
Cebador GSP3 10 μ M	1.0
Cebadores AUAP o UAP (Figura 19)	1.0
Producto de PCR diluído	5.0
Volumen final	49.5

Añadir 0.5 μ l de *Taq* ADN polimerasa (5 unidades/ μ l) y mezclar.

Composición final de la reacción: 20 mM de Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 nM GSP3, 200 nM AUAP o UAP, 200 μM de cada nucleótido (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), ADN PCR1 diluída y 2.5 unidades de *Taq* ADN polimerasa.

Transferir al termociclador y realizar el mismo programa detallado para la PCR
1. Visualizar los productos (5-20 μl) en gel de agarosa (TAE 1x) con bromuro de etidio 0.5 mg/L.

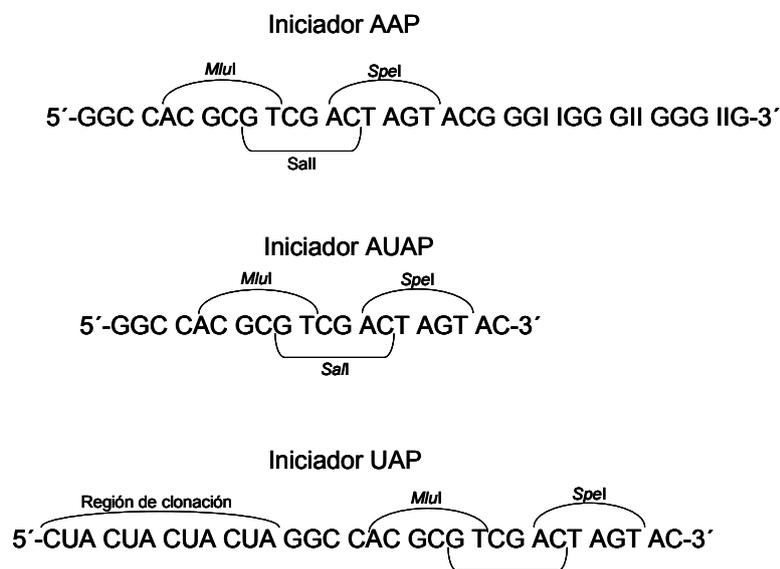


Figura 19. Secuencia de los iniciadores usados en la técnica de 5'RACE. Se indican las dianas de diferentes enzimas de restricción.

7. Clonación y Secuenciación

Estos pasos se realizaron como se detalló anteriormente.

4.12. Evaluación de la sensibilidad antimicrobiana en cepas que contienen el gen *qnrA* con diferentes sistemas automáticos

Se compararon los resultados de sensibilidad obtenidos con cuatro sistemas automáticos frente a quinolonas y β -lactámicos en cepas que presentan un plásmido que contienen simultáneamente *qnrA* y *bla*_{FOX-5}. Los sistemas usados fueron los siguientes:

- BD Phoenix (BD Diagnostic Systems, Sparks, Md, EE.UU.)
- MicroScan WalkAway (Dade Behring, Inc., West Sacramento, Calif., EE.UU.)
- VITEK-2 (bioMérieux-Vitek, Hazelwood, Mo, EE.UU.)
- Wider (Francisco Soria Melguizo, S.A., Madrid, España para Dade Behring, Inc., West Sacramento, Calif., EE.UU.)

Como método de referencia se usó el método de microdilución en caldo, detallado anteriormente.³⁸ Se estudiaron los siguientes antimicrobianos:

Quinolonas: ciprofloxacino, ácido nalidixico, norfloxacino y ofloxacino

β -lactámicos: ampicilina, cefotaxima, cefoxitina y ceftazidima

Los sistemas automáticos se usaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante, incluido el tamaño de inóculo. Las tarjetas y paneles y los rangos de concentraciones ($\mu\text{g/ml}$) usados por estos sistemas son:

- BD Phoenix: NMIC/ID-12 Combo (ampicilina, 4-16, cefotaxima, 1-16, cefoxitina, 4-16, ceftazidima, 1-16, ciprofloxacino, 0.125-2, ácido nalidixico, 8-32 y norfloxacino, 2-8)

- MicroScan WalkAway 96: panel Combo Negative type 1S (ampicilina, 4-16, cefotaxima, 0.5-32, ceftazidima, 8-16, ceftazidima, 1-16, ciprofloxacino, 0.12-2 mg/L; ofloxacino, 0.5-4 mg/L)
- Wider: panel Gram Negative MIC (cefoxitina, 4-16, ceftazidima, 0.5-16, ciprofloxacino, 0.12-4, ácido nalidíxico, 4-16)
- Vitek-2 (BioMerieux): AST-N020 (ampicilina, 4-32, cefotaxima, 1-32, cefoxitina, 8-32, ceftazidima, 1-32, ciprofloxacino, 0.5-4, ofloxacino, 0.5-4, norfloxacino, 1-32).

Las CMI obtenidas se convirtieron a su correspondiente categoría clínica (sensible, intermedio o resistente de acuerdo a los criterios del CLSI).³⁸

Los diferentes tipos de errores cometidos por los sistemas automáticos se catalogaron como:

- Errores máximos (EM): el organismo fue definido como resistente por el método de referencia y sensible por el sistema automático.
- Errores mayores (Em): el organismo fue definido como sensible por el método de referencia y resistente por el sistema automático.
- Errores menores (em): el organismo fue definido como sensible o resistente por el método de referencia o por el sistema automático e intermedio por el otro método.

Todos los EM y Em se repitieron dos veces por ambos métodos para constatar su veracidad.

4.13. Eficacia de fluoroquinolonas en la neumonía experimental murina por cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de QnrA

4.13.1. Cepas bacterianas, antimicrobianos y animales

Cepas Bacterianas

Se usaron dos cepas isogénicas derivadas de la cepa previamente publicada *K. pneumoniae* C2.^{148,150,151} Esta cepa carece de β-lactamasas y no produce las porinas OmpK35 y OmpK36. Además contiene una mutación en el gen *gyrA* en el codón 83 (TCC→TTC) la cual produce una sustitución de serina por fenilalanina (Ser83Phe) en la región QRDR de la proteína asociada a resistencia a quinolonas. Además posee un mecanismo de expulsión activa de quinolonas.

K. pneumoniae C2pMG252 es un transconjugante derivado de *K. pneumoniae* C2, que contiene el plásmido pMG252 que codifica *qnrA*.¹⁵¹ Este es un transconjugante estable en el cual el plásmido no se pierde si se crece en ausencia de antimicrobianos de selección.

Antimicrobianos

Los antimicrobianos en estudio fueron ciprofloxacino (Bayer), levofloxacino (Roussel Uclaf) y moxifloxacino (Bayer).

Animales

Se emplearon hembras de ratón C57BL/6 de 20-24 gramos, cuya característica principal para nuestro estudio es que son inmunocompetentes.

4.13.2. Sensibilidad *in vitro*

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

La CMI se realizó por el método de microdilución como se detalló en el apartado *Método de Microdilución*. Se estudió la actividad de fluoroquinolonas frente a tres inóculos bacterianos diferentes (10^5 , 10^6 y 10^7 UFC/ml).

Concentración Mínima Bactericida (CMB)

La CMB se determinó mediante subcultivo en placas de MHA sin antibiótico de las alícuotas de 100 µl de los pocillos de las placas de microdilución de concentración igual o mayor a la CMI del antimicrobiano correspondiente. Las placas se incubaron a 37°C durante 48 horas y se realizó recuento de colonias viables. La CMB se determinó como la concentración de antimicrobiano que eliminó al 99.9% del inóculo original.

4.13.3. Curvas de letalidad

Se realizó en medio MHB a concentraciones de 1x y 4x la CMI. En cada experimento se evaluó en paralelo un control sin antibiótico. El inóculo inicial usado en estos ensayos fue 10^6 UFC/ml.

Protocolo:

1. Las células se crecen en presencia del antimicrobiano (1x y 4x la CMI) a 37°C sin agitación.
2. A diferentes tiempos, tras la adición del antimicrobiano (0, 2, 4, 8 y 24 horas), se realizan recuentos de células viables inoculando 100 µl de distintas diluciones en placas de MHA sin antibiótico.
3. Tras 48 horas de incubación a 37°C, se realiza el recuento de bacterias viables (UFC/ml).

El poder bactericida se cuantifica por el tiempo necesario para alcanzar una caída de $3 \log_{10}$ del inóculo inicial.

4.13.4. Parámetros farmacocinéticos

Los niveles plasmáticos de ciprofloxacino, levofloxacino y moxifloxacino se determinaron después de inyectar una única dosis intramuscular de cada antimicrobiano. Las dosis administradas fueron 20 mg/kg para ciprofloxacino y moxifloxacino, y 25 mg/kg para levofloxacino. Después de 10, 15, 30, 60, 90, 120 y 150 minutos, se extrajo sangre del plexo periorbital de los ratones anestesiados, en grupos de tres ratones en cada punto de tiempo (Figura 20).

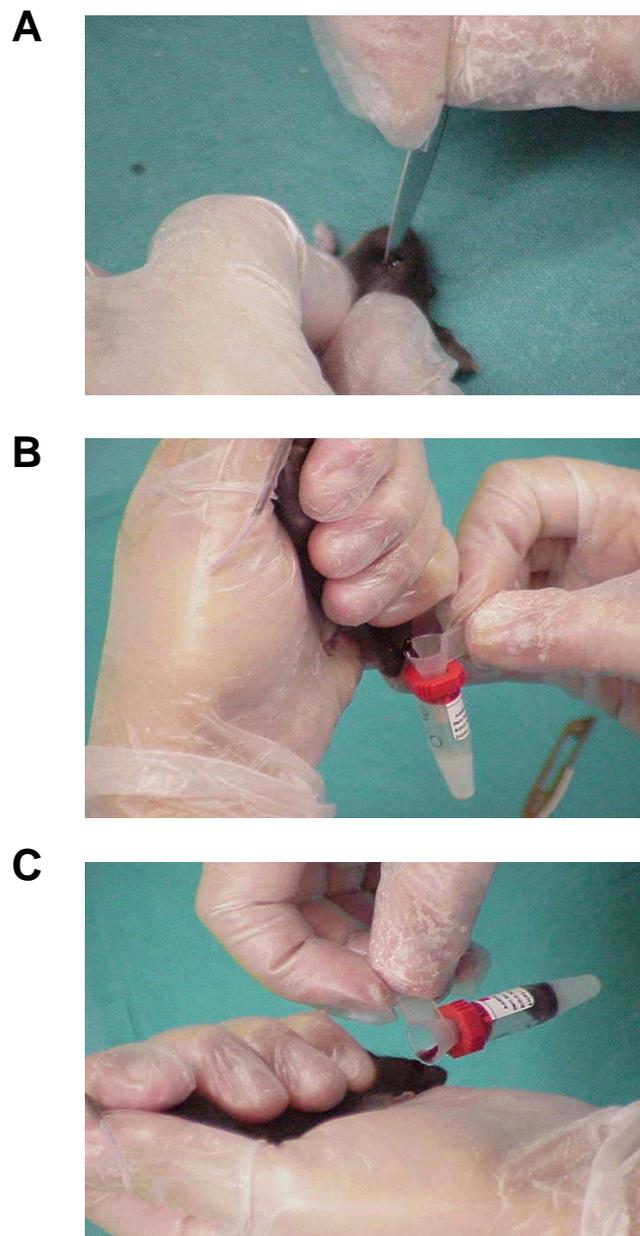


Figura 20. Extracción sanguínea del plexo periorbital de los ratones anestesiados. A: Incisión del plexo periorbital; B y C: Extracción de la sangre para la realización del bioensayo.

Las concentraciones plasmáticas de los antimicrobianos se calcularon mediante un bioensayo, usando como cepa indicadora *Staphylococcus epidermidis* ATCC 27626. La variación intra-día e inter-día de los ensayos fue $6.27\% \pm 1.45$ y $5.96\% \pm 0.57\%$ para ciprofloxacino, $7.82\% \pm 10.11\%$ y $7.18\% \pm 9.03\%$ para levofloxacino, y $4.45\% \pm 3.49\%$ y $4.97\% \pm 1.98\%$ para

moxifloxacino. Los coeficientes de regresión lineal de estos ensayos fueron: 0.96 ± 0.04 , 0.99 ± 0.07 y 0.88 ± 0.07 , respectivamente, siendo los límites inferiores de detección 0.9, 0.9 y 0.1 $\mu\text{g/ml}$. A partir de estos datos, se determinaron los siguientes parámetros farmacocinéticos usando el programa PKCALC.²³⁶

- Concentración máxima (C_{max} , mg/L)
- Área bajo la curva concentración-tiempo (AUC, mg h/L)
- Semivida biológica ($t_{1/2}$, h)

4.13.5. Modelo de neumonía experimental en ratón

Para la producción de neumonía en ratones se siguió un protocolo modificado del modelo de Esposito y Pennington,⁵⁵ el cual ha sido publicado anteriormente.²¹⁹ Los ratones se anestesian con 20 μl de thiopental sódico al 5% inyectado intraperitonealmente. Manteniendo el ratón suspendido verticalmente, con el cuello hiperextendido, la traquea es canulada con una aguja de punta roma, confirmándose la posición correcta mediante la sensación de contacto del extremo de la aguja con el cartílago traqueal. La aguja se conecta con una jeringa Hamilton (Hamilton Co., Reno, NV, USA) y se inyecta lentamente 50 μl de la suspensión bacteriana, preparada a partir de cultivo en TSB crecido durante 18 horas a 37°C , mezclada al 50% con mucina porcina diluída al 10% en solución salina, siendo el inóculo aproximadamente de 10^8 UFC. Los ratones se dejan en posición vertical durante 3 minutos y luego son colocados en un ángulo de 30° hasta despertar (Figura 21).

4.13.6. Tratamiento antimicrobiano

Se realizó para evaluar la efectividad de diferentes tratamientos. Se inocularon 65 ratones con la cepa *K. pneumoniae* C2, y otros 65 con la cepa *K. pneumoniae* C2pMG252. Los animales se dividieron en 4 grupos que durante 72 horas recibieron los siguientes tratamientos:

- Grupo control (no tratado, n=20)
- Tratamiento con ciprofloxacino (80 mg/kg/día, n=15)
- Tratamiento con levofloxacino (100 mg/kg/día, n=15)
- Tratamiento con moxifloxacino (80 mg/kg/día, n=15)

La primera dosis de cada antibiótico se administró 4 horas después de la inoculación, con el siguiente esquema de dosificación: 20, 20 y 40 mg/kg a las 8, 14 y 20 horas, respectivamente para ciprofloxacino y moxifloxacino; y 25, 25 y 50 mg/kg a las 8, 14 y 20 horas, respectivamente para levofloxacino.

La mortalidad se analizó a las 72 horas. Los ratones supervivientes se sacrificaron 4 horas después de la última dosis administrando una cantidad letal de thiopental sódico (Braun Medical, Barcelona, España) intraperitonealmente. Todos los ratones se analizaron inmediatamente después de la muerte.

Se realizó una toracotomía para extraer el corazón y los pulmones. Los pulmones se pesaron y se procesaron para cuantificar la cantidad de bacterias, previa homogenización en 2 ml de solución salina estéril (*Stomacher 80 Tekmar Co.*, Cincinnati, OH, USA). Tras una dilución 1:10, las alícuotas se sembraron en agar sangre Columbia e incubaron durante 24 horas a 37°C. La cuantificación se expresó como la media \pm SD (desviación estándar).

Las muestras de pulmón se procesaron para estudios histológicos en 5 ratones de cada grupo. Los pulmones se fijaron en formaldehído al 10%, y una vez embebidos en parafina se cortaron en secciones de 4 μ m. Los cortes se estudiaron por microscopía óptica.

Para confirmar que las fluoroquinolonas no fueron tóxicas, se trataron y analizaron grupos de 5 ratones no infectados durante 72 horas.



Figura 21. Manejo de los animales durante la inoculación bacteriana y posterior tratamiento. Anestesia: Dosis intraperitoneal con thiopental sódico. Inoculación: inoculación con 50 μ l de la suspensión bacteriana. Post-inoculación: Suspensión vertical durante tres minutos para favorecer el inicio de la infección. Tratamiento: dosis intraperitoneal de antimicrobiano.

Para el análisis estadístico se utilizó un test para comparación de medias (ANOVA) de los distintos grupos de estudio. Cuando la diferencia fue significativa, la comparación entre los grupos se realizó mediante los test “*post-hoc*” de Dunnett y Tukey-Kramer. La frecuencia de supervivientes se analizó mediante el test exacto de Fisher. Se usó el programa estadístico SPSS versión 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.).

4.13.7. Selección y caracterización de mutantes resistentes

La selección de mutantes derivados de las cepas C2 y C2pMG252 se realizó tanto *in vitro* como *in vivo*. *In vivo*, los homogeneizados de pulmón se inoculan en placas de MHA que contienen 4xCMl de ciprofloxacino, levofloxacino o moxifloxacino, tanto para una como otra cepa. Se usan los pulmones de los 15 ratones tratados de cada grupo. Las placas se incuban a 37°C durante 48 horas, y se realiza el recuento de colonias. *In vitro*, los

mutantes se seleccionan bajo las mismas condiciones usando una suspensión de bacterias crecidas en TSB (35°C, 20 horas) como inóculo.

La frecuencia de mutantes se calculó como la razón entre el número de colonias de las placas que contienen 4xMIC del antimicrobiano correspondiente y el inóculo original.

Se seleccionaron hasta 8 colonias de cada placa para estudios posteriores de sensibilidad. Los mutantes estables se tomaron como aquellos que mantuvieron el fenotipo de resistencia tras dos pases consecutivos en MHA sin antibiótico. Para cada colonia seleccionada se determina la actividad de las tres fluoroquinolonas. Los mutantes verdaderos se definieron como aquellos en los que la CMI del antimicrobiano con el que se seleccionó aumentó al menos 4 veces con respecto a la cepa original.

También se obtuvieron mutantes desde placas en las que se estableció un gradiente de concentración de antimicrobiano, en las que la concentración máxima fue 16xMIC.

El producto de la amplificación de la región QRDR de los genes *gyrA* y *parC* de los mutantes seleccionados se secuenció. Los cebadores usados para la amplificación y secuenciación se indican en la Tabla 23.

Tabla 23. Oligonucleótidos usados en esta tesis doctoral.

Nombre	Experimento	Secuencia (5'→3')	Localización	Fuente o referencia
REP1	REP-PCR	IIIGCGCCGICATCAGGC		260
A3	RAPD-PCR	AGTCAGCCAC		277
272	RAPD-PCR	AGCGGGCCAA		277
M13F	Secuenciación	GTAAAACGACGGCCAG		
M13R	Secuenciación	CAGGAAACAGCTATGAC		
T3	Secuenciación	AATTAACCCTCACTAAAGGG		
T7	Secuenciación	GTAATACGACTCACTATAGGGC		
CR-A	PCR	CACTWCCACATGCTGTKKC	Elementos CR	P. Nordmann
CR-B	PCR	CGCTTGAGSCGTTGCRYCC	Elementos CR	P. Nordmann
ORF513D3	PCR	CTCACGCCCTGGCAAGGTTT	orf513	144
ORF513D5	PCR	CTTTTGCCCTAGCTGCGGT	orf513	144
ORF513-F	PCR	GAAGTCTGCGAACACTGCGGC	orf513	Este estudio
SUL1-R	PCR	CATCTGATCGGACAGGGCGTC	<i>sul1</i>	Este estudio

qnrA1	PCR/Secuenciación	ATCCAGATCGGCAAAGGTTA	<i>qnrA</i>	GA Jacoby
qnrA2	PCR/Secuenciación	GATAAAGTTTTTCAGCAAGAGG	<i>qnrA</i>	GA Jacoby
qnrA	PCR	GGGTATGGATATTATTGATAAAG	<i>qnrA</i>	144
qnrB	PCR	CTAATCCGGCAGCACTATTA	<i>qnrA</i>	144
qnrS-A	PCR	CAATCATA CATATCGGCACC	<i>qnrS</i>	Este estudio
qnrS-B	PCR	AGTTCTTGCTGCCAGGCTGC	<i>qnrS</i>	Este estudio
CTX-MA1	PCR	SCSATGTGCAGYACCAGTAA	genes <i>bla</i> _{CTX-M}	125
CTX-MA2	PCR	CCGCRATATGRTTGGTGGTG	genes <i>bla</i> _{CTX-M}	125
dfrB	PCR	ATGCGCAGCATTGGGTGTC	genes <i>dfr</i>	Este estudio
dfrF	PCR	GTTATGGAGCAGCAACGATG	genes <i>dfr</i>	Este estudio
SPM-1A	PCR	CTGCTTGGATTCATGGGCGC	<i>bla</i> _{SPM-1}	202
SPM-1B	PCR	CCTTTCCGCGACCTTGATC	<i>bla</i> _{SPM-1}	202
GSP1- <i>qnrA</i>	5'RACE	AAGTACATCTTATGGCTGACTTGA	<i>qnrA</i>	144
GSP2- <i>qnrA</i>	5'RACE	ATGAAACTGCAATCCTCGAAACTG	<i>qnrA</i>	144
GSP3- <i>qnrA</i>	5'RACE	TGGCTGAAGTCACACTGATAAAAG	<i>qnrA</i>	144
GSP1- <i>bla</i> _{CTX-M-9}	5'RACE	CCAGCGCATGACCCAGCGTAAC	<i>bla</i> _{CTX-M-9}	Este estudio
GSP2- <i>bla</i> _{CTX-M-9}	5'RACE	GCGTCATTGTGCCGTTGACGTGT	<i>bla</i> _{CTX-M-9}	Este estudio
GSP3- <i>bla</i> _{CTX-M-9}	5'RACE	GCACCGCACTCGTCTGCGCATA	<i>bla</i> _{CTX-M-9}	Este estudio

GSP1- <i>bla</i> _{CTX-M-2}	5'RACE	CGCGAGCGGCGTGGTGGTAT	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	Este estudio
GSP2- <i>bla</i> _{CTX-M-2}	5'RACE	CGTTCATCGGCACGGTAGAGAA	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	Este estudio
GSP3- <i>bla</i> _{CTX-M-2}	5'RACE	CCAAGCCGACCTCCCGAACTT	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	Este estudio
GSP1- <i>dfrA10</i>	5'RACE	GCACCCCAACCAGCGAAGCT	<i>dfrA10</i>	Este estudio
GSP2- <i>dfrA10</i>	5'RACE	GCACTTCGTGCTCTGTGATAGTT	<i>dfrA10</i>	Este estudio
GSP3- <i>dfrA10</i>	5'RACE	GCCTTGATTACCGAATGCTCT	<i>dfrA10</i>	Este estudio
GSP1- <i>bla</i> _{SPM-1}	5'RACE	CGTCTCCGCGCCCATCTTCTT	<i>bla</i> _{SPM-1}	Este estudio
GSP2- <i>bla</i> _{SPM-1}	5'RACE	CGCGGTCTGTGACGACGAAA	<i>bla</i> _{SPM-1}	Este estudio
GSP3- <i>bla</i> _{SPM-1}	5'RACE	GCAAGTCGACATGATCCGAACT	<i>bla</i> _{SPM-1}	Este estudio
AAP	5'RACE	GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG		Invitrogen
AUAP	5'RACE	GGCCACGCGTCGACTAGTAC		Invitrogen
UAP	5'RACE	CUACUACUACUAGGCCACGCGTCGACTAGTAC		Invitrogen
gyrA-1	PCR/Secuenciación	AAATCTGCCC GTGTCGTTGGT	<i>gyrA</i>	V.J. Benedi
gyrA-2	PCR/Secuenciación	GCCATACCTACGGCGATACC	<i>gyrA</i>	V.J. Benedi
parC-A	PCR/Secuenciación	CTGAATGCCAGCGCCAAATT	<i>parC</i>	V.J. Benedi
parC-B	PCR/Secuenciación	GCGAACGATTTCCGGATCGTC	<i>parC</i>	V.J. Benedi

FOX-1F	PCR/Secuenciación	ATGTGGACGCCTTGAAC	genes <i>bla</i> _{FOX}	16
FOX-1R	PCR/Secuenciación	CACCACGAGAATAACCAT	genes <i>bla</i> _{FOX}	16
AmpR-1	PCR	TGCGGCGATTGAGCTGAATG	<i>ampR</i> ^a	P. Nordmann
AmpR-2	PCR	ATGTTGAGGAGAGTGCACTGC	<i>ampR</i> ^a	P. Nordmann
AmpR-3	PCR	GTTTCCGTACGGGACTGTAAC	<i>ampR</i> ^a	P. Nordmann
IS6100-A	PCR		IS6100	P. Nordmann
IS6100-B	PCR		IS6100	P. Nordmann
PreQnrAa	PCR/Clonación	GAAAGAGTTAGCACCTCCC	Pre- <i>qnrA</i> (<i>S. algae</i>) ^b	Este estudio
PreQnrAb	PCR/Clonación	CTAATCCGGCAGCACTATTA	Post- <i>qnrA</i> (<i>S. algae</i>) ^c	Este estudio
PreQnrVV1	PCR/Clonación	TGGCGATTTAAGCCACTTG	Pre- <i>qnrVV</i> (<i>V. vulnificus</i>)	Este estudio
PreQnrVV2	PCR/Clonación	TTCTTGCTAACGAGCTCG	Post- <i>qnrVV</i> (<i>V. vulnificus</i>)	Este estudio
PreQnrVP1	PCR/Clonación	TCTCGCTAAGGCTCGTAGC	Pre- <i>qnrVP</i> (<i>V. parahaemolyticus</i>)	Este estudio
PreQnrVP2	PCR/Clonación	TTCTCGTCGAGGTTATTTCG	Post- <i>qnrVP</i> (<i>V. parahaemolyticus</i>)	Este estudio
PreQnrPP1	PCR/Clonación	TTGTTAGGTGATAACCTTCGG	Pre- <i>qnrPP</i> (<i>P. profundum</i>)	Este estudio
PreQnrPP2	PCR/Clonación	CAATATTGTTAACGGTGCGC	Post- <i>qnrPP</i> (<i>P. profundum</i>)	Este estudio

^a Gen *ampR* según la secuencia de *Morganella morganii*.

^b Pre- hace referencia a que el cebador se localiza en la región 5' anterior al gen.

^c Post- hace referencia a que el cebador se localiza en la región 3' posterior al gen.

5. RESULTADOS

5.1. Estudio de prevalencia del gen *qnrA*

Estudio de prevalencia A

En este estudio, se analizaron un total de 425 cepas clínicas para determinar la presencia del gen *qnrA*. Esta colección constó de 159 *K. pneumoniae* y 266 *E. coli* y presentaba una distribución heterogénea en cuanto a sus orígenes geográficos (Tabla 24). Las cepas se obtuvieron de distintos estudios de seguimiento de resistencias: SENTRY (75 *K. pneumoniae* y 75 *E. coli*), GEIH-BLEE 2000 (10 *K. pneumoniae* y 108 *E. coli*), colección del Hospital Universitario Virgen Macarena (45 *K. pneumoniae* y 70 *E. coli*), un estudio multicéntrico en EE.UU. (11 *K. pneumoniae* y 13 *E. coli*), estudio ICARE (5 *K. pneumoniae*) y otras fuentes.^{25,93,107,240,257}

Las características sobre el origen de las cepas en esta colección se muestran en la Tabla 24. 57 aislados clínicos (13.41%) fueron productores de β -lactamasas de tipo AmpC plasmídicas (pACBL) o bien (en el caso de los aislados de *K. pneumoniae*) presentaron un fenotipo compatible con la producción de pACBL, que incluye resistencia a cefoxitina de acuerdo a las

normas del CLSI,³⁸ producción de porinas de membrana externa (previamente determinado por electroforesis en gel de poliacrilamida mediante SDS-PAGE) y la expresión de una β -lactamasa inhibida por cloxacilina, pero no por ácido clavulánico (usando inhibición *in situ* sobre geles de isoelectroenfoque).²²⁹ Además, 381 cepas clínicas (89.64%) presentaron un perfil de resistencia a ciprofloxacino, de acuerdo a las normas de CLSI.³⁸

Como controles positivos se usaron la cepa *K. pneumoniae* UAB1 y un transconjugante derivado de *E. coli* J53 conteniendo el plásmido pMG252 para verificar la presencia de *qnrA* mediante PCR,¹⁵¹ y la cepa *E. coli* (pBCH2.6) como control positivo para *qnrS*.⁸⁵

Tabla 24. Origen de los 425 aislados clínicos de *K. pneumoniae* y *E. coli* usados en el estudio de prevalencia A.

Especie	Número de Cepas	Origen	Estudio/Referencia
<i>E. coli</i> (n=266)	25	Europa	Estudio SENTRY
	25	Latino-América	
	25	EE.UU.	
	108	España (40 centros)	Estudio GEIH-BLEE 2000 ⁹³
	70	Sevilla, España	Hosp. Univ. V. Macarena
	13	EE.UU.	Multicenter study (GA Jacoby) ¹⁰⁷
<i>K. pneumoniae</i> (n=159)	25	Europa	Estudio SENTRY
	25	Latino-América	
	25	EE.UU.	
	10	España (40 centros)	Estudio GEIH-BLEE 2000 ⁹³
	45	Sevilla, España	Hosp. Univ. V. Macarena
	3	Barcelona, España	Dr. J. Liñares
	7	Atenas, Grecia	L. Tzouvelekis ²⁵⁷
	3	EE.UU.	P. Bradford ²⁵
	11	EE.UU.	Estudio Multicéntrico (GA Jacoby) ¹⁰⁷
	5	EE.UU.	Proyecto ICARE, F. Tenover ²⁴⁰

El gen *qnrA* se detectó mediante PCR en 3 cepas clínicas de *K. pneumoniae* (N5, 1960, 1132) de un total de 159 cepas (0.7%). Ninguno de los 266 aislados clínicos de *E. coli* resultó positivo mediante PCR para *qnrA* (Figuras 22 y 23). Las 3 cepas de *K. pneumoniae* que contenían el gen *qnrA* fueron resistentes a ácido nalidíxico (con una CMI igual o mayor de 32 $\mu\text{g/ml}$). Sólo la cepa 1132 fue resistente a ciprofloxacino (con una CMI de 4 $\mu\text{g/ml}$), la cepa N5 fue sensible (con una CMI de 0.25 $\mu\text{g/ml}$), y la cepa 1960 presentó sensibilidad (con una CMI de 1 $\mu\text{g/ml}$). La secuencia del gen *qnrA* fue idéntica a la previamente descrita por Tran y col.²⁵⁰ Estas cepas, además, contienen el gen *bla*_{FOX-5} que codifica la β -lactamasa plasmídica tipo AmpC FOX-5, como se comprobó mediante PCR y secuenciación.

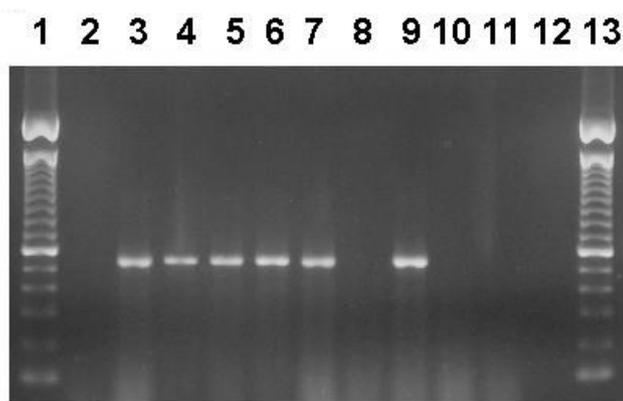


Figura 22. PCR de las cepas de *K. pneumoniae* que contienen el gen *qnrA* detectadas en el estudio de prevalencia A y sus respectivos transconjugantes que contienen o no dicho gen. Líneas 1 y 13: Marcador de pesos moleculares de 100 pb, línea 2: *E. coli* J53 Rif^R (control negativo), línea 3: *E. coli* J53 Rif^R pMG252 (control positivo), línea 4: *K. pneumoniae* N5; línea 5: *K. pneumoniae* 1960; línea 6: *K. pneumoniae* 1132, línea 7: tranconjugante procedente de la *K. pneumoniae* N5 que contiene *qnrA*, línea 8: tranconjugante procedente de la *K. pneumoniae* N5 que no contiene *qnrA*, línea 9: tranconjugante procedente de la *K. pneumoniae* 1960 que contiene *qnrA*, línea 10: tranconjugante procedente de la *K. pneumoniae* 1960 que no contiene *qnrA*, línea 11: tranconjugante procedente de la *K. pneumoniae* 1132 que no contiene *qnrA*, línea 12: control negativo (muestra sin ADN).

Además, en el estudio por PCR aparecieron una serie de falsos positivos en algunos aislados clínicos de *E. coli* en los que amplificó una banda de 450 pb aproximadamente, en vez del producto específico esperado para *qnrA* de 543 pb. Diversos intentos para secuenciar este fragmento fracasaron. Cuando

se realizó la detección de *qnrA* mediante “Dot-blot” usando como sonda el fragmento de 543 pb específico de *qnrA*, en estas mismas cepas no se obtuvo señal alguna, constatando la presencia de *qnrA* en las cepas de *K. pneumoniae* UAB1, N5, 1960 y 1132 y eliminando la duda de los falsos positivos (Figura 23).

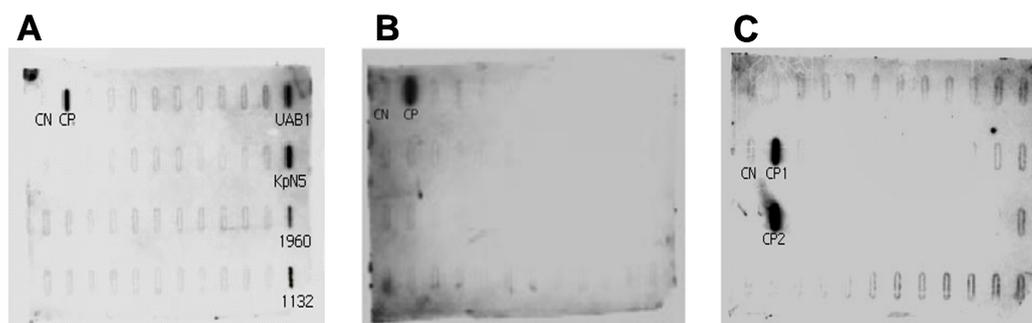


Figura 23. Detección mediante Dot-blot del gen *qnrA* en las colecciones de cepas estudiadas (Estudio de prevalencia A). CN (cepa *E. coli* J53), control negativo; CP o CP1 (cepa *E. coli* J53p) y CP2 (cepa *K. pneumoniae* UAB1), controles positivos para *qnrA*. A: Cepas de *K. pneumoniae* de los estudios SENTRY e ICARE. B: Cepas de *K. pneumoniae* del estudio SENTRY. C: Cepas de *E. coli* del estudio SENTRY.

La cepa de *K. pneumoniae* N5 se aisló en el estudio SENTRY en Wilmington, DE, EE.UU. en 1997 (información personal facilitada por el doctor D. Biedenbach, The JONES Group, JMI Lab, North Liberty, IA, EE.UU.). La cepas de *K. pneumoniae* 1960 y 1132 se aislaron durante el proyecto ICARE, ambas en la misma institución en Carolina del Norte en 1995 y 1996, respectivamente (información personal facilitada por el doctor F. Tenover, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, EEUU).

En este estudio de prevalencia se analizó la presencia del gen *qnrS* en las 3 cepas de *K. pneumoniae* (N5, 1960, 1132) *qnrA* positivas, y la cepa control *K. pneumoniae* UAB1.¹⁵¹ Ninguna de estas cepas fue positiva mediante PCR para *qnrS*.

Estudio de prevalencia B

En este segundo estudio de prevalencia, se analizó mediante PCR una colección de cepas clínicas aisladas en Australia. La cepa *E. coli* Lo se usó como control positivo para verificar la presencia de *qnrA* mediante PCR,¹⁴⁴ y la cepa *E. coli* (pBCH2.6) se usó como control para *qnrS*.⁸⁵ Se estudiaron en total 23 aislados clínicos de enterobacterias, todos ellos resistentes a ciprofloxacino, aislados en 2002 desde el área metropolitana de la ciudad de Sydney, en Australia. Las cepas se aislaron durante un periodo de dos meses a partir de muestras de orina. Esta colección constó de 11 *Klebsiella pneumoniae*, 8 *Escherichia coli*, 1 *Enterobacter cloacae*, 1 *Enterobacter agglomerans*, 1 *Proteus mirabilis* y 1 *Citrobacter youngae*. Además, en este estudio de prevalencia se incluyeron las cepas *E. coli* EC158 y *K. pneumoniae* K149, aisladas en Melbourne en septiembre de 2002 y productoras de la metalo- β -lactamasa IMP-4.²⁰⁴ 16 de los aislados (69.5%) fueron productores de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE).

