



# UNIVERSIDAD DE MURCIA

## FACULTAD DE BIOLOGÍA

Estudio de mecanismos de resistencia a  
fluoroquinolonas de localización plasmídica  
en aislamientos clínicos de enterobacterias  
en la Región de Murcia

D<sup>a</sup> Míriam Albert Hernández

2013





UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

Estudio de mecanismos de resistencia a  
fluoroquinolonas de localización plasmídica  
en aislamientos clínicos de enterobacterias  
en la Región de Murcia

D<sup>a</sup> Míriam Albert Hernández

2013



**ESTUDIO DE MECANISMOS DE RESISTENCIA A  
FLUOROQUINOLONAS DE LOCALIZACIÓN PLASMÍDICA  
EN AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE ENTEROBACTERIAS EN  
LA REGIÓN DE MURCIA**

Memoria presentada por la Licenciada en Farmacia D<sup>a</sup> Míriam  
Albert Hernández para optar al grado de Doctor, en el Área de  
Microbiología Médica

Fdo: Míriam Albert Hernández

V° B°

El director

V° B°

El director

Manuel Segovia Hernández

Genoveva Yagüe Guirao





D. Manuel Segovia Hernández, Catedrático de Universidad, y D<sup>a</sup> Genoveva Yagüe Guirao, Profesora Titular de Universidad del Área de Microbiología Médica del Departamento de Genética y Microbiología,

AUTORIZAN:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “Estudio de mecanismos de resistencia a fluoroquinolonas de localización plasmídica en aislamientos clínicos de enterobacterias en la región de Murcia”, realizada por D<sup>a</sup> Míriam Albert Hernández, bajo nuestra inmediata dirección y supervisión, en el Departamento de Genética y Microbiología, y que presenta para la obtención del grado de doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a      de junio de 2013

Manuel Segovia Hernández

Genoveva Yagüe Guirao





## *Agradecimientos*

Estoy inmensamente feliz en esta etapa de mi vida, la presentación de mi Tesis Doctoral. Este proyecto ha requerido años de trabajo y muchas horas de dedicación por mi parte, pero sin duda, no hubiera sido posible sin todas las personas que han contribuido de muy diversas maneras en su desarrollo y culminación.

En primer lugar, agradecer a mis directores de tesis, al Dr. Manuel Segovia Hernández, por su rigor profesional y por la oportunidad de realizar este proyecto, y a la Dra. Genoveva Yagüe Guirao, tanto por su valioso tiempo, sus conocimientos y experiencia profesional como por sus ánimos y apoyo personal en muchos momentos.

Agradecer al Dr. Juan Luis Muñoz Bellido, su excelente acogida y gran dedicación en la realización de una parte fundamental del trabajo experimental en el Hospital Universitario de Salamanca, así como por su eficacia y profesionalidad en éste y otros muchos proyectos. Gracias también por alimentar mi ilusión de cara al futuro profesional.

La etapa salmantina en la que desarrollé parte de este trabajo es un recuerdo inolvidable. Agradecer a todos los facultativos, técnicos y residentes que hicieron del Servicio de Microbiología mi casa. En especial, a Lourdes, Lucy, María, Marisa, Sara y Juan y por supuesto a Noelia, compañera de otras enriquecedoras etapas. A todos, gracias por los buenos ratos y risas en los descansos de la cafetería del hospital, y por hacer que disfrutara al máximo la ciudad de Salamanca. También agradecer a la Dra. Marta Fernández Vázquez, porque a pesar de conocernos personalmente de forma muy breve, ha dispuesto su ayuda en todo momento.

A Andrés y su familia, por haber formado parte de esta etapa y por su apoyo especialmente durante mi estancia en Salamanca.

La mayor parte del tiempo invertido en la realización de este trabajo ha transcurrido en Murcia, donde grandes personas han estado a mi lado. A todos los facultativos, residentes y técnicos que han estado presentes en muchos momentos de mi Tesis. En especial al Dr. Antonio Moreno Docón y la Dra. M<sup>a</sup> Asunción Iborra Bendicho, por su cercanía, honestidad e interés por cómo me van las cosas. A la Dra. Laura Murcia Flores por su compañía en muchas tardes de laboratorio y por su disponibilidad a resolver cualquier duda. A las enfermeras y

técnicos Asun y Sallo, tan completas profesional como personalmente, siempre atentas y aconsejándome en muchos aspectos de mi vida. A Pruden, Salud, Cándida y Tere *in memoriam*, por estar conmigo desde el principio de la residencia y enseñarme mucha Microbiología. A mis chicas de Serología y Virología, por su simpatía, profesionalidad y su apoyo personal siempre.

Ante todo quiero agradecer a Teresa y Merche, sus ánimos y apoyo incondicional en todo momento, por ofrecerme su casa y todas las comodidades del mundo, por hacerme sentir estupendamente bien siempre con vuestra compañía y estoy convencida de que habéis sido las mejores residentes, compañeras y amigas que podía encontrar en esta etapa.

A mis amigas eldenses, Ángela e Inma, almaseña M<sup>a</sup> José, alicantina María, madrileña Ana y granadina Fina. A todas gracias por vuestros ánimos, por estar a mi lado ya tantos años y por hacerme la vida tan divertida siempre.

Por supuesto agradecer a toda mi familia el apoyo absoluto para superar adversidades y celebrar juntos las buenas noticias.

A mi tía Adela, por cuidar de su sobrina y alegrarse siempre de mis logros.

A mis abuelos, que han sido mis segundos padres, transmiéndome siempre energía positiva y vitalidad, haciéndome ver que dónde hay problemas, siempre hay soluciones y regalándome amor y sonrisas desde que tengo uso de razón.

A mi hermana Raquel, por ser mi gran confidente, por estar siempre disponible para escucharme, por sus consejos, por preocuparse por mi en todos los aspectos, por sus ánimos, por hacerme reír, por proponerme nuevos retos e ilusiones y por su enorme generosidad al adquirir más responsabilidades en estos últimos meses para ofrecerme más tiempo en la finalización de este trabajo. Sé por qué tengo sólo una hermana, con ella lo tengo todo.

A mis padres, que siempre se han desvivido por nosotras, sólo pensando en trabajar toda una vida para darnos lo mejor. A ti, mamá, porque siempre confías en mi, por tus constantes ánimos, por sufrir las dificultades como si fueran tuyas y por vivir mis alegrías con tu mejor sonrisa y especialmente, porque siempre tienes esa frase que me reconforta en los buenos pero sobre todo en los malos momentos “qué orgullosa está la mamá de ti”. Gracias por ser como eres, por tu afán de superación a pesar de los obstáculos que te ha puesto la vida y por ser un ejemplo a seguir. Te adoro.

A todos Gracias de corazón.

°C	Grados Celsius
3'	Extremo 3' del ADN
5'	Extremo 5' del ADN
10x	Diez veces concentrado
4xCMI	Cuatro veces el valor de la CMI
8xCMI	Ocho veces el valor de la CMI
16xCMI	Dieciséis veces el valor de la CMI
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AK	Amikacina
AMP	Ampicilina
AMC	Amoxicilina/Ácido clavulánico
AMX	Amoxicilina
AN	Ácido nalidíxico
ATP	Adenosín trifosfato
AUC	Área bajo la curva de concentraciones plasmáticas ( <i>Area Under the Curve</i> )
BI	Bleomicina
BLEE	Beta-lactamasas de espectro extendido
BSA	Albúmina sérica bovina ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )
CAZ	Ceftazidima
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CIP	Ciprofloxacino
CI	Cloranfenicol
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
C <sub>max</sub>	Concentración máxima en suero
CMB	Concentración mínima bactericida
CMI	Concentración mínima inhibitoria

CTX	Cefotaxima
dNTPs	Deoxinucleósidos trifosfato
DR	Secuencias cortas repetidas directas ( <i>Direct Repeat</i> )
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EPA	Efecto post-antibiótico
Er	Eritromicina
ERIC-PCR	<i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR</i>
<i>et al</i>	y colaboradores
F	Biodisponibilidad
FEP	Cefepime
FOS	Fosfomicina
FOX	Cefoxitina
GABA <sub>A</sub>	Receptor tipo A del ácido gamma-aminobutírico ( <i>Gamma-Aminobutiric Acid</i> )
GM	Gentamicina
HCl	Ácido clorhídrico
Hg	Mercuriales
IMP	Imipenem
IR	Secuencias repetidas invertidas ( <i>Inverted Repeat</i> )
IRL	Secuencias repetidas invertidas izquierda ( <i>Inverted Repeat Left</i> )
IRR	Secuencias repetidas invertidas derecha ( <i>Inverted Repeat Right</i> )
IS	Secuencia de inserción ( <i>Insertion Sequence</i> )
Kb	Kilobases (1 Kb=1000 pb)
KDa	KiloDaltons (1 KDa=1000 Daltons)
Kn	Kanamicina
LVX	Levofloxacino
M	Concentración molar (mol soluto/litro solución)

MH	Agar Mueller-Hinton
min	Minutos
mM	Concentración milimolar (M/1000)
mg	Miligramo
mL	Mililitro
MXF	Moxifloxacino
NFX	Norfloxacino
nm	Nanómetros ( $10^{-9}$ metros)
nt	Nucleótido
OFX	Ofloxacino
ORF	Marco de lectura abierto ( <i>Open Reading Frame</i> )
pb	Pares de bases del ADN
PCR	Reacción en cadena de la ADN polimerasa ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PFGE	Electroforesis en gel de campo pulsante ( <i>Pulsed- Field Gel Electrophoresis</i> )
pH	$\text{Log } 1/(\text{H}^+) = -\log [\text{H}^+]$
QRDR	Región determinante de resistencia a quinolonas ( <i>Quinolone Resistance-Determining Region</i> )
REP-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con iniciadores específicos de secuencias repetidas ( <i>Repetitive Extragenic Palindromic-PCR</i> )
RPFQs	Resistencia plasmídica a fluoroquinolonas
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
SI	Sulfonamidas
SNC	Sistema nervioso central
St	Estreptomina
$t_{1/2}$	Semivida plasmática
TOB	Tobramicina

TBE	Tris-Borato-EDTA
Tris	Trihidroximetilaminometano
Tt	Tetraciclina
Vd	Volumen de distribución
V/cm	Voltios por centímetro
WT	Cepa salvaje ( <i>Wild-Type</i> )
µg	Microgramo ( $10^{-6}$ gramos)
µL	Microlitro ( $10^{-6}$ litros)
µM	Concentración micromolar ( $10^{-6}$ moles)

---

<b>I. INTRODUCCIÓN-JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>II. OBJETIVOS.....</b>	<b>5</b>
<b>III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>9</b>
<b>1. Quinolonas .....</b>	<b>9</b>
1.1. <i>Origen, estructura química, relación estructura actividad y clasificación .....</i>	9
1.2. <i>Mecanismo de acción: Interacción ADN-Topoisomerasas-Quinolonas.....</i>	16
1.3. <i>Farmacocinética y farmacodinamia .....</i>	22
1.4. <i>Espectro de actividad .....</i>	25
1.5. <i>Indicaciones clínicas .....</i>	25
1.6. <i>Efectos adversos .....</i>	30
<b>2. Mecanismos de resistencia a quinolonas.....</b>	<b>31</b>
2.1. <i>Modificaciones en las dianas moleculares (ADN-girasa y Topoisomerasa IV).....</i>	32
2.2. <i>Disminución de la permeabilidad de membrana.....</i>	34
2.3. <i>Expresión o sobreexpresión de sistemas de expulsión activa.....</i>	35
2.4. <i>Resistencia plasmídica a fluoroquinolonas (RPFQs).....</i>	36
<b>3. Elementos genéticos móviles implicados en resistencia a antimicrobianos.....</b>	<b>37</b>
3.1. <i>Plásmidos .....</i>	37
3.2. <i>Transposones.....</i>	40
3.2.1. <i>Secuencias de inserción .....</i>	43
3.2.2. <i>Transposones compuestos (Clase I).....</i>	44
3.2.3. <i>Transposones compuestos (Clase II).....</i>	47
3.3. <i>Integrones.....</i>	49
3.3.1. <i>Integrones de clase 1.....</i>	50
3.3.2. <i>Integrones de clase 2.....</i>	53

---

---

<b>4. Resistencia plasmídica a fluoroquinolonas (RPFQs)</b> .....	<b>55</b>
4.1. <i>Proteínas Qnr</i> .....	55
4.1.1. <i>Origen de las proteínas Qnr</i> .....	55
4.1.2. <i>Mecanismo de acción de Qnr</i> .....	57
4.1.3. <i>Tipos de Qnr</i> .....	58
4.1.4. <i>Prevalencia de Qnr</i> .....	62
4.1.5. <i>Epidemiología de Qnr</i> .....	63
4.1.6. <i>Efecto de Qnr sobre la actividad de las quinolonas</i> .....	63
4.2. <i>Enzima aac(6')-Ib-cr</i> .....	64
4.3. <i>Bombas de expulsión activa</i> .....	65
4.3.1. <i>OqxAB</i> .....	66
4.3.2. <i>QepA</i> .....	66
<b>5. Entorno genético de qnr</b> .....	<b>67</b>
5.1. <i>Entorno genético de qnrA</i> .....	70
5.2. <i>Entorno genético de qnrB</i> .....	77
5.3. <i>Entorno genético de qnrC</i> .....	78
5.4. <i>Entorno genético de qnrS</i> .....	79
5.5. <i>Entornos genéticos de cepas qnr-positivas portadoras de BLEEs</i> .....	81
<b>6. Entorno genético de aac-(6')-Ib-cr</b> .....	<b>81</b>
<b>7. Relación de los determinantes de RPFQs con las BLEEs</b> .....	<b>83</b>
<b>8. Implicación clínica de la resistencia plasmídica a fluoroquinolonas</b> .....	<b>87</b>
<b>IV. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>93</b>
<b>1. Selección, obtención y conservación de los aislamientos clínicos</b> .....	<b>93</b>
<b>2. Identificación y sensibilidad antibiótica</b> .....	<b>93</b>
<b>3. Amplificación y caracterización de diferentes genes mediante técnicas moleculares basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</b> .....	<b>95</b>

---



---

3.1. Extracción del ADN .....	95
3.2. Detección de genes codificantes de mecanismos de RPFQs.....	96
3.3. Caracterización de los alelos específicos de determinantes de RPFQs.....	97
3.4. Caracterización de BLEEs en cepas con y sin determinantes de RPFQs.....	98
3.5. Estudio de mutaciones en la QRDR de las topoisomerasas tipo II (ADN girasa y topoisomerasa IV) en aislamientos con determinantes de RPFQs .....	99
3.6. Detección y separación de los amplificados en gel de agarosa. Purificación, secuenciación e interpretación de los amplificados. ....	100
<b>4. Tipificación molecular de los aislamientos con determinantes de RPFQs.....</b>	<b>102</b>
4.1. REP-PCR (Repetitive Extragenic Palindromic-PCR) .....	102
4.2. ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR) .....	102
4.3. RFLP-PFGE (Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción-Electroforesis en campo pulsante).....	103
<b>5. Ensayos de conjugación en cepas con determinantes de RPFQs .....</b>	<b>107</b>
5.1. Material específico .....	107
5.2. <i>E. coli</i> J53 Az <sup>R</sup> .....	108
5.3. Procedimiento .....	108
<b>6. Entorno genético de cepas con determinantes de RPFQs.....</b>	<b>109</b>
6.1. Detección de ISEcp1.....	109
6.2. Entorno genético de <i>qnr</i> .....	110
<b>7. Selección de mutantes resistentes en cepas con determinantes de RPFQs .....</b>	<b>112</b>
7.1. Procedimiento .....	113
7.2. Interpretación de resultados .....	114
<b>8. Estudio de mutaciones de topoisomerasas en los mutantes seleccionados .....</b>	<b>115</b>
<b>V. RESULTADOS .....</b>	<b>119</b>

---

---

<b>1. Descripción de los aislamientos clínicos .....</b>	<b>119</b>
1.1. <i>Aislamientos clínicos .....</i>	119
1.2. <i>Procedencia e identificación de los aislamientos clínicos.....</i>	119
1.3. <i>Sensibilidad antibiótica global .....</i>	121
<b>2. Prevalencia y descripción de determinantes de RPFQs .....</b>	<b>123</b>
2.1. <i>Prevalencia global de determinantes de RPFQs.....</i>	123
2.2. <i>Caracterización de los mecanismos plasmídicos de resistencia a fluoroquinolonas</i>	125
2.3. <i>Determinación de los alelos específicos de los determinantes de RPFQs .....</i>	127
2.4. <i>Distribución de los determinantes de RPFQs por especie.....</i>	128
<b>3. Prevalencia y caracterización de BLEEs.....</b>	<b>131</b>
3.1. <i>Prevalencia y caracterización global de BLEEs .....</i>	131
3.2. <i>Relación entre producción de BLEEs y presencia de determinantes de RPFQs .....</i>	132
<b>4. Estudio de mutaciones en ADN girasa y topoisomerasa IV en aislamientos con determinantes de RPFQs.....</b>	<b>133</b>
<b>5. Epidemiología molecular de los aislamientos con determinantes de RPFQs .....</b>	<b>135</b>
5.1. <i>REP-PCR .....</i>	135
5.2. <i>ERIC-PCR .....</i>	135
5.3. <i>RFLP-PFGE .....</i>	137
<b>6. Relación entre aislamientos con RPFQs, la producción de BLEEs, la presencia de mutaciones en las topoisomerasas y la actividad de ácido nalidíxico (AN) y ciprofloxacino (CIP) .....</b>	<b>138</b>
6.1. <i>Relación entre aislamientos con RPFQs y la producción de BLEEs .....</i>	138
6.2. <i>Relación entre aislamientos con RPFQs y la presencia de mutaciones en las topoisomerasas .....</i>	139
6.3. <i>Relación entre aislamientos con RPFQs y la actividad de ácido nalidíxico (AN) y ciprofloxacino (CIP).....</i>	141

---

<b>7. Ensayos de conjugación en cepas con determinantes de RPFQs .....</b>	<b>142</b>
<b>8. Entorno genético de cepas con determinantes de RPFQs.....</b>	<b>142</b>
8.1. <i>Detección de ISEcp1</i> .....	142
8.2. <i>Entorno genético de qnr</i> .....	143
<b>9. Selección de mutantes resistentes a ciprofloxacino en cepas con determinantes de RPFQs.....</b>	<b>144</b>
9.1. <i>Selección de mutantes de primer escalón</i> .....	144
9.2. <i>Selección de mutantes de segundo escalón</i> .....	145
9.3. <i>Estudio de mutaciones de topoisomerasas tipo II en los mutantes obtenidos</i> .....	146
<b>10. Evaluación de la sensibilidad antibiótica a ciprofloxacino en cepas con determinantes de RPFQ por el método automatizado Vitek 2.....</b>	<b>146</b>
<b>VI. DISCUSION .....</b>	<b>153</b>
<b>VII. CONCLUSIONES .....</b>	<b>171</b>
<b>VIII. RESUMEN.....</b>	<b>175</b>
<b>IX. SUMMARY.....</b>	<b>179</b>
<b>X. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>183</b>



<b>Revisión bibliográfica</b> .....	<b>9</b>
<b>Figura 1.</b> Síntesis de ácido nalidíxico a partir de cloroquina.....	9
<b>Figura 2.</b> Estructura de la 4-quinolona (anillo bicíclico 4-oxo-1,4 dihidroquinoleína), molécula de donde derivan muchas de las quinolonas usadas en clínica.....	10
<b>Figura 3.</b> Relación entre la estructura química y la actividad antibacteriana de las quinolonas. ....	12
<b>Figura 4.</b> Quinolonas de primera generación .....	13
<b>Figura 5.</b> Fluoroquinolonas de segunda generación.....	14
<b>Figura 6.</b> Fluoroquinolonas de tercera generación.....	15
<b>Figura 7.</b> Fluoroquinolonas de cuarta generación. ....	15
<b>Figura 8.</b> Representación esquemática del mecanismo de acción de las topoisomerasas tipo II ( <i>Rodríguez-Martínez, 2005</i> ). ....	18
<b>Figura 9.</b> Inhibición de la acción de las topoisomerasas por fluoroquinolonas ( <i>Rodríguez-Martínez, 2005</i> ). ....	19
<b>Figura 10.</b> Modelo de Shen. A: Puntos más importantes en la interacción de las quinolonas. B: Interacción quinolona-ADN. Modificado de Mitscher LA ( <i>Mitscher, 2005</i> ). ....	21
<b>Figura 11.</b> Sitio de unión de las quinolonas en la interfase de las subunidades GyrA-GyrB ( <i>Hedde, 2000</i> ). ....	22
<b>Figura 12.</b> Proceso de conjugación ( <i>Snyder, 2007</i> ). ....	39
<b>Figura 13.</b> Representación esquemática de una secuencia repetida invertida (IR) con su eje de simetría ( <i>Fernández, 2010</i> ). ....	41
<b>Figura 14.</b> Representación esquemática de una secuencia repetida invertida (IR) no contigua en los extremos de un transposón con su eje de simetría ( <i>Fernández, 2010</i> ). ....	42
<b>Figura 15.</b> Representación esquemática de las secuencias cortas repetidas directas (DR) resultantes en el ADN receptor (color azul) tras la inserción de un transposón (color verde) ( <i>Fernández, 2010</i> ). ....	42
<b>Figura 16.</b> Representación esquemática de una IS. Las zonas de color gris representan secuencias de ADN no codificante. ORF: marco de lectura abierta. En amarillo intenso: IRR e IRL (Inverted Repeat Right/Left). En amarillo pálido: DR (Direct Repeat) ( <i>Fernández, 2010</i> )...	43

---

<b>Figura 17.</b> La acción de la transposasa sobre sus extremos terminales IR provoca la transposición de la secuencia de inserción ( <i>Snyder, 2007</i> ). .....	44
<b>Figura 18.</b> Representación esquemática de un transposón compuesto de clase I. Las zonas de color gris representan secuencias de ADN no codificante. En amarillo intenso: transposasas, IRR e IRL (Inverted Repeat Right/Left) ( <i>Fernández, 2010</i> ). .....	45
<b>Figura 19.</b> La acción de la transposasa sobre sus extremos terminales IR más externos de dos IS cercanos del mismo tipo provoca la transposición del elemento completo ( <i>Snyder, 2007</i> ). 46	
<b>Figura 20.</b> La acción de la transposasa sobre sus extremos externos (a-a, color azul) o sobre los extremos terminales IR más internos (b-b, color rojo) ( <i>Snyder, 2007</i> ). .....	47
<b>Figura 21.</b> Representación esquemática de un transposón compuesto de clase II. Las zonas de color gris indican secuencias de ADN no codificantes. En amarillo intenso: transposasa, IRR e IRL (Inverted Repeat Right/Left). En marrón: resolvasa y sitios res de recombinación. Adyacente a la resolvasa un gen de resistencia cualquiera transportado por el Tn complejo ( <i>Fernández, 2010</i> ). .....	48
<b>Figura 22.</b> Proceso de integración de sucesivos genes casete ( <i>Rowe-Magnus, 1999</i> ). .....	51
<b>Figura 23.</b> Representación esquemática de un proceso de integración de un gen casete ( <i>Bennett, 1999</i> ). .....	52
<b>Figura 24.</b> Integrón de clase 1 y su asociación con Tn402 ( <i>Cantón, 2006</i> ). .....	52
<b>Figura 25.</b> Estructura de In6 y de In7. En azul intI1 y en amarillo ISCR1. (catA2: gen de resistencia a cloranfenicol y drfA10: gen de resistencia a trimetoprim) ( <i>Toleman, 2006</i> ). .....	53
<b>Figura 26.</b> Integrón de clase 2 (flechas grises) y su asociación con Tn7 (flechas punteadas) ( <i>Rodríguez, 2008</i> ). .....	54
<b>Figura 27.</b> Secuencia de aminoácidos de distintas proteínas Qnr resaltando en amarillo los pentapéptidos repetidos con la secuencia consenso de S/T/A/V/C-D/N-L/F-S/T/R-G ( <i>Strahilevitz, 2009</i> ). .....	56
<b>Figura 28.</b> Distribución global de Qnr ( <i>Robicsek, 2006</i> ). .....	64
<b>Figura 29.</b> Entorno genético de cepas portadoras de <i>qnr</i> y comparación de la secuencia con otros integrones de clase 1 ( <i>Rodríguez-Martínez, 2005</i> ). .....	69
<b>Figura 30.</b> Idéntico entorno genético de <i>qnr</i> en los plámidos pMG252 y pQR1 ( <i>Mammeri, 2008</i> ). .....	69

<b>Figura 31.</b> Comparación de las dos diferentes estructuras para estos 4 aislamientos (Rodríguez-Martínez, 2007). .....	71
<b>Figura 32.</b> Tn2012 descrito por primera vez para ISEcp1C y qnrB19 (Cattoir, 2008B). .....	77
<b>Figura 33.</b> Estructura del plásmido p61/9 (Dionisi, 2009). .....	78
<b>Figura 34.</b> Entorno genético del gen qnrB19. Representación esquemática de los resultados de secuenciación comparados con las regiones flanqueantes halladas por Dionisi y colaboradores (Dionisi, 2009) Las flechas negras indican secuencias de inserción o secuencias repetidas. Las flechas blancas indican genes de resistencia antibiótica. Las flechas blancas ralladas indican secuencias parciales. El asterisco indica que la secuencia contiene una mutación puntual en comparación con la secuencia depositada en GenBank con el número de acceso: FJ790886. IR, repeticiones invertidas (Hordijk, 2011). .....	79
<b>Figura 35.</b> ISPmi1 está comprendida entre las IRL e IRR marcadas. En su interior, orfA y orfB, solapados, contienen un centro activo DDE. orfA es una proteína tipo-amidasa (Wang, 2009). .....	79
<b>Figura 36.</b> Entorno genético descrito en <i>Shigella flexneri</i> 2b (Hata, 2005). .....	79
<b>Figura 37.</b> Comparación de la estructura del plásmido pFBAOT6 de una cepa de <i>Aeromonas punctata</i> vs. pA3S7 portador de qnrS2, insertado en medio de mpR (metalopeptidasa). Dos barras negras señalan las IR y dos triángulos pequeños las DR (CCTCC) las dos diferentes estructuras para estos 4 aislamientos (Cattoir, 2008A). .....	80
<b>Figura 38.</b> Entorno genético de diferentes alelos de qnrA, qnrB, qnrS y aac(6')-Ib-cr en asociación con qnrA1 (pHSH2 China 2000) y qnrB10 (pARCF702 Argentina 2006) (Strahilevitz, 2009). .....	82
<b>Figura 39.</b> bla <sub>CTX-M-15</sub> en una estructura Tn3 (Eckert, 2006). .....	86
<b>Material y Métodos</b> .....	<b>93</b>
<b>Figura 40.</b> Método de doble difusión con discos para la confirmación fenotípica de la producción de beta-lactamasa de espectro extendido (BLEE). Distorsión del halo de inhibición debido a la inhibición de la BLEE por la acción del ácido clavulánico (en el centro de la placa) .....	95
<b>Figura 41.</b> Representación esquemática de la región correspondiente a qnr en un integrón compuesto de clase 1. En rojo, los nombres de los oligonucleótidos. Las flechas indican de forma aproximada los puntos de anclaje. Depositada en GenBank, accession AF174129 (Fernández, 2010). .....	112

---

<b>Resultados .....</b>	<b>119</b>
<b>Figura 42.</b> Procedencia de los aislamientos clínicos. IPPB: infección de piel y partes blandas, Respiratorio: muestras relacionadas con infecciones respiratorias de vías altas y bajas.....	120
<b>Figura 43.</b> Distribución por especies de los aislamientos clínicos. ....	120
<b>Figura 44.</b> Descripción global de los determinantes RPFQs detectados.....	125
<b>Figura 45.</b> Electroforesis del producto amplificado de algunos aislamientos con RPFQs ( <i>aac(6')-Ib-cr</i> ). Calle 1 y 11: peso molecular (PM). En las calles 6, 14 y 15, tras secuenciación se comprobó que el amplificado obtenido no correspondió a ninguno de los genes estudiados.....	126
<b>Figura 46.</b> Prevalencia de los distintos determinantes de RPFQs y sus combinaciones.....	127
<b>Figura 47.</b> Distribución de los determinantes de RPFQs por especie. ....	131
<b>Figura 48.</b> Patrones de bandas obtenidos por REP-PCR de los aislamientos con RPFQs. Calle 1: peso molecular (PM).....	136
<b>Figura 48.</b> Patrones de bandas obtenidos mediante ERIC-PCR de los aislamientos con RPFQs. ....	136
<b>Figura 50.</b> Patrones de bandas obtenidos de determinados aislamientos con RPFQs mediante RFLP-PFGE.....	137
<b>Figura 51.</b> Representación esquemática del entorno genético de <i>qnrA1</i> de la cepa 305. ...	143
<b>Figura 52.</b> Representación esquemática de la localización de la BLEE CTX-M-9 de la cepa 305 <i>qnrA1</i> -positiva. ....	143
<b>Figura 53.</b> Representación esquemática del entorno genético de <i>qnrB2</i> de la cepa 142. ...	144



<b>Revisión bibliográfica</b> .....	<b>9</b>
<b>Tabla 1.</b> Tipos de topoisomerasas bacterianas en <i>Escherichia coli</i> (Modificada de Rodríguez-Martínez, 2006). .....	17
<b>Tabla 2.</b> Algunos parámetros farmacocinéticos de las quinolonas más usadas (Modificada de Alós, 2009). .....	23
<b>Tabla 3.</b> Actividad <i>in vitro</i> de las principales quinolonas usadas en España frente a varios de los patógenos más importantes en la clínica (Modificada de Alós, 2009). Los valores expresan CMI <sub>90</sub> (mg/L). .....	26
<b>Tabla 4.</b> Mutaciones más frecuentes descritas en las subunidades GyrA, GyrB, ParC y ParE en distintas especies patógenas resistentes a quinolonas (Modificada de Rodríguez-Martínez, 2006). Varios aminoácidos entre paréntesis indican que pueden ocurrir varias sustituciones diferentes asociadas a resistencia.....	33
<b>Tabla 5.</b> Componentes de sistemas de bombas de expulsión activa en diferentes microorganismos (Modificada de Rodríguez-Martínez, 2005). .....	36
<b>Tabla 6.</b> Algunos ejemplos de transposones compuestos clase I. Abreviaturas: Kb (kilobase), Kn (kanamicina), Bl (bleomicina), St (estreptomicina), Cl (cloranfenicol), Tt (tetraciclina), Gn (gentamicina), TOB (tobramicina) (Bennett, 2008). .....	45
<b>Tabla 7.</b> Algunos ejemplos de transposones compuestos clase II. Abreviaturas: Kb (kilobase), AMP (ampicilina), St (estreptomicina), Sl (sulfonamidas), Tt (tetraciclina), Hg (mercuriales), Er (eritromicina) (Bennett, 2008). .....	48
<b>Tabla 8.</b> Ejemplos de genes casete conocidos para algunos antibióticos (Modificada de Fernández, 2010). .....	54
<b>Tabla 9.</b> Características de determinantes de RPFQs, su asociación con BLEES y entorno genético de <i>qnr</i> en diferentes referencias bibliográficas y áreas geográficas durante los últimos años. ....	72
<b>Tabla 10.</b> Principales características de BLEEs en Gram negativos (Modificada de Fernández, 2010). .....	83
<b>Tabla 11.</b> Principales BLEEs tipo CTX-M según cluster (Modificada de Fernández, 2010). .....	84
<b>Material y Métodos</b> .....	<b>93</b>
<b>Tabla 12.</b> Oligonucleótidos utilizados para la detección de determinantes de RPFQs. ....	97
<b>Tabla 13.</b> Oligonucleótidos diseñados para la amplificación del gen <i>qnrB</i> completo. ....	98