En esta colección 2 de las 25 cepas (8%) contenían el gen *qnrA*. En ambos casos, la secuencia del gen *qnrA* fue idéntica a la previamente descrita por Tran y col.²⁵⁰ La cepa *K. pneumoniae* K149, previamente descrita²⁰⁴ y que contenía los genes de resistencia a β -lactámicos *bla*_{SHV-12} y *bla*_{IMP-4}, fue positiva para dicho gen. Esta cepa presentó sensibilidad intermedia a ácido nalidíxico y fluoroquinolonas (Tabla 25), y además fue resistente a ampicilina, amoxicilina, ceftazidima, ticarcilina, ticarcilina+ácido clavulánico, imipenem, fosfomicina, tetraciclina, cloranfenicol, trimetoprim+sulfametoxazol, tobramicina, gentamicina, kanamicina, rifampicina y sulfamidas (Figura 24). Un segundo aislado clínico, que además contenía el gen *bla*_{SHV-12}, resultó *qnrA* positivo mediante PCR. Esta cepa fue resistente a quinolonas y fluoroquinolonas (Tabla 25, Figura 24) y, además, a ampicilina, amoxicilina, ceftazidima, tetraciclina, cloranfenicol, trimetoprim+sulfametoxazol, aminoglucósidos, rifampicina y sulfamidas (Tabla 25, Figura 24).

En este segundo estudio de prevalencia se analizó al mismo tiempo la presencia del gen *qnrS*. Ninguna de las cepas estudiadas fue positiva mediante PCR para dicho gen.

No se analizó la prevalencia de *qnrB* en ninguno de los dos estudios de prevalencia debido a que su secuencia nucleotídica no se encontraba disponible en el momento de la realización de estos estudios.

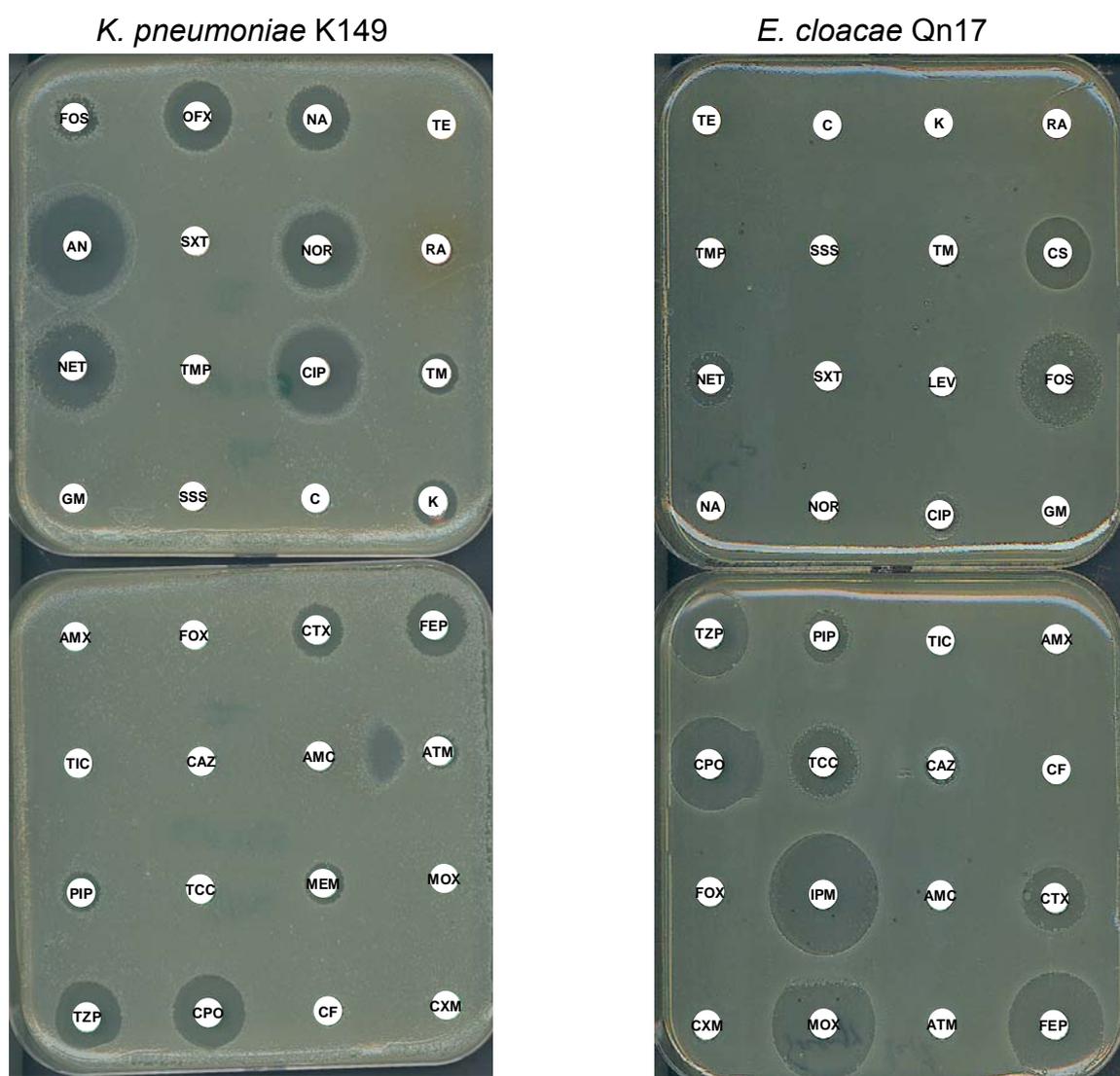


Figura 24. Antibiogramas de las cepas *K. pneumoniae* K149 y *E. cloacae* Qn17. La nomenclatura de los discos se especifica en el Anexo 2.

Tabla 25. Sensibilidad a quinolonas, β -lactámicos y otros antimicrobianos de los aislados clínicos que contienen *qnrA* y sus respectivos transconjugantes (TC) obtenidos en los estudios de prevalencia A y B. Los valores de CMI se expresan en $\mu\text{g/ml}$.

Antimicrobiano	UAB1	UAB1 TC	N5	N5 TC	1960	1960 TC	1132	K149	K149 TC	Qn17	<i>E. coli</i> J53 Az ^R	<i>E. coli</i> J53 Rif ^R
Ácido Nalídixico	32	32	32	32	>256	32	>256	16	16	>256	4	4
Ciprofloxacino	2	0.5	0.25	0.125	1	0.125	4	1	0.25	16	0.008	0.008
Ofloxacino	16	1	2	0.5	4	0.5	16	4	1	>32	0.06	0.06
Levofloxacino	1	0.5	0.25	0.125	0.5	0.125	2	1	0.125	16	0.015	0.015
Norfloxacino	16	2	2	1	4	1	16	2	1	32	0.06	0.06
Moxifloxacino	1	0.25	0.5	0.125	1	0.125		2	1	>32	0.008	0.008
Sparfloxacino	16	0.5						2	1	>32	0.015	0.015
Clinafloxacino	2	0.25	0.25	0.125	0.5	0.125	2				0.004	0.004
Trovafloxacino		2	8	2	16	0.5	32				0.015	0.015
Ampicilina	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128				2	2
Amoxicilina-clav.	16	4	16	8	16	4	16				2	2
Ampicilina-sulb.	64	16	64	16	64	16	64				1	1
Piperacilina	>256	256	>256	256	>256	128	>256				1	1
Piperacilina-taz.	8	4	8	4	8	4	16				0.5	0.5
Cefoxitina	>128	128	128	32	256	32	>256				2	2
Cefotaxima	8	8	8	2	4	2	8				<0.016	<0.016
Ceftazidima	64	16	32	8	16	8	64				0.047	0.047
Cefepima	0.25	0.047	0.25	0.064	0.19	0.047	0.5				<0.016	<0.016
Aztreonam	1	0.38	0.75	0.5	0.75	0.38	2				0.047	0.047
Imipenem	0.125	0.064	0.19	0.064	0.25	0.064	0.19				0.064	0.064
Meropenem	0.023	0.006	0.023	0.012	0.023	0.006	0.032				0.006	0.006
Amikacina	1.5	0.25	1.5	0.38	1	0.25	1.5				0.19	0.19
Tobramicina	12	1	12	2	16	1	16				0.125	0.125
Gentamicina	6	0.75	4	0.75	6	0.25	6				0.094	0.094
Cloranfenicol	64	24	48	24	96	16	>256				4	4
Tetraciclina	1	1	1	1	1	1	3				1	1

5.2. Epidemiología molecular de aislados que contienen el gen *qnrA*

Para determinar la relación clonal de las cepas de *K. pneumoniae* aisladas en EE.UU. se realizaron experimentos de electroforesis en campo pulsante (PFGE). Las cepas no estuvieron relacionadas clonalmente como se puede observar en la Figura 25, de acuerdo a los criterios de Tenover F., ya que difirieron en 3 o más bandas.²⁴⁶ Estos resultados se confirmaron mediante REP-PCR (Figura 26).

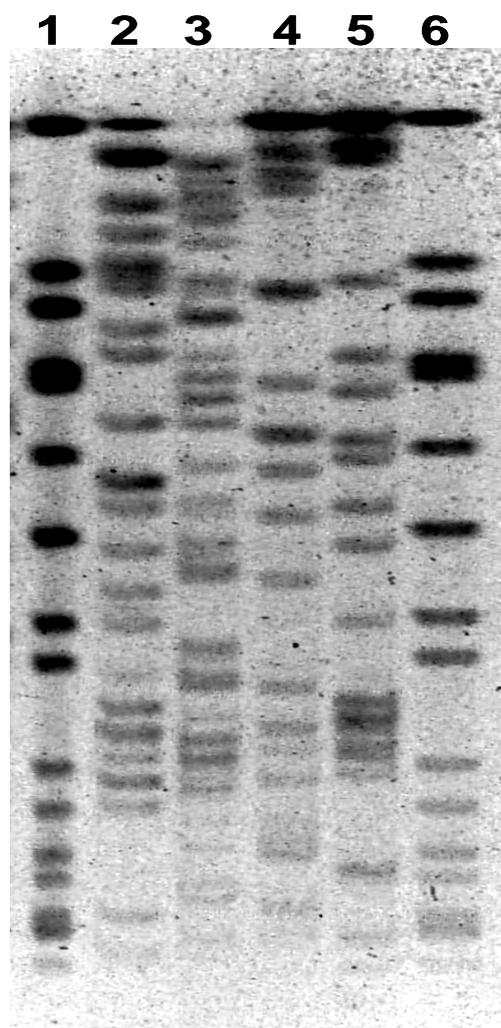


Figura 25. Patrón de PFGE de las cuatro cepas de *K. pneumoniae* aisladas en EE.UU. que contienen el gen *qnrA*. Líneas 1 y 6: marcador de peso molecular *S. aureus* NCTC 8325 digerido con *Sma*I, línea 2: *K. pneumoniae* UAB1, línea 3: *K. pneumoniae* N5, línea 4: *K. pneumoniae* 1960, línea 5: *K. pneumoniae* 1132.

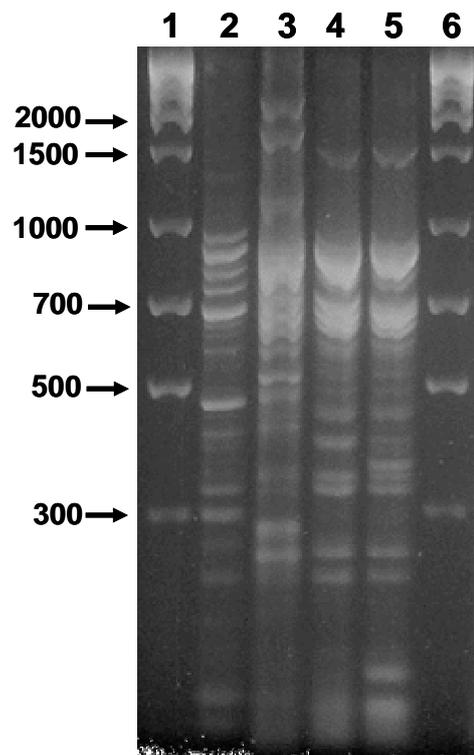


Figura 26. Patrón de REP-PCR de las cuatro cepas de *K. pneumoniae* aisladas en EE.UU. que contienen el gen *qnrA*. Líneas 1 y 6: marcador de peso molecular 300pb-10kb (Dominion, Cordoba, España), línea 2: *K. pneumoniae* UAB1, línea 3: *K. pneumoniae* N5, línea 4: *K. pneumoniae* 1960, línea 5: *K. pneumoniae* 1132. Los tamaños de la escalera se expresan en pb.

5.3. Movilidad del gen *qnrA*

5.3.1. Localización plasmídica

qnrA mostró una localización plasmídica en las cepas *K. pneumoniae* N5, *K. pneumoniae* 1960, *K. pneumoniae* 1132 y *K. pneumoniae* K149. En cambio la cepa *E. cloacae* Qn17 no mostró la presencia de plásmidos en gel de agarosa, y diversos intentos por transferir *qnrA* a un receptor sensible por conjugación (en *E. coli* J53Az^R) o transformación (en *E. coli* DH10B) fracasaron. En la Figura 27 se muestra el perfil plasmídico de la *K. pneumoniae* UAB1 y las tres *K. pneumoniae* que contiene *qnrA* procedentes del estudio de prevalencia A (N5, 1960 y 1132), así como de sus transconjugantes derivados. En los 4 casos se identificó un plásmido de aproximadamente 160-kb que contenía el gen *qnrA* como se verificó mediante ensayos de hibridación con

sonda. *K. pneumoniae* K149 también presentó un plásmido de 160-kb que contenía el gen *qnrA*.

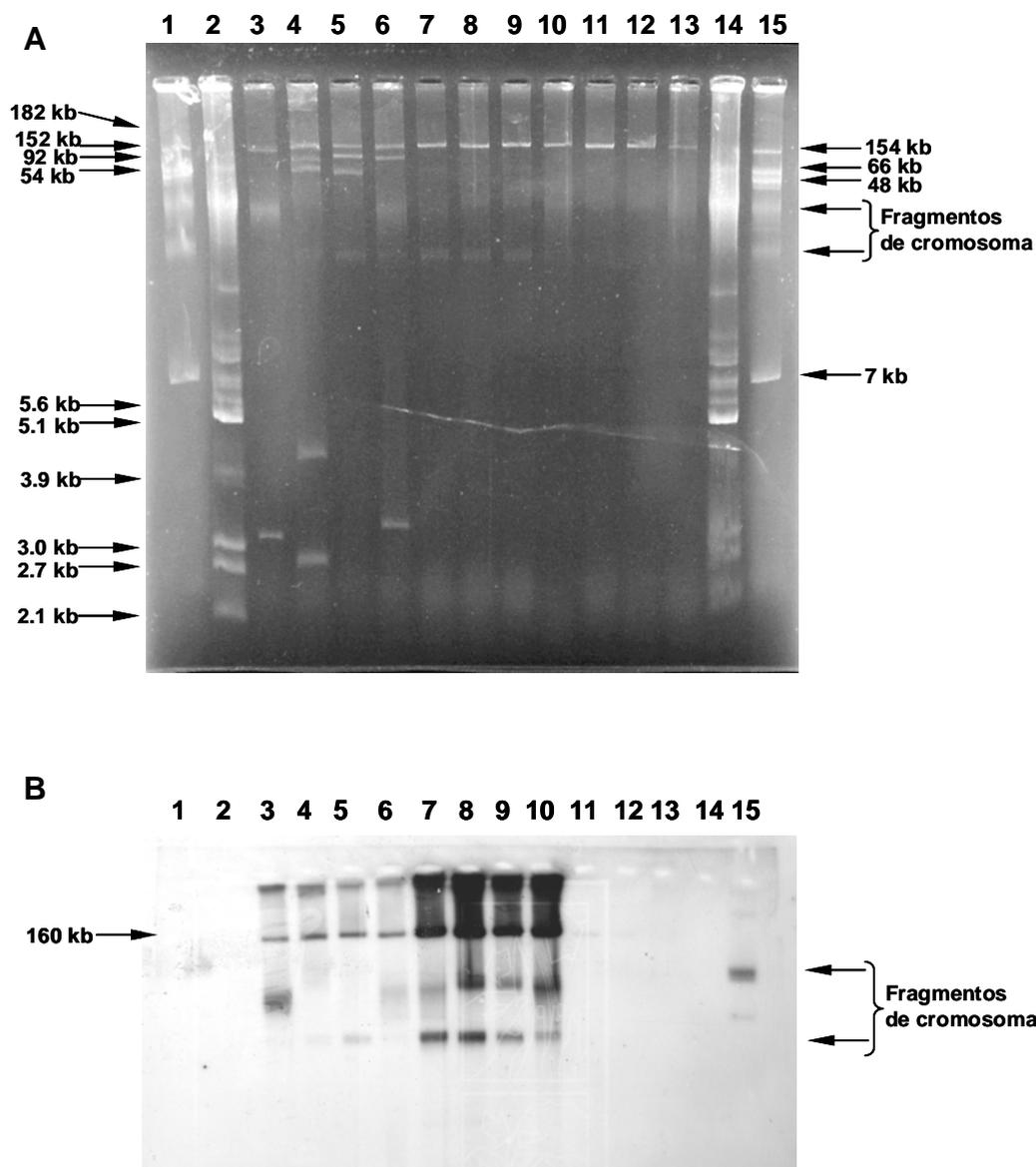


Figura 27. Perfil plasmídico de las cepas de *K. pneumoniae* detectadas en el estudio de prevalencia A que contienen el gen *qnrA* (A) y detección mediante hibridación con sonda del plásmido hospedador de *qnrA* (B). Líneas 1 y 15: *E. coli* 50192, líneas 2 y 14: *E. coli* V517, línea 3: *K. pneumoniae* UAB1, línea 4: *K. pneumoniae* N5, línea 5: *K. pneumoniae* 1960, línea 6: *K. pneumoniae* 1132, línea 7: transconjugante procedente de la *K. pneumoniae* UAB1 que contiene *qnrA*, línea 8: transconjugante procedente de la *K. pneumoniae* N5 que contiene *qnrA*, línea 9: transconjugante procedente de la *K. pneumoniae* 1960 que contiene *qnrA*, línea 10: transformante procedente de la *K. pneumoniae* 1132 que contiene *qnrA*, línea 11: transconjugante procedente de la *K. pneumoniae* N5 que no contiene *qnrA*, línea 12: transconjugante procedente de la *K. pneumoniae* 1960 que no contiene *qnrA*, línea 13: transconjugante procedente de la *K. pneumoniae* 1132 que no contiene *qnrA*. Todos los transconjugantes se realizaron sobre la cepa de referencia *E. coli* J53.

5.3.2. Ensayos de conjugación

La selección se realizó sobre medios que contenían azida sódica o rifampicina y estreptomycin, ampicilina, ceftazidima, amoxicilina o cloranfenicol.

El análisis mediante ensayos de conjugación mostró que el gen *qnrA* estaba presente en un plásmido conjugativo en las cepas de *Klebsiella pneumoniae* N5, 1960 y K149. La frecuencia de conjugación (estimada como el número de transconjugantes respecto al número de bacterias donadoras) fue similar para las tres cepas, aunque ligeramente superior en el caso de la *K. pneumoniae* N5. Estas frecuencias fueron de 5×10^{-5} - 5×10^{-6} para *K. pneumoniae* N5, y de 10^{-5} - 10^{-6} para *K. pneumoniae* 1960 y *K. pneumoniae* K149.

Como se observa en la Tabla 25, los transconjugantes procedentes de las cepas N5, 1960 y K149 presentaron una reducción de la sensibilidad a nalidíxico de 8-16 veces y a ciprofloxacino de 16-64 veces respecto a la cepa receptora *E. coli* J53Az^R. El perfil de resistencias difirió poco en los transconjugantes *qnrA* positivos obtenidos desde los diferentes donadores (Tabla 25). Todos presentaron una reducción en la sensibilidad frente a ácido nalidíxico y fluoroquinolonas. Además de las quinolonas, los transconjugantes procedentes de la cepa *K. pneumoniae* N5 presentaron una disminución de la sensibilidad a ampicilina, ampicilina+sulbactam, amoxicilina, amoxicilina+ácido clavulánico, ceftazidima, cefoxitina, cefotaxima, piperacilina, piperacilina+tazobactam, cefepima, aztreonam, aminoglucósidos, cloranfenicol, trimetoprim+sulfametoxazol y sulfamidas. Los transconjugantes procedentes de la cepa *K. pneumoniae* 1960 presentaron el mismo perfil que los de la cepa N5 (Figura 28). Además, se obtuvieron transconjugantes con un fenotipo de resistencia similar a los de las cepas N5 y 1960, pero sin reducción de la sensibilidad a quinolonas y negativos para *qnrA* por PCR y "Dot-blot" (Figura 29).

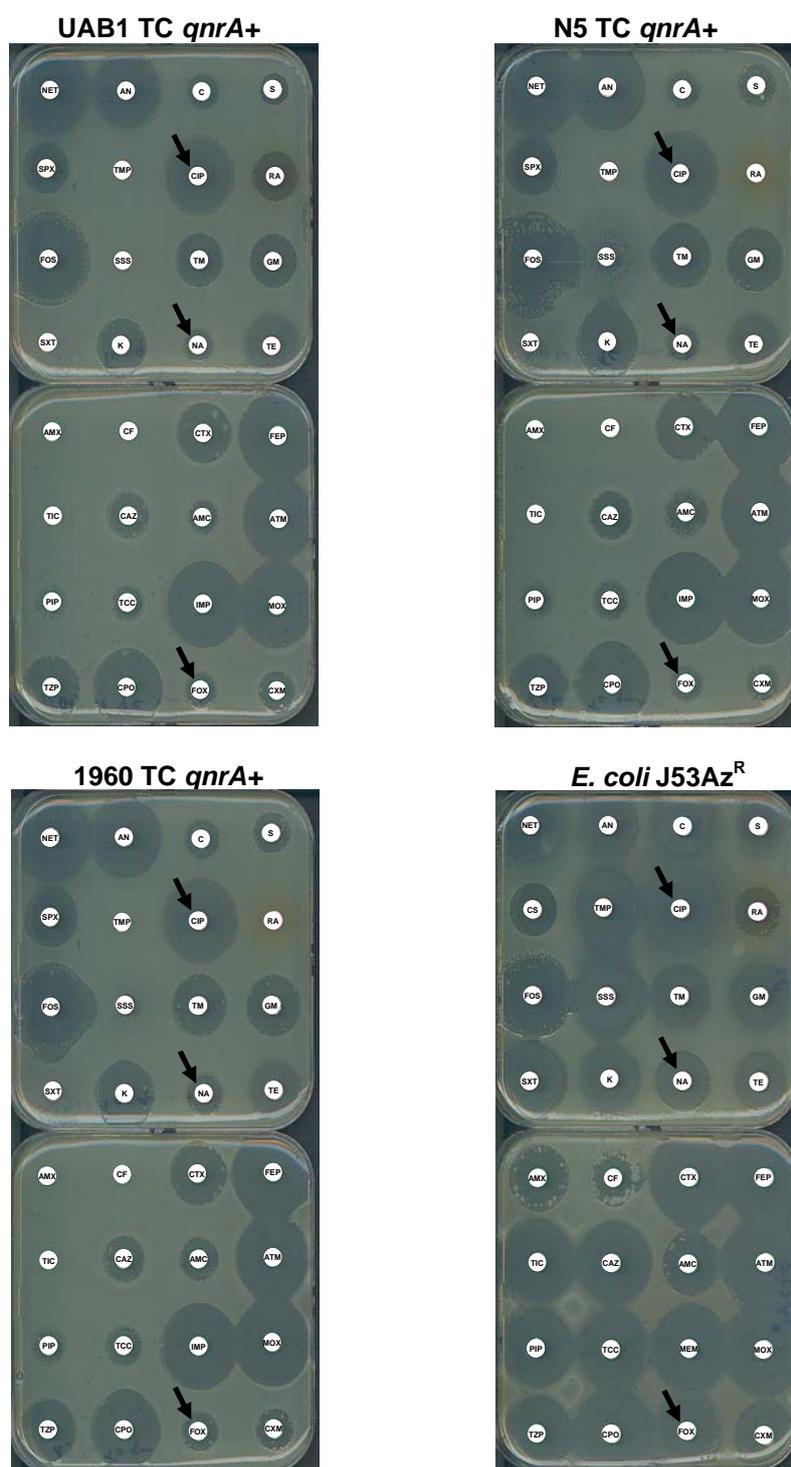


Figura 28. Antibiograma de los tranconjugantes que contienen el gen *qnrA* procedentes de las cepas *K. pneumoniae* UAB1, *K. pneumoniae* N5 y *K. pneumoniae* 1960. La reducción del halo para ácido nalidíxico (NA), ciprofloxacino (CIP) y cefoxitina (FOX) respecto a la cepa receptora *E. coli* J53Az^R se indica mediante una flecha. (TC: tranconjugante). La nomenclatura de los discos se especifica en el Anexo 2.

Los transconjugantes que contenían el gen *qnrA* procedentes de la cepa K149 mostraron reducción de la sensibilidad a ampicilina, amoxicilina, ceftazidima, tetraciclina, cloranfenicol, trimetoprim+sulfametoxazol, tobramicina y gentamicina. En este caso, la reducción de sensibilidad a quinolonas no fue acompañada de resistencia a sulfamidas cuando el receptor fue *E. coli* J53Az^R, aunque este efecto fue más claro en el receptor de transformación *E. coli* DH10B.

Aunque se intentó en repetidas ocasiones, no se obtuvieron transconjugantes que contuviesen el gen *qnrA* procedentes de las cepas *K. pneumoniae* 1132 o *E. cloacae* Qn17. De hecho, no se obtuvo ningún transconjugante de la cepa *E. cloacae* Qn17. De la cepa *K. pneumoniae* 1132 se obtuvieron transconjugantes con un fenotipo de resistencia similar a los de las cepas N5 y 1960, pero sin reducción de la sensibilidad a quinolonas y negativos para *qnrA* por PCR (Figura 29). En este caso, ensayos de electrotransformación en *E. coli* DH10B dieron como resultado la obtención de transformantes *qnrA* positivos procedentes de la cepa *K. pneumoniae* 1132 con reducción de la sensibilidad a quinolonas y fluoroquinolonas, β -lactámicos, trimetoprim y trimetoprim-sulfametoxazol, cloranfenicol y sulfamidas. No se obtuvieron transformantes procedentes de la cepa *E. cloacae* Qn17 por este método.

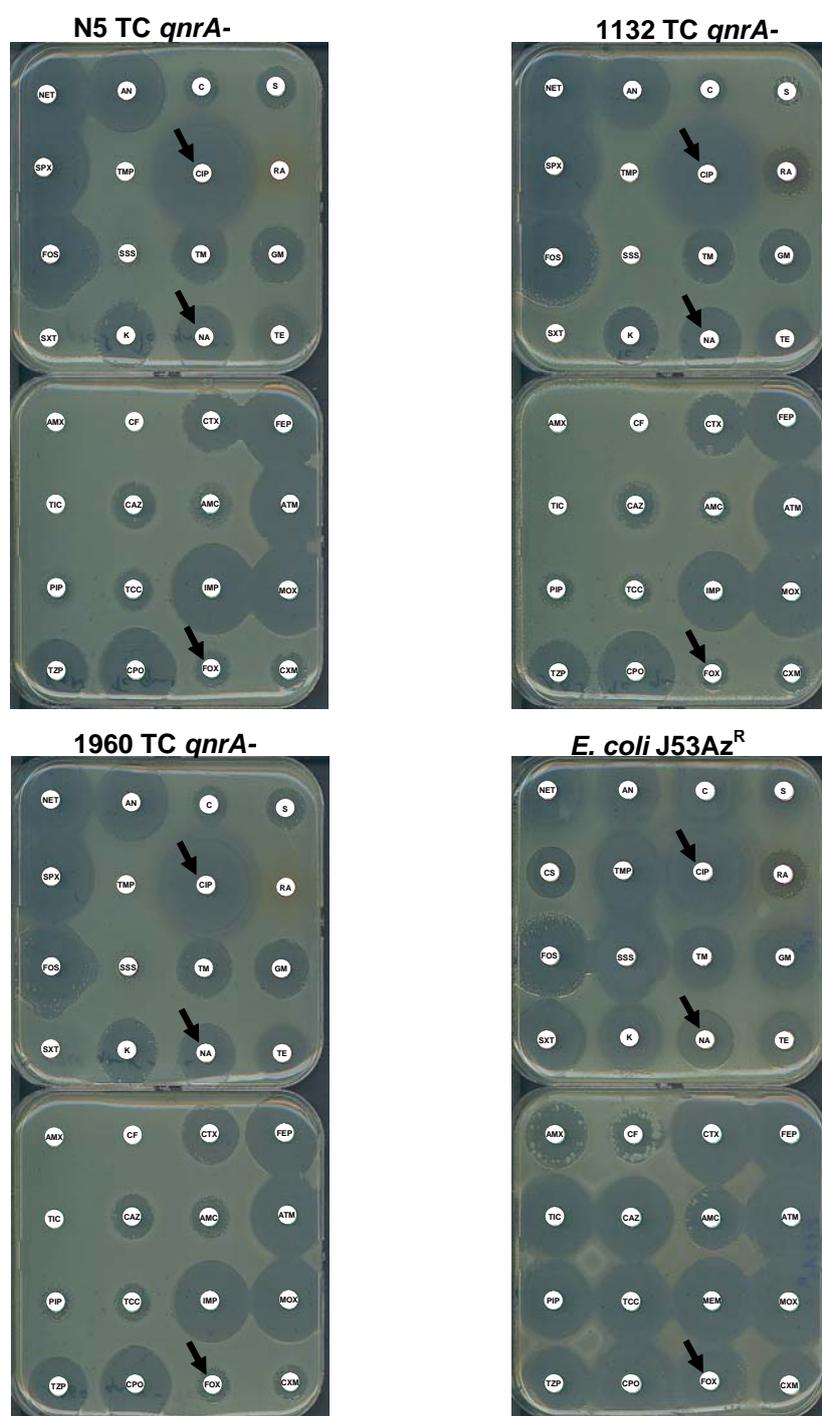


Figura 29. Antibiograma de los tranconjugantes que no contienen el gen *qnrA* procedentes de las cepas *K. pneumoniae* N5, *K. pneumoniae* 1960 y *K. pneumoniae* 1132. La reducción del halo para ácido nalidíxico (NA), ciprofloxacino (CIP) y cefoxitina (FOX) respecto a la cepa receptora *E. coli* J53Az^R se indica mediante una flecha. (TC: transconjugante). La nomenclatura de los discos se especifica en el Anexo 2.

5.4. Sensibilidad antimicrobiana de las cepas que presentan *qnrA*

En la Tabla 25 se muestran los valores de sensibilidad a quinolonas y otros antimicrobianos de las diferentes cepas clínicas que contienen *qnrA*, así como sus respectivos transconjugantes. Respecto a los valores de sensibilidad para ciprofloxacino, las cepas clínicas que contienen *qnrA* fueron sensibles (*K. pneumoniae* N5, *K. pneumoniae* 1960, *K. pneumoniae* K149), intermedias (*K. pneumoniae* UAB1) o resistentes (*K. pneumoniae* 1132, *E. cloacae* Qn17).

Las cepas *K. pneumoniae* UAB1, *K. pneumoniae* N5, *K. pneumoniae* 1960, *K. pneumoniae* 1132 no fueron deficientes en porinas, presentando las porinas OmpK35 y OmpK36. El análisis de la secuencia de los genes *gyrA* y *parC* sólo reveló una mutación en la subunidad A de la ADN girasa en el caso de la *K. pneumoniae* 1960 (Ser83Phe, TCG→TTC).

5.5. Evaluación del número de copias de *qnrA*

Se llevó a cabo una estimación semicuantitativa del número de copias totales (ADN total) como plasmídicas (ADN plasmídico) de *qnrA* tanto en las cuatro cepas de *Klebsiella pneumoniae* aisladas en EE.UU. como en sus transconjugantes derivados mediante la realización de un “Dot-blot” semicuantitativo. Se usaron diluciones seriadas de ADN de 1µg a 0.125µg y 300ng a 37.5ng de ADN total y ADN plasmídico, respectivamente. La cuantificación se realizó con el sistema *1D Image Analysis software* (Kodak, Rochester, N.Y.). Los datos mostrados corresponden a tres ensayos diferentes.

La comparación de la intensidad de bandas, cuando se usó ADN total, mostró que las cepas *K. pneumoniae* UAB1 y 1132 contenían aproximadamente 5 veces más copias de *qnrA* que la cepa 1960 (Figura 30, Tabla 26). Respecto a las copias de ADN plasmídico, las cepas *K. pneumoniae* UAB1 y 1132 contenían aproximadamente 8 veces más copias de *qnrA* que la cepa 1960. No se observaron diferencias claras en el número de copias de

ADN total o plasmídico en el caso de los transconjugantes procedentes de estas cepas (Figura 30, Tabla 26).

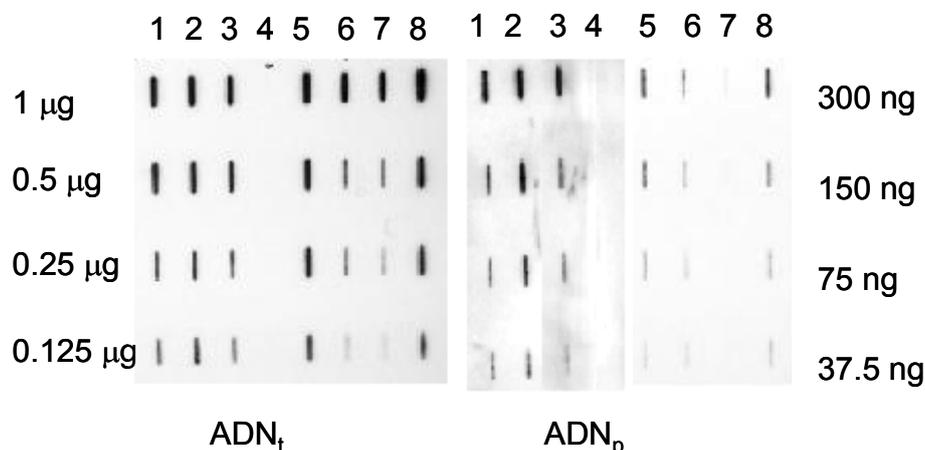


Figura 30. Dot-blot semicuantitativo del número de copias del gen *qnrA*. Se realizaron diluciones seriadas en base 2 tanto de ADN total (ADN_t) como de ADN plasmídico (ADN_p). 1: transconjugante procedente de la *K. pneumoniae* UAB1 que contiene *qnrA*; 2: transconjugante procedente de la *K. pneumoniae* N5 que contiene *qnrA*; 3: transconjugante procedente de la *K. pneumoniae* 1960 que contiene *qnrA*; 4: transconjugante procedente de la *K. pneumoniae* 1132 que no contiene *qnrA*; 5: *K. pneumoniae* UAB1; 6: *K. pneumoniae* N5; 7: *K. pneumoniae* 1960; 8: *K. pneumoniae* 1132. Los números de gramos indican la cantidad de ADN depositada en cada línea.

Tabla 26. Valores del número relativo de copias de *qnrA* de las cepas *K. pneumoniae* UAB1, *K. pneumoniae* N5, *K. pneumoniae* 1960 y *K. pneumoniae* 1132 y sus respectivos transconjugantes (TC), tanto de ADN plasmídico (ADN_p) como ADN total (ADN_t) bacteriano.