<b>Tabla 14.</b> Oligonucleótidos utilizados para caracterizar las BLEEs presentes en aislamientos con determinantes de RPFQs. ....	99
<b>Tabla 15.</b> Oligonucleótidos utilizados para la detección de mutaciones en la ADN girasa y la topoisomerasa IV. ....	100
<b>Tabla 16.</b> Oligonucleótidos utilizados en la REP-PCR.....	102
<b>Tabla 17.</b> Oligonucleótidos utilizados en la ERIC-PCR.....	103
<b>Tabla 18.</b> Oligonucleótidos utilizados para la detección de <i>ISEcp1</i> (Richter, 2010). ....	110
<b>Tabla 19.</b> Oligonucleótidos utilizados para el estudio del entorno genético de cepas con determinantes de RPFQs. Se muestra la pareja de oligonucleótidos usada en la detección de <i>qnrA</i> (estudio entorno genético cepa 305) (Modificada de Fernández, 2010). ....	111
<b>Resultados</b> .....	<b>119</b>
<b>Tabla 20.</b> Distribución de la procedencia de las cepas clínicas según especie. ....	121
<b>Tabla 21.</b> Porcentaje (%) de resistencia a diferentes antibióticos según especie. AMP: ampicilina; AMC: amoxicilina/ácido clavulánico; FOX: cefoxitina; AN: ácido nalidíxico; CIP: ciprofloxacino; CTX: cefotaxima; TOB: tobramicina; GM: gentamicina; AK: amikacina; IPM: imipenem. ....	124
<b>Tabla 22.</b> Distribución de los codones y sus correspondientes aminoácidos claves para discernir entre los diferentes alelos de QnrB. En color rojo se muestra el alelo definitivo de los aislamientos tras el análisis correspondiente de la secuencia. ....	128
<b>Tabla 23.</b> Características de los aislamientos con determinantes de RPFQs del estudio. (WT: <i>wildtype</i> , cepa salvaje; BLEE: beta-lactamasa de espectro extendido; AN: ácido nalidíxico; CIP: ciprofloxacino; CTX: cefotaxima; GM: gentamicina; TOB: tobramicina; AK: amikacina; NA: no aplica). ....	129
<b>Tabla 24.</b> Aislamientos clínicos de enterobacterias productoras de BLEEs detectadas en el estudio.....	132
<b>Tabla 25.</b> Distribución de genes de RPFQs en aislamientos productores y no productores de BLEEs. ....	139
<b>Tabla 26.</b> Relación entre mutaciones en las subunidades de la ADN girasa y la topoisomerasa IV y presencia de determinantes de RPFQs (WT: <i>wildtype</i> , cepa salvaje; aac: <i>aac(6')-Ib-cr</i> ).140	
<b>Tabla 27.</b> Frecuencia de selección de mutantes de primer escalón y su CMI (mg/L) a Ciprofloxacino (CIP) y Ofloxacino (OF). (NP: No procede). ....	147

**Tabla 28.** Frecuencia de selección de mutantes de segundo escalón y su CMI (mg/L) a Ciprofloxacino (CIP) y Ofloxacino (OF). (NP: No procede). ..... 148

**Tabla 29.** Comparación de las CMIs (mg/L) a ciprofloxacino (CIP) obtenidas por el método de referencia (E-test) y el sistema automatizado Vitek 2. AN: ácido nalidíxico; R: resistente; I:intermedio; S: sensible..... 150



---

## *I. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN*



Las fluoroquinolonas forman parte de los antibióticos más comúnmente prescritos tanto a nivel hospitalario como comunitario, debido en parte a su actividad antimicrobiana de amplio espectro así como por la posibilidad de administración vía oral. Como consecuencia de este uso masivo, la prevalencia de microorganismos Gram negativos, especialmente de la familia *Enterobacteriaceae*, resistentes a quinolonas está aumentando a nivel mundial y ha comenzado a condicionar de forma significativa su utilización en algunas circunstancias.

La resistencia a quinolonas está mediada tradicionalmente por mutaciones de genes cromosómicos que codifican para la topoisomerasa II (ADN-girasa) y/o topoisomerasa IV o bien por mutaciones de genes reguladores de la expresión de bombas de expulsión activa. Se pensaba que la resistencia a quinolonas sólo podía adquirirse por mutaciones cromosómicas, hasta que en 1998 se describió por primera vez resistencia a quinolonas transmisible horizontalmente mediante un plásmido conjugativo. Esta diseminación horizontal de mecanismos de resistencia a fluoroquinolonas abre la posibilidad de una rápida extensión de la resistencia a este grupo de antimicrobianos, más aún con el extenso uso de las mismas.

Desde la publicación de este primer elemento transmisible horizontalmente, denominado *qnrA*, se han descrito hasta la fecha tres mecanismos de resistencia plasmídica a fluoroquinolonas (RPFQs) diferentes: (i) genes *qnr* (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC* y *qnrS*) codificantes de proteínas Qnr que protegen a las topoisomerasas de la acción de las quinolonas, (ii) genes que codifican para una variante de la aminoglucosidasa acetiltransferasa capaz de modificar también a ciprofloxacino y norfloxacino denominada *aac(6′)-Ib-cr* y (iii) genes *qepA*, que codifican una bomba de expulsión. Multitud de estudios epidemiológicos han informado del aumento de la prevalencia de estos elementos genéticos plasmídicos en aislamientos clínicos de todo el mundo. Sin embargo, la mayoría de los estudios se han centrado en enterobacterias con fenotipos

específicos de resistencia, como presencia de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEEs) y/o sensibilidad disminuida a ácido nalidíxico o fluoroquinolonas, incluso cuando estos genes de RPFQs no confieren, por ellos mismos, resistencia de alto nivel a fluoroquinolonas.

Existen pocos datos sobre la prevalencia de estos mecanismos de resistencia plasmídicos en España, y los estudios disponibles se refieren sobre todo a su frecuencia en cepas productoras de BLEEs. Además, la mayor parte de los datos se refieren a *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp., pero se desconocen en otras especies de enterobacterias. Por tanto, sería interesante conocer la presencia de genes asociados a RPFQs en aislamientos clínicos de distintas especies de enterobacterias, portadoras y no portadoras BLEEs, así como estudiar los entornos genéticos a los que se asocian en unos y otros grupos, ya que podrían ser un indicador de su probabilidad de difusión y asociación a multirresistencia. Por otra parte, la RPFQs se asocia, de forma prácticamente sistemática, a resistencia de bajo nivel a fluoroquinolonas; sin embargo, la presencia de estos determinantes en una situación de uso masivo de FQs, puede favorecer el desarrollo de resistencia de alto nivel a las mismas con mayor frecuencia que en cepas que no poseen dichos determinantes. Por tanto, sería de gran importancia recabar información relativa a la influencia real que la presencia de estos genes plasmídicos pueda tener sobre la frecuencia de selección de mutantes con alto nivel de resistencia ya que, de demostrarse, podría conllevar un replanteamiento de determinadas estrategias terapéuticas a fin de minimizar el riesgo de selección de mutantes.



---

## *II. OBJETIVOS*



El **objetivo principal** de este estudio es conocer la prevalencia real de estos determinantes de RPFQs (genes *qnr*, *aac(6′)-Ib-cr* y *qepA*) en aislamientos clínicos de diferentes especies de enterobacterias consecutivos y de forma aleatoria, sin realizar una selección previa en base a la presencia de fenotipos específicos de resistencia, en la región de Murcia. Además, en los aislamientos portadores de genes RPFQs se plantean como **objetivos secundarios** los siguientes:

1. Analizar, de modo general, la asociación de los diferentes mecanismos plasmídicos de resistencia a fluoroquinolonas con la producción de BLEEs.
2. Estudiar la prevalencia de unos u otros mecanismos plasmídicos de resistencia a fluoroquinolonas en los aislamientos BLEE positivos y BLEE negativos.
3. Establecer la relación epidemiológica entre las cepas portadoras de uno o varios determinantes de resistencia plasmídica a fluoroquinolonas mediante la utilización de diferentes métodos de tipificación molecular: REP-PCR, ERIC-PCR y PFGE.
4. Estudio de la movilidad genética (transferencia horizontal) de los genes de resistencia a fluoroquinolonas mediada por plásmidos mediante ensayos de conjugación.
5. Determinación de la sensibilidad a fluoroquinolonas y a otros antibióticos tanto en las cepas clínicas que contienen uno o varios mecanismos de resistencia plasmídica a fluoroquinolonas como en los transconjugantes obtenidos a partir de ellas.

6. Establecer los entornos genéticos a los que se asocian estos genes en cepas productoras y no productoras de BLEEs, en diferentes especies de enterobacterias.
7. Estudiar la frecuencia de selección de mutantes con resistencia de alto nivel a fluoroquinolonas (ciprofloxacino) en cepas de las distintas especies, carentes de mutaciones en las topoisomerasas tipo II y tipo IV y portadoras de diferentes genes codificadores de RPFQs, o en su caso de distintas combinaciones de genes. En los mutantes seleccionados estudiar los mecanismos genéticos implicados en la resistencia a quinolonas.
8. Evaluación de la capacidad de detección de los mecanismos de resistencia plasmídica a fluoroquinolonas mediante sistemas automatizados.

---

### *III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA*

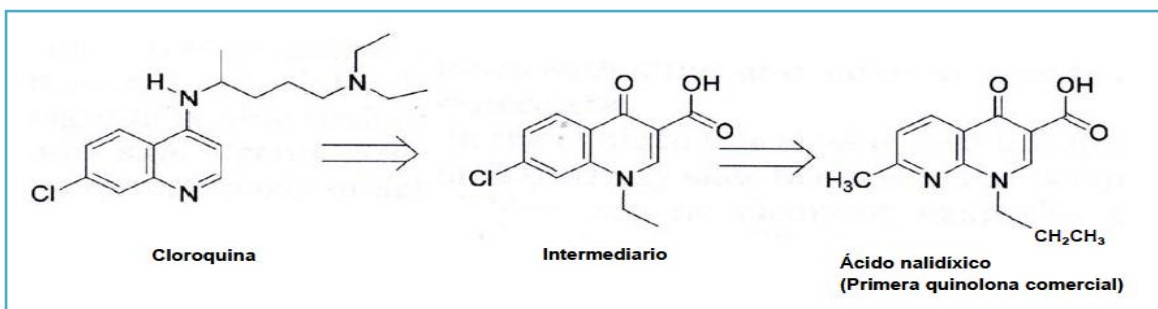


## 1. Quinolonas

### 1.1. Origen, estructura química, relación estructura-actividad y clasificación

#### Origen

En 1962, durante el proceso de síntesis y purificación de la cloroquina (fármaco para el tratamiento de la malaria) se descubrió un derivado de las quinolonas, el ácido nalidíxico (**Figura 1**), activo frente a algunas bacterias Gram negativas y capaz de alcanzar elevadas concentraciones en orina (*Leshner, 1962*). Aunque su uso clínico se limitó al tratamiento de las infecciones del tracto urinario, este hallazgo permitió que, a partir de finales de la década de 1980 y principios de 1990, tras diferentes modificaciones estructurales en el núcleo de la molécula de la 4-quinolona (**Figura 2**), se introdujeran en clínica nuevas quinolonas con actividad frente a bacterias Gram negativas, Gram positivas e incluso frente a anaerobias (*Spangler, 1996; Alós, 2009*).

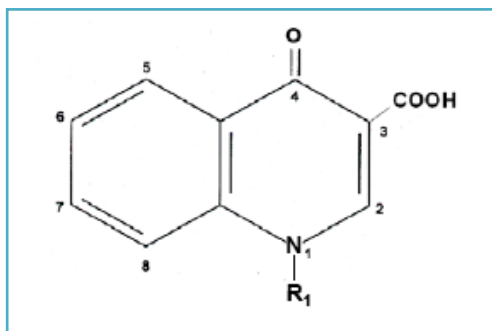


**Figura 1.** Síntesis de ácido nalidíxico a partir de cloroquina.

#### Estructura química y relación estructura-actividad

Las quinolonas de uso clínico tienen una estructura formada por dos anillos, con un nitrógeno en la posición 1, un grupo carbonilo en la posición 4 y un grupo

carboxilo en la posición 3 (**Figura 2**). La potencia y el espectro de actividad aumentan de manera significativa cuando se introduce un átomo de flúor en la posición 6, posiblemente porque mejora la penetración en tejidos y la unión a sus dianas, las topoisomerasas bacterianas. Frente a bacterias Gram negativas también aumenta la potencia si en la posición 7 se introduce un grupo piperazínico (norfloxacino, ciprofloxacino) o un grupo metil-piperazínico (ofloxacino, levofloxacino, gatifloxacino). Además, sustituyentes metilo en el grupo piperazínico mejoran la biodisponibilidad oral. Los compuestos que llevan en la posición 7 un doble anillo derivado del anillo pirrolidónico aumentan su actividad sobre bacterias Gram positivas (moxifloxacino). Un grupo metoxi en la posición 8 mejora la actividad frente a anaerobios (moxifloxacino, gatifloxacino) (Peterson, 2001; Domagala, 1994).



**Figura 2.** Estructura de la 4-quinolona (anillo bicíclico 4-oxo-1,4 dihidroquinoleína), molécula de donde derivan muchas de las quinolonas usadas en clínica.

En base a los diferentes radicales presentes en las posiciones de la molécula base 4-quinolona (**Figura 2**) podemos conocer la influencia de cada uno de ellos sobre su actividad (Bryskier, 1995):

- En la posición N-1 el sustituyente de mayor importancia es el grupo ciclopropil, que combina propiedades estéricas, espaciales y de interacción electrónica



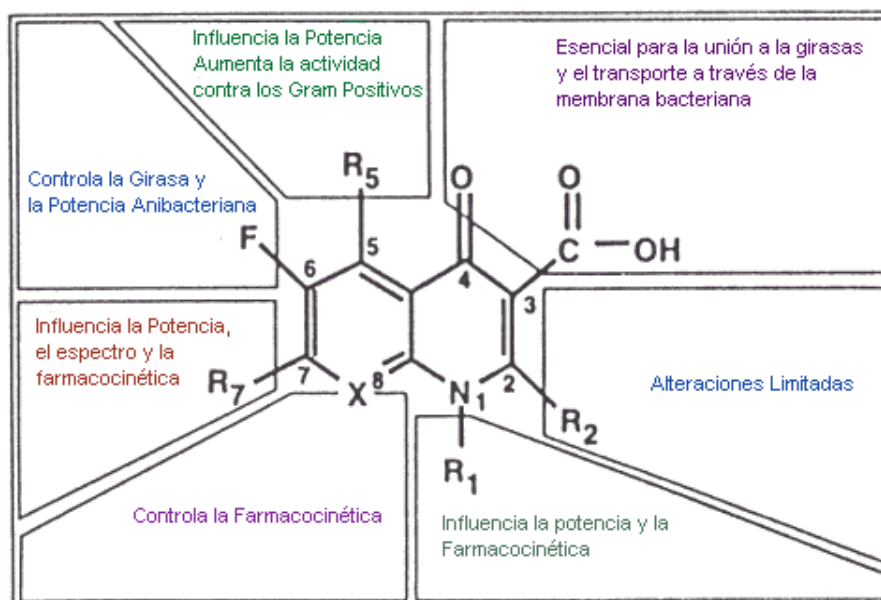
favorables para la unión a la diana. Ciprofloxacino es el ejemplo más importante con esta sustitución.

- 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. Por ejemplo, un grupo amino puede incrementar la absorción, distribución y actividad sobre especies Gram positivas. No obstante, 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 concentración mínima inhibitoria (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 mejoran la actividad biológica (potencia, espectro de acción y farmacocinética). Así, por ejemplo, las pirrolidinas y las piperazinas aumentan la potencia de estos fármacos en bacterias Gram negativas y bacterias Gram positivas, respectivamente.

- La presencia de grupos halógenos en la posición C8, como cloro o flúor, aumenta la actividad frente a anaerobios 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. Por ejemplo, el isómero levógiro de levofloxacin es 12 veces más activo que su respectivo isómero dextrógiro. La diferencia se atribuye al modo de interacción con el complejo ADN-topoisomerasa (Morrissey, 1996).

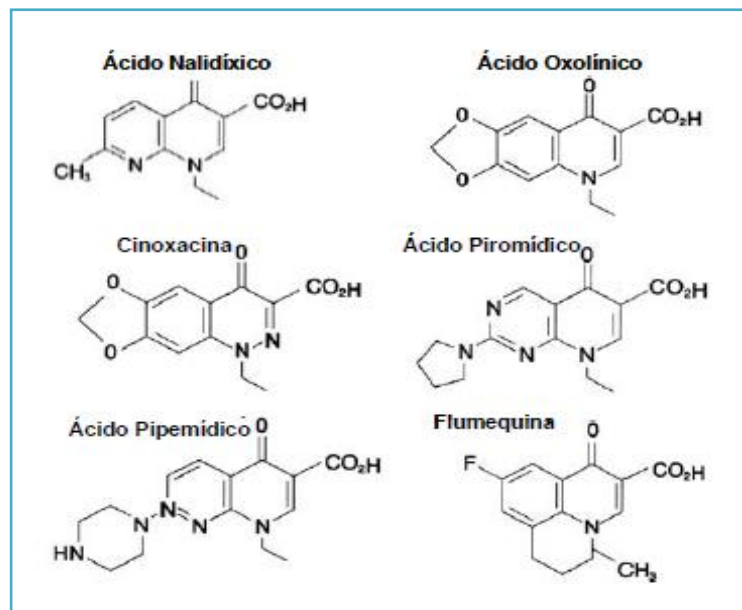
Además, hay que hacer notar que si bien ciertos sustituyentes pueden provocar cambios en la actividad biológica y/o química de la quinolona, las características finales son el resultado de la interacción de todos los radicales y el núcleo central de estos antimicrobianos (Gootz, 1998) (Figura 3).



**Figura 3.** Relación entre la estructura química y la actividad antibacteriana de las quinolonas.

### Clasificación

Las quinolonas, al igual que las cefalosporinas, pueden clasificarse por su espectro de actividad en generaciones (Naber, 1998). Las de **primera generación** (ácido nalidíxico, ácido pipemídico) (**Figura 4**), apenas usadas actualmente, tienen actividad frente a enterobacterias y algún otro microorganismo Gram negativo pero son prácticamente inactivas frente a Gram positivos, patógenos atípicos y anaerobios. Alcanzan bajas concentraciones en suero, su distribución sistémica es baja y sólo se pueden usar para el tratamiento de algunas infecciones urinarias.



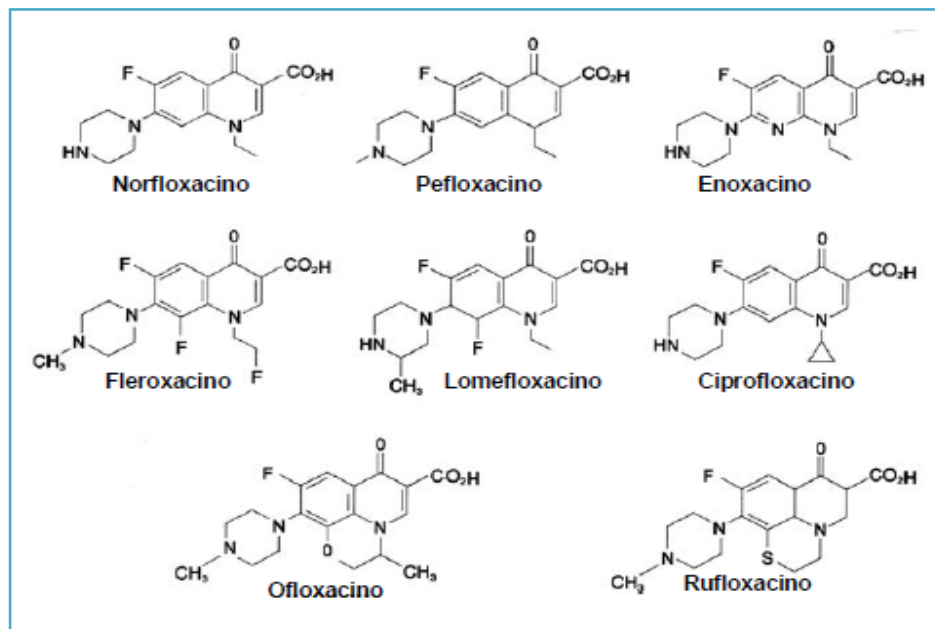
**Figura 4.** Quinolonas de primera generación.

A partir estas quinolonas, las siguientes ya incorporan un átomo de flúor en la posición 6 y se llaman por ello fluoroquinolonas. Las fluoroquinolonas de **segunda generación** (norfloxacino, ciprofloxacino) (**Figura 5**) presentan mayor actividad frente a Gram negativos, incluidos no fermentadores como *Pseudomonas aeruginosa*. Son

activas frente a algunos patógenos atípicos, pero tienen moderada actividad frente a Gram positivos y prácticamente nula frente a anaerobios.

Las fluoroquinolonas de **tercera generación** (levofloxacino) (**Figura 6**) mantienen las características de las segundas pero además tienen una mejor absorción por vía oral y mejor actividad frente a *P. aeruginosa*, Gram positivos y patógenos atípicos.

Finalmente, las fluoroquinolonas de **cuarta generación** (moxifloxacino) (**Figura 7**) aportan una mejora en la actividad frente a Gram positivos y además, una buena actividad frente a anaerobios, aunque disminuye su actividad frente a *P. aeruginosa*. Por sus mejores propiedades farmacocinéticas las fluoroquinolonas de tercera y cuarta generación pueden usarse para el tratamiento de infecciones sistémicas (Alós, 2009).



**Figura 5.** Fluoroquinolonas de segunda generación.

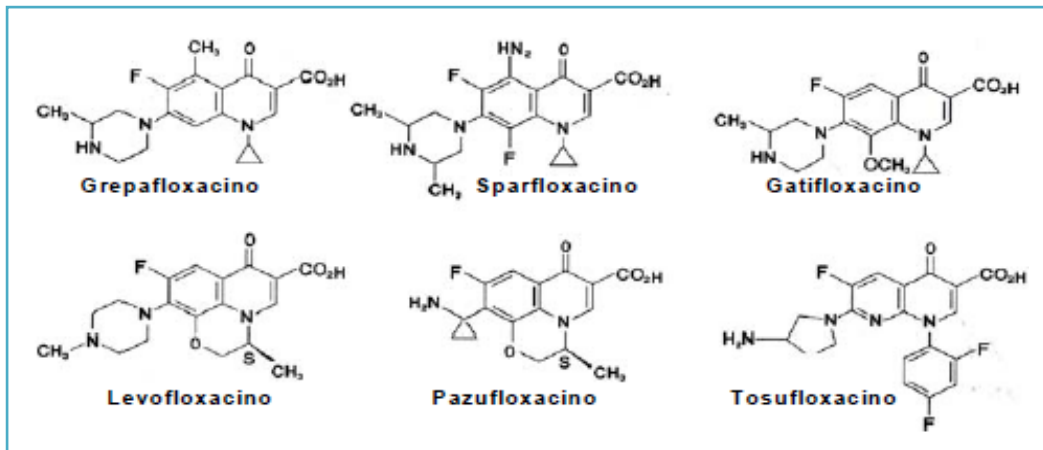


Figura 6. Fluoroquinolonas de tercera generación.

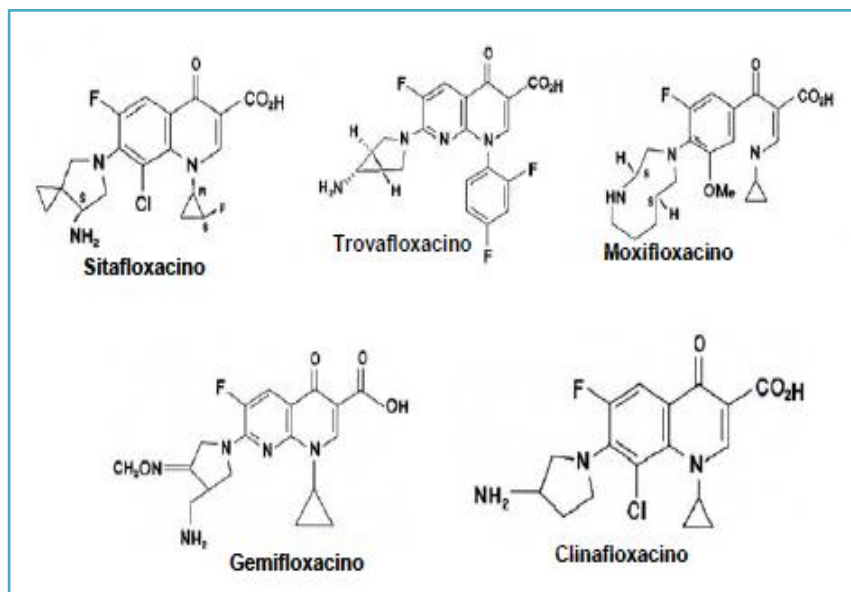


Figura 7. Fluoroquinolonas de cuarta generación.

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 situado en la posición 7 (**Figuras 4-7**).

### 1.2. Mecanismo de acción

Las fluoroquinolonas penetran en bacterias Gram negativas a través de porinas, aunque también lo pueden hacer directamente a través de la bicapa lipídica, y luego atraviesan la membrana interna para alcanzar el citoplasma. En bacterias Gram positivas la penetración ocurre directamente a través de la envuelta celular hasta alcanzar el citoplasma (Nikaido, 1993). Posteriormente, actúan a nivel del ADN bacteriano inhibiendo la síntesis de ADN. Esta inhibición ocurre por la interacción del antibiótico con el complejo formado por la unión del ADN a las topoisomerasas tipo II (ADN girasa y topoisomerasa IV), dianas de las quinolonas.

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 (Wang, 1971). Posteriormente, se fueron descubriendo otras topoisomerasas diferentes que se clasifican según su mecanismo de acción. En *Escherichia coli* se conocen 4 topoisomerasas diferentes (**Tabla 1**).

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) actúan cortando ambas hebras de un segmento de ADN, pasando otro segmento de ADN a través de la rotura, y volviendo a unir los extremos libres de ambas cadenas (Kato, 1990) (**Figura 8**). En ambos casos el proceso es energéticamente desfavorable, consumiéndose ATP durante el mismo (Wang, 1996).

La ADN girasa y la topoisomerasa IV están estructuralmente relacionadas y constan de dos pares de subunidades diferentes, las subunidades GyrA (875 aminoácidos) y GyrB (804 aminoácidos) en el caso de la ADN-girasa (codificadas por los

genes *gyrA* y *gyrB*, respectivamente) y las subunidades ParC (572 aminoácidos) y ParE (630 aminoácidos) en el caso de la topoisomerasa IV (codificadas por los genes *parC* y *parE*, respectivamente) (Kato, 1990; Wang, 1996). Concretamente, existe una identidad aminoacídica del 36% entre GyrA y ParC, y del 40% entre GyrB y ParE. 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.

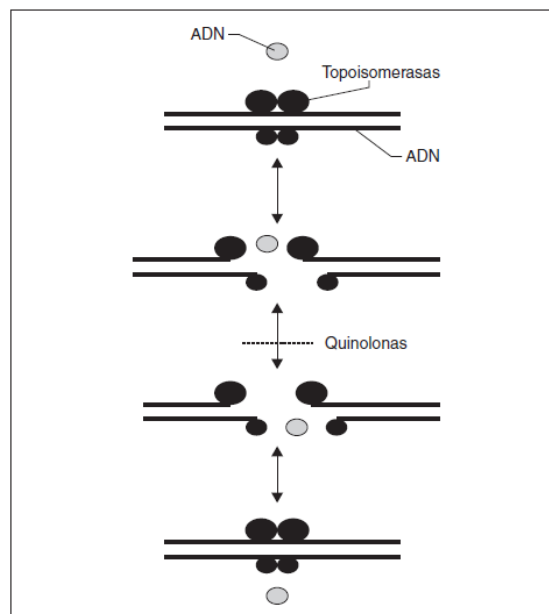
**Tabla 1.** Tipos de topoisomerasas bacterianas en *Escherichia coli* (Modificada de Rodríguez-Martínez, 2006)

Topoisomerasa	Tipo	Función principal	Genes	Año descubrimiento
<b>Topoisomerasa I</b>	I	Elimina superenrollamiento negativo	<i>topA</i>	1971
<b>Topoisomerasa II (AND girasa)</b>	II	Introduce superenrollamiento negativo Elimina superenrollamiento positivo (y negativo) (Decatenasa)	<i>gyrA/gyrB</i>	1976
<b>Topoisomerasa III</b>	I	(Elimina superenrollamiento negativo) (Decatenasa)	<i>topB</i>	1989
<b>Topoisomerasa IV</b>	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 está implicada en la relajación o enrollamiento del ADN durante el proceso de síntesis de ADN. La topoisomerasa IV está implicada en la separación de los cromosomas hijos tras la replicación del ADN (Hooper, 2001). En ambos casos, las fluoroquinolonas actúan atrapando al enzima sobre el ADN durante la reacción de topoisomerización, cuando la enzima ha producido la rotura del ADN y ha generado extremos libres en éste. La unión de la fluoroquinolona estabiliza el complejo produciéndose una barrera física para el movimiento de la horquilla de replicación

(Hiasa, 1996), la ARN polimerasa (Willmott, 1994) y la ADN helicasa (Shea, 1999). La colisión de este complejo con la horquilla de replicación desencadena una serie de sucesos, entre los que se incluyen la activación del sistema SOS, pero en general poco conocidos, que tienen como resultado final la muerte celular (Rodríguez-Martínez, 2005).

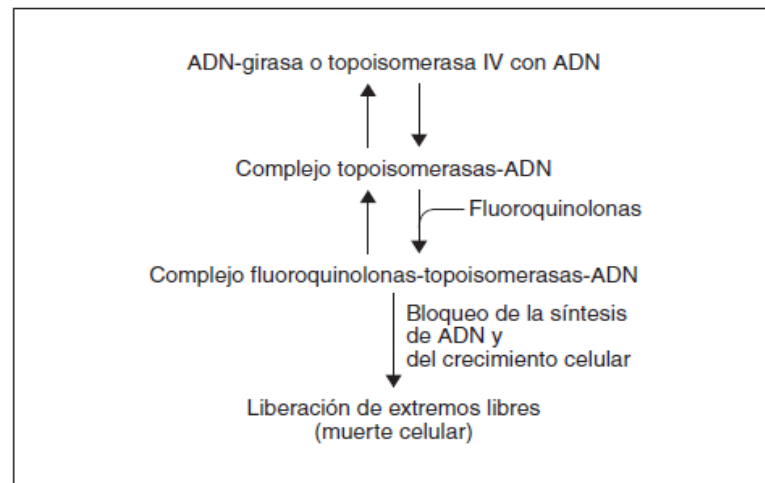


**Figura 8.** Representación esquemática del mecanismo de acción de las topoisomerasas tipo II (Rodríguez-Martínez, 2005).

En resumen, el mecanismo de acción de las quinolonas se basa en cuatro etapas (**Figura 9**) (Rodríguez-Martínez, 2005):

- Paso a través de las porinas de la pared bacteriana.
- Paso a través de la membrana citoplasmática hasta llegar al citoplasma.
- Inhibición de la ADN girasa y/o topoisomerasa IV.
- Inducción de la respuesta SOS.





**Figura 9.** Inhibición de la acción de las topoisomerasas por fluoroquinolonas (Rodríguez-Martínez, 2005).

En los Gram positivos la diana primaria es, en muchos casos, la topoisomerasa IV, mientras que en los Gram negativos es la ADN-girasa. Sin embargo, con independencia de que las bacterias sean Gram positivas o Gram negativas, 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 a la ADN-girasa (Pan, 1997; Fukuda, 1999).

En este sentido, se trabajó posteriormente, en nuevas fluoroquinolonas, como moxifloxacino y clinafloxacino, con objeto de obtener la misma o similar afinidad por ambas dianas (Takei, 2001), 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) (Strahilevitz, 2005).