Cepas	ADN_t		ADN_p	
	Intensidad Neta	Nº veces	Intensidad Neta	Nº veces
UAB1	56045±1214	5.48±0.4	17556±881	8.9±1.0
N5	21213±809	2.07±0.3	7322±455	4.3±1.0
1960	10220±744	<u>1</u>	1968±204	<u>1</u>
1132	48306±2001	4.72±0.5	14953±611	7.59±0.4
UAB1TC	37859±1536	<u>1</u>	11727±114	<u>1</u>
N5 TC	60868±715	1.60±0.2	27247±89	1.8±0.3
1960 TC	43300±959	1.14±0.1	15662±66	1.3±0.1
1132 TC	No señal	--	No señal	--

Estos valores se obtuvieron mediante Dot-blot semicuantitativo.

Los resultados del número de veces de copias de *qnrA* se muestran respecto al menor valor observado (representado como 1) y se expresa como la media de tres experimentos independientes \pm la desviación standard.

Las intensidades netas se midieron con el sistema 1D Image Analysis software (Kodak, Rochester, N.Y.). Los resultados se presentan separadamente para las cepas clínicas y sus transconjugantes.

5.6. Estructuras genéticas en las que se encuentra el gen *qnrA*

5.6.1. Estudio en tres *K. pneumoniae* aisladas en EE.UU.

Se han analizado tres cepas de *K. pneumoniae* procedentes de Estados Unidos aisladas a partir de los estudios SENTRY (N5) e ICARE (1960 y 1132). Estas cepas contenían plásmidos que codificaban el determinante de resistencia a quinolonas *qnrA*. Las tres cepas codifican, además, una β -lactamasa plasmídica de clase C, FOX-5, siendo resistentes a cefoxitina (determinado mediante PCR y secuenciación).

Las secuencias que flanquean *qnrA* en estas cepas se determinaron mediante clonación del producto de PCR amplificado a partir de ADN plasmídico y posterior secuenciación. Los cebadores usados (ORF513-F y SUL1-R) hibridan en los genes *orf513* y *sul1* y amplifican un fragmento de 1.7 kb aproximadamente que contiene el gen *qnrA* (Tabla 23).

Por otro lado, el ADN plasmídico de la cepa 1132 obtenido mediante el sistema *Mini Plasmid Prep Kit* (Ultraclean™, MO BIO laboratories, Inc.) fue digerido con el enzima de restricción *EcoRI* y ligado en el vector pUC18. El producto de la ligación se transformó en *E. coli* DH5 α generando una “mini-genoteca” del plásmido que contiene *qnrA* en esta cepa. La identificación de las colonias que contienen *qnrA* se realizó mediante “Colony-blot”.

El producto de PCR de 1.7kb obtenido con cebadores que hibridan con la fase de lectura abierta *orf513* y el gen de resistencia a sulfamidas *sul1* fue sometido a restricción con *Apal* y *PvuII* que cortan en *qnrA* (Figura 31), como una primera aproximación para constatar que este fragmento contiene el gen *qnrA*. Los fragmentos presentaron idénticos tamaños en todos los casos.

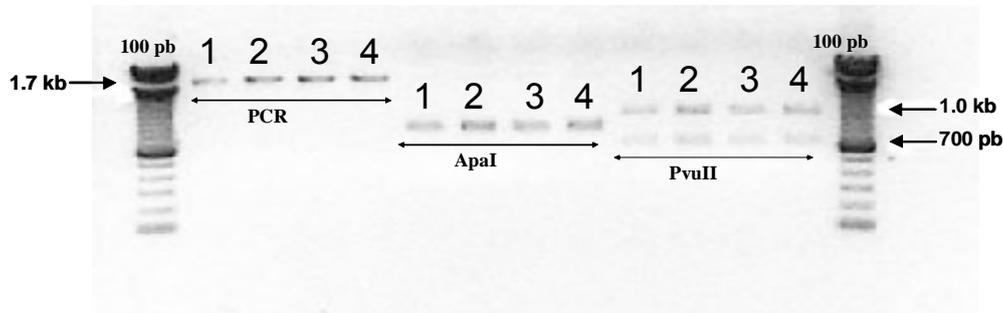


Figura 31. Digestión con diferentes enzimas de restricción del fragmento de PCR obtenido con los cebadores que hibrida en los genes *orf513* y *sul1*. PCR: Producto de PCR no digerido. *ApaI*: Producto de PCR digerido con *ApaI*. *PvuII*: Producto de PCR digerido con *PvuII*. 1: *K. pneumoniae* UAB1; 2: *K. pneumoniae* N5; 3: *K. pneumoniae* 1960; 4: *K. pneumoniae* 1132.

Posteriormente, el fragmento de 1.7kb se clonó en el vector pCR[®]2.1 (*TA Cloning Kit*, Invitrogen). El resultado de la secuenciación de este fragmento demostró que *qnrA* está flanqueado por los mismos genes en las tres cepas de *K. pneumoniae* estudiadas. Así, en su extremo 5', *qnrA* está flanqueado por la fase de lectura abierta *orf513*, una recombinasa putativa específica de sitio frecuente en los integrones de clase 1 de tipo compuesto. En su extremo 3' *qnrA* está flanqueado primero por el gen *qacEΔ1*, (que confiere bajo nivel de resistencia a ciertos compuestos amónicos), y luego por *sul1* (un gen de resistencia a sulfamidas). Tanto *orf513* (formando parte de un elemento CR1) como *qacEΔ1* y *sul1* (3'-CS) son secuencias conservadas de los integrones de clase 1, tipo In6 e In7 (Figura 32).

Estas secuencias fueron idénticas a las publicadas para el plásmido original pMG252 de la cepa *K. pneumoniae* UAB1 (número de acceso en GenBank AY070235).²⁵⁰

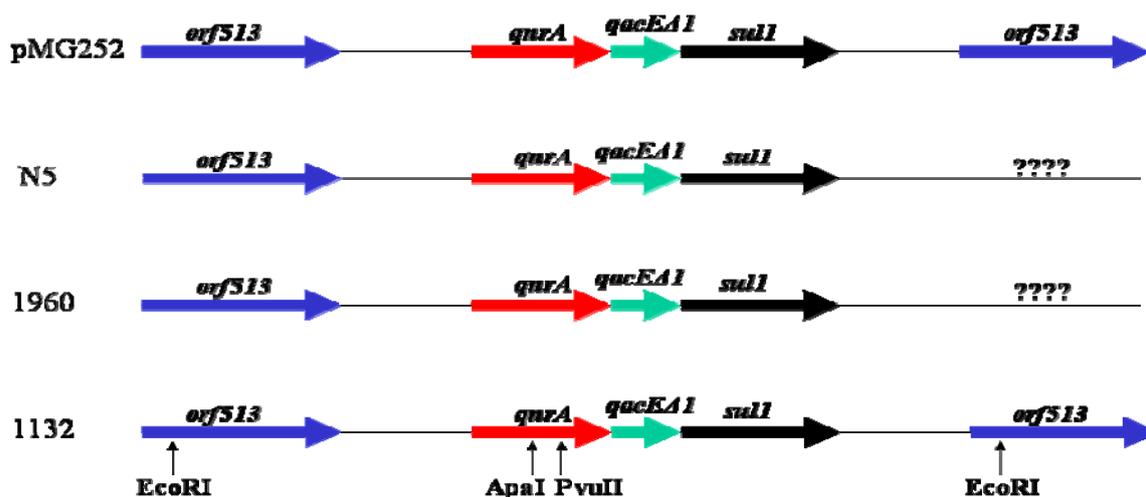


Figura 32. Comparación de las estructuras genéticas que circundan al gen *qnrA* en los plásmidos de las cepas *K. pneumoniae* UAB1 (pMG252), *K. pneumoniae* N5, *K. pneumoniae* 1960 y *K. pneumoniae* 1132.

Además, en la cepa 1132 se analizó un fragmento de mayor tamaño (4.3 kb aproximadamente) generado mediante restricción con *EcoRI* y insertado en el vector pUC18. Previo a la secuenciación, los transformantes fueron verificados por restricción para comprobar el tamaño de inserto (Figura 33). En este caso, la información de la secuencia obtenida corroboró la aproximación por clonación de producto de PCR, y, además, encontramos que tras los genes *qacEA1* y *sul1* localizados corriente debajo de *qnrA* se dispone una segunda copia de la fase de lectura abierta *orf513*, al menos en parte. Estas secuencias fueron idénticas a las publicadas para el plásmido original pMG252 (número de acceso en el GenBank AY070235).²⁵⁰



Figura 33. Digestión con *EcoRI* de algunos de los transformantes obtenidos al clonar ADN plasmídico digerido de la cepa *K. pneumoniae* 1132 sobre el vector pUC18. λH: ADN del fago lambda digerido con el enzima de restricción *HindIII*.

5.6.2. Estudio en una *K. pneumoniae* y un *E. cloacae* aislados en Australia

En las cepas *K. pneumoniae* K149 y *E. cloacae* Qn17 se analizó un fragmento de 3.495 pb generado mediante restricción con *Bam*H1 y posterior ligación sobre el vector pBK-CMV. La selección se realizó sobre placas de TSA suplementadas con 30 µg/ml de kanamicina y 4 µg/ml de ácido nalidíxico. Los resultados de la secuenciación mostraron que, en ambas cepas, *qnrA* se localiza en un integrón de clase 1 tipo In6-In7 similar a In36 e In37.²⁷⁵ Sin embargo, un posterior mapeo mediante PCR mostró la ausencia de la secuencia de inserción IS6100, la cual si estuvo presente en In36 e In37.

5.6.3. Determinación de la estructura del integrón y el posible transposón que albergan *qnrA* en otras cepas

Se estudiaron 5 cepas clínicas que contenían el gen *qnrA*: 2 cepas aisladas en Francia (*E. coli* Lo y *E. cloacae* Lo), 2 cepas aisladas en Tailandia (*E. coli* T2 y *E. coli* T7) y 1 aislada en Turquía (1 *Citrobacter freundii* LUT). El gen *qnrA* se clonó a partir de ADN total en el vector pBK-CMV (Stratagene) y se expresó en células *E. coli* DH10B. La selección de los clones se realizó sobre placas de MHA que contenían 30 µg/ml de kanamicina más 4 µg/ml de ácido nalidíxico. Se usaron diferentes enzimas de restricción (*Xba*I, *Bam*HI o *Sac*I) para obtener una variedad de fragmentos con dicho gen que facilitara la obtención de información de las secuencias. Éstas se analizaron con las herramientas informáticas disponibles en el sitio web de la base de datos del *Nacional Center Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Las estructuras genéticas que albergan *qnrA* en estas cepas resultaron ser las mismas en todas ellas. El análisis de los distintos plásmidos recombinantes mostró que *qnrA* en estas 5 cepas se encuentra formando parte de un integrón de clase 1, tipo In6 e In7 (Figura 34). *qnrA* está precedido de un elemento CR1, el cual, como se mostrará posteriormente, está implicado en la expresión de los genes localizados corriente abajo y codifica una recombinasa presumiblemente implicada en la movilización de genes. En su extremo 3' *qnrA* está flanqueado primero por el fragmento del gen *qacE*Δ1, y luego por *sul1* (un

gen de resistencia a sulfamidas) que constituyen la región 3'CS-2 del integrón (Figura 34).

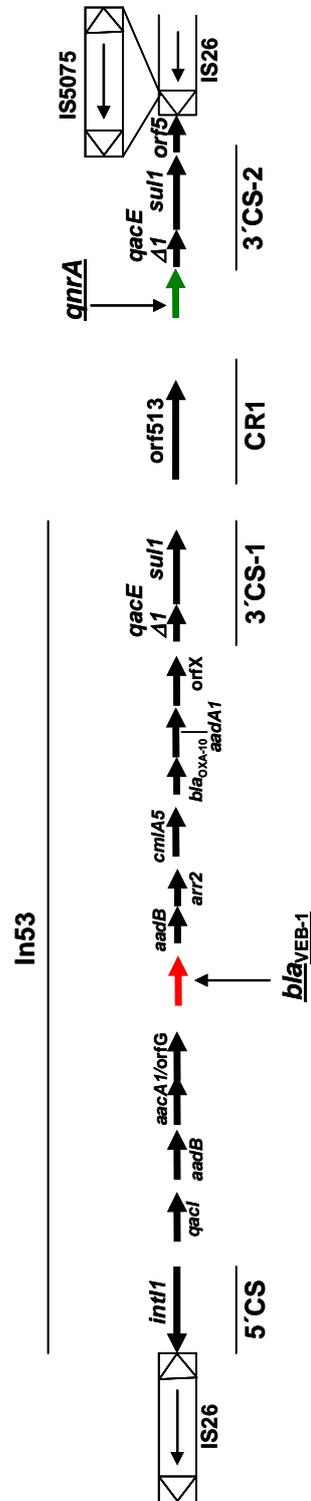


Figura 34. Representación esquemática del integrón de clase 1 que contiene a los genes *qnrA* y *bla_{VEB-1}*.

Todas estas cepas, además de *qnrA*, contenían el gen *bla*_{VEB-1}. Como se observa en la Figura 34 ambos genes (junto con *bla*_{OXA-10}) se encuentran dentro del mismo integrón lo cual da una oportunidad para la co-selección de la resistencia a β -lactámicos y quinolonas, además de aminoglicósidos (*aadB*, *aacA1*, *aadA1*), cloranfenicol (*cmIA5*), rifampicina (*arr-2*) y sulfamidas (*sul1*). Esta estructura muestra una identidad casi perfecta con el integrón In53 en el que se describió el gen *bla*_{VEB1} (Figura 34),¹⁶⁰ con la inclusión de la estructura CR1-*qnrA*. Por último, este integrón estuvo flanqueado por dos secuencias de inserción: IS26 localizada junto a la integrasa e IS5075 localizada en el extremo opuesto.

5.7. Expresión del gen *qnrA*

5.7.1. Niveles basales de transcripción del gen *qnrA*

En relación con los valores de CMI observados para diferentes transconjugantes (UAB1 TC, N5 TC y 1960 TC) (Tabla 27) obtenidos desde diferentes donadores (*K. pneumoniae* UAB1, *K. pneumoniae* N5 y *K. pneumoniae* 1960, respectivamente), nos planteamos verificar si estos cambios fenotípicos son el resultado de diferencias en los niveles de expresión (transcripción) de *qnrA* en estos transconjugantes. Se analizaron los niveles de transcritos específicos de *qnrA* mediante ensayos de “Northern-blot”. Como se observa en la Figura 35 y la Tabla 27, el número de transcritos de *qnrA* es al menos 4 veces mayor en el transconjugante procedente de la cepa *K. pneumoniae* UAB1 que en los procedentes de la cepas *K. pneumoniae* N5 o *K. pneumoniae* 1960. La señal detectada de los transcritos mostró un tamaño para el ARNm de *qnrA* en estos transconjugantes de 0.8 kb, como se estimó a partir de los tamaños de los ARN ribosómicos 16S y 23S mediante el uso del programa *1D Image Analysis software* (Kodak, Rochester, N.Y.). Este marcado aumento en la expresión basal del gen *qnrA* en el transconjugante procedente de la cepa *K. pneumoniae* UAB1 puede explicar, al menos en parte, su mayor resistencia a quinolonas y fluoroquinolonas respecto a los obtenidos de las cepas *K. pneumoniae* N5 o *K. pneumoniae* 1960.

Tabla 27. Características y perfil de resistencia de las cepas *K. pneumoniae* UAB1, *K. pneumoniae* N5 y *K. pneumoniae* 1960 y sus transconjugantes (TC).

Donadores	Especie	CMI ($\mu\text{g/ml}$)		Transcripción basal ^a	Incremento en el número de transcritos de <i>qnrA</i> ^b		Sustituciones en GyrA	Porinas ^c
		CIP	MXF		CIP	MXF		
UAB1	<i>K. pneumoniae</i>	2	1				No	+
N5	<i>K. pneumoniae</i>	0.25	0.5				No	+
1960	<i>K. pneumoniae</i>	1	1				S83F	+
Transconjugantes								
UAB1 TC	<i>E. coli</i>	0.5	0.25	4.04 \pm 0.7	4.3 \pm 0.5	4.1 \pm 0.3	No	
N5 TC	<i>E. coli</i>	0.125	0.125	1.2 \pm 0.2	5.1 \pm 0.2	2.3 \pm 0.3	No	
1960 TC	<i>E. coli</i>	0.125	0.125	1	2.6 \pm 0.4	1.3 \pm 0.1	No	
Receptor J53Az ^R	<i>E. coli</i>	0.008	0.008	--	--	--		

Las intensidades netas se midieron con el sistema 1D Image Analysis software (Kodak, Rochester, N.Y.).

La cuantificación de la transcripción se expresa como la media de tres experimentos independientes \pm la desviación standard.

CIP: ciprofloxacino, MXF: moxifloxacino.

^a La transcripción basal indica el número relativo de transcritos de *qnrA* respecto al valor más bajo, el cual es considerado 1.

^b El incremento del número de transcritos de *qnrA* se expresa respecto al valor obtenido de las células no inducidas.

^c El símbolo + indica la presencia de porinas.

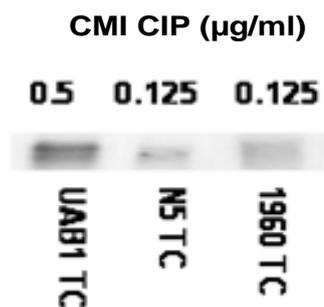


Figura 35. Expresión basal de *qnrA* en los transconjugantes procedentes de las cepas *K. pneumoniae* UAB1, *K. pneumoniae* N5 y *K. pneumoniae* 1960. Los valores numéricos representan las CMI de cada uno de los transconjugantes para ciprofloxacino (CIP) en µg/ml. TC significa transconjugante.

5.7.2. Efecto de las quinolonas en la expresión del gen *qnrA*

La siguiente pregunta que nos planteamos fue estudiar el posible efecto de las quinolonas sobre la expresión del gen *qnrA*. Se realizó un estudio preliminar con diferentes quinolonas y diferentes concentraciones de las mismas en función de las CMI para las cepas en estudio. Las células se crecieron a distintos tiempos (30 min, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h) a partir de un cultivo en fase exponencial en ausencia o presencia de cada quinolona a 0.2, 0.4, 0.8 o 1 vez la CMI. La Figura 36 muestra el efecto de las diferentes concentraciones de ciprofloxacino sobre la expresión de *qnrA*. Tras estos resultados preliminares, determinamos que la máxima expresión de *qnrA* se produjo a 0.4 veces la CMI. Esta concentración se usó para los posteriores estudios comparativos entre diferentes quinolonas (ciprofloxacino y moxifloxacino).

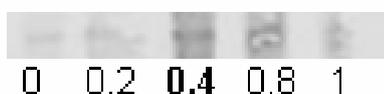


Figura 36. Northern-blot del efecto de diferentes concentraciones de ciprofloxacino sobre la expresión de *qnrA*. La expresión máxima observada se produjo a 0.4 veces la CMI. Las dosis de exposición fueron 0, 0.2, 0.4, 0.8 y 1 veces la CMI.

En estos ensayos, se incluyó un control de la expresión basal de bacterias crecidas sin antibiótico. Además, como control interno de la especificidad de la acción de las quinolonas en la expresión de *qnrA* se usó el

gen *bla*_{FOX5} (Figura 37). La presencia de quinolonas no afectó a la expresión de *bla*_{FOX5} respecto a las células crecidas en ausencia de quinolonas.



Figura 37. Northern-blot de la expresión en presencia y ausencia de quinolonas del gen *bla*_{FOX-5} como control interno en los ensayos de expresión del gen *qnrA*. Línea 1: transconjugante procedente de la cepa *K. pneumoniae* UAB1 en ausencia de ciprofloxacino; línea 2: transconjugante procedente de la cepa *K. pneumoniae* UAB1 tras 4 horas de incubación en presencia de ciprofloxacino a 0.4 veces la CMI.

Bajo estas condiciones, se realizó un estudio de respuesta de dosis del efecto de ciprofloxacino sobre la transcripción de *qnrA* en transconjugantes procedentes de distintos donadores (*K. pneumoniae* UAB1, *K. pneumoniae* N5 y *K. pneumoniae* 1960). La cantidad de transcritos de *qnrA* obtenidos del transconjugante de UAB1 fue mayor que para los transconjugantes de N5 y 1960 (Figura 38). Sin embargo hay que tener en cuenta las diferencias de expresión basal entre las cepas (Figura 35). En el “Northern-blot” mostrado en la Figura 38 se muestra como ciprofloxacino fue capaz de aumentar la expresión de *qnrA* en los tres transconjugantes, a una concentración de 0.4 veces la CMI. Este aumento fue de 4.3, 5.1 y 2.6 veces respecto a los valores de expresión basal (sin quinolona) en los transconjugantes de UAB1, N5 y 1960, respectivamente (Tabla 27).

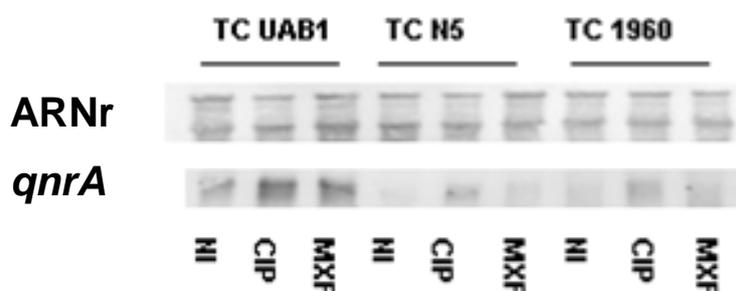


Figura 38. Análisis comparativo mediante Northern-blot del incremento de la expresión de *qnrA* tras 4 horas de incubación en presencia de ciprofloxacino (CIP) o moxifloxacino (MXF) a 0.4 veces la CMI. En este experimento se usaron los transconjugantes (TC) procedentes de las cepas *K. pneumoniae* UAB1, *K. pneumoniae* N5 y *K. pneumoniae* 1960. NI: células crecidas en ausencia de antimicrobiano. Se muestra el control de carga ARNr.

Al estar el gen *qnrA* implicado en la resistencia a fluoroquinolonas, se estudió si, además de ciprofloxacino, otras fluoroquinolonas como moxifloxacino son capaces de aumentar la transcripción de *qnrA*. Moxifloxacino fue capaz de aumentar la expresión de *qnrA*. La máxima expresión ocurrió a 0.4 veces la CMI tanto con ciprofloxacino como con moxifloxacino. Este valor de 0.4 veces la CMI de ciprofloxacino y moxifloxacino se usó para los estudios comparativos. El incremento en la transcripción de *qnrA* fue de 4.1, 2.3 y 1.3 veces respecto al nivel de expresión basal cuando moxifloxacino estuvo presente en el medio a 0.4 veces la CMI para los transconjugantes de UAB1, N5 y 1960, respectivamente (Figura 38, Tabla 27).

5.7.3. Punto de inicio de la transcripción y regiones promotoras

5.7.3.1. Análisis de las regiones promotoras del gen *qnrA*

La determinación del punto de inicio de la transcripción del gen *qnrA* y de las regiones promotoras adyacentes se analizó mediante ensayos de extensión con cebador (5'RACE) en dos cepas clínicas en las que el gen tiene una localización plasmídica: *K. pneumoniae* K149 y *E. coli* Lo. Las características de las cepas y los cebadores usados en estos ensayos se muestran en las Tablas 28 y 23.

Mediante ensayos de PCR convencional se verificó la colinealidad entre el gen *qnrA* y el elemento CR1 localizado corriente arriba hacia el extremo 5' de *qnrA*. La distancia que separa la región de recombinación (RCS) del elemento CR1 y el codón ATG de iniciación del gen *qnrA* fue de 98 y 31 pb para *E. coli* Lo y *K. pneumoniae* K149, respectivamente (Tabla 28, Figura 39). En ambos casos hubo una homología del 100% entre las regiones de recombinación de ambas cepas.

Tabla 28. Características de los aislados clínicos usados en este estudio que contienen un elemento CR asociado a un gen de resistencia a antimicrobianos.

Cepa	Origen geográfico	Elemento CR	Gen de resistencia asociado	Distancia que separa CR del gen de resistencia	Resistencia antibiótica	Fuente o referencia
<i>E. coli</i> Lo	Paris, Francia	CR1	<i>qnrA</i>	98 pb	Quinolonas	144
<i>K. pneumoniae</i> K149	Melbourne, Australia	CR1	<i>qnrA</i>	31 pb	Quinolonas	204
<i>E. coli</i> B36	Madrid, España	CR1	<i>bla</i> _{CTX-M-9}	94 pb	BLEE ^a	Este estudio
<i>K. pneumoniae</i> KP40C	Madrid, España	CR1	<i>bla</i> _{CTX-M-9}	94 pb ^b	BLEE	Este estudio
<i>E. coli</i> JAB	Paris, Francia	CR1	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	266 pb	BLEE	125
<i>A. baumannii</i> AYE	Paris, Francia	CR1	<i>dfrA10</i>	149 pb	TMP ^c	203
<i>P. aeruginosa</i> 23	Recife, Brasil	CR4	<i>bla</i> _{SPM-1}	163 pb	MBL ^d	202

^aBLEE: β-lactamasa de espectro extendido

^bEn este aislado existe una duplicación del sitio de recombinación del elemento CR1.

^cTMP, trimetoprim

^dMBL: metalo-β-lactamasa



Figura 39. Figura esquemática de las dos estructuras en las que el gen *qnrA* presenta una colinealidad con el elemento CR1 (constituido por el gen *orf513* y el sitio de recombinación RCS). Los genes se indican mediante flechas horizontales. Se indica la distancia que separa al RCS del elemento CR1 al codón de iniciación del gen *qnrA*.

Formando parte del elemento CR1, en la cepa *E. coli* Lo se identificó un promotor, denominado P_{CR1-2} , con una región -35 (TTCGGA) y otra región -10 (TTTATA) separadas por 18 pb. Además, la región -10 de P_{CR1-2} se encontró localizado en el RCS del elemento CR1 (Figura 41).

En ambas cepas *qnrA* positivas se encontró otro punto de inicio de la transcripción localizado 136 pb corriente arriba del codón ATG de *qnrA* en el caso de la cepa *E. coli* Lo, y a 68 pb en el caso de la cepa *K. pneumoniae* K149. A partir de este punto se definió un nuevo promotor, denominado P_{CR1-1} , constituido por la región -35 (TAAACG) y la región -10 (TAAGAT), con una región espaciadora de 17 pb (Figura 41). De este modo, P_{CR1-1} posibilita la expresión de *qnrA* tanto en *E. coli* Lo como *K. pneumoniae* K149.

5.7.3.2. Análisis de las regiones promotoras de otros genes asociados a elementos CR

En paralelo a los estudios de expresión de *qnrA*, nos planteamos analizar el papel de los elementos CR1 en la expresión de otros genes de resistencia no relacionados entre sí, y no sólo en el caso del gen *qnrA*. Mediante PCR, se analizó la presencia de elementos CR en cepas en las que ya se conocía anteriormente la presencia de diferentes genes de resistencia a antimicrobianos tales como *dfrA10*, *bla*_{CTX-M-9}, *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{SPM-1}, *bla*_{CTX-M-15},

*bla*_{FOX-1}, *bla*_{FOX-3}, *bla*_{FOX-5}, *bla*_{CMY-2}, *bla*_{CMY-4}, *bla*_{CMY-6}, *bla*_{MIR-1}, *bla*_{LAT-1}, *bla*_{LAT-2}, *bla*_{LAT-3}, *bla*_{LAT-4}, *bla*_{DHA-2} o *bla*_{ACT-1} y que pudiesen estar relacionados estructuralmente con elementos CR. Los cebadores para la detección de elementos CR y su colinealidad con los genes de resistencia se muestran en la Tabla 23. Se analizó un total de 53 cepas clínicas. Tras este primer estudio de prevalencia, se verificó la colinealidad con los genes de resistencia usando los cebadores que se muestran en la Tabla 23 mediante las diferentes combinaciones de los cebadores localizados en el gen de la recombinasa y los genes de resistencia. Los productos de PCR se secuenciaron y las secuencias se analizaron mediante el programa BLASTN disponible en la página WEB del *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

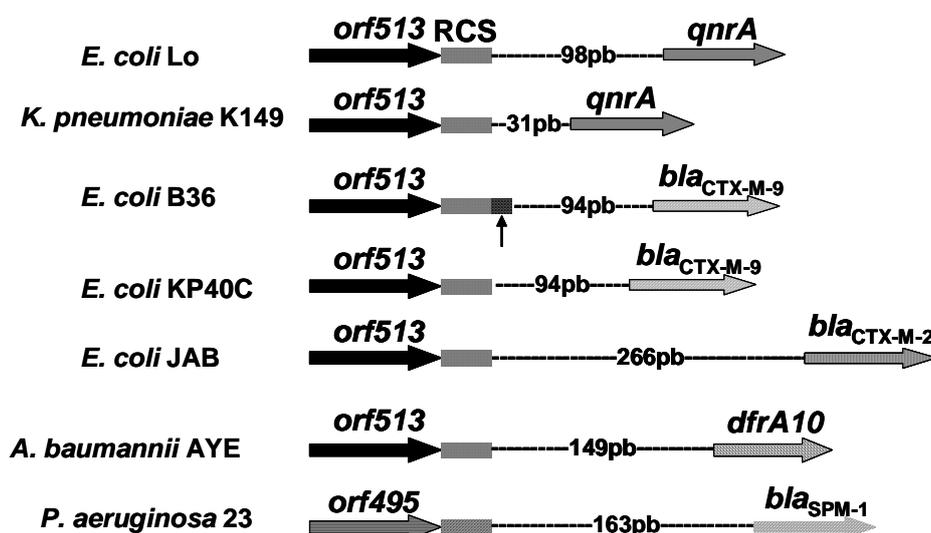


Figura 40. Figura esquemática de las diferentes estructuras estudiadas en las que se identificó colinealidad entre un elemento CR1 (constituido por el gen *orf513* y el sitio de recombinación RCS) y distintos genes de resistencia a antimicrobianos. Los genes se indican mediante flechas horizontales. Se indican las distancias que separa al RCS del elemento CR1 al codón de iniciación del gen *qnrA*. La flecha vertical indica una duplicación de parte del extremo 3' del elemento CR1 que incluye el RCS en la cepa *E. coli* B36. La estructura de la cepa *P. aeruginosa* 23 corresponde a un elemento CR4.

Las estructuras para el posterior análisis sobre la determinación del sitio de inicio de transcripción se seleccionaron de acuerdo a: i) los diferentes genes localizados corriente abajo de los elementos CR, ii) la distancia del sitio de recombinación (RCS) con el codón de iniciación de gen de resistencia, y iii) las

variaciones encontradas en el interior del sitio de recombinación (Figura 40). Se seleccionaron 4 cepas (3 *E. coli* y 1 *A. baumannii*) que contenían un elemento CR1, dos de ellas asociadas al gen *bla*_{CTX-M-9}, una a *dfrA10* y otra a *bla*_{CTX-M-2}, y una cepa que contenía un elemento CR4 asociado a *bla*_{SPM-1} (Tabla 28, Figura 40). Las dos cepas *bla*_{CTX-M-9} positivas (*E. coli* B36 y *K. pneumoniae* KP40C, Tabla 28) presentaron la misma distancia de 94 pb entre el sitio de recombinación del elemento CR1 y el codón de iniciación del gen de la β-lactamasa *bla*_{CTX-M-9}. Sin embargo, en este caso, se observó la existencia de una duplicación de 95 pb sobre el sitio de recombinación del elemento CR1 en la cepa *E. coli* B36 (Figura 40). Para la cepa de *A. baumannii* AYE la longitud de la secuencia entre el elemento CR1 y el gen de resistencia a trimetoprim *dfrA10* fue de 149 pb, mientras que en el caso de *E. coli* JAB esta distancia respecto al gen *bla*_{CTX-M-2} fue de 266 pb. La distancia del elemento CR4 con el gen *bla*_{SPM-1} en la cepa *P. aeruginosa* 23 fue de 163 pb (Figura 40, Figura 41).

El análisis detallado de la secuencia nucleotídica de estos elementos CR verificó su perfecta identidad en todos los casos, excepto en el elemento CR1 de la cepa *E. coli* B36, como se mencionó anteriormente, debido a una duplicación (Figura 41). En particular, los 33 pb correspondientes a la región de recombinación (RCS) fueron idénticos en todos los casos.

Como en el caso de la expresión del gen *qnrA*, el promotor *P*_{CR1-1} fue el responsable de controlar la expresión del gen *bla*_{CTX-M-9} tanto en la cepa *E. coli* B36 (y que presenta una duplicación que contiene el sitio de recombinación) como en la cepa *K. pneumoniae* KP40C, mientras que no se detectó expresión desde el promotor *P*_{CR1-2} u otro diferente.

En la cepa *E. coli* JAB, el gen *bla*_{CTX-M-2} se expresó bajo el control de un promotor, *P*_{ORI}, localizado entre el elemento CR1 y el codón de iniciación ATG de la β-lactamasa. Este sería el promotor original del gen de resistencia. Este promotor está formado por la región -35 (TTTTAC) y la región -10 (TATACT), con un espaciador de 17 pb (Figura 41). En este caso la distancia entre el nucleótido +1 y el codón de iniciación fue de 29 pb.

(A)

-35 P_{CR1-1} -10 -35 P_{CR1-2} -10 +1

CR1-*qnrA* Lo gagcggg[taaacg]agtgaggggaatttcagg[taagat]acttccgga**at**gaggagcaaaaaggtgg[tttata]cttcctata**acc**---/98 bp/---**atg**

CR1-*qnrA* K149 gagcggg[taaacg]agtgaggggaatttcagg[taagat]acttccgga**at**gaggagcaaaaaggtggtttatacttcctata**acc**---/31 bp/---**atg**

(B)

CR1-*bla*_{CTX-M-9} 36 gagcggg[taaacg]agtgaggggaatttcagg[taagat]acttccgga**at**gaggagcaaaaaggtggtttatacttcctata**acc**---/94 bp/---**atg**

-35 P_{CR1-1} -10 +1

CR1-*bla*_{CTX-M-9} 40C gagcggg[taaacg]agtgaggggaatttcagg[taagat]acttccgga**at**gaggagcaaaaaggtggtttatacttcctata**acc**---/94 bp/---**atg**

(C)

-35 P_{CR1-1} -10 +1

CR1-*dfrA10* AYE gagcggg[taaacg]agtgaggggaatttcagg[taagat]acttccgga**at**gaggagcaaaaaggtggtttatacttcctata**acc**---/149 bp/---**atg**

(D)

-35 P_{ORI} -10 +1

CR1-*bla*_{CTX-M-2}JAB aggagcaaaaaggtggtttatacttcctata**acc**---/201 bp/---[ttttac]tttttgttttttcaatg[tatact]tgaagg**c**---/29 bp/---**atg**

(E)

-35 P_{CR4} -10 +1

CR4-*bla*_{SPM-1} 23 ccttgtgccaccgcccggctaccccgcagactgcccgaaaagggcgt[ttgaat]ttcctatactctactcc[tacaat]gactcga---/144 bp/---**atg**

Figura 41. Secuencia detallada de las regiones promotoras de los genes *qnrA*, *bla*_{CTX-M-9}, *dfrA10*, *bla*_{CTX-M-2} y *bla*_{SPM-1}. Las secuencias promotoras se determinaron mediante experimentos de extensión con cebador. El sitio de iniciación de la transcripción (+1) y el codón de iniciación de la traducción (atg) se indican en negrita. El sitio de recombinación RCS se indica sombreado en gris. Las cajas -35 y -10 de los distintos promotores están encuadradas.

En resumen, el elemento CR1 proporcionó secuencias promotoras idénticas, P_{CR1-1} , implicadas en la expresión de *qnrA*, *dfrA10* y *bla*_{CTX-M-9}, con independencia de la distancia que separa el elemento CR1 del gen de resistencia en los casos de *qnrA* y *bla*_{CTX-M-9} (Figura 41). Además, en alguna ocasión (*qnrA* y *E. coli* Lo) aportó un segundo promotor, P_{CR1-2} , que no estuvo sistemáticamente implicado en la expresión de los genes de resistencia asociados.

El análisis del punto del inicio de la transcripción del gen *bla*_{SPM-1} en la cepa *P. aeruginosa* 23 asociado a un elemento CR4 mostró la existencia de un promotor híbrido, denominado P_{CR4} , formado por la región -35 (TTGAAT) (situada en la región de recombinación del elemento CR4), y la región -10 (TACAAT) original del gen *bla*_{SPM-1} (Figura 41).