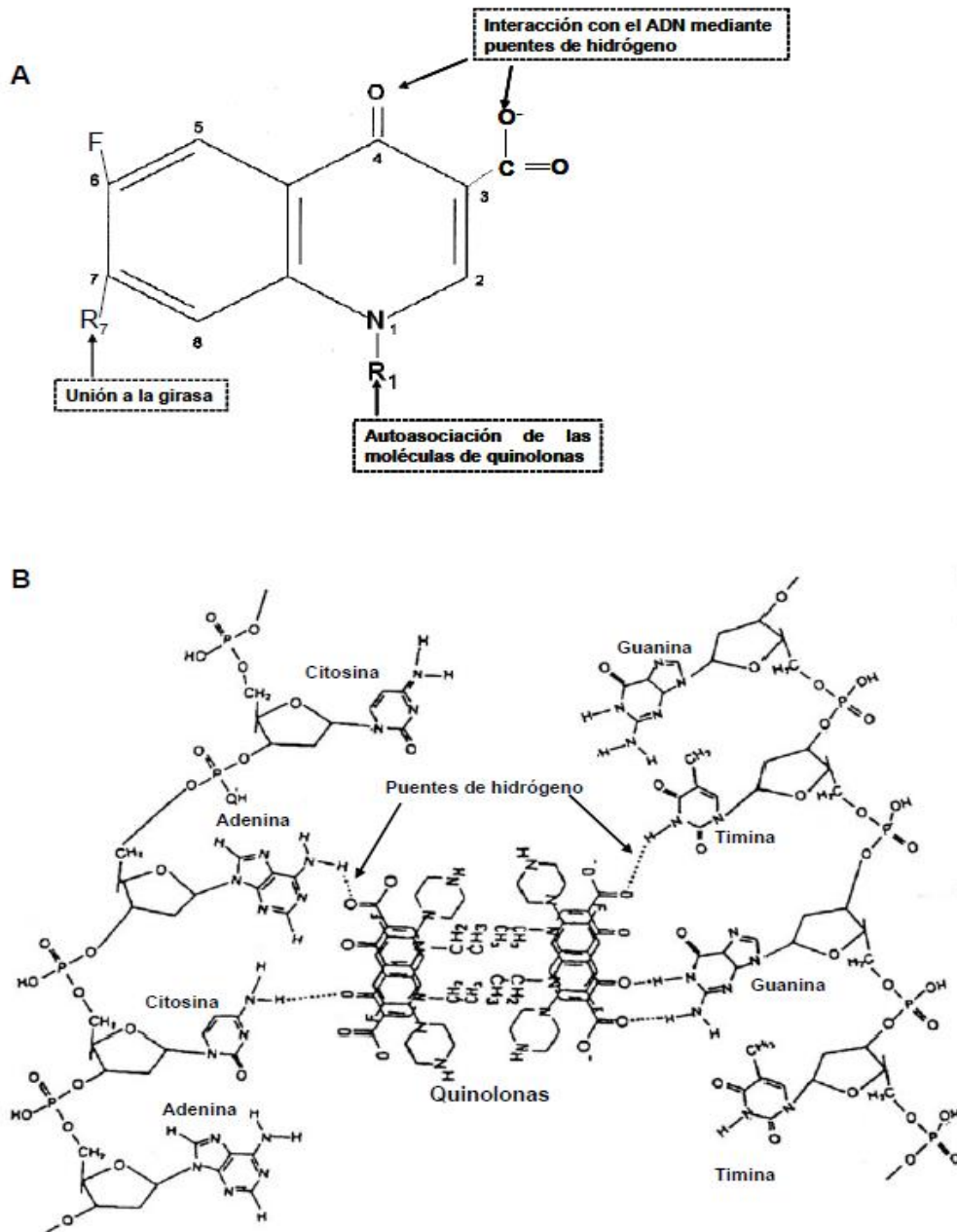
### **Interacción ADN-Topoisomerasas-Quinolonas**

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 (*Shen, 1989*). 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, de modo que 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 estructura de la quinolona serían: (i) el nitrógeno de la posición 1 (N-1), que haría posible la autoasociación de las moléculas de quinolonas, (ii) los grupos 3-carboxilo y 4-ceto, que interaccionarían con el ADN y (iii) el carbono de la posición 7 (C-7) que sería el punto de unión con la ADN girasa (**Figura 10**). Este modelo no es sólo consistente con todas las evidencias experimentales, sino que también tiene importancia en el diseño de nuevas estructuras de quinolonas.

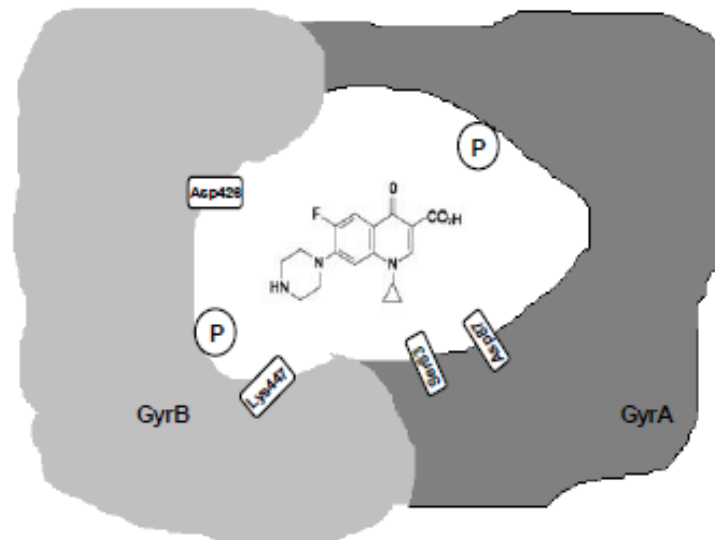
En un modelo alternativo ilustrado por Heddle y Maxwell, la interacción entre las quinolonas y las bases del ADN se apilan y confirma que las regiones de cadena simple son importantes (*Gatto, 1999; Heddle, 2000; Noble, 2003*). El modelo describe también un sitio de unión para una única quinolona en 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 11**).

Más recientemente, Tuma y colaboradores 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 (Tuma, 2002). 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.



**Figura 10.** Modelo de Shen. A: Puntos más importantes en la interacción de las quinolonas. B: Interacción quinolona-ADN. Modificado de Mitscher LA (Mitscher, 2005).



**Figura 11.** Sitio de unión de las quinolonas en la interfase de las subunidades GyrA-GyrB (Heddle, 2000).

Por otra parte, la topoisomerasa IV no ha sido estudiada con la misma profundidad que la ADN girasa, por lo que en su caso el modelo de Shen no se puede aplicar en su totalidad. La homología entre ambas topoisomerasas es del 40% y existen diferencias en su modo de acción, entre otras causas, porque el bolsillo de unión de la topoisomerasa IV es mayor que el de la ADN girasa.

### 1.3. Farmacocinética y farmacodinamia

Las quinolonas poseen propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas favorables (Hooper, 2000; Wolfson, 1989). Presentan muy buena absorción vía oral, siendo su biodisponibilidad de buena a excelente, en casi todos los casos superior al 50% y en algunos casos cercana al 100%, lo que tiene como ventaja la posibilidad de uso en terapia secuencial (Alós, 2009) (Tabla 2).

**Tabla 2.** Algunos parámetros farmacocinéticos de las quinolonas más usadas (Modificada de Alós, 2009).

Antimicrobiano	Dosis oral (mg)	C <sub>máx</sub> (mg/L)	t <sub>1/2</sub> (h)	F	Vd (L/kg)	Excreción renal (%)*	Metabolismo (%)
Ácido pipemídico	400	4.0	3.0	93	1.4-2.0	75	-
Norfloxacino	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
Ofloxacino	400	4.0	5.0	>95	1.2-1.4	90	3
Levofloxacino	500	5.0	7.0	>95	1.4	80	5
Moxifloxacino	400	3.0	13.0	90	3.0	40	50

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

C<sub>máx</sub>: concentración máxima en suero; t<sub>1/2</sub>: semivida plasmática; Vd: volumen de distribución; F: biodisponibilidad.

- **Absorción:** 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% (Walker, 1999).
- **Distribución:** El volumen de distribución en el organismo es amplio (Tabla 2), 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. Alcanzan sus valores máximos en 1-2 horas. Las concentraciones en suero son muy bajas en el caso del ácido pipemídico y norfloxacino, y de 2-7 mg/mL para las quinolonas de tercera y cuarta generación (Alós, 2009). La unión a proteínas plasmáticas es baja, entre el 20-40%, siendo la albúmina el principal punto de afinidad (Bergogne-Berezin, 2002).

- 
- **Metabolismo:** 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. La eliminación o excreción se produce mayoritariamente por vía renal para algunos agentes (ácido pipemídico, ofloxacino, levofloxacino), por vía no renal para otros (moxifloxacino), o por ambas (norfloxacino, ciprofloxacino) (**Tabla 2**). Dependiendo del porcentaje de eliminación renal de cada compuesto, deberá o no ajustarse la dosis en caso de insuficiencia renal. La excreción oscila entre 40-90% y se realiza tanto por filtración glomerular como por secreción tubular. Por otra parte, las fluoroquinolonas se excretan en parte por la pared intestinal, lo que explica su eficacia en procesos diarreicos. La semivida de eliminación varía de 1,5 a 17 horas (Alós, 2009).
  - **Actividad bactericida:** Las quinolonas tienen una actividad bactericida rápida que depende de la concentración, de modo que entre los parámetros más importantes para predecir la respuesta antimicrobiana, el éxito clínico y, posiblemente también la capacidad de selección de resistencias destaca el cociente de la concentración máxima en suero ( $C_{m\acute{a}x}$ ) y CMI. La eficacia frente a Gram negativos es óptima si el cociente  $C_{m\acute{a}x}/CMI$  es al menos 12 (Preston, 1998). Otro parámetro farmacocinético usado es el cociente del área bajo la curva de concentración sérica-tiempo y la CMI (AUC/CMI), que debe ser mayor de 125 para Gram negativos, aunque para *Streptococcus pneumoniae* se han propuesto valores mayores de 30 (Amsden, 2000; Ambrose, 2001). En general, en las fluoroquinolonas la concentración mínima bactericida (CMB) es similar a la CMI y se observan pocas diferencias de CMI al aumentar el inóculo, con la excepción de *Pseudomonas spp.* Por otra parte, las fluoroquinolonas tienen un efecto post-antibiótico (EPA) de 3-6 horas en estafilococos, algunas enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa* (Alós, 2009).

#### **1.4. Espectro de actividad**

Las fluoroquinolonas son claramente más activas frente a bacterias Gram negativas que las primeras quinolonas como el ácido nalidíxico o el ácido pipemídico. Además, presentan buena actividad frente a *P. aeruginosa* y frente a bacterias Gram positivas, aunque en diferentes grados (**Tabla 3**).

Frente a Gram negativos, la más potente, en general, es ciprofloxacino. Frente a *P. aeruginosa* las más activas son ciprofloxacino y levofloxacino. Las fluoroquinolonas de tercera generación, como ciprofloxacino y ofloxacino, tienen actividad moderada frente a Gram positivos. No se recomiendan en monoterapia, por la posibilidad de una rápida aparición de resistencia. Sin embargo, levofloxacino y, sobre todo, moxifloxacino tienen claramente aumentada su actividad frente a Gram positivos. Además, moxifloxacino es activo frente a anaerobios (Alós, 2009).

Por otra parte, algunas fluoroquinolonas son activas frente a algunas micobacterias, entre las que se incluye *Mycobacterium tuberculosis*, frente a *Legionella pneumophila*, *Chlamydia pneumoniae* y *Mycoplasma pneumoniae* (Jones, 2002).

#### **1.5. Indicaciones clínicas**

Por su espectro de actividad y potencia, las fluoroquinolonas se usan para el tratamiento de una gran variedad de infecciones, tanto en el medio hospitalario como en el ámbito extrahospitalario. Es importante remarcar que siempre que sea posible se prefiere la administración vía oral, dada su excelente biodisponibilidad, facilidad de administración, menor riesgo de efectos adversos y menor coste. La administración intravenosa es de elección en pacientes con infecciones graves o malabsorción intestinal (Alós, 2009). A continuación, se resumen las principales indicaciones clínicas:

**Tabla 3.** Actividad *in vitro* de las principales quinolonas usadas en España frente a varios de los patógenos más importantes en la clínica (Modificada de Alós, 2009). Los valores expresan CMI<sub>90</sub> (mg/L)

Microorganismo	AN	NFX	CIP	OFX	LVX	MXF
<i>Escherichia coli</i>	>32	>16	>4	>8	>8	>4
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>32	>16	>4	>8	>8	>4
<i>Proteus mirabilis</i>	>32	>16	>4	>8	>8	>4
<i>Proteus vulgaris</i>	8	0.12	0.06	0.25	0.12	0.25
<i>Enterobacter cloacae</i>	8	0.25	0.12	0.25	0.25	0.25
<i>Citrobacter freundii</i>	8	0.5	0.12	0.5	0.25	0.5
<i>Morganella morganii</i>	>32	>16	>4	>8	>8	>4
<i>Serratia marcescens</i>	>32	2	0.5	1	1	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>32	>16	>4	>8	>8	>4
<i>Campylobacter jejuni</i>	>32	>16	>4	>8	>8	>4
<i>Moraxella catarrhalis</i>	4	0.5	0.12	0.25	0.12	0.12
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	>32	>16	>1	>2	>2	>4
<i>Neisseria meningitidis</i>	1	0.03	0.015	0.03	0.03	0.06
<i>Staphylococcus aureus</i>	>32	>16	>4	>4	>4	>2
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	>32	16	2	2	1	0.12
<i>Enterococcus faecalis</i>	>32	>16	>4	>8	>8	>4
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	-	-	1	1	0.5	0.25
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	8	2	1	1	0.25
<i>Legionella</i>	1	0.5	0.12	0.12	0.06	0.06
<i>Bacteroides fragilis</i>	>16	>16	16	8	8	1

AN: ácido nalidíxico; NFX: norfloxacinó; CIP: ciprofloxacino; OFX: ofloxacino; LVX: levofloxacino; MXF: moxifloxacino.



**Infecciones del tracto urinario:** Por su actividad frente a enterobacterias, las principales causantes de infecciones urinarias, y dado que varias se eliminan de forma significativa por vía renal, norfloxacino, ciprofloxacino, ofloxacino y levofloxacino se han usado y mostrado eficaces en estas infecciones (Peterson, 2008). No obstante, debido a que las quinolonas se han usado con profusión para tratar infecciones urinarias, el aumento de resistencias es considerable. Algunas revisiones (Alós, 2009) sugieren que no deberían usarse en la mayoría de las cistitis no complicadas y reservar su indicación para infecciones complicadas. Por otro lado, al penetrar bien y concentrarse en tejido prostático, son una buena opción terapéutica en el tratamiento de las prostatitis.

**Infecciones de transmisión sexual:** Dosis única de varias fluoroquinolonas (ciprofloxacino, ofloxacino) son muy eficaces para tratar uretritis y cervicitis gonocócica no complicada. Sin embargo, el surgimiento y la extensión de resistencia a fluoroquinolonas de *Neisseria gonorrhoeae* han limitado su uso en algunas áreas. De hecho, el *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) desde 2007 ya no recomienda en EE.UU. su uso empírico para el tratamiento de la gonorrea (CDC, 2007). En España, la alta prevalencia de resistencia desaconseja también su uso para esta indicación (Alós, 2009). También se han usado para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria pélvica, en la cual el CDC recomienda actualmente como tratamiento parenteral alternativo y oral de elección la combinación de levofloxacino u ofloxacino con metronidazol (CDC, 2007), aunque debería revisarse esta indicación por la posible resistencia de *Neisseria gonorrhoeae*.

**Infecciones gastrointestinales:** En principio, tenían una excelente actividad *in vitro* frente a los principales patógenos causantes de gastroenteritis (*Salmonella* spp., *Shigella* spp., *E. coli*, *Campylobacter* spp., y otros). Sin embargo, han surgido problemas de resistencia, especialmente en *Campylobacter* spp. (Engberg, 2001).

**Infecciones intraabdominales:** Infecciones hepatobiliares e intraabdominales se han tratado con ciprofloxacino u ofloxacino, generalmente en asociación con un anaerobicida como metronidazol o clindamicina.

**Infecciones óseas y de prótesis osteoarticulares:** La experiencia clínica acumulada, sobre todo con ciprofloxacino, y su seguridad las convierte en uno de los mejores antibióticos para el tratamiento de osteomielitis crónica. En las producidas por enterobacterias hay quien las considera de primera elección, mientras que son alternativa en las producidas por *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, por los problemas de aparición de resistencia durante el tratamiento (Rissing, 1997; Karaminis, 2008).

**Infecciones de piel y partes blandas:** Aunque empleadas en varios tipos de estas infecciones, en muchos casos con resultados aceptables, actualmente no son el tratamiento de elección en la mayoría, ni siquiera alternativa en el caso de infecciones producidas por estafilococos resistentes a meticilina, por resistencia o aparición de resistencia durante el tratamiento (Stevens, 2005). En general, la monoterapia con uno de estos agentes no es adecuada, pero pueden ser útiles en combinación con otros antibióticos. En infecciones en el pie del diabético, las fluoroquinolonas figuran entre las alternativas, solas o en combinación (Consenso SEQ, 2007).

**Infecciones del tracto respiratorio:** En el tratamiento de la neumonía nosocomial, causada frecuentemente por bacilos Gram negativos, se han obtenido buenos resultados clínicos, mejores en las producidas por enterobacterias que en las causadas por *Pseudomonas aeruginosa* (Peloquin, 1989). Ante la sospecha de *P. aeruginosa* se recomiendan a dosis altas y asociadas a otro antibiótico antipseudomónico. Ciprofloxacino, ofloxacino y otras quinolonas de tercera generación presentan una moderada actividad intrínseca frente a *Streptococcus*

*pneumoniae*. Sin embargo, actualmente quinolonas como levofloxacino, y sobre todo moxifloxacino, cubren la gran mayoría de los posibles causantes de neumonía adquirida en la comunidad (*Streptococcus pneumoniae*, tanto sensible como resistente a betalactámicos y macrólidos, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* y microorganismos atípicos como *Legionella* spp., *Mycoplasma pneumoniae* y *Chlamydia pneumoniae*) (Alós, 2009).

**Infecciones por micobacterias:** Varias fluoroquinolonas presentan buena actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*, sobre todo levofloxacino y moxifloxacino. Los resultados de tratamiento con ellas han sido buenos y se consideran fármacos de segunda línea aunque cuando se han administrado en monoterapia se han dado casos de resistencia. Por otra parte, se han empleado con éxito en infecciones producidas por algunas micobacterias no tuberculosas (Alós, 2009).

**Infecciones oculares:** Las fluoroquinolonas en soluciones oftálmicas de alta concentración se han usado con éxito en el tratamiento de conjuntivitis y queratitis causadas por bacterias sensibles (Alós, 2009).

**Infecciones sistémicas graves. Fiebre en pacientes neutropénicos:** En pacientes con bacteriemia, el tratamiento con ciprofloxacino y ofloxacino ha sido eficaz, sobre todo en las causadas por enterobacterias y menos en las causadas por *Pseudomonas aeruginosa*. Actualmente, no se considera un tratamiento empírico recomendado en la bacteriemia, entre otros, por problemas de resistencia (Cisneros-Herreros, 2007). Las fluoroquinolonas de segunda generación (ciprofloxacino y ofloxacino), por su excelente actividad frente a Gram negativos y su pobre acción frente a anaerobios, son eficaces en eliminar los Gram negativos facultativos de la flora intestinal sin eliminar las bacterias anaerobias que previene de la colonización por bacterias nuevas. Se han usado con éxito en la profilaxis de infección en pacientes neutropénicos. En estos

pacientes la profilaxis antibiótica reduce la mortalidad, los episodios febriles y las infecciones bacterianas (Leibovici, 2006).

**Indicaciones pediátricas:** Por sus posibles efectos adversos sobre huesos y cartílagos, las fluoroquinolonas no se han usado en niños. Sin embargo, por su actividad frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *Stenotrophomonas maltophilia*, se usan cada vez más, sobre todo ciprofloxacino, en infecciones respiratorias en pacientes con fibrosis quística.

### **1.6. Efectos adversos**

Los efectos adversos más frecuentes que se producen en pacientes tratados con quinolonas son alteraciones gastrointestinales (10%) como náuseas, dolor abdominal, diarreas y/o inapetencia. En general, estos efectos son leves, autolimitados y sólo raramente requieren la suspensión del tratamiento (Ball, 1999). Además, estas manifestaciones aparecen con menor frecuencia cuando las quinolonas se administran por vía parenteral (García-Sánchez, 1999). Sin embargo, se ha documentado que cada quinolona tiende a producir un perfil característico de efectos adversos. Por ejemplo, algunas quinolonas (radical C7) son capaces de interactuar con receptores del sistema nervioso central (SNC), como los GABA<sub>A</sub>, produciendo cefaleas, insomnio y mareos (Halliwell, 1993). Por otra parte, el uso de ciprofloxacino, norfloxacino y levofloxacino se ha asociado a daños en tendones, principalmente en el tendón de Aquiles, por un mecanismo no bien conocido (Khaliq, 2003). Otra manifestación de toxicidad al tejido conectivo es su acción sobre los cartílagos de conjunción, por lo que están contraindicadas en niños y embarazadas, salvo raras excepciones (infecciones pulmonares en niños con fibrosis quística, infecciones complicadas del tracto urinario o exposición a *Bacillus anthracis*) (Alghasham, 2000; Sendzik, 2008).

Pueden aparecer manifestaciones cutáneas que pueden ser leves (eritema) o más graves como procesos de fotosensibilización. Esta fototoxicidad se ha observado con más frecuencia cuando el sustituyente en posición C8 es un halógeno y en las quinolonas con varios grupos flúor (Bryskier, 1995; Lietman, 1995). Otros autores (Deshpande, 2008) revelan datos sugerentes pero no concluyentes de que las fluoroquinolonas predisponen a los pacientes a enfermedad asociada a *Clostridium difficile*. Otros efectos adversos informados en la terapia con varias quinolonas son alargamiento del intervalo QTc en el electrocardiograma, que puede precipitar arritmias ventriculares fatales y de manera infrecuente efectos neurotóxicos graves como alucinaciones, depresión y reacciones psicóticas (Alós, 2009). Finalmente, comentar que se han retirado del mercado, o ni siquiera han llegado, alguna quinolonas a causa de problemas de fototoxicidad (clinafloxacino), toxicidad hepática (trovafloxacino) o cardíaca (grepafloxacino) (Alós, 2009).

## 2. Mecanismos de resistencia a quinolonas

El extenso uso de las quinolonas ha generado la aparición de bacterias resistentes a las mismas. Tradicionalmente, los principales mecanismos implicados en esta resistencia, todos mediados por elementos cromosómicos, han sido:

- a) Alteraciones en las dianas de las quinolonas (ADN girasa, topoisomerasa IV).
- b) Disminución en la acumulación del antibiótico en el interior bacteriano por impermeabilización de la membrana (pérdida de porinas o alteraciones del lipopolisacárido).
- c) Expresión de sistemas de expulsión activa.

Sin embargo, en 1998, se describe por primera vez la resistencia a quinolonas trasmisible horizontalmente a través de elementos genéticos móviles (Martínez-Martínez,

1998). Esta 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 en seres humanos, más aún con el extenso uso que se hace de las mismas (Rodríguez-Martínez, 2005).

### **2.1. Modificaciones en las dianas moleculares (ADN girasa, topoisomerasa IV)**

En bacterias Gram negativas y Gram positivas, la resistencia a quinolonas se produce, en su mayoría, por mutaciones cromosómicas en las dianas (Drlica, 1997; Hooper, 1998; Hooper, 2001). En *Escherichia coli*, la modificación de la diana es determinada por mutaciones en *gyrA* o *parC* (genes que codifican para la subunidad A de la ADN-girasa y la topoisomerasa IV, respectivamente), y en menor medida en *gyrB* o *parE* (genes que codifican para la subunidad B de la ADN-girasa y la topoisomerasa IV, respectivamente).

Las mutaciones suelen producirse en una región concreta de estos genes, denominada QRDR (región determinante de la resistencia a quinolonas, del inglés *quinolone resistance-determining region*) y que en el gen *gyrA* se sitúa entre los aminoácidos 67 y 106. Cambios en los aminoácidos de la QRDR alteran la estructura del sitio al que se unen las quinolonas en el complejo girasa-ADN y la resistencia se debe a disminución de la afinidad de la quinolona por dicho complejo (Willmott, 1993). Estudios cristalográficos sobre la estructura de GyrA sugieren también que los cambios aminoacídicos ocurren en la región que contiene el sitio activo, donde la enzima se une al ADN e interacciona con las quinolonas (Morais-Cabral, 1997). En la Tabla 4 se muestran algunas mutaciones descritas en las subunidades GyrA, GyrB, ParC y ParE en distintas especies patógenas resistentes a quinolonas.

**Tabla 4.** Mutaciones más frecuentes descritas en las subunidades GyrA, GyrB, ParC y ParE en distintas especies patógenas resistentes a quinolonas (Modificada de Rodríguez-Martínez, 2006). Varios aminoácidos entre paréntesis indican que pueden ocurrir varias sustituciones diferentes asociadas a resistencia.

	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Salmonella spp.</i>	<i>S.aureus</i>
<b>gyrA</b>	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) 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)
<b>gyrB</b>	Asp426Asn Lys447Glu			Ser464Phe	Tyr420Cys Arg437Leu Ser464(Tyr, Phe)	Asp437Asn Arg458Gln Pro456Ser
<b>parC</b>	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 Gly78Asp Ser80(Arg, Ile) Glu84(Lys, Gly)	Ser80(Phe, Tyr) Ser81Pro Glu84Lys Ala116(Pro, Glu)
<b>parE</b>	Leu416Phe Ile444Phe Leu445His Ser458Thr Glu469Asp Ile464Phe Ile529Leu				Glu453Gly Ser458Pro His461Tyr Ala498Thr Val512Gly	Asp435Asn Pro454Ser

Por otra parte, tanto en bacterias Gram negativas como en Gram positivas se ha demostrado que diferentes niveles de resistencia a quinolonas dependen de si las alteraciones ocurren en la diana primaria, la secundaria, o en ambas (Rodríguez-Martínez, 2005). Generalmente, se requieren múltiples mutaciones para alcanzar resistencia clínicamente importante en especies de la familia *Enterobacteriaceae*, de modo que cuando los microorganismos son resistentes a quinolonas, casi siempre contienen una o más mutaciones en la QRDR de los genes codificantes para la topoisomerasa II, con mayor frecuencia, y secundariamente en la topoisomerasa IV (Robicsek, 2006A). En bacterias Gram positivas la resistencia también se produce por pasos. En general, una primera mutación tiene lugar en el gen de la topoisomerasa IV, produciéndose como consecuencia ligeros aumentos de las CMI. Una segunda mutación, preferentemente en *gyrA*, resultará en un mayor aumento de las CMI, que haría que la bacteria fuese resistente a todas las quinolonas.

El uso de fluoroquinolonas que actúan en ambas topoisomerasas (II y IV), como moxifloxacin, puede tener ventajas sobre otras en la prevención de la resistencia por disminuir la posibilidad de selección de mutantes con algún grado de resistencia (Drlica, 2003).

## **2.2. Disminución de la permeabilidad de membrana**

La pérdida de permeabilidad de membrana es otra de las formas de resistencia de bajo nivel a fluoroquinolonas, por mutaciones en genes estructurales o reguladores que hacen que disminuya el número efectivo de porinas presentes en la membrana externa de las bacterias Gram negativas (Sanders, 1990). Por ejemplo, en *Escherichia coli* se han descrito mutaciones en los genes *ompC* y *ompF* y en *Klebsiella pneumoniae* en los genes *ompK35* y *ompK36* (Rodríguez-Martínez, 2005).



### 2.3. Expresión o sobreexpresión de sistemas de expulsión activa

Otro factor que afecta a la resistencia a fluoroquinolonas son mutaciones en los genes que codifican bombas de expulsión de transporte activo debido a su expresión o sobreexpresión. Se ha constatado que la sobreexpresión de estas bombas se produce tanto en bacterias Gram positivas como Gram negativas (Mazzariol, 2000) y que la magnitud de los aumentos de CMI que resultan depende de cada quinolona y de cada sistema de expulsión (Alós, 2009).

Los genes *norA* y *acrB*, codifican en *S. aureus* y en *E. coli*, respectivamente, bombas de expulsión activas de quinolonas (Muñoz-Bellido, 1999). Se ha descrito que la sobreexpresión de la bomba de expulsión NorA, por una mutación en el promotor, provoca un aumento de 2 a 4 veces la CMI de ciprofloxacino (Courvalin, 1990). Parece que la simple expresión de bombas de expulsión activa tiene un efecto limitado sobre la resistencia a fluoroquinolonas, pero su expresión basal sí contribuye de modo notable a la resistencia causada por otros mecanismos. Por ejemplo, si en cepas de *E. coli* con mutaciones en *gyrA* aparece además una mutación en *acrB*, el nivel de resistencia aumenta considerablemente.

Se han caracterizado un alto número de bombas de expulsión activa potencialmente implicadas en la resistencia a quinolonas, de modo que es difícil definir con exactitud el papel de cada una de ellas (Rodríguez-Martínez, 2005) (**Tabla 5**).

**Tabla 5.** Componentes de sistemas de bombas de expulsión activa en diferentes microorganismos (Modificada de *Rodríguez-Martínez, 2005*).

Microorganismo	Bomba	Proteína de unión a membrana	Proteína de membrana externa	Gen regulador o mutación
<i>P. aeruginosa</i>	MexB	MexA	OprM	<i>mexR</i>
	MexD	MexC	OprJ	<i>nfxB</i>
	MexF	MexE	OprN	<i>mexT</i>
	MexY	MexX	OprM	<i>mexZ</i>
<i>E. coli</i>	AcrB	AcrA	TolC	<i>acrR</i>
				<i>marA</i>
				<i>robA</i>
				<i>soxS</i>
<i>S. aureus</i>	NorA			<i>flqB</i>
				Mutación en promotor <i>arlRS</i>
<i>S. pneumoniae</i>	PmrA			

#### 2.4. Resistencia plasmídica a fluoroquinolonas (RPFQs)

En principio, las mutaciones cromosómicas explicaban la resistencia a quinolonas y la transferencia vertical de la misma. Sin embargo, de forma sorprendente en 1987 se informó de resistencia a quinolonas mediada por plásmidos en una cepa de *Shigella dysenteriae* (Munshi, 1987), aunque más tarde no pudo ser comprobada. Fue ya mucho después, en 1998, cuando se demostró y publicó por primera vez la existencia de una cepa clínica de *Klebsiella pneumoniae* aislada de un cultivo de orina en Birmingham, Alabama (EE.UU.), que contenía un plásmido, cuyos transconjugantes en *E. coli* incrementaban la resistencia a ácido nalidíxico de 4 a 32 mg/L, y a ciprofloxacino de 0.008 a 0.25 mg/L (Martínez-Martínez, 1998). Este plásmido, denominado pMG252, aumenta de 4 a 8 veces la resistencia debida a mutaciones definidas en la ADN-girasa, porinas o bombas de expulsión activa (Martínez-Martínez, 2003) y además, facilita la selección de mutantes resistentes a quinolonas. La presencia de este plásmido no alteraba el patrón de expresión de porinas en el hospedador ni

reducía la acumulación de quinolonas, lo que sugirió la existencia de un nuevo mecanismo de resistencia (Rodríguez-Martínez, 2005).

Antes de enlazar con dicho nuevo mecanismo de resistencia a fluoroquinolonas mediado por plásmidos, se realiza una breve revisión de los principales elementos genéticos móviles implicados en la resistencia a antimicrobianos.