5.8. Origen de la resistencia a quinolonas mediada por plásmidos

5.8.1. Origen del gen *qnrA*.

La actual emergencia en la detección de resistencia a quinolonas mediada por plásmidos nos condujo a pensar cual podría ser el origen o reservorio natural del determinante *qnrA*. La hipótesis de partida fue pensar que este gen tendría su origen en alguna especie de bacteria gramnegativa cuyo hábitat podría ser ambiental, humano o animal.

Se estudiaron 48 especies de bacterias gramnegativas, entre las que se incluían representantes de las familias *Enterobacteriaceae*, *Aeromonadaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Xanthomonadaceae*, *Moraxellaceae* y *Shewanellaceae*, algunas de ellas con significación clínica. Mediante ensayos por PCR con los cebadores definidos previamente se identificó la presencia de *qnrA* en 3 cepas de *Shewanella algae* (KB-1, KB-2 y KB-3)⁹² y en la cepa de referencia *Shewanella algae* CIP106454T.

La localización de estos genes tipo *qnrA* se determinó usando la endonucleasa I-Ceu-I. Mediante electroforesis en campo pulsante se obtuvieron en las cepas de *Shewanella sp.* 6 fragmentos de ADN (Figura 42).¹³² La sonda de ADN para ADN ribosómico consistente en un fragmento de PCR de 1.504 pb de los genes ARNr 16S y 23S hibridó con todos los fragmentos de las cepas de *Shewanella*, tanto *S. algae* como *S. putrefaciens*. La hibridación con la sonda de un fragmento interno del gen *qnrA* obtenida mediante PCR mostró una única señal sólo en las cepas de *S. algae* (Figura 42), del mismo tamaño que la señal de ADN ribosómico, mostrando la localización cromosómica de *qnrA* en *S. algae*, y su ausencia en *S. putrefaciens*.

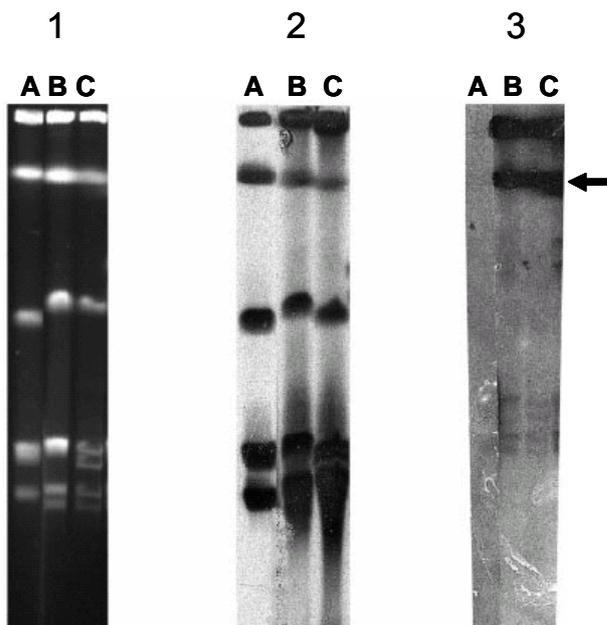


Figura 42. (Panel 1) Electroforesis en campo pulsante de ADN total de *Shewanella sp.* digerido con I-Ceu-I. Línea A: *Shewanella putrefaciens* de referencia CIP8040 (Instituto Paster, Paris); línea B: aislado clínico *Shewanella algae* KB-1; línea C: *Shewanella algae* de referencia CIP106454T (Instituto Paster, Paris). (Panel 2) Southern-blot realizado con una sonda específica para un fragmento de ARN ribosómico 16S-23S.⁷⁴ (Panel 3) Southern-blot realizado con una sonda específica para un fragmento interno del gen *qnrA*.¹⁴⁴ La flecha horizontal indica la posición de hibridación con la sonda de *qnrA*. No se obtuvo hibridación con la sonda de *qnrA* en el caso de la *Shewanella putrefaciens* de referencia.

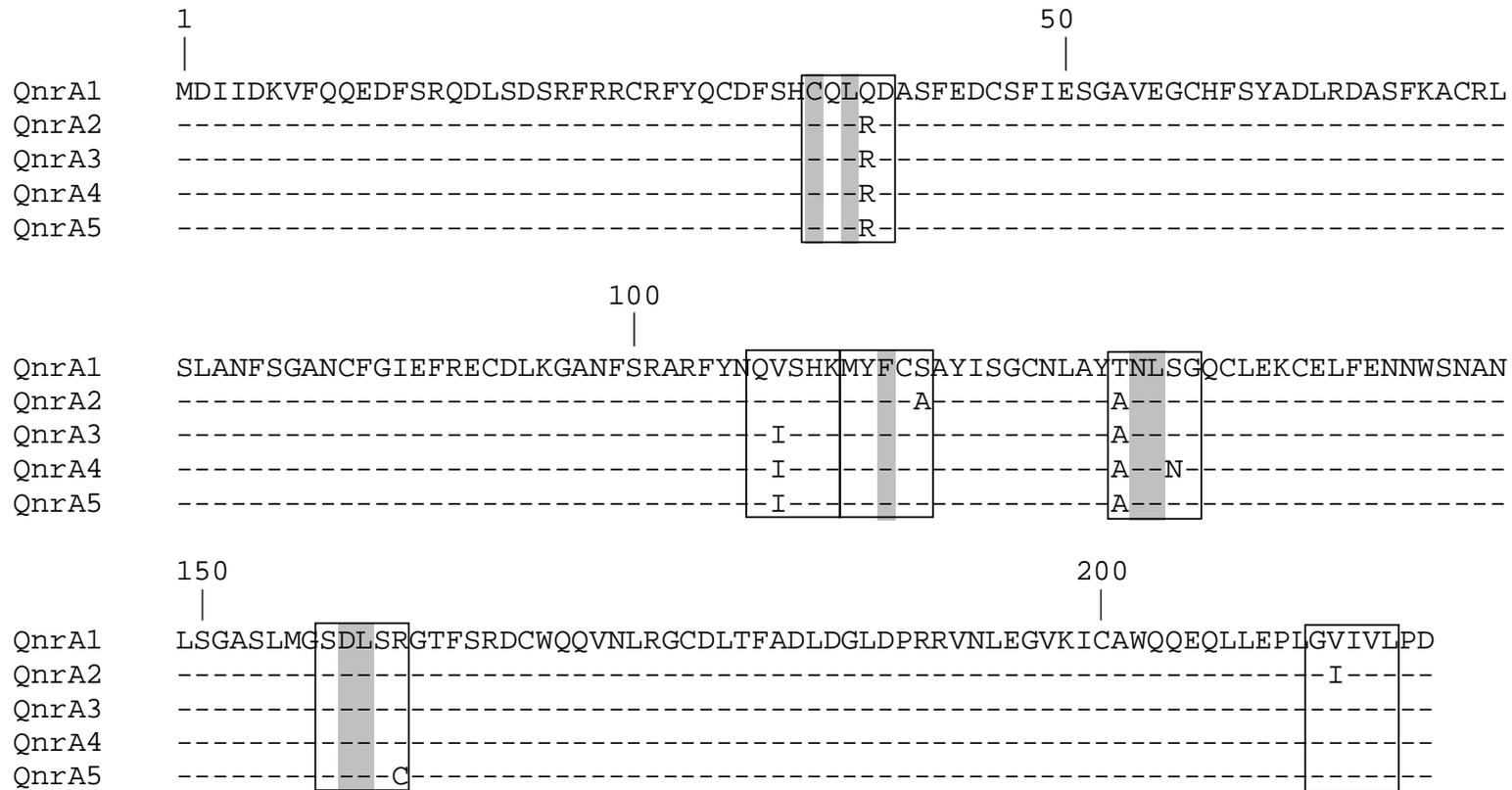


Figura 43. Comparación de las secuencias aminoacídicas de los determinantes de tipo QnrA mediados por plásmido con las secuencias de las cepas de *Shewanella algae*. Las secuencias de las proteínas mediadas por plásmidos denominadas QnrA1 y QnrA2 pertenecen a la de la cepa de *K. pneumoniae* UAB1 descrita originalmente en EE.UU.²⁵⁰ y a la de una cepa de *K. oxytoca* descrita en China (número de acceso en el GenBank AY675584), respectivamente. QnrA3 pertenece a la secuencia de la cepa de referencia *S. algae* CIP106454T y el aislado clínico *S. algae* KB-1, mientras que QnrA4 y QnrA5 pertenecen a las cepas *S. algae* KB-2 y *S. algae* KB-3, respectivamente.⁹² Las secuencias de las proteínas QnrA3, QnrA4 y QnrA5 se han depositado en el GenBank con los números de acceso DQ058661, DQ058662, DQ058663, respectivamente. El punteado lineal indica identidad aminoacídica. Los motivos pentapeptídicos en los que se han identificado sustituciones aminoacídicas al comparar con QnrA1 están encuadrados. En estos motivos, los residuos conservados identificados por Tran y col.²⁵⁰ están sombreados.

Se obtuvo la secuencia nucleotídica mediante secuenciación de estas 4 cepas y a partir de ella la correspondiente secuencia proteica. Esta secuencia proteica confirmó su homología con *qnrA* y mostró sólo de 2 a 4 sustituciones aminoacídicas (Figura 43). Además, el contenido en G+C de estos genes tipo *qnrA* de *S. algae* y el gen *qnrA* (52%) ya descrito clínicamente coincidieron perfectamente con el contenido en G+C del genoma de *S. algae*.^{263,264}

Cuando comparamos la resistencia natural a quinolonas de *S. algae* CIP106454T con una cepa de referencia de *Shewanella putrefaciens* CIP8040 (cepa de la colección del Instituto Pasteur, Paris, Francia), la cual es también un patógeno humano,²⁶ se observó que *S. algae* presenta una mayor resistencia intrínseca frente a estos antimicrobianos. Los valores de CMI de quinolonas y fluoroquinolonas para las cuatro cepas de *S. algae* que contenía *qnrA* fueron idénticos. La CMI de ácido nalidíxico fue 2 µg/ml, y para fluoroquinolonas fue 0.12, 0.5, 0.5, 0.5 µg/ml para ciprofloxacino, ofloxacino, esparfloxacino y norfloxacino. Estos valores de CMI fueron de 4 a 8 veces mayores que los obtenidos en la cepa de *S. putrefaciens*, filogenéticamente muy relacionada, pero que carece de *qnrA*.

qnrA se ha descrito en la región 3' de integrones de clase 1, asociados o formando parte de elementos CR1 y seguido de una segunda copia de la región 3'CS. Cuando se realizaron ensayos de PCR para determinar la presencia y colineridad de estas estructuras con *qnrA* en las cepas de *S. algae* no se obtuvo ningún producto de amplificación, verificando que *qnrA* en estas cepas no se encuentra formando parte de integrones de clase 1. Del mismo modo, los ensayos para amplificar otros genes previamente relacionados con la presencia de *qnrA*, como *ampR* o IS6100, produjeron un resultado negativo. Estos resultados muestran también que el elemento CR1 estuvo ausente, y por tanto, las secuencias promotoras proporcionadas por este elemento para la expresión de alto nivel de *qnrA* en *Enterobacteriaceae* no estuvieron asociadas a su expresión en *S. algae*.

5.8.2. Fuentes de posibles determinantes de resistencia a quinolonas tipo *qnr* (Familia *Vibrionaceae*)

Tras la identificación de *qnrA* como el primer gen de resistencia a quinolonas asociado a un elemento de movilidad horizontal (plásmidos conjugativos), se han identificado dos nuevos genes, *qnrB* y *qnrS*, pertenecientes a la familia de los pentapéptidos repetidos, asociados a plásmidos conjugativos y que confieren resistencia a quinolonas. QnrB y QnrS comparten un 41% y 60% de identidad aminoacídica con QnrA.

Como se describió anteriormente, el origen del gen plasmídico *qnrA* se encuentra en el cromosoma de *Shewanella algae*. Para aclarar el origen de los genes mediados por plásmidos *qnrB* y *qnrS*, al realizar una búsqueda mediante BLAST en la base de datos del NCBI identificamos algunas proteínas hipotéticas en el genoma de *Vibrio vulnificus* (AA007889), *Vibrio parahaemolyticus* (BAC61438), *Vibrio fischerii* (AAW85819) y *Photobacterium profundum* (CAG22829) que compartían una homología significativa con el determinante *qnrA*. A continuación se procedió a analizar la funcionalidad de estas proteínas en relación con la resistencia a quinolonas mediante clonación y análisis de su expresión en *Escherichia coli*.

El producto de PCR que contiene los genes tipo *qnr* de las cepas *S. algae* CIP106454 (PreQnrAa+PreQnrAb), *V. vulnificus* CIP103196 (PreQnrVV1+PreQnrVV2), *V. parahaemolyticus* CIP71.2 (PreQnrVP1+PreQnrVP2) y *P. profundum* CIP106289 (PreQnrPP1+PreQnrPP2) se clonó en el vector pPCRBluntII-TOPO (Invitrogen) obteniéndose los plásmidos recombinantes pSA-1, pVV-1, pVP-1 y pPP-1, respectivamente (Tabla 23). Los valores de CMI de quinolonas de las cepas de referencia y los clones obtenidos se muestran en la Tabla 29. Tras repetidos intentos, la CMI de quinolonas para *P. profundum* CIP106289 no pudo ser determinada debido a su crecimiento extremadamente lento (no se obtuvo crecimiento tras 72 horas a 10°C). En base a la sensibilidad a quinolonas de las cepas de referencia es difícil sospechar la presencia de genes tipo *qnr* en el cromosoma de estas especies.

Tabla 29. CMI (µg/ml) de quinolonas mediante tiras de Etest para *Vibrio vulnificus* CIP103196, *Vibrio parahaemolyticus* CIP71.2, *Shewanella algae* CIP106454 y los clones en *E. coli* TOP10 que contienen los plásmidos recombinantes pVV-1, pVP-1, pPP-1 y pSA-1 que expresan los determinantes de resistencia a quinolonas QnrVV, QnrVP, QnrPP y QnrA3, respectivamente, y la cepa de referencia *E. coli* TOP10.

Quinolonas	<i>V. vulnificus</i> CIP103196	<i>V. parahaemolyticus</i> CIP71.2	<i>S. algae</i> CIP 106454	<i>E. coli</i> TOP10 (pVV-1) (QnrVV)	<i>E. coli</i> TOP10 (pVP-1) (QnrVP)	<i>E. coli</i> TOP10 (pPP-1) (QnrPP)	<i>E. coli</i> TOP10 (pSA-1) (QnrA3)	<i>E. coli</i> TOP10
Ácido Nalidíxico	1	1	4	6	4	6	2	0.75
Flumequina	0.25	0.5	0.5	2	2	2	1	0.25
Ácido oxolínico	0.125	0.25	0.25	1	0.5	1	0.5	0.25
Esparfloxacino	0.094	0.38	0.75	0.38	0.25	0.38	0.064	< 0.002
Moxifloxacino	0.094	0.25	2	0.25	0.094	0.25	0.094	0.004
Ofloxacino	0.094	0.19	0.75	0.25	0.125	0.5	0.125	0.016
Norfloxacino	0.047	0.19	1.5	0.75	0.38	0.75	0.25	0.032
Ciprofloxacino	0.032	0.064	0.38	0.19	0.064	0.25	0.047	0.003
Enrofloxacino	0.06	0.125	0.06	0.06	0.03	0.125	0.06	0.003

Una vez expresados en *E. coli*, estos plásmidos recombinantes con genes tipo *qnr* confieren un mayor aumento relativo en el nivel de resistencia a fluoroquinolonas que a quinolonas. Se observó un efecto similar a la presencia de estos genes tipo *qnr* en plásmidos recombinantes en el plásmido que expresaba el gen *qnrA* procedente de *S. algae* CIP106454 (Tabla 29).

La clonación y secuenciación de los genes tipo *qnr* de *V. vulnificus* CIP103196, *V. parahaemolyticus* CIP71.2 y *P. profundum* CIP106289 identificó a nivel nucleotídico estos determinantes, que fueron casi idénticos a las secuencias descritas para las correspondientes cepas de referencia para las cuales se dispone del genoma completo en la base de datos del NCBI (se observó un máximo de 3 substituciones aminoacídicas). De este modo, estas secuencias presentan un alto grado de conservación, al igual que en el caso de los genes de *qnrA* y *S. algae*. En la Figura 44 se muestra una comparación de las secuencias aminoacídicas de los distintos genes tipo *qnr* (incluida una secuencia homóloga de *Vibrio fischerii* informada recientemente en GeneBank). Estas secuencias mostraron una identidad aminoacídica del 41% al 75% (Tabla 30). Excepto para *S. algae* y QnrA que comparten un 99% de identidad, las demás secuencias comparte un máximo del 67% de identidad con los determinantes Qnr (QnrA, QnrB, QnrS) (Tabla 30). Todas estas proteínas tipo Qnr pertenecen, al igual que QnrA, a la familia de proteínas de los pentapéptidos repetidos, definida por la presencia de repeticiones en serie de motivo conservado A(D/N)LXX, donde X es cualquier aminoácido.¹⁵ A partir de nuestros datos la secuencia consenso para la familia de proteínas tipo Qnr podría ser A/C D/N L/F S/R G/R.

Al igual que para *qnrA* en el cromosoma de *S. algae*, se estudió la posible asociación de estos genes tipo *qnr* en *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* y *P. profundum* con elementos asociados a integrones tipo 1 (CR1, 3'CS), *ampR* o IS6100. En todos los casos se obtuvieron resultados negativos.

Tabla 30. Porcentajes (%) de identidad aminoacídica de las proteínas de tipo Qnr codificadas por cromosoma y las proteínas QnrA, QnrB y QnrS mediadas por plásmido.

	QnrB	QnrS	QnrVV	QnrVP	QnrVF	QnrPP
QnrA	41	60	58	57	65	67
QnrB		39	40	43	42	41
QnrS			53	55	62	62
QnrVV				66	62	61
QnrVP					58	59
QnrVF						75

5.9. Estudio de la sensibilidad a quinolonas y β -lactámicos en cepas que contienen el gen *qnrA* con diferentes sistemas automáticos

Se estudiaron cuatro cepas clínicas de *K. pneumoniae* (UAB1, N5, 1960 y 1132) y sus respectivos transconjugantes que contenían el gen *qnrA* (excepto el transconjugante procedente de la cepa 1132). Tanto las cepas clínicas como los transconjugantes contenían al mismo tiempo la β -lactamasa plasmídica tipo AmpC FOX-5. Los resultados obtenidos con los sistemas automáticos MicroScan, Phoenix, Wider y Vitek se evaluaron tomando como método de referencia el sistema de microdilución en caldo siguiendo las recomendaciones del CLSI.³⁸

Las CMI de diferentes quinolonas y β -lactámicos usando el método de referencia y los diferentes sistemas automáticos se muestran en la Tabla 31. En la Tabla 32 se muestra el número de errores detectados en los resultados de los distintos sistemas automáticos para quinolonas y β -lactámicos cuando se compararon con el método de referencia.

Quinolonas

En cuanto a los resultados obtenidos para quinolonas, los errores máximos (EM) se observaron en los casos de ácido nalidíxico, norfloxacino y ofloxacino. Estos errores máximos (EM) en el caso de ácido nalidíxico fueron producidos por los sistemas Phoenix y Wider, aunque hay que recordar que los paneles del sistema MicroScan y las tarjetas del sistema Vitek-2 no contienen este antimicrobiano. La CMI de ácido nalidíxico para las cepas implicadas en estos errores máximos (EM) mediante el método de referencia fue 32 $\mu\text{g/ml}$ (un valor cercano al punto de sensibilidad intermedia), mientras que este valor fue de 16 $\mu\text{g/ml}$ con los sistemas automáticos (excepto en el caso de la cepa *K. pneumoniae* N5 cuya CMI con el sistema Phoenix fue 8 $\mu\text{g/ml}$). Los errores máximos (EM) observados para norfloxacino y ofloxacino se produjeron en la cepa *K. pneumoniae* UAB1 con el sistema Vitek-2. En el caso de ciprofloxacino no se detectó ningún error máximo (EM).

Los errores mayores (Em) se observaron con los sistemas Phoenix y Wider. En ambos casos el error se produjo en la detección de sensibilidad de ciprofloxacino en la cepa *K. pneumoniae* 1960. Aunque la CMI mediante el método de referencia reflejó consistentemente un valor de 1 $\mu\text{g/ml}$, el valor obtenido con los sistemas automáticos fue de >2 $\mu\text{g/ml}$ para el sistema Phoenix y 4 $\mu\text{g/ml}$ para el sistema Wider.

En todos los sistemas evaluados se contabilizaron errores menores (em). El número de errores menores detectados para ciprofloxacino fue mayor que para el resto de quinolonas estudiadas (0, 1, 4 y 2 para MicroScan, Phoenix, Wider y Vitek, respectivamente). Sumando todos los resultados obtenidos para quinolonas, el sistema MicroScan fue el que presentó un menor número de errores, mientras que el sistema Wider fue el que presentó el mayor número de errores.

Tabla 31. Comparación de las CMI (µg/ml) obtenidas por el método de referencia de microdilución y los cuatro sistemas automáticos evaluados.

Cepa	Antimicrobiano	Método de Referencia	MicroScan	Phoenix	Wider	Vitek-2
UAB1	Ciprofloxacino	2 (I)	2	>2	2	1
	Ácido Nalidíxico	32 (R)		>32	16	
	Norfloxacino	16 (R)		>8		2
	Ofloxacino	16 (R)	4			2
	Cefoxitina	>128 (R)	>16	>16	>16	>64
	Ceftazidima	64 (R)	>16	>16	>16	16
	Cefotaxima	8 (S)	8	16	8	4
	Ampicilina	>128 (R)	>16	>16		>32
N5	Ciprofloxacino	0.25 (S)	1	1	2	0.25
	Ácido Nalidíxico	32 (R)		8	16	
	Norfloxacino	2 (S)		2		0.5
	Ofloxacino	2 (S)	2			2
	Cefoxitina	128 (R)	>16	>16	>16	>64
	Ceftazidima	32 (R)	>16	>16	16	16
	Cefotaxima	8 (S)	32	>16	8	4
	Ampicilina	>128 (R)	>16	>16		>32
1960	Ciprofloxacino	1 (S)	1	>2	4	2
	Ácido Nalidíxico	>256 (R)		>32	>16	
	Norfloxacino	4 (S)		8		8
	Ofloxacino	4 (I)	>4			>8
	Cefoxitina	256 (R)	>16	>16	>16	>64
	Ceftazidima	16 (I)	16	>16	>16	16
	Cefotaxima	4 (S)	4	8	4	4
	Ampicilina	>128 (R)	>16	>16		>32
1132	Ciprofloxacino	4 (R)	>2	>2	4	>4
	Ácido Nalidíxico	>256 (R)		>32	>16	
	Norfloxacino	16 (R)		>8		16
	Ofloxacino	16 (R)	>4			>8
	Cefoxitina	>256 (R)	>16	>16	>16	>64
	Ceftazidima	64 (R)	>16	>16	>16	>64
	Cefotaxima	8 (S)	8	16	8	8
	Ampicilina	>128 (R)	>16	>16		>32

TC: Transconjugante en *E. coli* J53.

*Los huecos en blancos se deben a que ese sistema automático no dispone del antimicrobiano correspondiente.

β-lactámicos

En los estudios de sensibilidad a β-lactámicos no se encontraron errores en los resultados obtenidos para cefoxitina y ampicilina. Los errores máximos (EM) detectados sólo se encontraron para ceftazidima y se produjeron con los sistemas Phoenix y Wider. La CMI de ceftazidima de la cepa UAB1TC (cepa en la que se encontraron estos errores) fue de 32 µg/ml mediante el método de referencia, el cual es un valor cercano al punto de sensibilidad intermedia. Sin embargo la CMI obtenida con los sistemas automáticos fue de 8 µg/ml.

Tabla 31 (Continuación). Comparación de las CMI (µg/ml) obtenidas por el método de referencia de microdilución y los cuatro sistemas automáticos evaluados.

Cepa	Antimicrobiano	Método de Referencia	MicroScan	Phoenix	Wider	Vitek-2
UAB1 TC	Ciprofloxacino	0.5 (S)	1	0.5	2	1
	Ácido Nalidíxico	32 (R)		16	16	
	Norfloxacino	2 (S)		2	2	
	Ofloxacino	1 (S)	2			2
	Cefoxitina	>128 (R)	>16	>16	>16	>64
	Ceftazidima	32 (R)	>16	8	8	16
	Cefotaxima	8 (S)	8	8	8	4
	Ampicilina	>128 (R)	>16	>16		>32
N5 TC	Ciprofloxacino	0.125 (S)	1	0.25	2	<0.25
	Ácido Nalidíxico	32 (R)		16	16	
	Norfloxacino	1 (S)		2	2	
	Ofloxacino	0.5 (S)	2			2
	Cefoxitina	32 (R)	>16	>16	>16	>64
	Ceftazidima	8 (S)	16	16	16	16
	Cefotaxima	2 (S)	4	8	4	4
	Ampicilina	>128 (R)	>16	>16		>32
1960 TC	Ciprofloxacino	0.125 (S)	1	0.25	2	<0.25
	Ácido Nalidíxico	32 (R)		16	16	
	Norfloxacino	1 (S)		2	2	
	Ofloxacino	0.5 (S)	2			1
	Cefoxitina	32 (R)	>16	>16	>16	>64
	Ceftazidima	8 (S)	8	8	8	16
	Cefotaxima	2 (S)	4	8	8	4
	Ampicilina	>128 (R)	>16	>16		>32
1132 TC	Ciprofloxacino	0.008 (S)	<0.12	<0.13	<0.12	<0.25
	Ácido Nalidíxico	4 (S)		<8	<4	
	Norfloxacino	0.06 (S)		<2	<0.5	
	Ofloxacino	0.06 (S)	<0.5			<0.25
	Cefoxitina	128 (R)	>16	>16	>16	>64
	Ceftazidima	32 (R)	16	16	16	16
	Cefotaxima	4 (S)	8	8	8	4
	Ampicilina	>128 (R)	>16	>16		>32

TC: Transconjugante en *E. coli* J53.

*Los huecos en blancos se deben a que ese sistema automático no dispone del antimicrobiano correspondiente.

Sólo se detectó un error mayor (Em) en el caso de cefotaxima, en el que el sistema Phoenix erró con la cepa *K. pneumoniae* N5. En este caso, la CMI por el método de referencia fue 8 µg/ml, mientras que usando el sistema Phoenix fue consistentemente >16 µg/ml. Se detectaron diversos errores menores (em) en el caso de la sensibilidad de ceftazidima y cefotaxima.

De todos estos datos es importante destacar algunos aspectos. Es reseñable que el sistema experto de la base de datos del sistema Phoenix indicó la posibilidad de la producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en todas las cepas. Además, en el caso del sistema VITEK-2, se realizó una recomendación para el cambio de la categoría clínica de todas las cefalosporinas a la categoría de resistente.

Tabla 32. Errores observados en la sensibilidad o resistencia a quinolonas y β -lactámicos cometidos por los distintos sistemas automáticos cuando se comparó con el método de referencia.

Antimicrobiano	Errores	MicroScan	Phoenix	Wider	Vitek-2
Ciprofloxacino	Menor	0	1	4	2
	Mayor	0	1	1	0
	Máximo	0	0	0	0
Ácido Nalidíxico	Menor	-	0	0	-
	Mayor	-	0	0	-
	Máximo	-	4	5	-
Norfloxacino	Menor	-	1	-	1
	Mayor	-	0	-	0
	Máximo	-	0	-	1
Ofloxacino	Menor	2	-	-	1
	Mayor	0	-	-	0
	Máximo	0	-	-	1
Cefoxitina	Menor	0	0	0	0
	Mayor	0	0	0	0
	Máximo	0	0	0	0
Ceftazidima	Menor	2	3	4	6
	Mayor	0	0	0	0
	Máximo	0	1	1	0
Cefotaxima	Menor	1	2	0	0
	Mayor	0	1	0	0
	Máximo	0	0	0	0
Ampicilina	Menor	0	0	-	0
	Mayor	0	0	-	0
	Máximo	0	0	-	0

*Los huecos en blancos se deben a que ese sistema automático no dispone del antimicrobiano correspondiente.

5.10. Eficacia de fluoroquinolonas en la neumonía experimental murina por cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de QnrA

5.10.1. Sensibilidad *in vitro*

En la Tabla 33 se muestra los valores de sensibilidad ($\mu\text{g/ml}$) de las cepas parentales *K. pneumoniae* C2 y *K. pneumoniae* C2pMG252 frente a ciprofloxacino, levofloxacino y moxifloxacino, junto con los valores frente a distintos mutantes resistentes a quinolonas obtenidos a partir de estas dos cepas isogénicas.

Moxifloxacino ($0.25 \mu\text{g/ml}$) fue el antimicrobiano con mayor actividad frente a *K. pneumoniae* C2, la cual carece del plásmido pMG252 que codifica el gen *qnrA*. Ciprofloxacino ($0.5 \mu\text{g/ml}$) y levofloxacino ($0.5 \mu\text{g/ml}$) fueron una dilución menos activos. Frente a *K. pneumoniae* C2pMG252, la fluoroquinolona más activa fue levofloxacino ($2 \mu\text{g/ml}$), mientras que ciprofloxacino ($4 \mu\text{g/ml}$) y moxifloxacino ($4 \mu\text{g/ml}$) lo fueron una dilución menos.

Al analizar el efecto inóculo de estas cepas sobre la sensibilidad a fluoroquinolonas, se observó un efecto similar en todas las combinaciones de cepa/antimicrobiano. Cuando el inóculo fue igual o mayor de 10^7 ufc/ml, la CMI obtenida mediante microdilución fue $>128 \mu\text{g/ml}$.

La concentración mínima bactericida (CMB) fue la misma que la correspondiente CMI, excepto en el caso de ciprofloxacino y *K. pneumoniae* C2, y en el caso de levofloxacino y la *K. pneumoniae* C2pMG252. En estos casos la CMB fue una dilución mayor que la CMI (Tabla 33).

Tabla 33. Sensibilidad (CMI y CMB en $\mu\text{g/ml}$) a ciprofloxacino, levofloxacino y moxifloxacino de la cepas *K. pneumoniae* C2 y *K. pneumoniae* C2. Se indican Las frecuencias de aparición de mutantes *in vitro* e *in vivo* para las tres quinolonas y las CMIs de éstos.

Cepas	Antimicrobiano	CMIs	CMBs	Mutantes <i>in vitro</i>		Mutantes <i>in vivo</i>	
				Frecuencia	CMIs	Frecuencia	CMIs
<i>K. pneumoniae</i> C2	Ciprofloxacino	0.5	1	4×10^{-7}	8-16	No detección	--
	Levofloxacino	0.5	0.5	1.4×10^{-7}	8-16	No detección	--
	Moxifloxacino	0.25	0.25	1.3×10^{-7}	8	10^{-4}	8
<i>K. pneumoniae</i> C2pMG252	Ciprofloxacino	4	4	10^{-6}	32-64	10^{-4}	32-64
	Levofloxacino	2	4	5×10^{-6}	16-64	10^{-3}	32-64
	Moxifloxacino	4	4	2.1×10^{-7}	32-64	10^{-4}	32-64

5.10.2. Curvas de letalidad

Las curvas de letalidad se usaron como un método cinético para determinar la capacidad de matar a los microorganismos en relación al tiempo y a una concentración fija de antimicrobiano. El poder bactericida se cuantifica por el tiempo necesario para alcanzar una caída de tres logaritmos decimales (\log_{10}) de la concentración bacteriana inicial.

Los resultados de los ensayos realizados mediante las curvas de letalidad se muestran en las Figuras 45 y 46. A una concentración fija de 4xCMI de las distintas fluoroquinolonas, la reducción en el número de células viables de *K. pneumoniae* C2 causada por ciprofloxacino, levofloxacino y moxifloxacino tras 4 horas de incubación fue de 3.4, 3.3 y 3.6 \log_{10} , respectivamente. Se observó recrecimiento bacteriano en el caso de levofloxacino y moxifloxacino a partir de las 8 horas de incubación. Ciprofloxacino, por el contrario, mantuvo su actividad hasta al menos las 24 horas de incubación.

En el caso de *K. pneumoniae* C2pMG252, la reducción de la viabilidad celular provocada por ciprofloxacino, levofloxacino y moxifloxacino fue de 1.4, 1.8 y 1.7 \log_{10} a las 4 horas de incubación, 2.2, 2.3 y 2.3 \log_{10} a las 8 horas de incubación, y 3.1, -0.4 y 3.4 \log_{10} a las 24 horas de incubación, respectivamente. De este modo, ciprofloxacino y moxifloxacino necesitaron de un periodo de entre 8 y 24 horas para producir una reducción de tres logaritmos decimales de la concentración bacteriana inicial, mientras que se produjo un recrecimiento bacteriano para levofloxacino entre las 8 y las 24 horas (Figura 46).

A una concentración fija de 1xCMI se observó una menor actividad bactericida entre las 2 horas y las 8 horas tanto de levofloxacino como moxifloxacino frente a *K. pneumoniae* C2 que a una concentración de 4xCMI. Sin embargo, esta diferencia no se observó con ciprofloxacino. Igualmente, no se observaron diferencias significativas entre las tres quinolonas a las 24 horas. Estos resultados se muestran en la Figura 45.

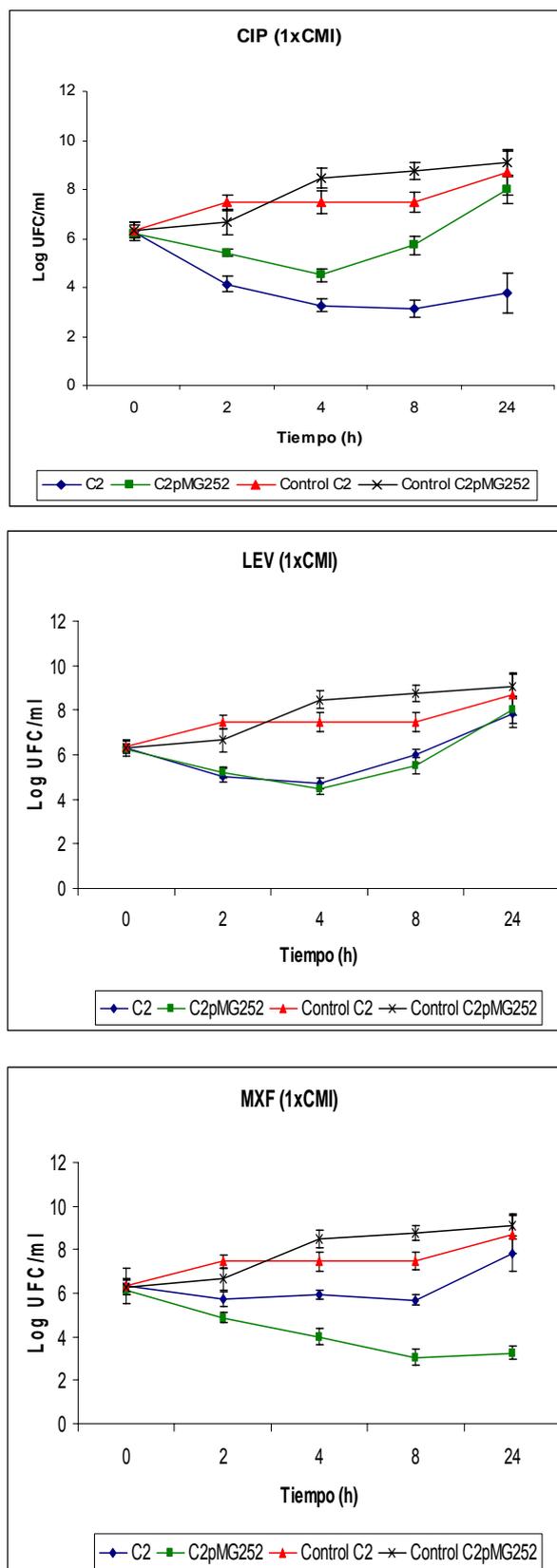


Figura 45. Recuento de bacterias viables en los ensayos de las curvas de letalidad con ciprofloxacino (CIP), levofloxacino (LEV) y moxifloxacino (MXF) en las cepas *K. pneumoniae* C2 y *K. pneumoniae* C2(pMG252) a una concentración de 1xCMi, en comparación con un control sin antibióticos.

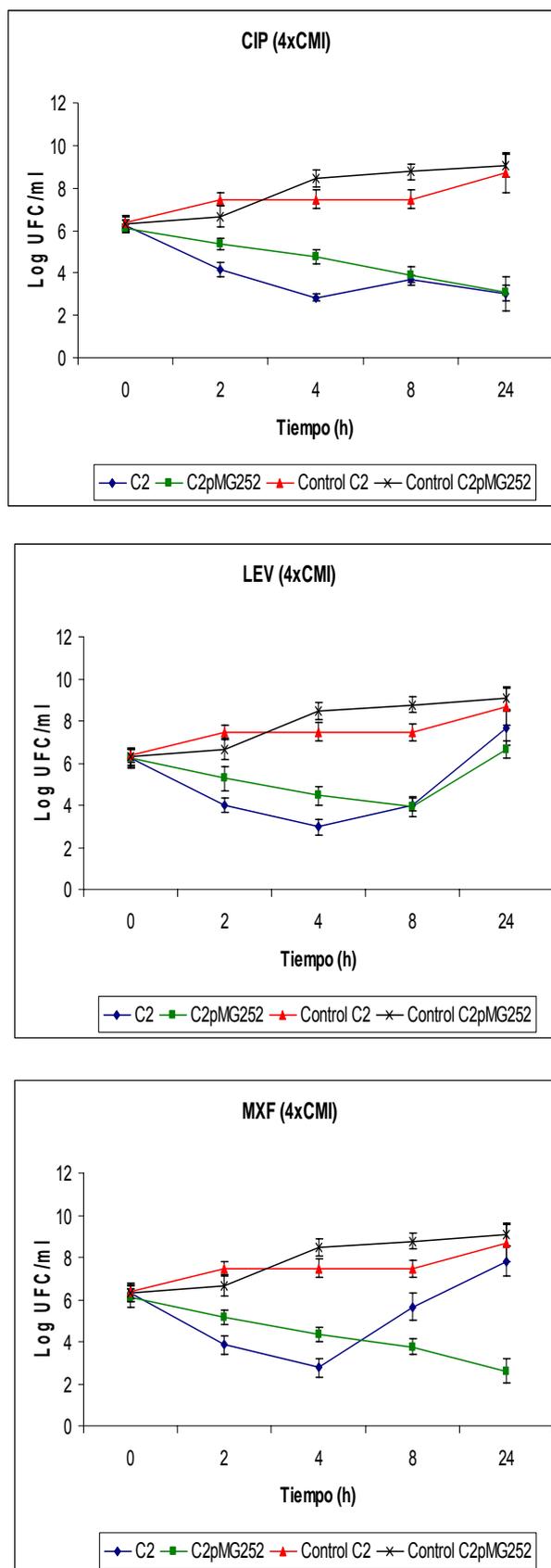


Figura 46. Recuento de bacterias viables en los ensayos de las curvas de letalidad con ciprofloxacino (CIP), levofloxacino (LEV) y moxifloxacino (MXF) en las cepas *K. pneumoniae* C2 y *K. pneumoniae* C2(pMG252) a una concentración de 4XCMi, en comparación con un control sin antibióticos.

En la cepa que contiene el gen *qnrA*, *K. pneumoniae* C2pMG252, no se observaron diferencias importantes en la actividad bactericida de estas quinolonas a las concentraciones estudiadas de 1xCMI y 4xCMI, excepto para ciprofloxacino y levofloxacino a las 8 horas (Figuras 45 y 46).

5.10.3. Estudios farmacocinéticos

Los resultados de los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos estudiados para cada antimicrobiano (C_{max} , C_{max}/CMI , $t_{1/2}$, AUC y AUC_{0-24}/CMI) se muestran en la Tabla 34. Los valores de AUC_{0-24}/CMI de los antimicrobianos fueron mayores de 30 en el caso de *K. pneumoniae* C2 (52.48, 31.84 y 42.4 para ciprofloxacino, levofloxacino y moxifloxacino, respectivamente), y en cambio estos valores fueron inferiores a 7 para *K. pneumoniae* C2pMG252 (6.56, 3.98 y 1.32 para ciprofloxacino, levofloxacino y moxifloxacino, respectivamente).

5.10.4. Estudios histopatológicos

Tanto los ratones inoculados con *K. pneumoniae* C2 como con *K. pneumoniae* C2pMG252 mostraron alteraciones histológicas compatibles con bronconeumonía aguda focal y en algún caso neumonía panlobular bilateral. En todos los tejidos estudiados se advirtió, en mayor o menor grado, congestión vascular difusa y septal con focos aislados de hemorragia. Por otro lado se observó infiltración inflamatoria de polimorfonucleares, a veces con abscesos segmentarios, o infiltración de los macrófagos alveolares, así como presencia de colonias de bacterias gramnegativas.

Tabla 34. Parámetros farmacodinámicos/farmacocinéticos de ciprofloxacino, levofloxacino y moxifloxacino para las cepas *K. pneumoniae* C2 (C2) y *K. pneumoniae* C2pMG252 (C2pMG252).

Antimicrobiano (Dosis)	C _{max} (mg/L)	t _{1/2} (h)	AUC (mg·h/l)	C _{max} /CMI		AUC ₀₋₂₄ /CMI	
				C2	C2 pMG252	C2	C2 pMG252
Ciprofloxacino (20 mg/kg)	11.57	0.38	6.56	23.14	2.89	52.48	6.56
Levofloxacino (25 mg/kg)	7.89	0.39	3.98	15.78	1.97	31.84	3.98
Moxifloxacino (20 mg/kg)	6.84	0.33	2.65	27.36	0.85	42.4	1.32

5.10.5. Eficacia terapéutica en la neumonía experimental

Las tasas de supervivencia entre los animales inoculados con la cepa *K. pneumoniae* C2 fueron las siguientes: 26.7% para los animales control (inoculados, pero no tratados con fluoroquinolona alguna), 100% para los animales tratados con ciprofloxacino o levofloxacino y 46.7% para los tratados con moxifloxacino. Estos datos se muestran en las Tablas 35 y 36. Ciprofloxacino y levofloxacino disminuyeron la tasa de muerte provocada por *K. pneumoniae* C2 cuando se comparó con el grupo control ($p < 0.001$) y con el tratado con moxifloxacino ($p = 0.002$).

En el caso de los animales inoculados con *K. pneumoniae* C2pMG252, las tasas de muerte fueron las siguientes: 14.3% para los animales control, 53.3% para los animales tratados con ciprofloxacino o levofloxacino y 33.3% para los tratados con moxifloxacino. Ciprofloxacino y levofloxacino disminuyeron la mortalidad provocada por *K. pneumoniae* C2pMG252 comparado con el grupo control ($p = 0.03$).

El recuento de bacterias viables encontradas en los pulmones de los distintos grupos de animales se muestra en las Tablas 35 y 36. Con la cepa *K. pneumoniae* C2 todos los grupos mostraron una disminución significativa del número de bacterias en los pulmones respecto al grupo control (3.53 ± 1.04 , 3.38 ± 0.46 y 4.98 ± 1.98 para ciprofloxacino, levofloxacino y moxifloxacino, respectivamente, versus 9.16 ± 2.16 UFC/gramo para el control; $p < 0.001$).

Con *K. pneumoniae* C2pMG252 no se apreciaron diferencias significativas con ninguna de las fluoroquinolonas en el número de bacterias respecto al grupo control (7.74 ± 2.67 , 7.57 ± 3.84 y 8.27 ± 3.73 para ciprofloxacino, levofloxacino y moxifloxacino, respectivamente, versus 9.65 ± 2.49 UFC/gramo para el control; $p < 0.001$) (Tablas 35 y 36).

Tabla 35. Efecto del tratamiento sobre la tasa de supervivencia y el aclaramiento bacteriano en pulmón de ratón en el caso de la cepa *K. pneumoniae* C2.

Tratamiento	Dosis	N	Supervivencia (%)	Log10 UFC/g de pulmón
Control		15	4 (26.7)	9.16±2.16
Ciprofloxacino	80 mg/kg/d	15	15 (100) ^{a,b}	3.53±1.04 ^c
Levofloxacino	100 mg/kg/d	15	15 (100) ^{a,b}	3.38±0.46 ^c
Moxifloxacino	80 mg/kg/d	15	7 (46.7)	4.98±1.98 ^c

N = número de ratones estudiados.

^ap<0.001 comparado con el grupo control.

^bp=0.002 comparado con el grupo tratado con moxifloxacino.

^cp<0.001 comparado con el grupo control.

Tabla 36. Efecto del tratamiento sobre la tasa de supervivencia y el aclaramiento bacteriano en pulmón de ratón en el caso de la cepa *K. pneumoniae* C2(pMG252).

Tratamiento	Dosis	N	Supervivencia (%)	Log UFC/g de pulmón
Control		15	2 (14.3)	9.65±2.49
Ciprofloxacino	80 mg/kg/d	15	8 (53.3) ^a	7.74±2.67 ^b
Levofloxacino	100 mg/kg/d	15	8 (53.3) ^a	7.57±3.84 ^b
Moxifloxacino	80 mg/kg/d	15	5 (33.3)	8.27±3.73 ^b

N = número de ratones estudiados.

^ap=0.03 comparado con el grupo control.

^bp no significativa comparado con el grupo control.

Al comparar la supervivencia entre los dos grupos tratados con ciprofloxacino o levofloxacino, la tasa de supervivencia fue mayor en los grupos infectados con *K. pneumoniae* C2 (el 100% con ambos antimicrobianos) que en los que se infectaron con *K. pneumoniae* C2pMG252 (53.3% con ambos antimicrobianos, $p=0.003$). Sin embargo con moxifloxacino no hubo diferencia significativa entre los grupos infectados con una u otra de las cepas. Además, en cuanto al recuento de bacterias en pulmón, las tres fluoroquinolonas fueron más eficientes en los animales infectados con *K. pneumoniae* C2 que con *K. pneumoniae* C2pMG252 ($p<0.001$ para ciprofloxacino y levofloxacino, y $p=0.007$ para moxifloxacino).

5.10.6. Selección y caracterización de mutantes resistentes

Los datos sobre la frecuencia de obtención de mutantes resistentes a fluoroquinolonas seleccionados a partir de bacterias crecidas tanto *in vitro* como *in vivo* y seleccionadas en medio de selección a 4xCMI o en placas de gradiente (Figura 47) se muestran en la Tabla 33. En el caso de bacterias crecidas *in vitro* en medio MHB, la presencia del plásmido pMG252, en la cepa *K. pneumoniae* C2pMG252, produjo un incremento en la frecuencia de obtención de mutantes de 2 veces para moxifloxacino, y de más de 36 veces para ciprofloxacino y levofloxacino, con respecto a lo observado en la cepa *K. pneumoniae* C2.

Este mismo efecto fue más evidente cuando el inóculo usado para la selección de mutantes provenía de bacterias crecidas *in vivo* directamente desde homogeneizado de pulmones. La frecuencia de obtención de mutantes de la cepa *K. pneumoniae* C2pMG252 en comparación con la cepa *K. pneumoniae* C2 fue mucho mayor para ciprofloxacino y levofloxacino, y similar en el caso de moxifloxacino (Tabla 33).

Es reseñable decir que en el caso de la *K. pneumoniae* C2pMG252 se seleccionaron más mutantes cuando las placas se inocularon con bacterias crecidas *in vivo* que cuando se usaron bacterias crecidas *in vitro* (100 veces para ciprofloxacino, 200 veces para levofloxacino y 475 veces para moxifloxacino) (Tabla 33).

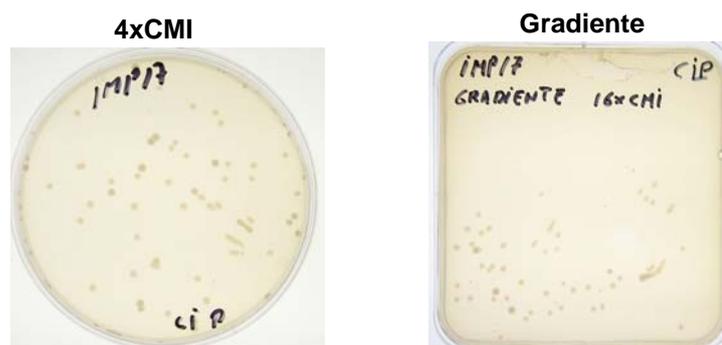


Figura 47. Selección de mutantes sobre MHA a 4xCMI o en placas de gradiente.

Las CMI's para estos mutantes obtenidos desde la cepa *K. pneumoniae* C2 fue de 16 a 64 veces más alta que para la propia *K. pneumoniae* C2. De igual modo, las CMI's de fluoroquinolonas de los mutantes obtenidos desde la cepa *K. pneumoniae* C2pMG252 fue de 8 a 16 veces más alta que para la cepa *K. pneumoniae* C2pMG252.

Todos los mutantes obtenidos *in vitro* o *in vivo* con ciprofloxacino, levofloxacino o moxifloxacino fueron mutantes estables, y mantuvieron el nivel de resistencia a quinolonas cuando se crecieron en medio sin antimicrobiano durante dos pases sucesivos de 24 horas.

Las cepas *K. pneumoniae* C2 y *K. pneumoniae* C2pMG252 contenían la sustitución descrita previamente Ser83Phe en GyrA. Se usaron distintos mutantes, hasta tres para cada fluoroquinolonas, obtenidos de la cepa *K. pneumoniae* C2 y *K. pneumoniae* C2pMG252 tanto *in vivo* como *in vitro* para analizar las regiones QRDR de los genes *gyrA* y *parC*. Todos mostraron la mutación previamente definida en las cepas parentales. No se encontró ninguna otra mutación previamente relacionada con resistencia a quinolonas en

K. pneumoniae. Mediante la técnica de SSCP se constató la uniformidad de las secuencias de *gyrA* y *parC* de las cepas parentales *K. pneumoniae* C2 y *K. pneumoniae* C2pMG252 y sus mutantes (Figura 48). En algunos mutantes se encontraron mutaciones no relacionadas hasta ahora con resistencia a quinolonas. Un mutante obtenido *in vitro* mostró dos cambios en GyrA (Tyr100Cys y Gly114Asp). La sustitución Lys113Glu se encontró en dos mutantes diferentes, y la sustitución Lys73Gln en otro.

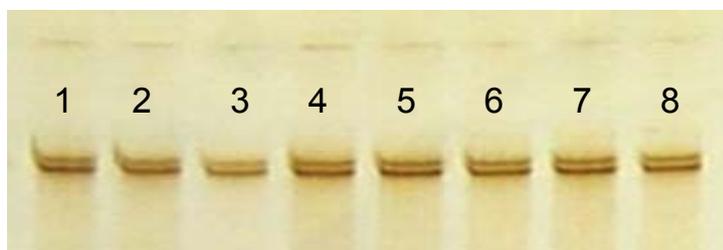


Figura 48. SSCP de las secuencias de *gyrA* de la cepa *K. pneumoniae* C2pMG252 y mutantes en los que no se detectaron diferencias en la movilidad electroforética. Línea 1: *K. pneumoniae* C2pMG252, líneas 2-8: mutantes derivados resistentes a quinolonas seleccionados.

6. DISCUSIÓN

La extensa utilización de las fluoroquinolonas ha favorecido la selección de bacterias resistentes a estos agentes, lo que con el tiempo se ha traducido en un notable aumento en el porcentaje de resistencia tanto en bacterias grampositivas como gramnegativas en los últimos años. Hasta la fecha, los principales mecanismos implicados en este tipo de resistencia han sido dos (ambos mediados por elementos cromosómicos): las alteraciones en las dianas de las quinolonas y la disminución en la acumulación del antibiótico en el interior bacteriano por impermeabilización de la membrana (pérdida de porinas o alteraciones del lipopolisacárido) o por expresión de sistemas de expulsión activa. En 1998, se describe por primera vez resistencia a quinolonas transmisible horizontalmente en una cepa de *K. pneumoniae* aislada en 1994 en Birmingham, Alabama, E.E.U.U., a partir de una muestra de orina.¹⁵¹ El gen *qnr*, posteriormente denominado *qnrA*, es el responsable genético de dicha resistencia.²⁵⁰ La diseminación horizontal de mecanismos de resistencia a fluoroquinolonas puede proporcionar la posibilidad de una rápida expansión de la resistencia a estos antimicrobianos, tanto en patógenos de animales como humanos, más aún con el amplio uso que se hace de las mismas.

El producto del gen *qnrA* es una proteína de 218 aminoácidos perteneciente a la familia de los pentapéptidos repetidos que presenta dos dominios de 11 y 28 copias (A/CD/NL/FXX) en tándem separados por una única glicina. Se ha estudiado *in vitro* el papel protector de QnrA frente a quinolonas mediante la producción y posterior purificación de QnrA unido a una cola de histidinas en *E. coli*. La protección de la ADN girasa fue proporcional a la concentración de QnrA e inversamente proporcional a la concentración de ciprofloxacino.²⁵⁰ Posteriormente, una aproximación bioquímica del mecanismo de acción de QnrA ha mostrado que esta proteína puede unirse tanto al holoenzima como a sus subunidades GyrA y GyrB. Esta unión no requiere la formación del complejo enzima-ADN-quinolona ya que ocurre también en ausencia de ADN relajado, ciprofloxacino o ATP. De este modo la formación del complejo QnrA-ADN girasa ocurriría antes de la formación del complejo enzima-ADN-quinolona, protegiendo de la posterior unión de la quinolonas.²⁵² Parece que la protección de QnrA sobre la Topoisomerasa IV ocurre de modo similar.²⁵¹

El objetivo fundamental de este trabajo consistió en realizar una aproximación a la importancia clínica de la aparición de resistencia a quinolonas mediada por plásmidos, en base a estudios de prevalencia y de epidemiología molecular. En un paso posterior se han estudiado distintos aspectos que rodean a la biología de este fenómeno, como la movilidad genética del gen responsable, el nivel de resistencia a quinolonas obtenido y su relación con el nivel de expresión de los genes. Además, el estudio sobre la detección de este mecanismo de resistencia mediante sistemas automatizados de detección de resistencias y la puesta a punto y análisis de un modelo *in vivo* en ratones han proporcionado información adicional de interés.

En los últimos 3 años han aparecido múltiples estudios sobre la prevalencia de la resistencia a quinolonas mediada por plásmidos, principalmente en la familia *Enterobacteriaceae*. En 2003, Jacoby G.A. y col.¹⁰⁹ estudiaron mediante PCR la presencia de *qnrA* en 350 cepas clínicas de bacterias gramnegativas de 18 países y 24 estados de EE.UU. La prevalencia fue muy baja (1.4%), detectándose en 4 *K. pneumoniae*, 1 *E. coli* y 1 *Klebsiella*

sp. En estas cepas *qnrA* estuvo asociado en el mismo plásmido al gen *bla*_{FOX-5} que codifica una β -lactamasa plasmídica tipo AmpC. Al mismo tiempo se investigó en esta colección la asociación de *qnrA* con el gen *mcbG*, otro gen que codifica una proteína de la familia de los pentapéptidos implicada en inmunidad bacteriana y que protege a la ADN girasa. Sólo se aisló una cepa *mcbG* positiva, la cual resultó negativa para el gen *qnrA*.

Ese mismo año, Wang M. y col.²⁷⁵ publicaron un trabajo similar sobre 78 cepas de *E. coli* aisladas en Shangai (China), todas ellas resistentes a ciprofloxacino. Desde 1993 la frecuencia de resistencia a ciprofloxacino en *E. coli* ha superado el 50% en esta zona. En este caso, el gen *qnrA* se identificó en 6 de los 78 aislados (7.7%), mediante la técnica de hibridación de ADN sobre colonias. En todos los casos fue posible transferir la resistencia a quinolonas a un receptor sensible. Además, la secuencia de *qnrA* fue idéntica a la publicada originalmente (AY070235), excepto en un caso en el que apareció una mutación silenciosa (CTA→CTG en la posición 537).

Más recientemente han aparecido nuevos datos de prevalencia. Se han detectado genes de tipo *qnrA* en 11 cepas (*E. coli*, *K. pneumoniae* y *Enterobacter sakazakii*) de un total de 23 aislados (48%) de enterobacterias que contenían el gen *bla*_{VEB-1} aisladas en Bangkok (Tailandia) en 1999,²⁰⁶ añadiendo esta región a la lista de zonas en las cuales el determinante *qnrA* se ha diseminado. *qnrA* ha sido localizado en cepas de *E. coli* en el sur de Korea en 2 de 260 aislados (0.7%) (194 resistentes a ciprofloxacino y 66 sensibles) en el periodo 2001-2003.¹¹² En Hong Kong (China), *qnrA* se ha identificado en plásmidos conjugativos de 4 aislados de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis no relacionados clonalmente que también contienen el gen *bla*_{CTX-M-14}.³⁶

En 2004, Wang y col.²⁷³ publicaron nuevos datos sobre la prevalencia de *qnrA* en EE.UU. en cepas de *K. pneumoniae* y *E. coli* resistentes a ciprofloxacino. Un total de 8 nuevas cepas de *K. pneumoniae* de 72 estudiadas (11.1%) contenían el gen *qnrA*, el cual no se detectó en *E. coli*. En 7 casos fue posible transferir mediante conjugación la resistencia a quinolonas a un receptor sensible. En 5 de los plásmidos, *qnrA* se asoció al gen *bla*_{FOX-5} (como

en el caso del plásmido descrito originalmente, pMG252¹⁵¹), mientras que los otros dos presentaron el gen *bla*_{SHV-7}. Otro reciente estudio pone de manifiesto la alta distribución de la resistencia a quinolonas mediada por el gen plasmídico *qnrA* en los EE.UU. en los géneros *Enterobacter* y *Klebsiella* en cepas resistentes a ceftazidima con una prevalencia del 17% y el 10%, respectivamente.²¹⁶

En el año 2005 se ha publicado por primera vez la aparición de aislados clínicos *qnrA* positivos en Europa.^{32,42,114,144,164,258,279} Mammeri H. y col.¹⁴⁴ estudiaron por PCR una colección de 297 cepas de *E. coli* clínicas resistentes a ácido nalidíxico aisladas en el Hospital de Bicetre de Paris (Francia) en 2003. Una única cepa resultó positiva (0.3%), en la cual *qnrA* estuvo presente en un plásmido conjugativo de 180-kb que contenía al mismo tiempo el gen *bla*_{VEB-1}. Casi simultáneamente, Jonas D. y col.¹¹⁴ determinaron la prevalencia de *qnrA* mediante PCR en 703 aislados de enterobacterias resistentes a fluoroquinolonas o cefalosporinas aislados en unidades de cuidados intensivos de 34 hospitales en Alemania de 2000 a 2003. *qnrA* se encontró en una cepa de *Enterobacter sp.* y en 5 de *C. freundii* (0.8%), en un plásmido conjugativo de 180-kb aproximadamente.

En Holanda *qnrA* se ha descrito en *C. freundii*, *E. coli*, *Enterobacter amnigenus*, *E. cloacae* y *K. pneumoniae* con una prevalencia de un 52.5% sobre un brote epidémico de 179 aislados.¹⁸⁴ También se ha identificado en *P. stuartii* en Egipto;²⁷⁹ y en una cepa de *C. freundii* y otra de *E. cloacae* en Turquía de un total de 49 (4%) cepas productoras de BLEEs.¹⁶⁴ Además, en 2005, se ha comunicado por primera vez la presencia de *qnrA* en España en enterobacterias en aislados clínicos de Salamanca y Santander.^{32,258}

Por último, en el 45th ICAAC (*Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*) se han expuesto nuevos trabajos que reflejan la amplia distribución de este mecanismo de resistencia ya que se ha notificado desde Canadá, Reino Unido, Korea, China y España.^{32,52,115,205,276}

La amplia distribución de este mecanismo de resistencia pone de manifiesto que su existencia en cepas clínicas se produjo hace tiempo, y, por supuesto, con anterioridad a su descubrimiento. En la Figura 49 se muestra la distribución geográfica de los distintos genes de tipo *qnr* publicados hasta la escritura de esta Tesis Doctoral.

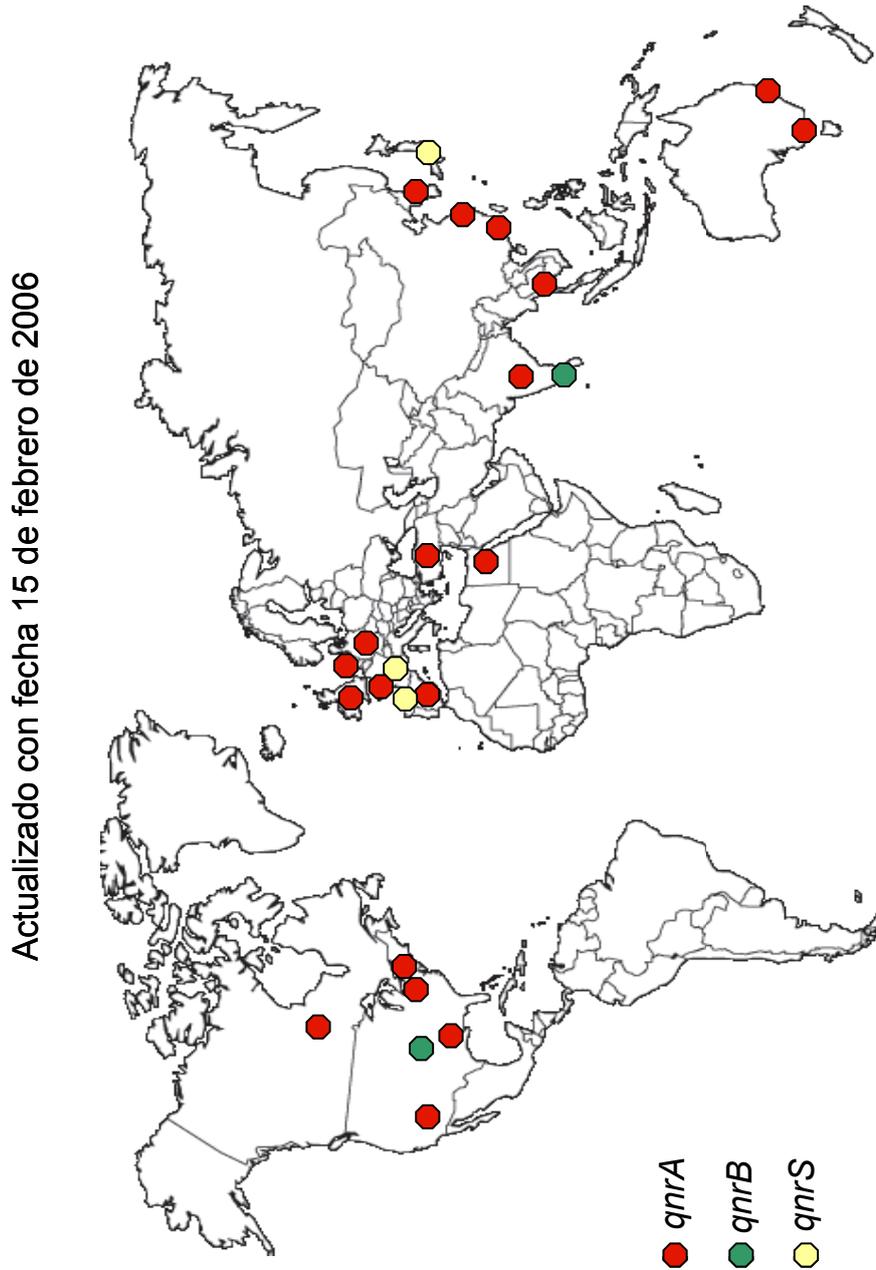


Figura 49: Distribución geográfica de genes tipo *qnr* en cepas clínicas.

En el primero de los dos estudios de esta Tesis Doctoral (Estudio de prevalencia A) se analizaron un total de 425 cepas clínicas para determinar la presencia del gen *qnrA*. Esta colección constó de 159 *K. pneumoniae* y 266 *E. coli*, y presentaban una distribución heterogénea en cuanto a sus orígenes geográficos. El 13.4% fueron productores de pACBL o bien (en el caso de los aislados de *K. pneumoniae*) presentaron un fenotipo compatible con la producción de pACBL, y el 89.6% presentó un perfil de resistencia a ciprofloxacino de acuerdo a las normas del CLSI.³⁸ El gen *qnrA* se detectó mediante PCR en 3 cepas clínicas de *K. pneumoniae* de un total de 159 cepas (1.8%). La cepa de *K. pneumoniae* N5 se aisló en el estudio SENTRY en Wilmington, DE, EE.UU. en 1997. Las cepas de *K. pneumoniae* 1960 y 1132 se aislaron durante el proyecto ICARE, ambas desde la misma institución en Carolina del Norte en 1995 y 1996, respectivamente. Ninguno de los 266 aislados clínicos de *E. coli* resultó positivo mediante PCR para el gen *qnrA*. La secuencia del gen *qnrA* fue idéntica a la previamente descrita por Tran y col.²⁵⁰ Estas cepas, además, contienen el gen *bla*_{FOX-5} que codifica la β -lactamasa plasmídica tipo AmpC FOX-5 y no presentan relación clonal alguna como quedó reflejado mediante las técnicas de PFGE y REP-PCR.

En el estudio de prevalencia B de esta Tesis Doctoral, se estudió mediante PCR una colección de 25 cepas clínicas de enterobacterias aisladas en 2002 en el área metropolitana de las ciudades de Sydney y Melbourne, en Australia. Todas ellas eran resistentes a ciprofloxacino y 16 de los aislados (69.5%) fueron productores de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE). En esta colección, 2 (*K. pneumoniae* y *E. cloacae*) de las 25 cepas (8%) contenían el gen *qnrA*. En ambos casos, la secuencia del gen fue idéntica a la previamente descrita por Tran y col.²⁵⁰ La cepa *K. pneumoniae* K149, previamente descrita²⁰⁴, contenía los genes de resistencia a β -lactámicos *bla*_{SHV-12} (en el mismo plásmido que *qnrA*) y *bla*_{IMP-4}. La cepa de *E. cloacae* Qn17 *qnrA* positiva también presentó el gen *bla*_{SHV-12}.

Los resultados de nuestros estudios de prevalencia del gen *qnrA* están en consonancia con los datos publicados actualmente, en los que, si bien parece, que la prevalencia es baja en el número total de aislados de enterobacterias (menos del 1%), este porcentaje aumenta a valores en torno al 10% en colecciones de enterobacterias que reúnen características como resistencia a quinolonas, resistencia a ceftazidima o cefotaxima, o presencia de BLEEs. Además, parece claro que este determinante está ampliamente diseminado alrededor de todo el mundo, como indica su descripción en América del Norte, Europa, Asia, y de acuerdo a nuestros resultados, también Australia.

Respecto a los valores de sensibilidad para ciprofloxacino, las cepas clínicas que contienen *qnrA* fueron tanto sensibles (*K. pneumoniae* N5, *K. pneumoniae* 1960, *K. pneumoniae* K149), intermedias (*K. pneumoniae* UAB1), como resistentes (*E. cloacae* Qn17, *K. pneumoniae* 1132). Esto da una idea de la dificultad para la detección de este nuevo mecanismo de resistencia, ya que actualmente no existen marcadores fenotípicos específicos.

En el último año han aparecido dos nuevos genes relacionados con *qnrA*, *qnrB* y *qnrS*, que también codifican proteínas pertenecientes a los pentapéptidos repetidos y que se encuentran sobre plásmidos conjugativos. Estos genes confieren bajo nivel de resistencia a quinolonas, al igual que *qnrA*. QnrB y QnrS comparten un 41% y un 60% de identidad aminoacídica con QnrA. QnrB se ha identificado en cepas de *Citrobacter koseri*, *E. coli*, *E. cloacae* y *K. pneumoniae* de la India y EE.UU. asociado a la presencia de genes de BLEEs como *bla*_{CTX-M-15} o *bla*_{SHV-12}.¹¹⁰ QnrS ha sido aislada de una cepa de *Shigella flexneri* aislada en Japón asociado a una β -lactamasa *bla*_{TEM-1} en el mismo plásmido.⁸⁵ Sin embargo, hay aún muy pocos datos sobre la prevalencia real de estos dos determinantes y la epidemiología molecular de las especies que pueden albergarlos. Aunque, muy recientemente, se ha detectado *qnrS* en cepas clínicas de *E. cloacae* en España³³ y también en Francia (comunicación personal del Dr. Patrice Nordmann).

De acuerdo con nuestros resultados, la presencia de *qnrS* no pudo ser demostrada en ninguna de las cepas estudiadas a tal propósito. En el momento de escribir esta Tesis Doctoral, la secuencia del gen *qnrB* no se encontraba disponible en el banco de secuencias de la base de datos del *Nacional Center Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), con lo cual su prevalencia no ha sido examinada.

A pesar que se han estudiado otras especies de bacterias gramnegativas como *P. aeruginosa* y *A. baumannii*, todas las especies en las que se han identificado determinantes tipo *qnr* son enterobacterias. Sin embargo, se ha demostrado que la resistencia a quinolonas mediada por plásmidos del gen *qnrA* puede transferirse en el laboratorio a una *P. aeruginosa* de referencia mediante conjugación,¹⁵¹ abriendo la posibilidad de su acceso a estas especies en la naturaleza.

En la Tabla 37 se pueden observar un resumen de las CMI de diferentes quinolonas frente a algunas de las cepas clínicas publicadas y obtenidas de nuestro trabajo que contienen *qnrA* y de sus transconjugantes derivados.^{144,174,206,274} Como se puede observar las CMI de ciprofloxacino frente a los transconjugantes varían entre 0.125 y 2 µg/ml, lo cual representa un aumento de la CMI de 16 a 250 veces, en relación con la del recipiente *E. coli* J53 (0.008 µg/ml).²⁷⁴ Además, parece que la actividad de diferentes quinolonas frente a QnrA, como sitafloxacino, BAYy3118 y premafloxacino es mayor que la de ciprofloxacino tanto en los transconjugantes como en los donadores.²⁷⁴ De acuerdo a las normas del CLSI, QnrA por sí solo confiere resistencia a ácido nalidíxico, pero no a fluoroquinolonas.²⁷⁴

Los transconjugantes procedentes de las cepas *K. pneumoniae* N5, *K. pneumoniae* 1960 y *K. pneumoniae* K149 presentaron una reducción de la sensibilidad a ácido nalidíxico de 8-16 veces y a ciprofloxacino de 16-64 veces con respecto a la cepa receptora *E. coli* J53.

Tabla 37. Valores publicados de sensibilidad ($\mu\text{g/ml}$) a diferentes quinolonas en cepas clínicas de *E. coli* y *K. pneumoniae* que presentan el gen *qnrA* y sus transconjugantes derivados.

Quinolonas	<i>E. coli</i> J53	Donadores		Transconjugantes	
		<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>
Ácido Nalidíxico	4	≥ 256	32- ≥ 256	8-32	16-32
Ciprofloxacino	0.008	16- ≥ 256	2-16	0.125-2	0.25-0.5
Norfloxacino	0.06	1- ≥ 256	2-16	1	1-2
Ofloxacino	0.06	0.5- ≥ 256	4	0.5-1	1
Levofloxacino	0.015	≥ 32	2-32	0.25-1	0.25-0.5
Moxifloxacino	0.008	32- ≥ 64	2-32	0.5-1	0.5-1
Gatifloxacino	0.008	16- ≥ 32	2-32	0.25-1	0.25-0.5
Sparfloxacino	0.015	16- ≥ 64	2-64	0.25-2	0.5-1
BAYy3118	0.004	4-32	0.5-8	0.06-0.25	0.125
Sitafloxacino	0.008	4-16	0.5-8	0.06-0.25	0.125
Premafloxacino	0.03	16- ≥ 64	2-16	0.25-0.5	0.25

Tanto los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral como los datos publicados en la literatura indican que la transferencia de la resistencia a quinolonas mediada por el gen plasmídico *qnrA* se asocia con resistencia a otros grupos de antimicrobianos como β -lactámicos, aminoglucósidos, rifampicina, tetraciclina, cloranfenicol, trimetoprim o sulfamidas.^{36,109,110,114,151,174,184,206,216,273,275} Esto es debido a que *qnrA* se encuentra asociado a plásmidos de multiresistencia junto a otras estructuras como transposones o integrones como detallamos posteriormente.