### 3. Elementos genéticos móviles implicados en resistencia a antimicrobianos

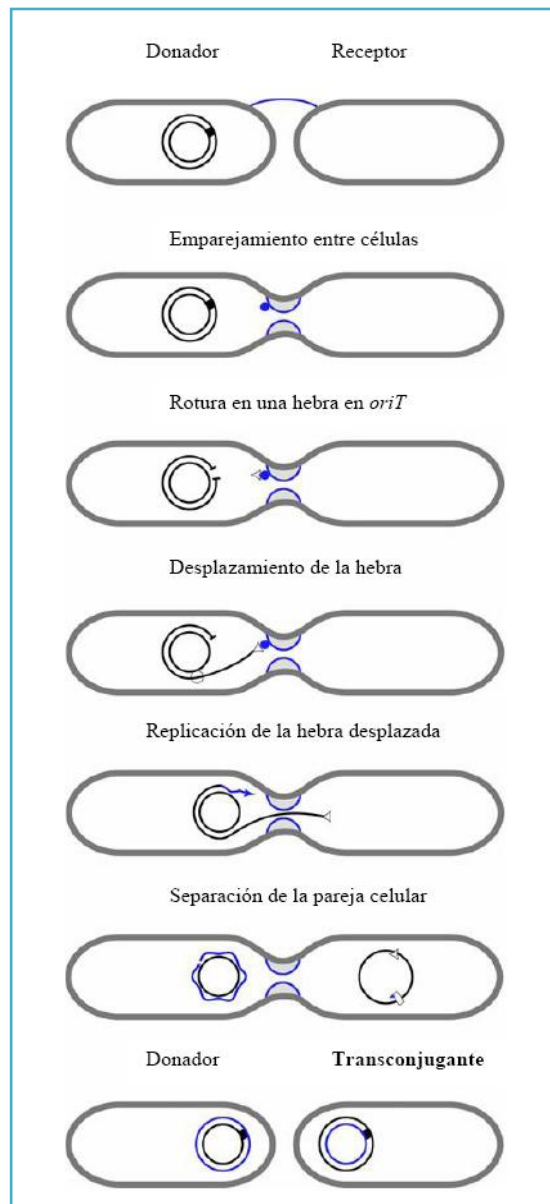
Las bacterias son capaces de heredar genes de resistencia antibiótica con el fin de obtener protección frente a la mayoría de antibióticos. La diseminación de estos genes de resistencia mediante transferencia genética horizontal ha derivado en una rápida aparición de resistencia a antibióticos entre bacterias (Ploy, 2000). Multitud de estudios han demostrado que los elementos genéticos móviles como **plásmidos** y **transposones** son capaces de facilitar la difusión de material genético entre diferentes especies o géneros bacterianos (Barlow, 2004). Adicionalmente, en los años 80, unos elementos genéticos denominados **integrones** también se identificaron dentro de estos elementos móviles (Stokes, 1989).

#### 3.1. Plásmidos

Un plásmido es una unidad de ADN extracromosómico de tamaño variable (1- >100 Kb) que se replica de forma autónoma y autorregulada, y que puede ser movilizado entre diferentes células bacterianas a través de un proceso de conjugación. La mayoría de los plásmidos son moléculas circulares de doble cadena sin extremos

libres aunque también existen plásmidos lineales en diferentes especies bacterianas y fúngicas. Durante el proceso de conjugación las dos hebras del plásmido se separan, quedando una de ellas en la célula donadora y la otra en el interior de la célula receptora, o transconjugante. De este modo, ambas hebras sirven de molde en cada una de las células para la síntesis de una nueva molécula completa de doble cadena, portando ambas una copia del plásmido (**Figura 12**). Todas las células portadoras de un plásmido auto-transferible (plásmido conjugativo) son células donadoras potenciales. Para poder conjugarse con otras, producen una estructura proteica, denominada *pilus* sexual que facilita el proceso. A pesar de que los plásmidos codifican los genes necesarios para la iniciación de su replicación, dependen de factores codificados por la célula hospedadora (ligasas, ADN polimerasas, helicasas,...) para llevar a cabo el proceso completo.

Los plásmidos se han descrito en bacterias Gram positivas y Gram negativas, en levaduras e incluso en algún otro tipo de hongo. Pueden alcanzar hasta el 10% del material genético celular total. Los plásmidos no son imprescindibles para la supervivencia celular ya que, a diferencia del cromosoma, no codifican genes esenciales. Sin embargo, a menudo codifican genes que permiten a la bacteria que los contiene adaptarse mejor a condiciones adversas o competir en superioridad con otros microorganismos para ocupar un determinado nicho ecológico. Desde un punto de vista clínico, en la mayoría de especies bacterianas de interés patógeno, está ampliamente documentada la participación de los plásmidos en el soporte y movilización de genes de resistencia antibiótica. Además, poseen la capacidad de transferirse entre diferentes especies bacterianas, hecho que también contribuye al entendimiento de la evolución de las poblaciones bacterianas.



**Figura 12.** Proceso de conjugación (Snyder, 2007).

Existen diferentes tipos de plásmidos y cada uno de ellos se caracteriza al menos por dos propiedades constantes:

- El número de copias existentes en el interior celular, que puede variar desde una a miles de ellas.

- La incompatibilidad entre plásmidos para poder ser heredados en la misma línea celular, lo que a finales de los años 80 permitió tipificar y clasificar a los plásmidos en grupos de incompatibilidad (Couturier, 1988).

La incompatibilidad plasmídica se define como el fracaso de dos plásmidos corresidentes para ser heredados de forma estable en ausencia de presión selectiva externa, es decir, si la introducción de un segundo plásmido desestabiliza la herencia del primero estos dos plásmidos serán incompatibles. Este fenómeno es consecuencia de compartir elementos de herencia plasmídica, como son los mecanismos de replicación o partición (Novick, 1987; Actis, 1999), y no a la existencia de genes específicos de incompatibilidad. En resumen, una misma célula bacteriana puede ser portadora de uno o más tipos de plásmidos diferentes, pudiendo estar cada uno de ellos en cantidades totalmente dispares pero sólo los plásmidos de diferente grupo de incompatibilidad plasmídica pueden coexistir en la misma célula.

Además de clasificar a los plásmidos por grupos de incompatibilidad, según el fenotipo que codifiquen podemos distinguir: (i) plásmidos de resistencia si portan genes de resistencia a antibióticos y metales pesados, (ii) plásmidos bacteriocinogénicos que codifican alguna bacteriocina y simultáneamente confieren inmunidad frente a esa bacteriocina a la bacteria que lo posee o (iii) plásmidos de virulencia, como por ejemplo, los portadores de la toxina tetánica en *Clostridium tetani*.

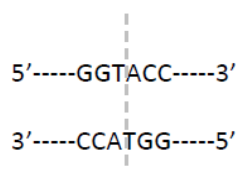
### **3.2. Transposones**

La secuenciación completa de plásmidos ha permitido el conocimiento de otros elementos fundamentales en la movilización genética, como son los transposones e

integrones presentes en los mismos, y de cómo éstos participan también en la transmisión de resistencia a genes antimicrobianos (Cantón, 2003; Dobrindt, 2001).

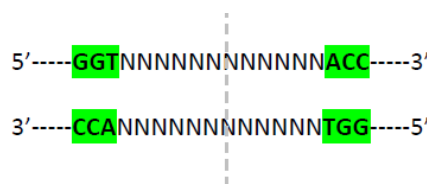
Los transposones son elementos genéticos móviles que tienen la habilidad de moverse tanto intra- como inter-molecularmente entre diferentes tipos de secuencias de ADN, es decir, de un plásmido a otro, de un plásmido a un cromosoma y viceversa (Bennett, 2008). El transposón no codifica sus propias funciones de replicación, pero sí aquellas relacionadas con la capacidad de moverse entre los elementos de ADN replicativos (plásmidos y cromosomas) sin la ayuda de la maquinaria recombinatoria del hospedador. El movimiento de un transposón se denomina transposición y la enzima que codifica y promueve dicho proceso, transposasa. Los movimientos de transposición, generalmente, no necesitan homología entre la secuencia del transposón y el sitio de inserción, de modo que la consecuencia de la transposición es la aparición del transposón en una localización diferente a la original (recombinación no homóloga e ilegítima). Pueden existir en plásmidos, en el cromosoma de un hospedador o integrados en otros transposones, valiéndose siempre de sus regiones terminales para promover su recombinación desde una región a otra de ADN (Alekhun, 2007).

Una característica común de la estructura de los transposones, exceptuando los denominados transposones *Rolling-Circle* (RC), es que contienen secuencias repetidas en sus extremos denominadas secuencias repetidas invertidas (IR). Son dos secuencias que, siendo una idéntica o prácticamente idéntica a la otra, se encuentran dispuestas en orientación inversa, una en cada hebra, generando un eje de simetría entre ellas:



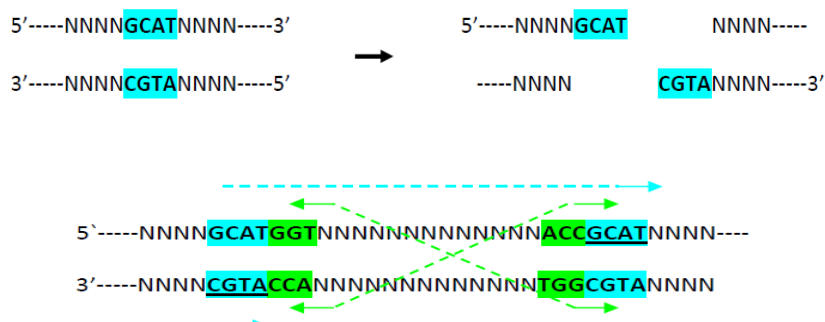
**Figura 13.** Representación esquemática de una secuencia repetida invertida (IR) con su eje de simetría (Fernández, 2010).

En el caso de los transposones, estas secuencias generadas a cada lado del eje de simetría, no se hallan contiguas, pero aún así siguen formando una repetición invertida. Las IR de los transposones suelen tener varios pb (entre 10 y 30) y no siempre son una copia perfecta entre ellas, basta con que presenten alta homología. De este modo, en todos los procesos de transposición, la transposasa corta la secuencia donadora en los extremos del transposón reconociendo determinadas IR para después insertar dicho fragmento en el ADN receptor.



**Figura 14.** Representación esquemática de una secuencia repetida invertida (IR) no contigua en los extremos de un transposón con su eje de simetría (Fernández, 2010).

Otra característica común, exceptuando a los transposones RC, es la presencia adicional de secuencias cortas repetidas directas (DR) en el ADN receptor una vez ha ocurrido el proceso de transposición. Son, por tanto, consecuencia de la inserción del transposón en el corte generado en el ADN receptor (color azul), ya que se produce un proceso natural de rellenado de “huecos” que deriva en la formación de estas DR al duplicarse en la misma cadena:



**Figura 15.** Representación esquemática de las secuencias cortas repetidas directas (DR) resultantes en el ADN receptor (color azul) tras la inserción de un transposón (color verde) (Fernández, 2010).

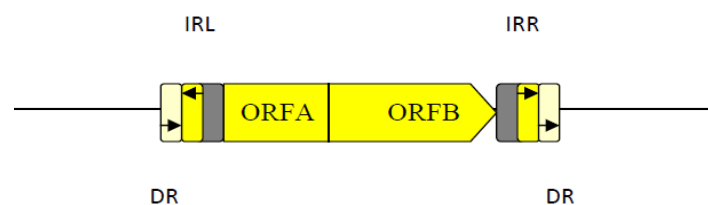


Se han descrito distintos tipos de transposones bacterianos en función de su estructura genética: las secuencias de inserción, que son los transposones bacterianos más pequeños, los transposones compuestos de clase I y de clase II (Fernández, 2010).

Al igual que ocurre con los plásmidos, si el transposón contiene al menos un gen de resistencia a antimicrobianos, se denomina transposón de resistencia.

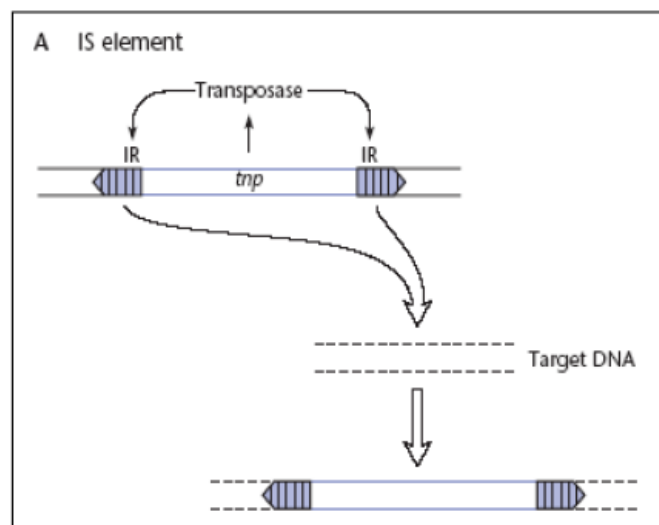
### 3.2.1. Secuencias de inserción

Las secuencias de inserción (IS) son elementos genéticos de menos de 2.5 kb pero con la misma capacidad de transposición que los grandes transposones. Actualmente se conocen múltiples familias de IS: IS1, IS3, IS4, IS5, IS6, IS21, IS30, IS66, IS91, IS110, IS200/IS605, IS256, IS630, IS982, IS1380, ISAs1 e ISL3. Su estructura es sencilla, ya que codifican poco más que la transposasa que les permite promover su propia transposición e integrarse en multitud de sitios específicos. Esta enzima está codificada por uno o dos marcos de lectura abierta (ORF, *Opening Read Frame*) que consumen la práctica totalidad de la longitud del elemento. Las IS van flanqueadas por unas secuencias repetidas invertidas, IRR e IRL (*Inverted Repeat Right/Left*, respectivamente). Sólo algunas familias carecen de ellas: IS91, IS110 y IS200/IS605 (Mahillon, 1998). Tras la inserción, al igual que en el caso de los transposones, se generan las DR en el ADN receptor, que quedan flanqueando la IS. La estructura de una IS podría ser la representada en la **Figura 16**.



**Figura 16.** Representación esquemática de una IS. Las zonas de color gris representan secuencias de ADN no codificante. ORF: marco de lectura abierta. En amarillo intenso: IRR e IRL (*Inverted Repeat Right/Left*). En amarillo pálido: DR (*Direct Repeat*) (Fernández, 2010).

La longitud de estas DR, de entre 2 y 14 pb, es característica para cada elemento y generalmente siempre se generará una duplicación de longitud determinada, por ejemplo, para IS1 son 9 pb. Las IR tienen una doble funcionalidad: por un lado, proporcionan el sitio exacto para reconocimiento específico de la transposasa, y por otro, son el punto de anclaje en las reacciones de corte y transferencia de cadena que llevan a la transposición del elemento (**Figura 17**).



**Figura 17.** La acción de la transposasa sobre sus extremos terminales IR provoca la transposición de la secuencia de inserción (Snyder, 2007).

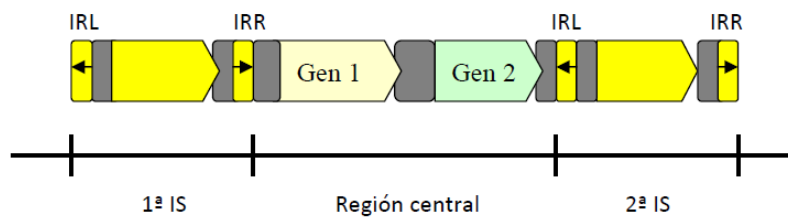
### 3.2.2. Transposones compuestos (Clase I)

Son elementos genéticos móviles formados por una serie central de genes, que por sí solos no podrían transponerse, flanqueados por una pareja de secuencia de inserción (IS) del mismo tipo formando así un transposón compuesto. Una de las diferencias con una IS, es que aporta al menos una alteración del fenotipo celular por la expresión de dichos genes centrales. La **Tabla 6** muestra algunos de los transposones compuestos más conocidos, junto a algunas de sus características.

**Tabla 6.** Algunos ejemplos de transposones compuestos de clase I. Abreviaturas: Kb (kilobase), Kn (kanamicina), Bl (bleomicina), St (estreptomycin), Cl (cloranfenicol), Tt (tetraciclina), GM (gentamicina), TOB (tobramicina) (Bennett, 2008).

Transposón	Tamaño (Kb)	IS terminal	Resistencia
<b>En Gram negativos</b>			
Tn5	5,7	IS50	Kn, Bl, St
Tn9	2,5	IS1	Cl
Tn10	9,3	IS10	Tt
Tn903	3,1	IS903	Kn
Tn1525	4,4	IS15	Kn
Tn2350	10,4	IS1	Kn
<b>En Gram positivos</b>			
Tn4001	4,7	IS256	GM, TOB, Kn
Tn4003	3,6	IS257	TOB

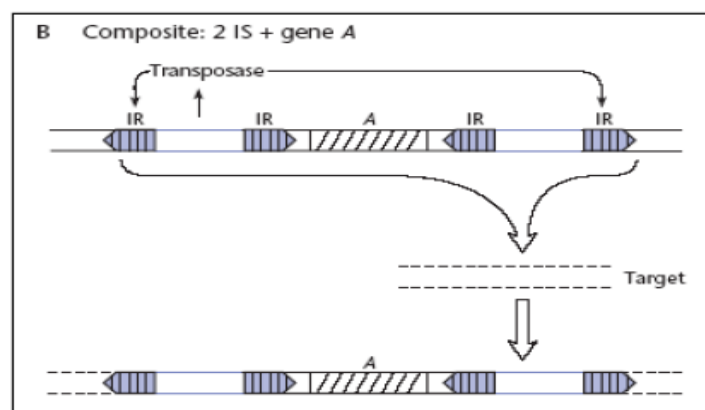
La estructura de un transposón compuesto de clase I podría ser la representada en la **Figura 18**. Las IS terminales pueden estar dispuestas en la misma dirección o en direcciones opuestas. Así, por ejemplo, las IS50 de Tn5 y las IS10 de Tn10 están orientadas en direcciones opuestas y las IS1 de Tn9 en la misma dirección.