Hay que señalar que la presencia de *qnrA* en los transconjugantes estudiados se muestra estable tras sucesivos pases en medios sin presión antibiótica, permaneciendo el fenotipo de resistencia a quinolonas, así como otras resistencias, con la excepción de un caso donde se perdió la resistencia a quinolonas, y también la asociada a trimetoprim+sulfamethoxazol, cloranfenicol y tetraciclina.²⁷⁵ El plásmido que poseía este transconjugante en particular tenía un tamaño ligeramente inferior al esperado, indicando que al menos en este caso parte del integrón se pudo perder durante el proceso de conjugación.²⁷⁵ Estos resultados estarían en consonancia con nuestras observaciones, en las que en los diferentes ensayos de conjugación se

obtuvieron transconjugantes en los que, manteniéndose la resistencia a β -lactámicos, la resistencia a quinolonas habría desaparecido.

La resistencia a quinolonas mediada por plásmidos, aunque produce resistencia de bajo nivel, parece que facilita la selección de resistencia de alto nivel a quinolonas.¹⁵¹ Se sabe desde hace tiempo que los plásmidos que median resistencia a bajas concentraciones de estreptomina incrementan la selección de niveles mayores de resistencia.¹⁹³ En nuestro modelo de eficacia de fluoroquinolonas en la neumonía experimental murina producida por cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de QnrA y deficientes en porinas la frecuencia de aparición de mutantes es mayor en las cepas que producen QnrA, tanto en el modelo *in vitro* como *in vivo*. En este modelo, las CMI de ciprofloxacino, levofloxacino y moxifloxacino aumentaron de 8 a 32 veces, pasando de 0.25-0.5 $\mu\text{g/ml}$ (sensibles) a 4 $\mu\text{g/ml}$ (resistentes), lo cual está en concordancia con el efecto aditivo previamente propuesto de los distintos mecanismos de resistencia a quinolonas y la presencia de *qnrA*.¹⁴⁹ Se piensa que la sensibilidad disminuida a un antimicrobiano permite a las poblaciones bacterianas alcanzar concentraciones a las cuales puede ocurrir la aparición de mutaciones secundarias que permiten la aparición de alta resistencia. Esto sería lo que ocurriría con la resistencia a estreptomina y a quinolonas codificada por el gen *qnrA*, donde la frecuencia de mutantes de alta resistencia aumenta en los transconjugantes respecto del recipiente *E. coli* J53 sin plásmido. Sin embargo, el efecto de *qnrA* o pMG252 (el plásmido que lo contiene) sobre la tasa de aparición de mutantes parece que no es extensible a cualquier antimicrobiano, ya que este fenómeno no se reproduce en el caso de rifampicina.¹⁵¹

En las 4 cepas de *K. pneumoniae* productoras de QnrA que se han mostrado en este estudio (cepas *K. pneumoniae* N5, *K. pneumoniae* 1960, *K. pneumoniae* 1132, *K. pneumoniae* K149), se identificó un plásmido de 160-kb aproximadamente que contenía el gen *qnrA* como se verificó mediante ensayos de hibridación con sonda. De acuerdo a los datos publicados, el tamaño de los plásmidos en los que se encuentra *qnrA* está entre 54-kb y más de 180-kb.^{109,151,164,206,273,275} En cambio la cepa *E. cloacae* Qn17 no mostró la

presencia de plásmidos en gel de agarosa, existiendo la posibilidad de una localización exclusivamente cromosómica de *qnrA* en este caso.

Los ensayos de conjugación mostraron que el gen *qnrA* estuvo presente en un plásmido conjugativo en las cepas de *Klebsiella pneumoniae* N5, 1960 y K149. La frecuencia de conjugación fue similar, con valores entre 10^{-5} - 10^{-6} . La cepa *K. pneumoniae* 1132 transfirió un plásmido que codifica la pACBL FOX-5, pero que no presenta *qnrA*. En un principio podría ser atribuido a la localización cromosómica de este determinante. Al menos en la cepa *Klebsiella pneumoniae* 1132 no fue así, ya que mediante electrotransformación del ADN plasmídico se obtuvieron transformantes en los que el plásmido sí codifica *qnrA*. Otra posibilidad es la de un plásmido no conjugativo, sin embargo en estos transformantes *qnrA* se localiza en un plásmido de tamaño similar al de los transconjugantes que también contienen el gen *bla*_{FOX-5}. Una última posibilidad sería la pérdida de la región que contiene el gen *qnrA* por recombinación homóloga. Este proceso ha quedado demostrada recientemente en estructuras similares a las que se encuentra *qnrA* (integrones de clase 1) para el gen *drfA10* con regiones repetidas corriente arriba y corriente abajo, lo que posibilita este proceso¹⁸⁸. Esta misma explicación sería válida para algunos transconjugantes obtenidos de las cepas *Klebsiella pneumoniae* N5 y *Klebsiella pneumoniae* 1960, en las que la resistencia a quinolonas se perdió. Además, se han notificado casos similares,^{109,112,114,144,206,273} así, por ejemplo, en un estudio sobre cepas de *E. coli* en China la transferencia de *qnrA* se observó en cinco de seis cepas en las que se detectó.²⁷⁵

Además de la movilidad de los genes de tipo *qnrA* a través de plásmidos conjugativos, éstos se encuentran formando parte de integrones de clase 1 de la familia In6-In7, conocidos también como integrones de tipo *Sul1*.^{144,206,250,273,275} Estas estructuras genéticas poseen duplicaciones de los genes *qacEΔ1* y *sul1*, entre las cuales se encuentra la fase de lectura abierta *orf513*.¹⁸⁸ Aunque no se ha demostrado aún, esta fase de lectura codificaría una proteína que actuaría como una recombinasa en la movilización de los genes localizados inmediatamente corriente abajo. Además, *qnrA* no presenta el elemento de 59 pb (o sitio *attC*) asociado a los genes estructurales de este

tipo de integrón. *qnrA* está precedido de regiones conservadas CR1 en la que el gen *orf513* codifica una recombinasa y existe un sitio de recombinación situado inmediatamente corriente abajo. En la Figura 50 se representa esquemáticamente una comparación de distintas estructuras publicadas que contienen el gen *qnrA* junto con los datos obtenidos de nuestro trabajo.

En la Figura 50 se refleja la variabilidad de las secuencias tanto corriente arriba como corriente abajo de *qnrA*, sugiriendo que el proceso que ha permitido la inserción de *qnrA* en integrones de clase 1 tipo In6-In7 ha ocurrido en diferentes ocasiones y puede variar. Respecto a la distancia que separa *qnrA* del elemento CR1 se han encontrado dos estructuras diferentes (Figura 51), lo cual correspondería con dos sucesos de movilización independientes.

Los resultados de esta Tesis Doctoral muestran la vinculación del gen *bla*_{VEB-1} que codifica la BLEE VEB-1 con el gen *qnrA* en cinco aislados clínicos (3 *E. coli* y 1 *E. cloacae* y 1 *Citrobacter freundii*) aislados en zonas geográficas aparentemente no relacionadas (Francia, Tailandia y Turquía). Como se observa en la Figura 34, tanto *qnrA* como *bla*_{VEB-1} (junto con *bla*_{OXA-10}) se encuentran dentro del mismo integrón lo cual da una oportunidad para la co-selección de la resistencia a β -lactámicos y quinolonas; además de a aminoglicósidos (*aadB*, *aacA1*, *aadA1*), cloranfenicol (*cmlA5*), rifampicina (*arr-2*) y sulfamidas (*sul1*). Esta estructura muestra una identidad casi perfecta con el integrón In53 en el que se describió el gen *bla*_{VEB-1}.¹⁶⁰ Por último, este integrón estuvo flanqueado por dos secuencias de inserción: IS26 localizada junto a la integrasa e IS5075 localizada en el extremo opuesto, las cuales podrían estar implicadas en la movilización de esta estructura constituyendo un transposón compuesto.

Como se ha comentado anteriormente, los aislados que presentan *qnrA*, expresan al mismo tiempo BLEEs como SHV-5^{164,275}, SHV-7²⁷⁵, SHV-12, CTX-M-14³⁶, CTX-M-15¹¹⁰ o VEB-1.^{144,206} También se ha informado su presencia en cepas con pACBL FOX-5.^{109,151}

Los determinantes *qnrB* detectados se han asociado a la presencia de la BLEE SHV-12.¹¹⁰

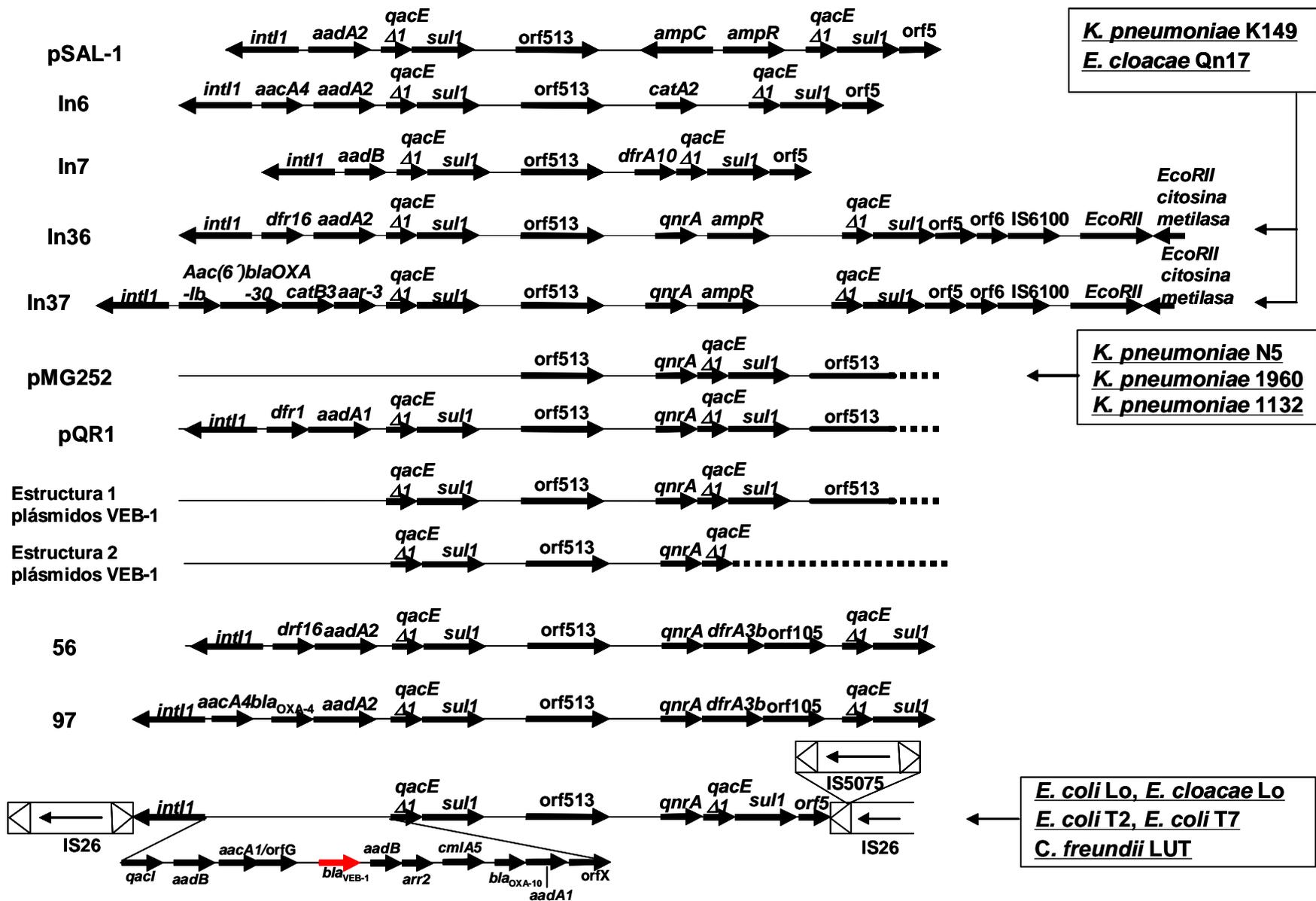


Figura 50. Comparación de la diversidad de entornos genéticos de *qnrA*.

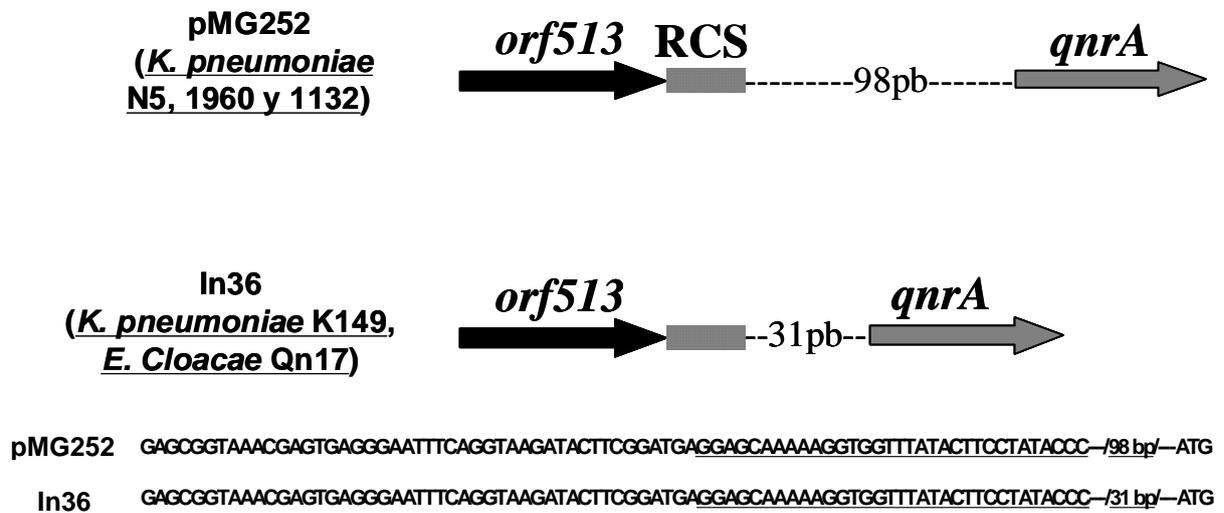


Figura 51. Representación esquemática de las estructuras CR1-*qnrA* descritas.

Es importante recalcar que esta asociación de genes de resistencia puede explicar al menos en parte la frecuente asociación entre resistencia a fluoroquinolonas y cefalosporinas de espectro extendido.¹⁸⁹ No se conoce si existe una unión en la emergencia de estas resistencias a través de estos mecanismos en enterobacterias, aunque de existir podría ser debida a la presión antibiótica ambiental.

En algunas de estas estructuras el gen *ampR* implicado en la regulación de la expresión de la cefalosporinasa codificada por el cromosoma de *Morganella morganii* se localiza justo corriente abajo de *qnrA*.²⁷⁵ Sin embargo, no se ha encontrado el gen *ampC* de la β -lactamasa cercano a esta estructura, con lo cual parece probable que la co-localización de *qnrA* y genes de β -lactamasas de espectro extendido dentro del mismo plásmido ha sido debida a sucesos genéticos no relacionados. En un integrón de tipo *Sul1* que contiene *qnrA* de una cepa de *E. coli* de China se ha identificado la presencia de repeticiones invertidas (IR) de 25 pb en la porción externa de la región 5'-CS e inmediatamente corriente debajo de la segunda copia de la región constante 3'-CS. Además, estas IR estuvieron circundadas por duplicaciones directas de

5pb (CTGTT), indicando la posibilidad de un proceso de transposición (aunque no se detectó ningún gen para la transposasa en las cercanías)²⁷⁵.

El ambiente genético de *qnrB* es actualmente desconocido, mientras que *qnrS* no forma parte de un integrón de clase 1, sino que se ha encontrado adyacente a un transposón Tn3 que contiene el gen *bla*_{TEM-1} (Figura 52).⁸⁵

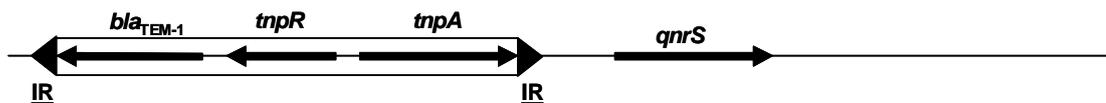


Figura 52. Entorno genético de *qnrS*.

Las diferencias en el nivel de expresión de los genes estructurales de un integrón pueden deberse a variaciones en la fuerza de los promotores, la posición relativa que ocupen los genes estructurales dentro del mismo,⁴¹ y en el caso de integrones que se encuentran en plásmidos se pueden deber al número de copias plasmídicas, existiendo una relación inversamente proporcional entre el número de copias y el tamaño del plásmido.

Aunque la distancia real del gen *qnrA* con los promotores P_{ant} y P_2 en las cepas de *K. pneumoniae* UAB1, N5, 1960 y 1132 no está totalmente determinada, es probable que esta sea demasiado grande como para influenciar su expresión. Los plásmidos en los que se encuentra *qnrA* en estas cepas presentan una serie de características similares como es una movilidad similar en gel, el entorno genético cercano de *qnrA* es el mismo y la producción de la pACBL FOX-5. Estos datos sugieren que estos plásmidos pueden tener un origen común, a pesar de que han sido aislados en diferentes puntos geográficos de los EE.UU.

De los resultados de los experimentos de conjugación obtenidos con el mismo donador con las cepas *K. pneumoniae* UAB1, N5, 1960 se obtuvieron transconjugantes con idéntico nivel de sensibilidad a quinolonas. Sin embargo,

la sensibilidad difirió en los transconjugantes obtenidos a partir de distintos donadores. Así los transconjugantes procedentes de la cepa UAB1 presentaron menor sensibilidad que los obtenidos de la cepa N5 ó 1960. En otros trabajos se han obtenido resultados similares en los que la sensibilidad de los transconjugantes frente a ciprofloxacino varió de 0.125 a 2 µg/ml.²⁷⁵

En las cepas clínicas *K. pneumoniae* UAB1 y N5 se obtuvo un mayor número de copias que en la cepa 1960, pero en este caso es difícil determinar la relación entre el número de copias y el nivel de resistencia debido a que pueden estar presentes en ellas otros mecanismos de resistencia. Sin embargo, en los transconjugantes analizados las diferencias en el número de copias fueron mínimas. La regulación de la replicación de estos plásmidos de amplio rango de hospedador no se conoce completamente y depende también del receptor.^{86,134,249} En este caso, al usar la misma cepa receptora (*E. coli* J53Az^R), las diferencias en el número de copias debidas a diferencias en la replicación del ADN plasmídico se pueden descartar. Nuestros datos sugieren que el número de copias no es el factor determinante para la resistencia.

Los estudios de expresión con los transconjugantes en *E. coli* muestran que las quinolonas aumentan la transcripción de *qnrA* (tanto ciprofloxacino como moxifloxacino), existiendo una buena correlación del nivel de transcripción de *qnrA* y el nivel de resistencia a quinolonas tanto a nivel basal como tras la inducción con quinolonas. Se ha descrito previamente que antimicrobianos como β-lactámicos o vancomicina pueden inducir la expresión de genes de resistencia como algunas AmpC adquiridas horizontalmente o genes cromosómicos implicados en la biosíntesis de la pared celular.^{4,22,24,61,124} También ciprofloxacino induce la expresión de genes vinculados con la respuesta al estrés oxidativo en *S. aureus*,¹⁸ y norfloxacino induce la respuesta SOS y otros genes de función desconocida en *E. coli*.²³⁴ En *P. aeruginosa*, el transportador MexXY se induce en presencia de antimicrobianos como los aminoglucósidos.²³⁷ La mayor expresión de *qnrA* en presencia de quinolonas tendría sentido para la supervivencia celular, ya que un incremento en la cantidad de transcritos de *qnrA* permitiría a las células responder rápidamente ante los efectos dañinos de estos antimicrobianos que inhiben la replicación del

ADN mediante la protección de las topoisomerasas tipo II. Es necesario determinar en estas cepas si *qnrA* se expresa desde el mismo promotor, y como afectarían estos promotores a la expresión. Además, se debe determinar si otros factores plasmídicos o cromosómicos afectan a la expresión de *qnrA*, o si otros genes plasmídicos contribuyen a la disminución de la sensibilidad a quinolonas. Este podría ser el caso del gen de la acetiltransferasa de aminoglucósidos AAC(6')-Ib modificada, publicado a finales de 2005, que es capaz de afectar la actividad de ciprofloxacino mediante N-acetilación del nitrógeno del grupo piperazinil. El gen de este enzima se ha localizado en plásmidos transferibles, al igual que *qnrA*, y confiere bajo nivel de resistencia a quinolonas (un aumento de la CMI de ciprofloxacino de 3 veces).²¹⁷

El papel de los integrones de clase 1 en la adquisición, diseminación y expresión de genes de resistencia a antimicrobianos está bien establecido en la familia de la *Enterobacteriaceae*.^{81,214} Los integrones de clase 1 denominados de tipo *Sul1* se definen porque poseen unas estructuras en la que el gen *orf513*, que posiblemente codifica una recombinasa, junto a genes adquiridos (normalmente de resistencia a antimicrobianos) se encuentran adyacentes a la región 3'-CS1 del integrón y normalmente flanqueado por una segunda copia del complejo *qacEΔ1/sul1* (3'-CS2). El gen *orf513* se encuentra asociado en su extremo 3' a un sitio de recombinación y ambos constituyen la región común CR1. Es en esta estructura en la que se ha descrito el gen *qnrA* como se comentó anteriormente. Se han descrito estructuras similares a CR1 como CR2, CR3 y CR4 que codifican las recombinasas putativas OrfA, Orf2 y Orf495, respectivamente, que comparten un 66%, 55% y 54% de identidad aminoacídica con Orf513.¹⁸⁸ Partridge S.R. y col. han sugerido que estos elementos CR están implicados en la movilización de los genes localizados corriente abajo.¹⁸⁸

En el caso del gen *qnrA*, sólo se habían identificado las secuencias promotoras P_{ant} localizadas en el interior de la integrasa en dos transconjugantes diferentes. Estas secuencias fueron las mismas (TGGACA-17pb-TAAACT) y estuvieron demasiado distantes como para afectar la

expresión de *qnrA*.²⁷⁵ Además, existe un trabajo en el que se muestran las secuencias promotoras proporcionadas por CR1 para la expresión de *qnrA*.¹⁴⁴

El objetivo de nuestro trabajo fue, en primer lugar, confirmar el papel del elemento CR1 en la expresión de *qnrA* en las dos estructuras en las que ha sido descrito dicho gen, respecto a la distancia que separa al elemento CR1 de *qnrA* (Figura 51), y, adicionalmente, analizar si este elemento promueve la expresión de otros genes de resistencia a antimicrobianos no relacionados. En resumen, los resultados de nuestro trabajo muestran que el elemento CR1 proporciona las secuencias promotoras para la expresión de los genes *qnrA*, *dfrA10* y *bla*_{CTX-M-9} en las cepas y estructuras analizadas (independientemente de la distancia que separa al elemento CR1 del gen de resistencia en el caso de los genes *qnrA* y *bla*_{CTX-M-9}). Sin embargo, no estuvo sistemáticamente implicado en la expresión de los genes de resistencia asociados (como fue el caso de *bla*_{CTX-M-2}). El promotor denominado P_{CR1-2} responsable de la expresión de *qnrA* correspondió con el informado previamente para la cepa *E. coli* Lo,¹⁴⁴ la cual presenta una secuencia similar a la de pMG252.²⁵⁰ En este trabajo se ha identificado un nuevo promotor denominado P_{CR1-1} , responsable de la expresión de *qnrA* tanto en *E. coli* Lo (similar a pMG252) como en *K. pneumoniae* K149 (similar a In36²⁷⁵). Este promotor estuvo también implicado en la expresión de *dfrA10* y *bla*_{CTX-M-9}. En el caso de la cepa *E. coli* Lo, la existencia de dos promotores implicados en la expresión de *qnrA* podría incrementar el nivel de producción de QnrA. En el caso de ambos promotores las secuencias se encontraron en el interior del elemento CR1, mostrando la implicación de este elemento en la expresión de genes de resistencia.

En el caso del gen *bla*_{CTX-M-2}, éste se expresó desde su promotor original, localizado entre el elemento CR1 y el gen de resistencia. La causa más probable para que en este caso CR1 no esté implicado en la expresión del gen de resistencia es la excesiva distancia entre ellos (266 pb). También el elemento CR4 analizado proporcionó la caja -35 para la constitución de un promotor híbrido responsable de la expresión del gen *bla*_{SPM-1} en la cepa *P. aeruginosa* 23.

Finalmente, los resultados de este estudio enfatizan que el elemento CR1 puede no estar solo implicado en la movilización de genes de resistencia a antimicrobianos, sino que juega un papel activo en la transcripción (expresión) de éstos proporcionando las secuencias promotoras en diferentes especies de bacterias gramnegativas. La existencia de diferentes promotores puede depender del gen de resistencia que se expresa, la distancia entre CR1 y dicho gen, y de la especie y cepa clínica en que se encuentre. Parece que los genes de resistencia pueden expresarse débilmente en sus hospedadores o reservorios originales como se ha observado en el caso del bajo nivel de resistencia a cefalosporinas en *Kluyvera ascorbata* y *Kluyvera georgiana* que son progenitores de los genes de β -lactamasas mediados por plásmido *bla*_{CTX-M-2} y *bla*_{CTX-M-8}, respectivamente.^{104,201} Otro ejemplo puesto de manifiesto a lo largo del desarrollo de esta Tesis Doctoral es la total sensibilidad a quinolonas de *Shewanella algae* siendo progenitor del gen de resistencia a quinolonas mediado por plásmido *qnrA*. De este modo, los elementos CR (y en concreto CR1) pueden ser una potente herramienta para la obtención de resistencia a antimicrobianos con significación clínica.

Desde un punto de vista práctico se ha informado previamente la problemática del uso de sistemas automáticos en la detección de resistencia a fluoroquinolonas, aunque las nuevas adaptaciones y actualizaciones han solucionado parte de estos problemas.⁵⁰ De este modo, nos pareció interesante analizar como los sistemas comerciales automatizados para el estudio de la sensibilidad se afectan por la presencia de un nuevo mecanismo de resistencia como es la resistencia plasmídica a quinolonas mediada por el gen *qnrA*. Se realizó un análisis de las cepas clínicas y sus transconjugantes que contienen *qnrA* y la β -lactamasa *bla*_{FOX-5} con los sistemas automáticos BD Phoenix (BD Diagnostic Systems, Sparks, Md, EE.UU.), MicroScan WalkAway (Dade Behring, Inc., West Sacramento, Calif.), VITEK-2 (bioMérieux-Vitek, Hazelwood, Mo.) y Wider (Francisco Soria Melguizo, S.A., Madrid, España).

Estos sistemas mostraron más errores mayores y errores máximos en la detección de resistencia a quinolonas que a β -lactámicos en la cepas

analizadas. Sin embargo, se detectó un alto número de errores menores agrupados en torno a los valores de sensibilidad intermedia tanto para quinolonas como β -lactámicos. El sistema MicroScan WalkAway (Dade Behring, Inc., West Sacramento, Calif.) mostró ser el más eficaz, ya que no presentó errores mayores o errores máximos.

El sistema experto de BD Phoenix (BD Diagnostic Systems, Sparks, Md, EE.UU.) señaló la posibilidad de la presencia de una β -lactamasa de espectro extendido en todas las cepas estudiadas, y el sistema VITEK-2 (bioMérieux-Vitek, Hazelwood, Mo.) hizo una recomendación para el cambio de categoría clínica de todas las cefalosporinas al rango de resistentes. Las β -lactamasas AmpC plasmídicas están incrementado su número entre aislados de *K. pneumoniae* y *E. coli* en los últimos años. El CLSI no presenta recomendaciones específicas para la detección de las cepas de *K. pneumoniae* que producen este tipo de β -lactamasas, pero parece razonable que se considerasen resistentes a todos los β -lactámicos, con excepción de las carbapenemas y, probablemente, las cefalosporinas anfóteras como cefepima o cefpiroma.

Por último, muchos de los errores menores notificados tanto para β -lactámicos como para quinolonas pertenecen a CMI's agrupadas en torno a puntos de sensibilidad intermedia. De este modo, un cambio en la CMI de una dilución para un microorganismo produce un error menor. Los paneles y tarjetas de estos sistemas automáticos contienen un número limitado para la determinación de la sensibilidad. Por esta razón, ya que la sensibilidad intermedia depende de una única dilución, un error en un único pocillo puede producir un resultado incorrecto. De acuerdo a nuestros resultados, si excluimos los errores debidos a una sola dilución con el método de referencia, la mayoría de los errores menores habrían sido eliminados, incluyendo los errores máximos en el caso del ácido nalidíxico para el cual no existe el nivel de sensibilidad intermedia.

La resistencia a quinolonas en *Enterobacteriaceae* es actualmente uno de los problemas más importantes en resistencia a antibióticos en España, en otros países europeos (www.earss.rivm.nl/) y EE.UU. (www.apua.org) y está aumentando en todo el mundo, como se ha comentado ampliamente.^{66,127} La actual aparición de la resistencia plasmídica a quinolonas mediada por el gen *qnrA* nos hizo plantearnos la cuestión de cual podría ser su reservorio natural, si especies gramnegativas de hábitat ambiental, humano o animal.

Como se ha demostrado en la sección de Resultados, el reservorio natural del gen *qnrA* se encuentra en el cromosoma de *Shewanella algae*, una bacteria gramnegativa perteneciente a la familia *Shewanellaceae* ampliamente distribuída en ambientes marinos y de agua dulce.^{165,177,263} *Shewanella putrefaciens* es otro patógeno humano²⁶ que en muchas ocasiones es confundido en infecciones realmente provocadas por *S. algae*.²⁶⁴ Las infecciones provocadas por *S. algae* son producidas mayoritariamente por exposición a ambientes de agua salada.²⁶³ Las cepas de *S. algae* usadas en este trabajo presentan un fenotipo de sensibilidad a quinolonas. Basándonos en este fenotipo, en un principio no se sospecharía la presencia del gen *qnrA*. Sin embargo, los niveles de resistencia a quinolonas de *S. algae* son cuatro a ocho veces mayores que los de *Shewanella putrefaciens* (muy relacionado genéticamente y que no presenta *qnrA* en su cromosoma).

En su especie reservorio, *qnrA* no se encuentra asociado a elementos CR o integrones como en el caso de los aislados clínicos descritos.^{144,206,216,273,275} Las secuencias promotoras localizadas sobre el elemento CR1 responsables de su alto nivel de expresión en *Enterobacteriaceae* no se encuentran en *S. algae*. Esto podría explicar la sensibilidad a quinolonas por parte de *S. algae* si *qnrA* se expresa débilmente.

Nuestros resultados indican que especies de bacterias gramnegativa de nichos ambientales, y no sólo de origen veterinario, pueden actuar como reservorio de genes de resistencia a antimicrobianos en su paso a patógenos humanos.^{283,290} El posible papel de los ambientes acuáticos como reservorio de genes de resistencia ha sido puesto de manifiesto.

Poirel L. y col. han publicado recientemente que otra especie de *Shewanella*, *Shewanella onediensis*, es el reservorio natural de OXA-48, una oxacilinas con actividad carbapenemasa codificada por plásmido identificada en *K. pneumoniae*.²⁰⁰ Estos datos indican la posibilidad de intercambios genéticos entre *Shewanellaceae* y *Enterobacteriaceae* en el medio natural. Además, estos datos añaden conocimiento al origen de genes de resistencia a antibióticos con significación clínica, lo cual ha sido establecido sin ambigüedad en muy pocos casos, como por ejemplo el origen en enterobacterias de genes de β -lactamasas de tipo AmpC, y BLEEs como SHV o CTX-M;^{104,196,201} y para determinantes de resistencia a tetraciclina en micobacterias con un origen en *Streptomyces rimosus*.¹⁸⁶

Las quinolonas, usadas como tratamiento en humanos, se usan ampliamente en acuicultura,¹⁷⁵ ya que son moléculas sintéticas estables en ambientes acuáticos.²⁵⁶ Una posibilidad es que las concentraciones subinhibitorias de quinolonas en ambientes acuáticos pueden favorecer la selección de cepas de *S. algae* y potenciar la transferencia de este gen de resistencia a quinolonas a *Enterobacteriaceae*. El papel de las quinolonas para inducir esta transferencia genética puede estar relacionado con la inducción del sistema de reparación bacteriano SOS, como se ha sugerido previamente.¹⁷

Además de *qnrA*, el primer gen de resistencia a quinolonas asociado a un elemento de movilidad horizontal (plásmidos conjugativos) descrito, recientemente han aparecido *qnrB* y *qnrS*,^{85,110} pertenecientes también a la familia de los pentapéptidos repetidos asociados a plásmidos conjugativos y confiriendo resistencia a quinolonas. QnrB y QnrS comparten un 41% y un 60% de identidad aminoacídica con QnrA, respectivamente. *Vibrio parahaemolyticus* posee también una proteína homóloga de QnrA que comparte un 58% de identidad aminoacídica.²²⁵

Para aclarar el origen de los genes mediados por plásmidos *qnrB* y *qnrS*, se procedió a realizar una búsqueda mediante BLAST en la base de datos del GeneBank. Algunas proteínas hipotéticas en el genoma de *Vibrio vulnificus* (AA007889), *Vibrio parahaemolyticus* (BAC61438), *Vibrio fischerii* (AAW85819)

y *Photobacterium profundum* (CAG22829) compartían homología significativa con el determinante QnrA. En esta búsqueda no se encontró ningún homólogo de genes tipo *qnr* en el genoma de *Vibrio cholerae*.

Una vez que estos genes se expresaron en *E. coli*, los plásmidos recombinantes que contienen estos genes tipo *qnr* confieren una reducción significativa de la sensibilidad a fluoroquinolonas, mayor que a quinolonas. Los valores de CMI de estos antimicrobianos son similares en todos los genes tipo *qnr* clonados, incluyendo los resultados obtenidos para *S. algae* CIP106454. El mayor nivel de expresión de los genes tipo *qnr* puede depender de la presencia de elementos genéticos (elementos CR, secuencias de inserción,...), como ocurre en el caso del gen mediado por plásmido *qnrA*.

La similitud de las secuencias de los genes tipo *qnr* de las cepas usadas en este trabajo con las depositadas en la base de datos del NCBI (no más de tres aminoácidos de diferencia) indican un alto grado de conservación, al igual que ha ocurrido en el caso de *qnrA* y *S. algae*. La comparación de las secuencias aminoacídicas mostró que estos genes cromosómicos comparten entre sí una identidad de entre el 41% y el 75%. Todos estas proteínas de tipo Qnr cromosómicas pertenecen a la familia de los pentapéptidos repetidos, definidas por la presencia de repeticiones en tandem de la secuencia consenso A(D/N)LXX, donde X es cualquier aminoácido.^{15,174} Tanto las proteínas Qnr plasmídicas como cromosómicas están constituidas por dos dominios de 11 y 32 unidades conectadas por una única glicina, como se observó para QnrA.¹⁷⁴ En el caso particular de las proteínas tipo Qnr, la secuencia consenso que se podría proponer sería A/C D/N L/F S/R G/R.

Durante la realización de este trabajo, se ha publicado la clonación en *E. coli* de otro determinante Qnr del genoma de la cepa de referencia *V. parahaemolyticus* VPA0095. Los autores informan de una proteína mutante de tipo Qnr obtenida durante el proceso de clonación con una sustitución de una cisteína a tirosina en la posición 115.²²⁵ Parece que esta mutación confiere un mayor nivel de resistencia a quinolonas y fluoroquinolonas.²²⁵ Ya que el resto de determinantes Qnr cromosómicos y plasmídicos contienen esta misma

cisteína en la posición 115, sería muy interesante realizar estudios de mutagénesis para evaluar el papel de los cambios en esta posición sobre los niveles de resistencia a fluoroquinolonas con significación clínica.

A partir de los datos de que disponemos, existen indicios para pensar que ciertas especies de bacterias gramnegativas de ambientes acuáticos tales como *Shewanella* o *Vibrionaceae* actúan como reservorio de genes de resistencia a quinolonas tipo Qnr. El origen de los genes codificados por plásmido *qnrB* y *qnrS* es todavía incierto. Su reservorio se podría encontrar en otras bacterias de ambientes acuáticos como *Aeromonadaceae* o *Plesiomonas*.

Por último, el conocimiento de las secuencias de ADN de estos genes de tipo *qnr* de *Vibrionaceae* será de utilidad para el diseño de herramientas para la detección de nuevos genes de tipo *qnr* mediados por plásmidos que puedan haberse movilizado a bacterias patógenas, sobre todo en *Enterobacteriaceae*.

Los resultados de esta Tesis Doctoral sugieren que la producción de QnrA puede tener relevancia clínica *in vivo* cuando el gen se expresa en cepas de *K. pneumoniae* con mecanismos adicionales de resistencia a quinolonas. Esto es importante ya que la mayoría de las cepas que contienen *qnrA* son multirresistentes.^{110,114,273,275}

El modelo que hemos desarrollado es adecuado para estudiar los cambios histopatológicos característicos de la neumonía y el recuento de bacterias en los pulmones infectados. Además, sólo el 14-26% de los animales no tratados sobrevivieron a la infección, permitiéndonos evaluar el impacto de las fluoroquinolonas sobre la mortalidad. Si bien las tres fluoroquinolonas usadas produjeron una disminución de 3 log₁₀ de recuento bacteriano en pulmones de animales infectados con *K. pneumoniae* C2, esto no se observó para *K. pneumoniae* C2pMG252 debido al efecto de *qnrA*. Del mismo modo, se observó un 100% de supervivencia en los animales infectados con *K. pneumoniae* C2 al tratarlos con ciprofloxacino o levofloxacino en contraste a la menor supervivencia de los animales infectados con *K. pneumoniae* C2pMG252 y tratados con estos antimicrobianos. Sorprendentemente,

moxifloxacino fracasó en la reducción de la mortalidad en ambos casos, sobre todo después de observar su buena actividad bactericida *in vitro* sobre *K. pneumoniae* C2pMG252. Es paradójico que moxifloxacino a 4xCMI es menos bactericida contra *K. pneumoniae* C2 que contra *K. pneumoniae* C2pMG252. Esto se debe probablemente a que la cantidad absoluta de antimicrobiano usado fue más alta debido a la mayor CMI de moxifloxacino para *K. pneumoniae* C2pMG252. Otra observación interesante es que aunque moxifloxacino redujo el número de bacterias en pulmón, esta reducción fue menor (aunque no significativamente menor) que para las otras dos quinolonas estudiadas. Esta diferencia entre moxifloxacino y las otras dos quinolonas no se explica por diferencias en el parámetro AUC_{0-24}/CMI . Puede ocurrir que los mecanismos expresados por *K. pneumoniae* C2 sean más eficientes *in vivo* para moxifloxacino, pero se desconoce actualmente la razón para estas discrepancias.

El CLSI advierte sobre la posibilidad de fracaso terapéutico o retraso en la respuesta al tratamiento con fluoroquinolonas en pacientes con salmonelosis extraintestinal causada por cepas resistentes a ácido nalidíxico pero sensibles a fluoroquinolonas. No existen comentarios para otras *Enterobacteriaceae*.³⁸ Un reciente estudio⁵³ realizado sobre pacientes infectados con *K. pneumoniae* productora de la β -lactamasa de espectro extendido TEM-52 (sensible a ciprofloxacino, 0.38 $\mu\text{g/ml}$) indica que el tratamiento con ciprofloxacino se asoció a fracaso terapéutico o una respuesta parcial. En otro estudio en un modelo de ratas con granuloma, se obtuvo eficacia terapéutica con una dosis de 40 mg/kg de ciprofloxacino en una cepa sensible de *K. pneumoniae* (0.06 $\mu\text{g/ml}$), lo cual contrasta con la necesidad de una dosis de 200 mg/kg para obtener esta misma eficacia en una cepa de *K. pneumoniae* de bajo nivel de resistencia (0.5 $\mu\text{g/ml}$). Estos datos indican la contribución de la sensibilidad disminuida en la resistencia *in vivo*.⁶⁵ Nuestros resultados muestran que tanto ciprofloxacino como levofloxacino son eficaces en ratones infectados con una cepa de *K. pneumoniae* que contiene la sustitución S83F en GyrA, no presenta porinas y sí sistemas de expulsión activos de quinolonas y que son resistentes a ácido nalidíxico (CMI para ciprofloxacino 0.5 $\mu\text{g/ml}$). Es posible que las

diferencias entre los distintos estudios se deban a diferencias entre las cepas usadas. De este modo, parece razonable la realización de estudios adicionales para evaluar la relevancia clínica de los mecanismos que confieren resistencia de bajo nivel a quinolonas en *K. pneumoniae* y otros bacilos entéricos.

Se ha informado en modelos en animales que los valores de la razón AUC_{0-24}/CMI para alcanzar un efecto bacteriostático con quinolonas deben estar sobre 35.^{44,139} Este valor se alcanzó con *K. pneumoniae* C2, pero no con *K. pneumoniae* C2pMG252. Una razón C_{max}/CMI de 8-10, tanto *in vitro* como *in vivo*, previene la aparición de mutantes resistentes durante el tratamiento con quinolonas.⁴⁴ Del mismo modo, estos valores se obtuvieron para *K. pneumoniae* C2, pero no para *K. pneumoniae* C2pMG252.

En estudios anteriores,⁵⁹ se ha sugerido que el efecto inóculo en *E. coli* sobre la actividad de fluoroquinolonas es bastante débil, y menor que para β -lactámicos. En nuestro caso, se observó un efecto inóculo ($CMI > 128 \mu g/ml$ para fluoroquinolonas con un inóculo de 10^7 UFC/ml) tanto en *K. pneumoniae* C2 como en su transconjugante. La diferencia se puede deber nuevamente a la naturaleza de las cepas usadas. Éstas no contienen mecanismos específicos para reducir el acumulo intracelular de quinolonas, y sí una sustitución en la ADN girasa, con lo cual sólo con mutaciones adicionales en los genes *gyrA* y/o *parC* o en genes reguladores se facilitarían la aparición de mutantes de alto nivel de resistencia. De hecho hemos obtenido *in vitro* mutantes de ambas cepas usadas en nuestro estudio. Inesperadamente, el análisis de *gyrA* y *parC* reveló que no contenían cambios habitualmente relacionados con resistencia a quinolonas en *K. pneumoniae*.^{34,47,146,148} Es necesaria una caracterización de los mecanismos responsables de la resistencia en estos mutantes.

La presencia de QnrA incrementa la frecuencia de mutación *in vitro* de 2 a 36 veces, en consonancia con resultados anteriores.¹⁵¹ En este estudio, cuando las bacterias se aislaron de pulmones de animales tratados, la presencia de pMG252 incrementó la frecuencia de aparición de mutantes de 100 a 500 veces respecto al modelo *in vitro*. Esto se puede explicar por la exposición previa por el tratamiento con fluoroquinolonas de estas bacterias.

Por último, destacar que estos resultados indican que la expresión de QnrA en *K. pneumoniae* con mecanismos adicionales de resistencia causa fracaso terapéutico de las fluoroquinolonas en un modelo de neumonía en ratones.

7. CONCLUSIONES

1. La resistencia a quinolonas mediada por plásmidos se ha descrito en todo el mundo y está aumentando en los últimos años. La prevalencia de este mecanismo de resistencia en enterobacterias es baja (< 1%) si bien aumenta hasta el 10% en aislados resistentes a quinolonas, ceftazidima, cefotaxima, que expresan BLEEs o β -lactamasas tipo AmpC.
2. Los aislados clínicos que contienen el determinante de resistencia a quinolonas QnrA pueden ser resistentes, intermedios o sensibles a quinolonas.
3. La producción de QnrA reduce la sensibilidad a fluoroquinolonas, pero el nivel de resistencia que ocasiona no sobrepasa los puntos de corte habitualmente considerados para definir resistencia de importancia clínica. Este hecho dificulta la detección de este nuevo mecanismo de resistencia, ya que actualmente no existen marcadores fenotípicos específicos.

4. Los aislados clínicos que expresan *qnrA* suelen ser multirresistentes, observándose una coexistencia de este mecanismo con los genes que codifican las BLEEs SHV-5, SHV-7, SHV-12, CTX-M-14, CTX-M-15 o VEB-1, y con la pACBL FOX-5.
5. *qnrA* se encuentra formando parte de integrones de clase 1 de la familia In6-In7. Además, se ha determinado la co-localización de *qnrA* y el gen *bla*_{VEB-1} formando parte de un mismo integrón de clase 1.
6. El integrón descrito que contiene *qnrA* está flanqueado por dos secuencias de inserción, IS26 localizada junto al gen de la integrasa e IS5075 localizada en el extremo opuesto de dicho integrón. Ambas secuencias podrían estar implicadas en la movilización de esta estructura constituyendo un transposón compuesto.
7. Los estudios de expresión de *qnrA* en transconjugantes de *E. coli* muestran que ciprofloxacino y moxifloxacino aumentan la transcripción de *qnrA*, existiendo una buena correlación entre el nivel de transcripción de *qnrA* y el nivel de resistencia a quinolonas.
8. Los elementos CR1, constituidos por el gen *orf513* y un sitio de recombinación, contienen las regiones promotoras responsables para la expresión de *qnrA*, pudiendo proporcionar al menos dos promotores diferentes, P_{CR-1} y P_{CR-2} .
9. En paralelo, los elementos CR pueden proporcionar secuencias promotoras de un modo general a los genes localizados en su extremo 3', como se ha demostrado en el caso de CR1 y *qnrA*, *dfrA10* y *bla*_{CTX-M-9}, y CR4 y *bla*_{SPM-1}, constituyendo una potente herramienta para la obtención de resistencia a antimicrobianos con significación clínica.

10. Los sistemas automáticos y semiautomáticos utilizados en el laboratorio de Microbiología para la determinación de la sensibilidad de las enterobacterias a los antimicrobianos no son completamente fiables para establecer la categoría clínica de fluoroquinolonas en aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* o sus transconjugantes derivados en *E. coli* que producen QnrA.
11. El reservorio natural del gen *qnrA* se encuentra en el cromosoma de *Shewanella algae*, una bacteria gramnegativa perteneciente a la familia *Shewanellaceae* ampliamente distribuida en ambientes marinos y de agua dulce. Estas bacterias podrían actuar como reservorio de genes de resistencia a antimicrobianos para determinados patógenos humanos.
12. Ciertas especies de bacterias gramnegativas de ambientes acuáticos como las de la familia *Vibrionaceae* actúan como reservorio de genes de resistencia a quinolonas tipo *qnr*. El origen de los genes *qnrB* y *qnrS*, codificados por plásmidos, es todavía incierto.
13. La producción de QnrA tiene relevancia clínica *in vivo*. En un modelo murino de neumonía causado por *Klebsiella pneumoniae* productor de QnrA y que posee mecanismos adicionales de resistencia a quinolonas se observó un fracaso terapéutico con fluoroquinolonas.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Adewoye, L., Sutherland, A., Srikumar, R. & Poole, K. The mexR repressor of the mexAB-oprM multidrug efflux operon in *Pseudomonas aeruginosa*: characterization of mutations compromising activity. *J. Bacteriol.* **184**, 4308-4312 (2002).
2. Alekshun, M. N. & Levy, S. B. Alteration of the repressor activity of MarR, the negative regulator of the Escherichia coli marRAB locus, by multiple chemicals in vitro. *J. Bacteriol.* **181**, 4669-4672 (1999).
3. Alekshun, M. N. & Levy, S. B. Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: the mar regulon. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 2067-2075 (1997).
4. Allen, N. E. & Hobbs, J. N., Jr. Induction of vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* by non-glycopeptide antibiotics. *FEMS Microbiol. Lett.* **132**, 107-114 (1995).
5. Alonso, A. & Martínez, J. L. Expression of multidrug efflux pump SmeDEF by clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 1879-1881 (2001).
6. Alos, J. I. Quinolonas. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **21**, 261-267 (2003).
7. Alos, J. I., Oteo, J., Aracil, B. & Gómez-Garces, J. L. Comparative *in vitro* study of the activity of moxifloxacin and other antibiotics against 150 strains of penicillin non-susceptible *Streptococcus pneumoniae* and against 110 strains of ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*

- isolated in 1999-2000 in Spain. *J. Antimicrob. Chemother.* **48**, 145-148 (2001).
8. Andriole, V. T. The future of the quinolones. *Drugs* **58 Suppl 2**, 1-5 (1999).
 9. Arakawa Y, Murakami M., Suzuki K., Ito H., Wacharotayankun R., Ohsuka S., Kato N. & Ohta M. A novel integron-like element carrying the metallo-beta-lactamase gene blaIMP. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 1612-1615 (1995).
 10. Asensio, C. & Pérez-Díaz, J. C. A new family of low molecular weight antibiotics from enterobacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **69**, 7-14 (1976).
 11. Bachoual, R., Tankovic, J. & Soussy, C. J. Analysis of the mutations involved in fluoroquinolone resistance of *in vivo* and *in vitro* mutants of *Escherichia coli*. *Microb. Drug Resist.* **4**, 271-276 (1998).
 12. Baranova, N. & Nikaido, H. The *baeSR* two-component regulatory system activates transcription of the *yegMNOB* (*mdtABCD*) transporter gene cluster in *Escherichia coli* and increases its resistance to novobiocin and deoxycholate. *J. Bacteriol.* **184**, 4168-4176 (2002).
 13. Bassam, B. J., Caetano-Anolles, G. & Gresshoff, P. M. DNA amplification fingerprinting of bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 70-76 (1992).
 14. Bastarrachea, F. On the origin of plasmid-borne, extended-spectrum, antibiotic resistance mutations in bacteria. *J. Theor. Biol.* **190**, 379-387 (1998).
 15. Bateman, A., Murzin, A. G. & Teichmann, S. A. Structure and distribution of pentapeptide repeats in bacteria. *Protein Sci.* **7**, 1477-1480 (1998).
 16. Bauernfeind, A., Wagner, S., Jungwirth, R., Schneider, I. & Meyer, D. A novel class C beta-lactamase (FOX-2) in *Escherichia coli* conferring resistance to cephamycins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 2041-2046 (1997).
 17. Beaber, J. W., Hochhut, B. & Waldor, M. K. SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature* **427**, 72-74 (2004).
 18. Becerra, M. C. & Albesa, I. Oxidative stress induced by ciprofloxacin in *Staphylococcus aureus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **297**, 1003-1007 (2002).
 19. Berg D.E. & Howe M.M. *Mobile DNA*. American Society for Microbiology (ASM). Washington DC (1989).
 20. Bergogne-Berezin, E. Clinical role of protein binding of quinolones. *Clin. Pharmacokinet.* **41**, 741-750 (2002).

21. Black, K., Buikema, W. J. & Haselkorn, R. The *hglK* gene is required for localization of heterocyst-specific glycolipids in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* **177**, 6440-6448 (1995).
22. Bonnet R., Chanal C., Ageron E., Sirot D., De Champs C., Grimont P., Sirot J. Inducible AmpC beta-lactamase of a new member *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 3316-3319 (2002).
23. Bouza, E., López, M. D., Bernaldo de Quiros, J. C. & Rodríguez-Creixems, M. Ciprofloxacin in patients with bacteremic infections. The Spanish Group for the Study of Ciprofloxacin. *Am. J. Med.* **87**, 228S-231S (1989).
24. Boyle-Vavra, S., Yin, S., Challapalli, M. & Daum, R. S. Transcriptional induction of the penicillin-binding protein 2 gene in *Staphylococcus aureus* by cell wall-active antibiotics oxacillin and vancomycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 1028-1036 (2003).
25. Bradford P.A., Urban C., Mariano N., Projan S.J., Rahal J.J. & Bush K. Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC beta-lactamase, and the lost of an outer membrane protein. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 563-569 (1997).
26. Brink, A. J., van, S. A. & van Rensburg, A. J. *Shewanella (Pseudomonas) putrefaciens* bacteremia. *Clin. Infect. Dis.* **20**, 1327-1332 (1995).
27. Brisson-Noel, A., Arthur, M. & Courvalin, P. Evidence for natural gene transfer from gram-positive cocci to *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **170**, 1739-1745 (1988).
28. Bryskier, A. & Chantot, J. F. Classification and structure-activity relationships of fluoroquinolones. *Drugs* **49 Suppl 2**, 16-28 (1995).
29. Burman, L. G. Apparent absence of transferable resistance to nalidixic acid in pathogenic Gram-negative bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* **3**, 509-516 (1977).
30. Burrus, V., Pavlovic, G., Decaris, B. & Guedon, G. Conjugative transposons: the tip of the iceberg. *Mol. Microbiol.* **46**, 601-610 (2002).
31. Cambau, E., Bordon, F., Collatz, E. & Gutmann, L. Novel *gyrA* point mutation in a strain of *Escherichia coli* resistant to fluoroquinolones but not to nalidixic acid. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**, 1247-1252 (1993).
32. Cano, M. E., Martínez-Martínez, L., García-Lobo, J. M., Calvo, J. & Agüero, J. Detection of *orf513* and *qnrA* among multiresistant gramnegative clinical isolates in Spain. *Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy* C1-1043-74 (2005).

33. Cano, M.E., Rodríguez-Martínez, J.M., Agüero, J., Pascual, A., García-Lobo, J.M., Velasco, C. & Martínez-Martínez, L. Detection of *qnrS* in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* in Spain. 16th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious (2006).
34. Chen, F. J., Lauderdale, T. L., Ho, M. & Lo, H. J. The roles of mutations in *gyrA*, *parC*, and *ompK35* in fluoroquinolone resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Microb. Drug Resist.* **9**, 265-271 (2003).
35. Chen, S., Zhang, A., Blyn, L. B. & Storz, G. *MicC*, a second small-RNA regulator of Omp protein expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **186**, 6689-6697 (2004).
36. Cheung T.K., Chu Y.W., Chu M.Y., Ma C.H., Yung R.W., Kam K.M. Plasmid-mediated resistance to ciprofloxacin and cefotaxime in clinical isolates of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis in Hong Kong. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**, 586-596 (2005).
37. Chu, D. T. & Fernandes, P. B. Structure-activity relationships of the fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**, 131-135 (1989).
38. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Fifteenth informational supplement. Document M100-S15. *Clinical and Laboratory Standards*, Wayne, Pa. *Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS*. (2005).
39. Cohen, S. P., McMurry, L. M., Hooper, D. C., Wolfson, J. S. & Levy, S. B. 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.* **33**, 1318-1325 (1989).
40. Cohen, S. P., Yan, W. & Levy, S. B. A multidrug resistance regulatory chromosomal locus is widespread among enteric bacteria. *J. Infect. Dis.* **168**, 484-488 (1993).
41. Collis, C. M. & Hall, R. M. Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 155-162 (1995).
42. Corkill, J. E., Anson, J. J. & Hart, C. A. High prevalence of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnrA* in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* from blood cultures in Liverpool, UK. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**, 1115-1117 (2005).
43. Courvalin, P. Plasmid-mediated 4-quinolone resistance: a real or apparent absence? *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**, 681-684 (1990).
44. Craig, W. A. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clin. Infect. Dis.* **26**, 1-10 (1998).

45. Cullen M., Steven N., Billingham L., Gaunt C., Hastings M., Simmonds P., Stuart N., Rea D., Bower M., Fernando I., Huddart R., Gollins S., Stanley A.; Simple Investigation in Neutropenic Individuals of the Frequency of Infection after Chemotherapy +/- Antibiotic in a Number of Tumours (SIGNIFICANT) Trial Group. Antibacterial prophylaxis after chemotherapy for solid tumors and lymphomas. *N. Engl. J. Med.* **353**, 988-998 (2005).
46. Cullen, M. E., Wyke, A. W., Kuroda, R. & Fisher, L. M. Cloning and characterization of a DNA gyrase A gene from *Escherichia coli* that confers clinical resistance to 4-quinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**, 886-894 (1989).
47. Deguchi T., Fukuoka A., Yasuda M., Nakano M., Ozeki S., Kanematsu E., Nishino Y., Ishihara S., Ban Y., Kawada Y.. Alterations in the GyrA subunit of DNA gyrase and the ParC subunit of topoisomerase IV in quinolone-resistant clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 699-701 (1997).
48. Derbyshire, K. M., Kramer, M. & Grindley, N. D. Role of instability in the cis action of the insertion sequence IS903 transposase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **87**, 4048-4052 (1990).
49. Dinh, T., Paulsen, I. T. & Saier, M. H., Jr. A family of extracytoplasmic proteins that allow transport of large molecules across the outer membranes of gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **176**, 3825-3831 (1994).
50. Doern, G. V., Torres, B. B., Jankins, M. & Jones, R. N. Accurate characterization of ofloxacin susceptibility with *Enterobacteriaceae* using a modified GNS F6 card and the bioMerieux Vitek System. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **25**, 133-135 (1996).
51. Doolittle, W. F., Kirkwood, T. B. & Dempster, M. A. Selfish DNAs with self-restraint. *Nature* **307**, 501-502 (1984).
52. Ellington, M. J., Hope, R., Turton, J., Livermore, D. M. & Woodford, N. *Enterobacter spp.* with *qnrA* are widely scattered among hospitals in South-East (SE) England. *Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy* C2-786-119 (2005).
53. Endimiani A., Luzzaro F., Perilli M., Lombardi G., Coli A., Tamborini A. & Amicosante G., Toniolo A. Bacteremia due to *Klebsiella pneumoniae* isolates producing the TEM-52 extended-spectrum beta-lactamase: treatment outcome of patients receiving imipenem or ciprofloxacin. *Clin. Infect. Dis.* **38**, 243-251 (2004).
54. Engberg, J., Aarestrup, F. M., Taylor, D. E., Gerner-Smidt, P. & Nachamkin, I. Quinolone and macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: resistance mechanisms and trends in human isolates. *Emerg. Infect. Dis.* **7**, 24-34 (2001).

55. Espósito, A. L. & Pennington, J. E. Effects of aging on antibacterial mechanisms in experimental pneumonia. *Am. Rev. Respir. Dis.* **128**, 662-667 (1983).
56. Everett, M. J., Jin, Y. F., Ricci, V. & Piddock, L. J. Contributions of individual mechanisms to fluoroquinolone resistance in 36 *Escherichia coli* strains isolated from humans and animals. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**, 2380-2386 (1996).
57. Ferrero, L., Cameron, B. & Crouzet, J. Analysis of *gyrA* and *griA* mutations in stepwise-selected ciprofloxacin-resistant mutants of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 1554-1558 (1995).
58. Fink M.P., Snyderman D.R., Niederman M.S., Leeper K.V. Jr., Johnson R.H., Heard S.O., Wunderink R.G., Caldwell J.W., Schentag J.J. & Siami G.A. Treatment of severe pneumonia in hospitalized patients: results of a multicenter, randomized, double-blind trial comparing intravenous ciprofloxacin with imipenem-cilastatin. The Severe Pneumonia Study Group. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 547-557 (1994).
59. Firsov, A. A., Vostrov, S. N., Kononenko, O. V., Zinner, S. H. & Portnoy, Y. A. Prediction of the effects of inoculum size on the antimicrobial action of trovafloxacin and ciprofloxacin against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in an in vitro dynamic model. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 498-502 (1999).
60. Fluit, A. C. & Schmitz, F. J. Resistance integrons and super-integrons. *Clin. Microbiol. Infect.* **10**, 272-288 (2004).
61. Fortineau, N., Poirel, L. & Nordmann, P. Plasmid-mediated and inducible cephalosporinase DHA-2 from *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **47**, 207-210 (2001).
62. Friedman, S. M., Lu, T. & Drlica, K. Mutation in the DNA gyrase A gene of *Escherichia coli* that expands the quinolone resistance-determining region. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 2378-2380 (2001).
63. Frohman, M. A., Dush, M. K. & Martin, G. R. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **85**, 8998-9002 (1988).
64. Fukuda, H. & Hiramatsu, K. Primary targets of fluoroquinolones in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 410-412 (1999).
65. Fursted, K. & Schumacher, H. Significance of low-level resistance to ciprofloxacin in *Klebsiella pneumoniae* and the effect of increased

- dosage of ciprofloxacin in vivo using the rat granuloma pouch model. *J. Antimicrob. Chemother.* **50**, 421-424 (2002).
66. Garau J., Xercavins M., Rodríguez-Carballeira M., Gómez-Vera J.R., Coll I., Vidal D., Llovet T. & Ruíz-Bremon A. Emergence and dissemination of quinolone-resistant *Escherichia coli* in the community. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 2736-2741 (1999).
67. García Sánchez JE, López R & Prieto J. *Antimicrobianos en medicina*. Proas Science. Barcelona (1999).
68. Garrido, M. C., Herrero, M., Kolter, R. & Moreno, F. The export of the DNA replication inhibitor Microcin B17 provides immunity for the host cell. *EMBO J.* **7**, 1853-1862 (1988).
69. Gatto, B., Capranico, G. & Palumbo, M. Drugs acting on DNA topoisomerases: recent advances and future perspectives. *Curr. Pharm. Des* **5**, 195-215 (1999).
70. Gellert, M., Mizuuchi, K., O'Dea, M. H. & Nash, H. A. DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **73**, 3872-3876 (1976).
71. Genilloud, O., Moreno, F. & Kolter, R. DNA sequence, products, and transcriptional pattern of the genes involved in production of the DNA replication inhibitor microcin B17. *J. Bacteriol.* **171**, 1126-1135 (1989).
72. Gines, P. & Navasa, M. Antibiotic prophylaxis for spontaneous bacterial peritonitis: how and whom? *J. Hepatol.* **29**, 490-494 (1998).
73. Giraud, E., Brisabois, A., Martel, J. L. & Chaslus-Dancla, E. Comparative studies of mutations in animal isolates and experimental *in vitro*- and *in vivo*-selected mutants of *Salmonella spp.* suggest a counterselection of highly fluoroquinolone-resistant strains in the field. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 2131-2137 (1999).
74. Girlich D., Poirel L., Leelaporn A., Karim A., Tribuddharat C., Fennewald M. & Nordmann P. Molecular epidemiology of the integron-located VEB-1 extended-spectrum beta-lactamase in nosocomial enterobacterial isolates in Bangkok, Thailand. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 175-182 (2001).
75. Gómez-Gómez J.M., Blázquez J., Espinosa De Los Monteros L.E., Baquero M.R., Baquero F. & Martínez J.L. *In vitro* plasmid-encoded resistance to quinolones. *FEMS Microbiol. Lett.* **154**, 271-276 (1997).
76. Gomis, M. & Ledesma, F. El futuro de las quinolonas. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **14**, 463-465 (1996).
77. Gootz TD & Brighty KE. The Quinolones. Academia Press (ed.), pp. 417-429 (Andriole, VT., San Diego, California., 1998).

-
78. Gootz TD & Brighty KE The Quinolones. Academia Press (ed.), pp. 29-80 (Andriole,VT., San Diego, California.,1998).
 79. Grkovic, S., Brown, M. H. & Skurray, R. A. Transcriptional regulation of multidrug efflux pumps in bacteria. *Semin. Cell Dev. Biol.* **12**, 225-237 (2001).
 80. Grkovic, S., Brown, M. H. & Skurray, R. A. Regulation of bacterial drug export systems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**, 671-701 (2002).
 81. Hall, R. M. & Collis, C. M. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol. Microbiol.* **15**, 593-600 (1995).
 82. Hall, R. M. & Stokes, H. W. Integrons or super integrons? *Microbiology* **150**, 3-4 (2004).
 83. Hall, R. M. & Stokes, H. W. Integrons: novel DNA elements which capture genes by site-specific recombination. *Genetica* **90**, 115-132 (1993).
 84. Halliwell, R. F., Davey, P. G. & Lambert, J. J. Antagonism of GABA_A receptors by 4-quinolones. *J. Antimicrob. Chemother.* **31**, 457-462 (1993).
 85. Hata M., Suzuki M., Matsumoto M., Takahashi M., Sato K., Ibe S. & Sakae K. Cloning of a novel gene for quinolone resistance from a transferable plasmid in *Shigella flexneri* 2b. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 801-803 (2005).
 86. Haugan, K., Karunakaran, P., Tondervik, A. & Valla, S. The host range of RK2 minimal replicon copy-up mutants is limited by species-specific differences in the maximum tolerable copy number. *Plasmid* **33**, 27-39 (1995).
 87. Heddle, J. G., Barnard, F. M., Wentzell, L. M. & Maxwell, A. The interaction of drugs with DNA gyrase: a model for the molecular basis of quinolone action. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **19**, 1249-1264 (2000).
 88. Heddle J.G., Blance S.J., Zamble D.B., Hollfelder F., Miller D.A., Wentzell L.M., Walsh C.T. & Maxwell A. The antibiotic microcin B17 is a DNA gyrase poison: characterisation of the mode of inhibition. *J. Mol. Biol.* **307**, 1223-1234 (2001).
 89. Hegde S.S., Vetting M.W., Roderick S.L., Mitchenall L.A., Maxwell A., Takiff H.E. & Blanchard J.S. A fluoroquinolone resistance protein from *Mycobacterium tuberculosis* that mimics DNA. *Science* **308**, 1480-1483 (2005).

90. Heisig, P., Schedletzky, H. & Falkenstein-Paul, H. Mutations in the *gyrA* gene of a highly fluoroquinolone-resistant clinical isolate of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**, 696-701 (1993).
91. Heisig, P. & Tschorny, R. Characterization of fluoroquinolone-resistant mutants of *Escherichia coli* selected *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 1284-1291 (1994).
92. Heritier, C., Poirel, L. & Nordmann, P. Genetic and biochemical characterization of a chromosome-encoded carbapenem-hydrolyzing ambler class D beta-lactamase from *Shewanella algae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 1670-1675 (2004).
93. Hernández, J. R., Pascual, A., Cantón, R. & Martínez-Martínez, L. *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de betalactamasas de espectro extendido en hospitales españoles (Proyecto GEIH-BLEE 2000). *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **21**, 77-82 (2003).
94. Hernández-Allés S., Benedí V.J., Martínez-Martínez L., Pascual A., Aguilar A., Tomas J.M., Alberti S. Development of resistance during antimicrobial therapy caused by insertion sequence interruption of porin genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 937-939 (1999).
95. Herrero, M. & Moreno, F. Microcin B17 blocks DNA replication and induces the SOS system in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **132**, 393-402 (1986).
96. Higgins, P. G., Fluit, A. C. & Schmitz, F. J. Fluoroquinolones: structure and target sites. *Curr. Drug Targets.* **4**, 181-190 (2003).
97. 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.* **29**, 535-538 (1986).
98. Hofmann K. & Stoffel W. TMbase: A database of membrane spanning protein segments. *Biol Chem Hoppe Seyler* **347**, 166 (1993).
99. Hooper DC & Wolfson JS. Quinolone Antimicrobial Agents. American Society Microbiology (ed.), pp. 53-75 Washington, DC., 1993).
100. Hooper, D. C. Bacterial topoisomerases, anti-topoisomerases, and anti-topoisomerase resistance. *Clin. Infect. Dis.* **27 Suppl 1**, S54-S63 (1998).
101. Hooper, D. C. New uses for new and old quinolones and the challenge of resistance. *Clin. Infect. Dis.* **30**, 243-254 (2000).
102. Hopkins, K. L., Davies, R. H. & Threlfall, E. J. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. *Int. J. Antimicrob. Agents* **25**, 358-373 (2005).

103. Hoshino K., Kitamura A., Morrissey I., Sato K., Kato J. & Ikeda H. Comparison of inhibition of *Escherichia coli* topoisomerase IV by quinolones with DNA gyrase inhibition. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 2623-2627 (1994).
104. Humeniuk C., Arlet G., Gautier V., Grimont P., Labia R. & Philippon A. Beta-lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 3045-3049 (2002).
105. Ince, D. & Hooper, D. C. Quinolone resistance due to reduced target enzyme expression. *J. Bacteriol.* **185**, 6883-6892 (2003).
106. Itokazu, G. S., Quinn, J. P., Bell-Dixon, C., Kahan, F. M. & Weinstein, R. A. Antimicrobial resistance rates among aerobic gram-negative bacilli recovered from patients in intensive care units: evaluation of a national postmarketing surveillance program. *Clin. Infect. Dis.* **23**, 779-784 (1996).
107. Jacoby G.A., Han P., Alvarez M. & Tenover F Survey of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) production in US clinical isolates. *Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy C1-1043-74* (1995).
108. Jacoby, G. A. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin. Infect. Dis.* **41 Suppl 2**, S120-S126 (2005).
109. Jacoby, G. A., Chow, N. & Waites, K. B. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 559-562 (2003).
110. Jacoby, G.A., Walsh, K., Mills D., Walker V., Robicsek A., Oh H. & Hooper DC. A new plasmid mediated gene for quinolone resistance. *Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy C2-1898a* (2004).
111. Jain, C. & Kleckner, N. Preferential cis action of IS10 transposase depends upon its mode of synthesis. *Mol. Microbiol.* **9**, 249-260 (1993).
112. Jeong J.Y., Yoon H.J., Kim E.S., Lee Y., Choi S.H., Kim N.J., Woo J.H. & Kim YS. Detection of *qnr* in clinical isolates of *Escherichia coli* from Korea. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 2522-2524 (2005).
113. Johnson, R. C. & Reznikoff, W. S. DNA sequences at the ends of transposon Tn5 required for transposition. *Nature* **304**, 280-282 (1983).
114. Jonas, D., Biehler, K., Hartung, D., Spitzmuller, B. & Daschner, F. D. Plasmid-mediated quinolone resistance in isolates obtained in german intensive care units. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 773-775 (2005).

115. Jun,J., Kwak,Y., Kim,S., Kim,E., Lee,J., Choi,S., Jeong,J., Kim,Y. & Woo,J. Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance in Clinical Isolates of *Enterobacter cloacae* from Korea . *Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy* C2-787-119 (2005).
116. Kaneko,T., Sato,S., Kotani,H., Tanaka,A., Asamizu,E., Nakamura,Y., Miyajima,N., Hirosawa,M., Sugiura,M., Sasamoto,S., Kimura,T., Hosouchi,T., Matsuno,A., Muraki,A., Nakazaki,N., Naruo,K., Okumura,S., Shimpo,S., Takeuchi,C., Wada,T., Watanabe,A., Yamada,M., Yasuda,M. & Tabata,S. Sequence analysis of the genome of the unicellular *Cyanobacterium synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res.* **3**, 109-136 (1996).
117. Karas, J. A., Pillay, D. G., Muckart, D. & Sturm, A. W. Treatment failure due to extended spectrum beta-lactamase. *J. Antimicrob. Chemother.* **37**, 203-204 (1996).
118. Kato J., Nishimura Y., Imamura R., Niki H., Hiraga S. & Suzuki H. New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli*. *Cell* **63**, 393-404 (1990).
119. Khodursky, A. B., Zechiedrich, E. L. & Cozzarelli, N. R. Topoisomerase IV is a target of quinolones in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**, 11801-11805 (1995).
120. Kieser, T. Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid* **12**, 19-36 (1984).
121. Kleckner, N. Transposable elements in prokaryotes. *Annu. Rev. Genet.* **15**, 341-404 (1981).
122. Kohler, T., Epp, S. F., Curty, L. K. & Pechere, J. C. Characterization of MexT, the regulator of the MexE-MexF-OprN multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **181**, 6300-6305 (1999).
123. Kumagai Y., Kato J.I., Hoshino K., Akasaka T., Sato K. & Ikeda H. Quinolone-resistant mutants of *Escherichia coli* DNA topoisomerase IV *parC* gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**, 710-714 (1996).
124. Lai, M. H. & Kirsch, D. R. Induction signals for vancomycin resistance encoded by the *vanA* gene cluster in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**, 1645-1648 (1996).
125. Lartigue, M. F., Poirel, L. & Nordmann, P. Diversity of genetic environment of *bla*(CTX-M) genes. *FEMS Microbiol. Lett.* **234**, 201-207 (2004).

126. Lautenbach E., Strom B.L., Bilker W.B., Patel J.B., Edelstein P.H. & Fishman N.O. Epidemiological investigation of fluoroquinolone resistance in infections due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Clin. Infect. Dis.* **33**, 1288-1294 (2001).
127. Lautenbach E., Strom B.L., Nachamkin I., Bilker W.B., Marr A.M., Larosa L.A. & Fishman N.O. Longitudinal trends in fluoroquinolone resistance among *Enterobacteriaceae* isolates from inpatients and outpatients, 1989-2000: differences in the emergence and epidemiology of resistance across organisms. *Clin. Infect. Dis.* **38**, 655-662 (2004).
128. Leelaporn, A., Firth, N., Byrne, M. E., Roper, E. & Skurray, R. A. Possible role of insertion sequence IS257 in dissemination and expression of high- and low-level trimethoprim resistance in staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 2238-2244 (1994).
129. Leshner, G. Y., Froelich, E. J., Gruett, M. D., Bailey, J. H. & Brundage, R. P. 1,8-Naphthyridine derivatives. A new class of chemotherapeutic agents. *J. Med. Pharm. Chem.* **91**, 1063-1065 (1962).
130. Lietman, P. S. Fluoroquinolone toxicities. An update. *Drugs* **49 Suppl 2**, 159-163 (1995).
131. Lister, P. D. & Sanders, C. C. Pharmacodynamics of levofloxacin and ciprofloxacin against *Streptococcus pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **43**, 79-86 (1999).
132. Liu, S. L., Hessel, A. & Sanderson, K. E. Genomic mapping with I-Ceu I, an intron-encoded endonuclease specific for genes for ribosomal RNA, in *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, and other bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**, 6874-6878 (1993).
133. Livermore, D. M. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **8**, 557-584 (1995).
134. Llanes, C., Gabant, P., Couturier, M., Bayer, L. & Plesiat, P. Molecular analysis of the replication elements of the broad-host-range RepA/C replicon. *Plasmid* **36**, 26-35 (1996).
135. Lomovskaya, O., Kawai, F. & Martin, A. Differential regulation of the *mcb* and *emr* operons of *Escherichia coli*: role of *mcb* in multidrug resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**, 1050-1052 (1996).
136. López de, F. F., Magni, C., de, M. D. & López, P. Transcriptional activation of the citrate permease P gene of *Lactococcus lactis* biovar diacetylactis by an insertion sequence-like element present in plasmid pCIT264. *Mol. Gen. Genet.* **250**, 428-436 (1996).
137. Louarn, J. M., Bouche, J. P., Legendre, F., Louarn, J. & Patte, J. Characterization and properties of very large inversions of the *E. coli*

- chromosome along the origin-to-terminus axis. *Mol. Gen. Genet.* **201**, 467-476 (1985).
138. Low KB. *Escherichia coli* and *Salmonella*: celular and molecular biology. American Society Microbiology (ASM). Washington, DC (1996).
139. MacGowan, A. P., Wootton, M. & Holt, H. A. The antibacterial efficacy of levofloxacin and ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* assessed by combining antibiotic exposure and bacterial susceptibility. *J. Antimicrob. Chemother.* **43**, 345-349 (1999).
140. Machida, C. & Machida, Y. Regulation of IS1 transposition by the *insA* gene product. *J. Mol. Biol.* **208**, 567-574 (1989).
141. Magnet, S., Courvalin, P. & Lambert, T. Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 3375-3380 (2001).
142. Mahillon, J. & Chandler, M. Insertion sequences. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 725-774 (1998).
143. Makris, J. C., Nordmann, P. L. & Reznikoff, W. S. Mutational analysis of insertion sequence 50 (IS50) and transposon 5 (Tn5) ends. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **85**, 2224-2228 (1988).
144. Mammeri, H., Van De, L. M., Poirel, L., Martínez-Martínez, L. & Nordmann, P. Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* in Europe. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 71-76 (2005).
145. Mandell G.L., Bennett J.E. & Dolin R. Principles and practice of infectious diseases. Churchill Livingstone, Nueva York (2000).
146. Martínez-Martínez L., García I., Ballesta S., Benedí V.J., Hernández-Allés S, & Pascual A. Energy-dependent accumulation of fluoroquinolones in quinolone-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 1850-1852 (1998).
147. Martínez-Martínez L., Hernández-Allés S., Alberti S., Tomas J.M., Benedí V.J. & Jacoby G.A. *In vivo* selection of porin-deficient mutants of *Klebsiella pneumoniae* with increased resistance to cefoxitin and expanded-spectrum-cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**, 342-348 (1996).
148. Martínez-Martínez L., Pascual A., Conejo Mdel C., García I., Joyanes P., Doménech-Sánchez A., Benedí V.J. Energy-dependent accumulation of norfloxacin and porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and relationship to extended-spectrum beta-lactamase production. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 3926-3932 (2002).

149. Martínez-Martínez, L., Pascual, A., García, I., Tran, J. & Jacoby, G. A. Interaction of plasmid and host quinolone resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**, 1037-1039 (2003).
150. Martínez-Martínez L., Pascual A., Hernández-Allés S., Álvarez-Díaz D., Suárez Al., Tran J., Benedí V.J. & Jacoby G.A. Roles of beta-lactamases and porins in activities of carbapenems and cephalosporins against *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 1669-1673 (1999).
151. Martínez-Martínez, L., Pascual, A. & Jacoby, G. A. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* **351**, 797-799 (1998).
152. Masecar, B. L., Celesk, R. A. & Robillard, N. J. Analysis of acquired ciprofloxacin resistance in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**, 281-286 (1990).
153. Mazodier, P. & Davies, J. Gene transfer between distantly related bacteria. *Annu. Rev. Genet.* **25**, 147-171 (1991).
154. Mitscher, L. A. Bacterial topoisomerase inhibitors: quinolone and pyridone antibacterial agents. *Chem. Rev.* **105**, 559-592 (2005).
155. Moniot-Ville, N., Guibert, J., Moreau, N., Acar, J.F., Collatz, E. & Gutmann, L. Mechanisms of quinolone resistance in a clinical isolate of *Escherichia coli* highly resistant to fluoroquinolones but susceptible to nalidixic acid. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**, 519-523 (1991).
156. Montero, C., Mateu, G., Rodríguez, R. & Takiff, H. Intrinsic resistance of *Mycobacterium smegmatis* to fluoroquinolones may be influenced by new pentapeptide protein MfpA. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 3387-3392 (2001).
157. Morrissey I., Hoshino K., Sato K., Yoshida A., Hayakawa I., Bures M.G. & Shen LL. Mechanism of differential activities of ofloxacin enantiomers. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**, 1775-1784 (1996).
158. Mouneimne, H., Robert, J., Jarlier, V. & Cambau, E. Type II topoisomerase mutations in ciprofloxacin-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 62-66 (1999).
159. Munshi M.H., Sack D.A., Haider K., Ahmed Z.U., Rahaman M.M. & Morshed MG. Plasmid-mediated resistance to nalidixic acid in *Shigella dysenteriae* type 1. *Lancet* **2**, 419-421 (1987).
160. Naas, T., Mikami, Y., Imai, T., Poirel, L. & Nordmann, P. Characterization of In53, a class 1 plasmid- and composite transposon-located integron of *Escherichia coli* which carries an unusual array of gene cassettes. *J. Bacteriol.* **183**, 235-249 (2001).

161. Nagakubo, S., Nishino, K., Hirata, T. & Yamaguchi, A. The putative response regulator BaeR stimulates multidrug resistance of *Escherichia coli* via a novel multidrug exporter system, MdtABC. *J. Bacteriol.* **184**, 4161-4167 (2002).
162. Nakamura, S., Nakamura, M., Kojima, T. & Yoshida, H. *gyrA* and *gyrB* mutations in quinolone-resistant strains of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**, 254-255 (1989).
163. Navia, M. M., Ruíz, J., Ribera, A., de Anta, M. T. & Vila, J. Analysis of the mechanisms of quinolone resistance in clinical isolates of *Citrobacter freundii*. *J. Antimicrob. Chemother.* **44**, 743-748 (1999).
164. Nazic, H., Poirel, L. & Nordmann, P. Further identification of plasmid-mediated quinolone resistance determinant in *Enterobacteriaceae* in Turkey. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 2146-2147 (2005).
165. Nedoluha, P. C., Owens, S., Russek-Cohen, E. & Westhoff, D. C. Effect of sampling method on the representative recovery of microorganisms from the surfaces of aquacultured finfish. *J. Food Prot.* **64**, 1515-1520 (2001).
166. Nesvera, J., Hochmannova, J. & Patek, M. An integron of class 1 is present on the plasmid pCG4 from gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **169**, 391-395 (1998).
167. Nikaido, H. Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. *J. Biol. Chem.* **269**, 3905-3908 (1994).
168. Nikaido, H. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science* **264**, 382-388 (1994).
169. Nikaido, H. Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **178**, 5853-5859 (1996).
170. Nikaido, H. Antibiotic resistance caused by gram-negative multidrug efflux pumps. *Clin. Infect. Dis.* **27 Suppl 1**, S32-S41 (1998).
171. Nikaido, H. & Thanassi, D. G. Penetration of lipophilic agents with multiple protonation sites into bacterial cells: tetracyclines and fluoroquinolones as examples. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**, 1393-1399 (1993).
172. Nikaido, H. & Vaara, M. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* **49**, 1-32 (1985).
173. Noble, C. G., Barnard, F. M. & Maxwell, A. Quinolone-DNA interaction: sequence-dependent binding to single-stranded DNA reflects the interaction within the gyrase-DNA complex. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 854-862 (2003).

-
174. Nordmann, P. & Poirel, L. Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in *Enterobacteriaceae*. *J. Antimicrob. Chemother.* (2005).
175. NORM/NORM-VET2002. Consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in Norway. Oslo (2003).
176. Norrby, S. R. Side-effects of quinolones: comparisons between quinolones and other antibiotics. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **10**, 378-383 (1991).
177. Nozue H., Hayashi T., Hashimoto Y., Ezaki T., Hamasaki K., Ohwada K. & Terawaki Y. Isolation and characterization of *Shewanella algae* from human clinical specimens and emendation of the description of *S. algae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**, 628-634 (1992).
178. Oethinger, M., Kern, W. V., Jellen-Ritter, A. S., McMurry, L. M. & Levy, S. B. Ineffectiveness of topoisomerase mutations in mediating clinically significant fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* in the absence of the AcrAB efflux pump. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 10-13 (2000).
179. Oram, M. & Fisher, L. M. 4-Quinolone resistance mutations in the DNA gyrase of *Escherichia coli* clinical isolates identified by using the polymerase chain reaction. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**, 387-389 (1991).
180. Oram, M., Kuroda, R. & Fisher, L. M. *Escherichia coli* DNA gyrase: genetic analysis of *gyrA* and *gyrB* mutations responsible for thermosensitive enzyme activity. *FEBS Lett.* **312**, 61-65 (1992).
181. Oteo, J., Lazaro, E., de Abajo, F. J., Baquero, F. & Campos, J. Antimicrobial-resistant invasive *Escherichia coli*, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* **11**, 546-553 (2005).
182. Ouabdesselam, S., Hooper, D. C., Tankovic, J. & Soussy, C. J. Detection of *gyrA* and *gyrB* mutations in quinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* by single-strand conformational polymorphism analysis and determination of levels of resistance conferred by two different single *gyrA* mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 1667-1670 (1995).
183. Ozeki S., Deguchi T., Yasuda M., Nakano M., Kawamura T., Nishino Y. & Kawada Y. Development of a rapid assay for detecting *gyrA* mutations in *Escherichia coli* and determination of incidence of *gyrA* mutations in clinical strains isolated from patients with complicated urinary tract infections. *J. Clin. Microbiol.* **35**, 2315-2319 (1997).
184. Paauw A., Fluit A.C., Verhoef M.A. *et al.* A major outbreak with plasmid-mediated, *qnr* encoded, quinolone resistance. 44th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington D.C. (2004).

-
185. Pan, X. S. & Fisher, L. M. Targeting of DNA gyrase in *Streptococcus pneumoniae* by sparfloxacin: selective targeting of gyrase or topoisomerase IV by quinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 471-474 (1997).
 186. Pang, Y., Brown, B. A., Steingrube, V. A., Wallace, R. J., Jr. & Roberts, M. C. Tetracycline resistance determinants in *Mycobacterium* and *Streptomyces* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 1408-1412 (1994).
 187. Partridge, S. R., Brown, H. J., Stokes, H. W. & Hall, R. M. Transposons Tn1696 and Tn21 and their integrons In4 and In2 have independent origins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 1263-1270 (2001).
 188. Partridge, S. R. & Hall, R. M. In34, a complex In5 family class 1 integron containing *orf513* and *dfrA10*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 342-349 (2003).
 189. Paterson D.L., Mulazimoglu L., Casellas J.M., Ko W.C., Goossens H., Von Gottberg A., Mohapatra S., Trenholme G.M., Klugman K.P., McCormack J.G. & Yu V.L. Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended-spectrum beta-lactamase production in *Klebsiella pneumoniae* isolates causing bacteremia. *Clin. Infect. Dis.* **30**, 473-478 (2000).
 190. Paulsen, I. T. Multidrug efflux pumps and resistance: regulation and evolution. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**, 446-451 (2003).
 191. Paulsen, I. T., Nguyen, L., Sliwinski, M. K., Rabus, R. & Saier, M. H., Jr. Microbial genome analyses: comparative transport capabilities in eighteen prokaryotes. *J. Mol. Biol.* **301**, 75-100 (2000).
 192. Peacock J.E., Herrington D.A., Wade J.C., Lazarus H.M., Reed M.D., Sinclair J.W., Haverstock D.C., Kowalsky S.F., Hurd D.D., Cushing D.A., Harman C.P. & Donowitz G.R. Ciprofloxacin plus piperacillin compared with tobramycin plus piperacillin as empirical therapy in febrile neutropenic patients. A randomized, double-blind trial. *Ann. Intern. Med.* **137**, 77-87 (2002).
 193. Pearce, L. E. & Meynell, E. Mutation to high-level streptomycin-resistance in R⁺ bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **50**, 173-176 (1968).
 194. Pesci E.C., Milbank J.B., Pearson J.P., McKnight S., Kende A.S., Greenberg E.P. & Iglewski B.H. Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 11229-11234 (1999).
 195. Pestova, E., Beyer, R., Cianciotto, N. P., Noskin, G. A. & Peterson, L. R. Contribution of topoisomerase IV and DNA gyrase mutations in *Streptococcus pneumoniae* to resistance to novel fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 2000-2004 (1999).

196. Philippon, A., Arlet, G. & Jacoby, G. A. Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 1-11 (2002).
197. Phillips I, King A & Shannon K. The Quinolones. Andriole, V.T. San Diego, California. (1998).
198. Piddock, L. J. Mechanisms of fluoroquinolone resistance: an update 1994-1998. *Drugs* **58 Suppl 2**, 11-18 (1999).
199. Pierrat, O. A. & Maxwell, A. Evidence for the role of DNA strand passage in the mechanism of action of microcin B17 on DNA gyrase. *Biochemistry* **44**, 4204-4215 (2005).
200. Poirel, L., Heritier, C. & Nordmann, P. Chromosome-encoded ambler class D beta-lactamase of *Shewanella oneidensis* as a progenitor of carbapenem-hydrolyzing oxacillinase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 348-351 (2004).
201. Poirel, L., Kampfer, P. & Nordmann, P. Chromosome-encoded Ambler class A beta-lactamase of *Kluyvera georgiana*, a probable progenitor of a subgroup of CTX-M extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 4038-4040 (2002).
202. Poirel, L., Magalhaes, M., Lopes, M. & Nordmann, P. Molecular analysis of metallo-beta-lactamase gene bla(SPM-1)-surrounding sequences from disseminated *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Recife, Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 1406-1409 (2004).
203. Poirel, L., Menuteau, O., Agoli, N., Cattoen, C. & Nordmann, P. Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French hospital. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 3542-3547 (2003).
204. Poirel L., Pham J.N., Cabanne L., Gatus B.J., Bell S.M. & Nordmann P. Carbapenem-hydrolysing metallo-beta-lactamases from *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolated in Australia. *Pathology* **36**, 366-367 (2004).
205. Poirel, L., Pitout, J. D., Calvo, A. L., Church, D. L. & Nordmann, P. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance in Canada. *Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy C2-789-119-120* (2005).
206. Poirel, L., Van De, L. M., Mammeri, H. & Nordmann, P. Association of plasmid-mediated quinolone resistance with extended-spectrum beta-lactamase VEB-1. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 3091-3094 (2005).
207. Poole, K. Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 2233-2241 (2000).
208. Poole, K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**, 20-51 (2005).

-
209. Poole, K. Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**, 255-264 (2001).
210. Poole K., Tetro K., Zhao Q., Neshat S., Heinrichs D.E. & Bianco N. Expression of the multidrug resistance operon *mexA-mexB-oprM* in *Pseudomonas aeruginosa*: *mexR* encodes a regulator of operon expression. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**, 2021-2028 (1996).
211. Price JR. Some reactions of 1-methyl 4-quinolona 3 carboxylic acid, a degradation product of the alcaloids. *Aus. J. Sci.* **217**, 271-281 (1949).
212. Rahman M., Sultan Z., Monira S., Alam A., Nessa K., Islam S., Nahar S., Shama-A-Waris, Alam Khan S., Bogaerts J., Islam N. & Albert J. Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolated in Bangladesh (1997 to 1999): rapid shift to fluoroquinolone resistance. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 2037-2040 (2002).
213. Recchia, G. D. & Hall, R. M. Gene cassettes: a new class of mobile element. *Microbiology* **141**, 3015-3027 (1995).
214. Recchia, G. D. & Hall, R. M. Origins of the mobile gene cassettes found in integrons. *Trends Microbiol.* **5**, 389-394 (1997).
215. Rissing, J. P. Antimicrobial therapy for chronic osteomyelitis in adults: role of the quinolones. *Clin. Infect. Dis.* **25**, 1327-1333 (1997).
216. Robicsek, A., Sahm, D. F., Strahilevitz, J., Jacoby, G. A. & Hooper, D. C. Broader distribution of plasmid-mediated quinolone resistance in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 3001-3003 (2005).
217. Robicsek A., Strahilevitz J., Jacoby G.A., Macielag M., Abbanat D., Park C.H., Bush K. & Hooper D.C. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat. Med.* **12**, 83-88 (2006).
218. Rodríguez-Bano J., Navarro M.D., Romero L., Muniain M.A., Perea E.J., Pérez-Cano R., Hernández J.R. & Pascual A. Clinical and molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* as a cause of nosocomial infection or colonization: implications for control. *Clin. Infect. Dis.* **42**, 37-45 (2006).
219. Rodríguez-Hernández M.J., Pachón J., Pichardo C., Cuberos L., Ibáñez-Martínez J., García-Curiel A., Caballero F.J., Moreno I. & Jiménez-Mejías ME.. Imipenem, doxycycline and amikacin in monotherapy and in combination in *Acinetobacter baumannii* experimental pneumonia. *J. Antimicrob. Chemother.* **45**, 493-501 (2000).
220. Rosser, S. J. & Young, H. K. Identification and characterization of class 1 integrons in bacteria from an aquatic environment. *J. Antimicrob. Chemother.* **44**, 11-18 (1999).
-

-
221. Rowe-Magnus D.A., Guerout A.M., Ploncard P., Dychinco B., Davies J. & Mazel D. The evolutionary history of chromosomal super-integrations provides an ancestry for multiresistant integrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 652-657 (2001).
222. Rowe-Magnus, D. A. & Mazel, D. The role of integrations in antibiotic resistance gene capture. *Int. J. Med. Microbiol.* **292**, 115-125 (2002).
223. Sabate, M. & Prats, G. Estructura y función de los integrones. *Enferm. Infec. Microbiol. Clin.* **20**, 341-345 (2002).
224. Saenz, Y., Zarazaga, M., Briñas, L., Ruíz-Larrea, F. & Torres, C. Mutations in *gyrA* and *parC* genes in nalidixic acid-resistant *Escherichia coli* strains from food products, humans and animals. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**, 1001-1005 (2003).
225. Saga T., Kaku M., Onodera Y., Yamachika S., Sato K. & Takase H. *Vibrio parahaemolyticus* chromosomal *qnr* homologue VPA0095: demonstration by transformation with a mutated gene of its potential to reduce quinolone susceptibility in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 2144-2145 (2005).
226. Sambrook J & Russell DW *Molecular Cloning. A laboratory manual.* (2001).
227. Sánchez, D. P. Sistemas MDR y resistencia a los antimicrobianos. *Rev. Esp. Quimioter.* **16**, 172-187 (2003).
228. Sánchez R., Fernández-Baca V., Díaz M.D., Muñoz P., Rodríguez-Creixems M. & Bouza E. Evolution of susceptibilities of *Campylobacter spp.* to quinolones and macrolides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 1879-1882 (1994).
229. Sanders, C. C., Sanders, W. E., Jr. & Moland, E. S. Characterization of beta-lactamases in situ on polyacrylamide gels. *Antimicrob. Agents Chemother.* **30**, 951-952 (1986).
230. Sato, K. & Nakae, T. Outer membrane permeability of *Acinetobacter calcoaceticus* and its implication in antibiotic resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **28**, 35-45 (1991).
231. Schafer, A., Kalinowski, J., Simon, R., Seep-Feldhaus, A. H. & Puhler, A. High-frequency conjugal plasmid transfer from gram-negative *Escherichia coli* to various gram-positive coryneform bacteria. *J. Bacteriol.* **172**, 1663-1666 (1990).
232. Sergio Mella M., Guillermo Acuña L., Maritza Muñoz Q. & et al. Quinolonas: Aspectos generales sobre su estructura y clasificación. *Rev. Chil. Infect.* **17**, 53-66 (2000).
-

-
233. Shafer W.M., Veal W.L., Lee E.H., Zarantonelli L., Balthazar J.T. & Rouquette C. Genetic organization and regulation of antimicrobial efflux systems possessed by *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**, 219-224 (2001).
234. Shaw K.J., Miller N., Liu X., Lerner D., Wan J., Bittner A. & Morrow B.J. Comparison of the changes in global gene expression of *Escherichia coli* induced by four bactericidal agents. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **5**, 105-122 (2003).
235. Shen L.L., Mitscher L.A., Sharma P.N., O'Donnell T.J., Chu D.W., Cooper C.S. & Rosen T. Pernet A.G. Mechanism of inhibition of DNA gyrase by quinolone antibacterials: a cooperative drug-DNA binding model. *Biochemistry* **28**, 3886-3894 (1989).
236. Shumaker, R. C. PKCALC: a basic interactive computer program for statistical and pharmacokinetic analysis of data. *Drug Metab Rev.* **17**, 331-348 (1986).
237. Sobel, M. L., McKay, G. A. & Poole, K. Contribution of the MexXY multidrug transporter to aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 3202-3207 (2003).
238. Spangler, S. K., Visalli, M. A., Jacobs, M. R. & Appelbaum, P. C. Susceptibilities of non-*Pseudomonas aeruginosa* gram-negative nonfermentative rods to ciprofloxacin, ofloxacin, levofloxacin, D-ofloxacin, sparfloxacin, ceftazidime, piperacillin, piperacillin-tazobactam, trimethoprim-sulfamethoxazole, and imipenem. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**, 772-775 (1996).
239. Stern, M. J., Ames, G. F., Smith, N. H., Robinson, E. C. & Higgins, C. F. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. *Cell* **37**, 1015-1026 (1984).
240. Steward C.D., Rasheed J.K., Hubert S.K., Biddle J.W., Raney P.M., Anderson G.J., Williams P.P., Brittain K.L., Oliver A., McGowan J.E. Jr. & Tenover F.C. Characterization of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from 19 laboratories using the National Committee for Clinical Laboratory Standards extended-spectrum beta-lactamase detection methods. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 2864-2872 (2001).
241. Stover C.K., Pham X.Q., Erwin A.L., Mizoguchi S.D., Warrenner P., Hickey M.J., Brinkman F.S., Hufnagle W.O., Kowalik D.J., Lagrou M., Garber R.L., Goltry L., Tolentino E., Westbrook-Wadman S., Yuan Y., Brody L.L., Coulter S.N., Folger K.R., Kas A., Larbig K., Lim R., Smith K., Spencer D., Wong G.K., Wu Z., Paulsen I.T., Reizer J., Saier M.H., Hancock R.E., Lory S. & Olson M.V. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**, 959-964 (2000).

-
242. Strahilevitz, J. & Hooper, D. C. Dual targeting of topoisomerase IV and gyrase to reduce mutant selection: direct testing of the paradigm by using WCK-1734, a new fluoroquinolone, and ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 1949-1956 (2005).
243. Szczepanowski R., Krahn I., Linke B., Goesmann A., Puhler A. & Schluter A. Antibiotic multiresistance plasmid pRSB101 isolated from a wastewater treatment plant is related to plasmids residing in phytopathogenic bacteria and carries eight different resistance determinants including a multidrug transport system. *Microbiology* **150**, 3613-3630 (2004).
244. Takei, M., Fukuda, H., Kishii, R. & Hosaka, M. Target preference of 15 quinolones against *Staphylococcus aureus*, based on antibacterial activities and target inhibition. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 3544-3547 (2001).
245. Tavío M.M., Vila J., Ruíz J., Ruíz J., Martín-Sánchez A.M. & Jiménez de Anta M.T. Mechanisms involved in the development of resistance to fluoroquinolones in *Escherichia coli* isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* **44**, 735-742 (1999).
246. Tenover F.C., Arbeit R.D., Goering R.V., Mickelsen P.A., Murray B.E., Persing D.H. & Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 2233-2239 (1995).
247. Tillotson, G. S. Quinolones: structure-activity relationships and future predictions. *J. Med. Microbiol.* **44**, 320-324 (1996).
248. Tolun V., Kucukbasmaci O., Torumkuney-Akbulut D., Catal C., Ang-Kucuker M. & Ang O. Relationship between ciprofloxacin resistance and extended-spectrum beta-lactamase production in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains. *Clin. Microbiol. Infect.* **10**, 72-75 (2004).
249. Toukdarian, A. E. & Helinski, D. R. TrfA dimers play a role in copy-number control of RK2 replication. *Gene* **223**, 205-211 (1998).
250. Tran, J. H. & Jacoby, G. A. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 5638-5642 (2002).
251. Tran, J. H., Jacoby, G. A. & Hooper, D. C. Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein QnrA with *Escherichia coli* topoisomerase IV. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 3050-3052 (2005).
252. Tran, J. H., Jacoby, G. A. & Hooper, D. C. Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 118-125 (2005).

-
253. Trieu-Cuot, P., Gerbaud, G., Lambert, T. & Courvalin, P. *In vivo* transfer of genetic information between gram-positive and gram-negative bacteria. *EMBO J.* **4**, 3583-3587 (1985).
254. Truong, Q. C., Nguyen Van, J. C., Shlaes, D., Gutmann, L. & Moreau, N. J. A novel, double mutation in DNA gyrase A of *Escherichia coli* conferring resistance to quinolone antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 85-90 (1997).
255. Tuma, J., Connors, W. H., Stitelman, D. H. & Richert, C. On the effect of covalently appended quinolones on termini of DNA duplexes. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 4236-4246 (2002).
256. Turiel, E., Martín-Esteban, A., Bordin, G. & Rodríguez, A. R. Stability of fluoroquinolone antibiotics in river water samples and in octadecyl silica solid-phase extraction cartridges. *Anal. Bioanal. Chem.* **380**, 123-128 (2004).
257. Tzouveleakis L.S., Tzelepi E., Prinarakis E., Gazouli M., Katrahoura A., Giakkoupi P., Paniara O. & Legakis N.J. Sporadic emergence of *Klebsiella pneumoniae* strains resistant to cefepime and ceftazidime in Greek hospitals. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 266-268 (1998).
258. Valverde Romero E., Parras Padilla T., Herrero Hernández A., Fernández Gorostarzu J., García-Rodríguez J.A. & MuñozBellido J.L. Plasmid mediated quinolone resistance gene among ESBL-producing *E. coli* and *K. pneumoniae* in Spain. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* P1416 (2005).
259. Verdet, C., Arlet, G., Barnaud, G., Lagrange, P. H. & Philippon, A. A novel integron in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, carrying the *bla*(DHA-1) gene and its regulator gene *ampR*, originated from *Morganella morganii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 222-225 (2000).
260. Versalovic, J., Koeuth, T. & Lupski, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* **19**, 6823-6831 (1991).
261. Vila, J., Ruíz, J., Goni, P. & Jiménez de, A. T. Quinolone-resistance mutations in the topoisomerase IV *parC* gene of *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* **39**, 757-762 (1997).
262. Vila J., Ruíz J., Marco F., Barcelo A., Goni P., Giralt E. & Jiménez de Anta T. Association between double mutation in *gyrA* gene of ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* and MICs. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 2477-2479 (1994).
263. Vogel, B.F., Holt, H.M., Gerner-Smidt, P., Bundvad, A., Sogaard, P. & Gram, L. Homogeneity of Danish environmental and clinical isolates of *Shewanella algae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 443-448 (2000).

-
264. Vogel, B. F., Jorgensen, K., Christensen, H., Olsen, J. E. & Gram, L. Differentiation of *Shewanella putrefaciens* and *Shewanella algae* on the basis of whole-cell protein profiles, ribotyping, phenotypic characterization, and 16S rRNA gene sequence analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 2189-2199 (1997).
265. Von, R. N. & Adam, D. Quinolone antibacterials. An update of their pharmacology and therapeutic use. *Drugs* **47**, 872-901 (1994).
266. Wade D.S., Calfee M.W., Rocha E.R., Ling E.A., Engstrom E., Coleman J.P. & Pesci EC. Regulation of *Pseudomonas* quinolone signal synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **187**, 4372-4380 (2005).
267. Wagstaff, A. J. & Balfour, J. A. Grepafloxacin. *Drugs* **53**, 817-824 (1997).
268. Walker, R. C. The fluoroquinolones. *Mayo Clin. Proc.* **74**, 1030-1037 (1999).
269. Wang, G., Whittam, T. S., Berg, C. M. & Berg, D. E. RAPD (arbitrary primer) PCR is more sensitive than multilocus enzyme electrophoresis for distinguishing related bacterial strains. *Nucleic Acids Res.* **21**, 5930-5933 (1993).
270. Wang, H., Dzink-Fox, J. L., Chen, M. & Levy, S. B. Genetic characterization of highly fluoroquinolone-resistant clinical *Escherichia coli* strains from China: role of *acrR* mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 1515-1521 (2001).
271. Wang, J. C. Interaction between DNA and an *Escherichia coli* protein omega. *J. Mol. Biol.* **55**, 523-533 (1971).
272. Wang, J. C. DNA topoisomerases. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 635-692 (1996).
273. Wang, M., Sahm, D. F., Jacoby, G. A. & Hooper, D. C. Emerging plasmid-mediated quinolone resistance associated with the *qnr* gene in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 1295-1299 (2004).
274. Wang, M., Sahm, D. F., Jacoby, G. A., Zhang, Y. & Hooper, D. C. Activities of newer quinolones against *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* containing the plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnr*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 1400-1401 (2004).
275. Wang M., Tran J.H., Jacoby G.A., Zhang Y., Wang F. & Hooper D.C. Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 2242-2248 (2003).
276. Wang, M., Ye, X., Wu, S., Liu, Y. & Zhang, Y. Prevalence of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnrA* among consecutive clinical strains Isolated from a teaching hospital in Shanghai , China.
-

- Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy* C2-785-119 (2005).
277. Welsh, J. & McClelland, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* **18**, 7213-7218 (1990).
278. White, P. A., McIver, C. J. & Rawlinson, W. D. Integrons and gene cassettes in the *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 2658-2661 (2001).
279. Wiegand I, Khalaf N., Al-Agamy M.H.M & Wiedemann B First detection of the transferable quinolone resistance determinant in clinical *Providencia stuartii* strains in Egypt. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* O347 (2004).
280. Wiener J., Quinn J.P., Bradford P.A., Goering R.V., Nathan C., Bush K. & Weinstein R.A. Multiple antibiotic-resistant *Klebsiella* and *Escherichia coli* in nursing homes. *JAMA* **281**, 517-523 (1999).
281. Willmott, C. J. & Maxwell, A. A single point mutation in the DNA gyrase A protein greatly reduces binding of fluoroquinolones to the gyrase-DNA complex. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**, 126-127 (1993).
282. Wise, R. & Honeybourne, D. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of fluoroquinolones in the respiratory tract. *Eur. Respir. J.* **14**, 221-229 (1999).
283. Witte, W. Medical consequences of antibiotic use in agriculture. *Science* **279**, 996-997 (1998).
284. Wolfson, J. S. & Hooper, D. C. Fluoroquinolone antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* **2**, 378-424 (1989).
285. Wootton J.C. Sequences with 'unusual' amino acid compositions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4**, 421 (1994).
286. Yorgey P., Lee J., Kordel J., Vivas E., Warner P., Jebaratnam D. & Kolter R. Posttranslational modifications in microcin B17 define an additional class of DNA gyrase inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**, 4519-4523 (1994).
287. Yoshida, H., Bogaki, M., Nakamura, M. & Nakamura, S. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**, 1271-1272 (1990).
288. Yoshida, H., Bogaki, M., Nakamura, M., Yamanaka, L. M. & Nakamura, S. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrB* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**, 1647-1650 (1991).
289. Yoshimura, F. & Nikaido, H. Permeability of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane to hydrophilic solutes. *J. Bacteriol.* **152**, 636-642 (1982).

290. Young, H. K. Antimicrobial resistance spread in aquatic environments. *J. Antimicrob. Chemother.* **31**, 627-635 (1993).
291. Zerbib, D., Polard, P., Escoubas, J. M., Galas, D. & Chandler, M. The regulatory role of the IS1-encoded InsA protein in transposition. *Mol. Microbiol.* **4**, 471-477 (1990).
292. Zgurskaya, H. I. Molecular analysis of efflux pump-based antibiotic resistance. *Int. J. Med. Microbiol.* **292**, 95-105 (2002).
293. Ziha-Zarifi, I., Llanes, C., Kohler, T., Pechere, J. C. & Plesiat, P. *In vivo* emergence of multidrug-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* overexpressing the active efflux system MexA-MexB-OprM. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 287-291 (1999).

Anexo 1. Secuencias cargadas en la base de datos del GeneBank de genes de tipo *qnr* localizados en plásmidos de cepas clínicas. Actualizado en Marzo de 2006.

	Organismo	Nº acceso	Plásmido	Referencia	
<i>qnrA</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AY070235	pMG252	250	
	<i>Escherichia coli</i>	AY259085	pHSH1	275	
	<i>Escherichia coli</i>	AY259086	pHSH2	275	
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	AY675584			
	<i>Escherichia coli</i>	AY655485	pQR-1	144	
	<i>Escherichia coli</i>	AY878717	pKO97	112	
	<i>Escherichia coli</i>	AY878718	pKO56	112	
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	AY995191			
	<i>Proteus mirabilis</i>	DQ151889			
	<i>Salmonella enteritidis</i>	AY906856		36	
	<i>Enterobacter cloacae</i>	DQ208404	pHZ36		
	<i>Enterobacter cloacae</i>	DQ208405	pHZ40		
	<i>qnrS</i>	<i>Shigella flexneri</i>	AB178643	pAH0376	85
		<i>Shigella flexneri</i>	AB187515	pAH0376	85
<i>qnrB</i>	<i>Citrobacter koseri</i>	DQ351242	pMG301		
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	DQ351241	pMG298		

Anexo 2. Acrónimos de los distintos antimicrobianos usados para la realización de antibiogramas mediante difusión en disco.

Ácido nalidíxico	NA
Amicacina	AN
Amoxicilina	AMX
Amoxicilina+Clavulánico	AMC
Aztreonam	ATM
Cefazolina	CF
Cefepima	FEP
Cefotaxima	CTX
Cefoxitina	FOX
Cefpodoxima	CPO
Ceftazidima	CAZ
Cefsulodina	CS
Cefuroxima	CXM
Ciprofloxacino	CIP
Cloranfenicol	C
Cotrimoxazol	SXT
Esparfloxacino	SPX
Estreptomina	S
Fosfomicina	FOS
Gentamicina	GM
Imipenem	IPM
Kanamicina	K
Levofloxacino	LEV
Meropenem	MEM
Moxalactam	MOX
Moxifloxacino	MXF
Netilmicina	NET
Norfloxacino	NOR
Piperacilina	PIP
Piperacilina+Tazobactam	TZP
Rifampicina	RA
Sulfamida	SSS
Tetraciclina	TE
Ticarcilina	TIC
Ticarcilina+Clavulánico	TCC
Trimetoprim	TMP