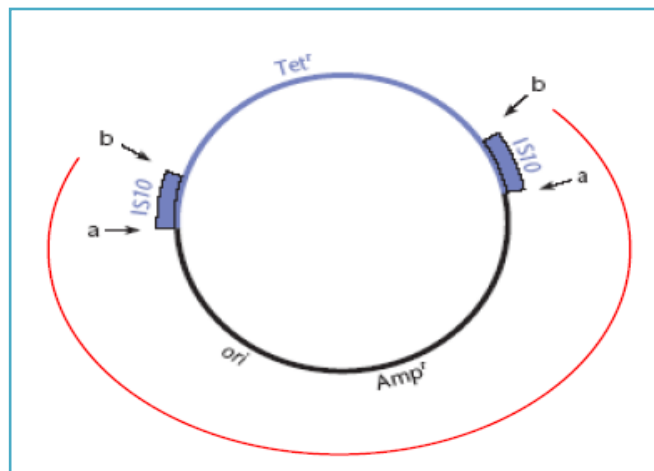
**Figura 18.** Representación esquemática de un transposón compuesto de clase I. Las zonas de color gris representan secuencias de ADN no codificante. En amarillo: transposasas, IRR e IRL (*Inverted Repeat Right/Left*) (Fernández, 2010)

Cada IS puede transponerse de forma independiente, ya que la transposasa que codifica cada una actúa sobre las secuencias terminales que forman parte de la propia IS unitaria. Sin embargo, también puede actuar desde la IRL más próxima a la IRR más distal del elemento compuesto, ya que ambas IS en un transposón de este tipo son idénticas. Si esto sucede, los dos elementos IS se transponen en bloque, como una unidad, transportando de paso los genes que formaban la región central (**Figura 19**). Con una sola de las IS que codifique correctamente la transposasa (en casos de mutaciones en la otra) es suficiente para promover la transferencia del transposón completo.

En moléculas circulares, la transposición puede ocurrir en dos posibles direcciones: actuando sobre los extremos externos (**Figura 19**) o sobre los internos en la dirección contraria (**Figura 20**), provocando la creación de un nuevo transposón, que a su vez incluirá los genes que hayan quedado dentro de lo delimitado por la pareja de IS. En el ejemplo de la **Figura 20**, un hipotético Tn10 que transporta el gen *tet* de resistencia a tetraciclinas, se halla en un plásmido con su origen de replicación (*ori*) y un gen de resistencia a ampicilina no movilizable hasta la llegada de Tn10 y la transposición de sus extremos internos.



**Figura 19.** La acción de la transposasa sobre sus extremos terminales IR más externos de dos IS cercanos del mismo tipo provoca la transposición del elemento completo (Snyder, 2007).



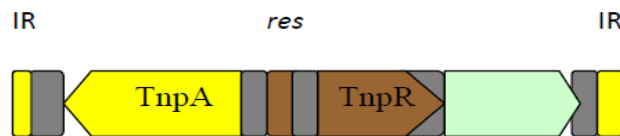
**Figura 20.** La acción de la transposasa sobre sus extremos externos (a-a, color azul) o sobre los extremos terminales IR más internos (b-b, color rojo) (Snyder, 2007)

Por tanto, la presencia de transposones compuestos hace que sean posibles múltiples combinaciones, movilizándose en el proceso de transferencia de una molécula a otra, o dentro de la misma, los genes situados entre ambas IS.

### 3.2.3. Transposones compuestos (Clase II)

Los transposones compuestos de clase II son elementos genéticos que pueden movilizarse entre el cromosoma bacteriano y los plásmidos presentes en la bacteria. La estructura genética consta de una transposasa junto a una resolvasa, más los determinantes de resistencia que transporte, todo ello flanqueado por una copia de IR en cada extremo. La presencia de estas dos enzimas le permite su recombinación e integración en el cromosoma bacteriano o en plásmidos (García-Rodríguez, 2006). Por otra parte, se conoce un grupo de transposones de esta clase que puede transferirse con una estructura circular similar a la de los plásmidos, denominados transposones conjugativos. Estos transposones contienen las recombinasas sitio-específicas que promueven la escisión y posterior integración cromosómica; sin embargo, no podrán nunca ser considerados plásmidos, ya que aunque durante el proceso de

conjugación sí se da una ciclo de replicación sobre una de las hebras, el mantenimiento de este tipo de elementos en la progenie bacteriana sólo necesita de la integración en el cromosoma y no de la replicación de la molécula de doble cadena (Burrus, 2002). La **Tabla 7** muestra algunos ejemplos más relevantes de transposones compuestos de clase II. La estructura de un transposón compuesto de clase II podría ser la representada en la **Figura 21**:



**Figura 21.** Representación esquemática de un transposón compuesto de clase II. Las zonas de color gris indican secuencias de ADN no codificantes. En amarillo intenso: transposasa, IRR e IRL (*Inverted Repeat Right/Left*). En marrón: resolvasa y sitios *res* de recombinación. Adyacente a la resolvasa un gen de resistencia cualquiera transportado por el Tn complejo (Fernández, 2010).

**Tabla 7.** Algunos ejemplos de transposones compuestos clase II. Abreviaturas: Kb (kilobase), AMP (ampicilina), St (estreptomicina), Sl (sulfonamidas), Tt (tetraciclina), Hg (mercuriales), Er (eritromicina) (Bennett, 2008).

Transposón	Tamaño (Kb)	IRs terminal (pb)	Resistencia
<b>En Gram negativos</b>			
Tn1	5	38/38	AMP
Tn3	5	38/38	AMP
Tn21	20	35/38	St, Sl, Hg
Tn501	8,2	35/38	Hg
Tn1721	11,4	35/38	Tt
Tn3926	7,8	36/38	Hg
<b>En Gram positivos</b>			
Tn551	5,3	35	Er
Tn917	5,3	38	Er

La transposasa TnpA, codificada por el gen *tnpA*, es la enzima que promueve la transposición. Las IR terminales son los sitios donde la TnpA actuará para promover la transposición. La resolvasa TnpR, codificada por el gen *tnpR*, presenta doble funcionalidad: por un lado, actúa como represor de la transcripción de la transposasa, de modo que en caso de estar mutado este gen, se producirían tasas superiores de transposición al permitirse una síntesis mayor de la transposasa. Por otro lado, escinde los “cointegrados” generados a través de un proceso de recombinación específica de sitio entre las secuencias *res* de las dos copias del transposón en el cointegrado.

### **3.3. Integrones**

Los integrones son sistemas de expresión y captura de genes caracterizados esencialmente por la presencia de un gen *intI* que codifica para una integrasa, un sitio de recombinación (*attI*) y un promotor (Ploy, 2000). Los integrones son capaces de capturar genes casete del medio y de incorporarlos por un mecanismo de recombinación específica de sitio (Barlow, 2004). Los genes casete son pequeñas piezas genéticas que contienen un gen en un marco de lectura abierto (ORF, *Open Reading Frame*) y una secuencia adicional de 59 pb (*59-be* o *attC*), que funciona como sitio específico para el proceso de recombinación. No suelen llevar promotor para el gen que codifican y utilizan el del integrón que ocupan para expresarlo. Normalmente suelen tener entre 500 y 1000 pb y cuando son movilizados se hallan en forma de moléculas libre circulares no replicativas (Bennett, 1999). Los integrones actúan como sistemas naturales de clonaje y expresión genética que incorporan ciertos ORFs (genes casete) y los convierten en genes funcionales (Rowe-Magnus, 2001). La forma más sencilla de un integrón se caracteriza por:

- ✓ Una integrasa (*intI*) que es una tirosina-recombinasa
- ✓ Un sitio específico de recombinación (*attI*) de 65 pb

- ✓ Un promotor principal ( $P_{ant}$ ) que promueve la expresión de los genes integrados
- ✓ Un segundo promotor ( $P_{int}$ ) muy cerca de ( $P_{ant}$ ) que en su extremo 3' (no siempre está presente)

Los genes casete son movilizados gracias que la integrasa reconoce los sitios *attC* en el gen casete y *attI* en su propia secuencia, provocando esto la escisión e integración de dicho gen casete. En la **Figura 22** se muestra el proceso de integración de sucesivos genes casete.

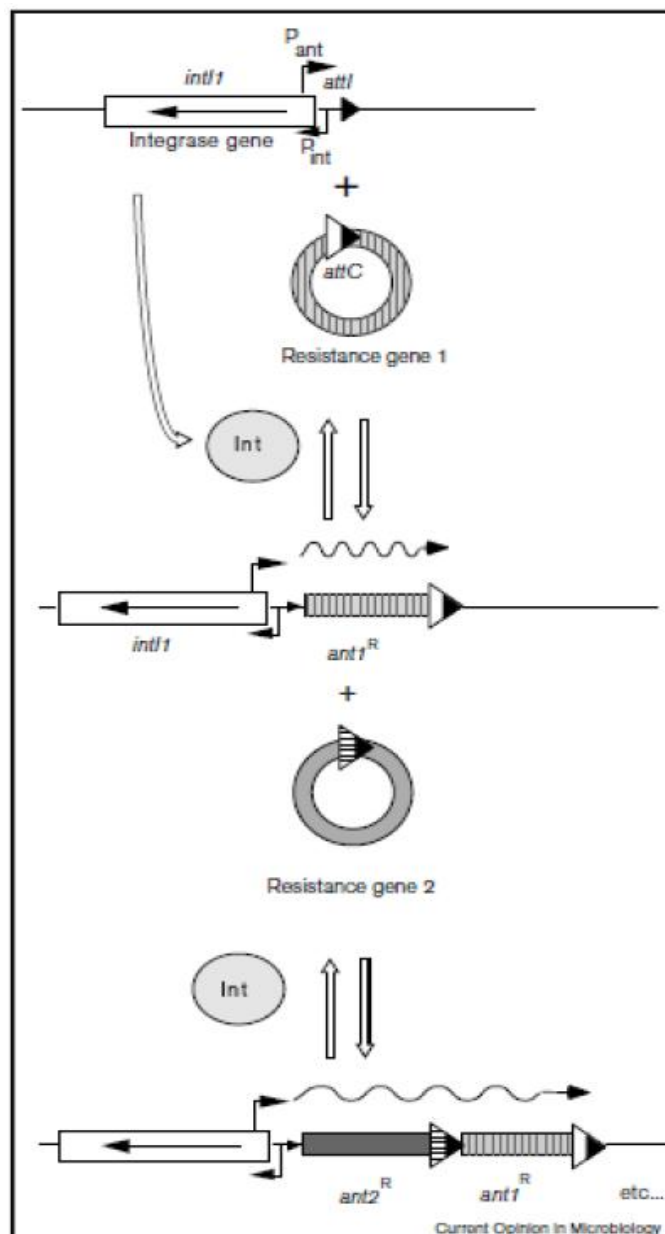
Hasta la fecha se conocen al menos 9 clases de integrones en base a diferencias en las secuencias de los genes de la integrasa (Nield, 2001). Los **integrones de clase 1 y 2** contienen genes casete de resistencia antibiótica, especialmente en miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (Fluit, 1999), y son los que centran la mayoría de los estudios (Barlow, 2004). El resto de clases de integrones también pueden contener genes casete de resistencia pero su prevalencia a nivel mundial permanece baja (Nield, 2001). No obstante, destacar la descripción de **integrones de clase 3** por primera vez en una cepa de *Serratia marcescens* y posteriormente en bacterias Gram negativas resistentes a imipenem de aislados clínicos transportando todos ellos la metalo-beta-lactamasa  $bla_{IMP}$  como gen casete (Arakawa, 1995). Finalmente, los **integrones de clase 4**, denominados **superintegrones**, se han descrito en el pequeño cromosoma de *Vibrio cholerae*. Contienen cientos de genes casete que codifican adaptaciones que van más allá de la resistencia antibiótica y patogenicidad (Rowe-Magnus, 1999).

### 3.3.1. Integrones de clase 1

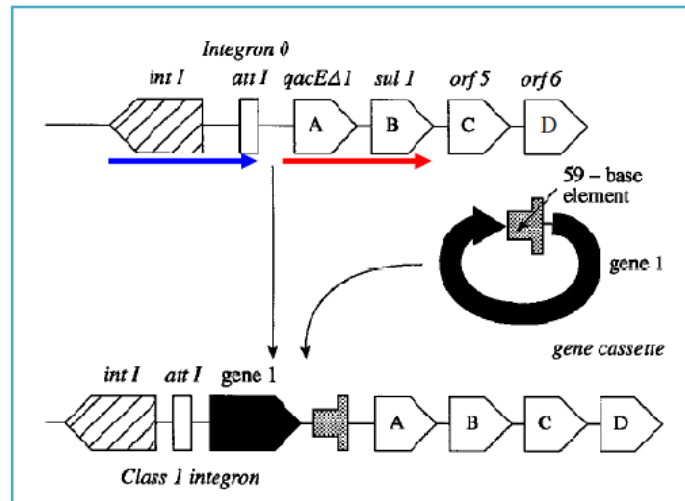
Los integrones de clase 1 agrupan a la mayoría de integrones conocidos y son un claro ejemplo de elemento genético común en proteobacterias. Un integrón de clase 1 está compuesto por dos regiones conservadas (**Figura 23**), una en el extremo 5'



(5'CS) (flecha azul) que incluye el gen de la integrasa *int1*, los promotores y el sitio *attI*, y otra región en el extremo 3' (3'CS) (flecha roja) que contiene un gen de resistencia a sulfonamidas (*su1*) y un gen truncado de resistencia a compuestos de amonio cuaternario (*qacE $\delta$ 1*). Estos dos últimos genes no son genes casete ya que se encuentran fijos en el integrón.

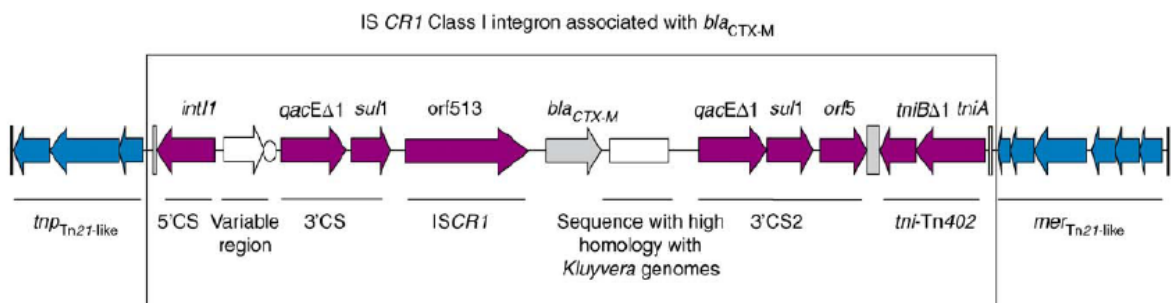


**Figura 22.** Proceso de integración de sucesivos genes casete (Rowe-Magnus, 1999).



**Figura 23.** Representación esquemática de un proceso de integración de un gen cassette (Bennett, 1999).

La integración de genes cassette ocurre normalmente en el sitio *attI*, desplazando hacia la derecha a los ya existentes previamente. En función de la longitud entre *attI* y 3'CS, dada por los genes cassette incorporados, se describen los sucesivos integrones: In1, In2, In3, In4 e In5 (Sabaté, 2002). A los integrones que transportan genes cassette que codifican resistencia a antimicrobianos y desinfectantes se les denomina integrones de resistencia. Muchos de los integrones de clase 1 descritos en aislamientos clínicos están formando parte de un módulo de transposición, siendo el mejor ejemplo el transposón Tn402, denominado actualmente Tn5090 (Cantón, 2006) (Figura 24). Estos transposones, como ya es sabido, pueden localizarse tanto en plásmidos como en cromosomas.

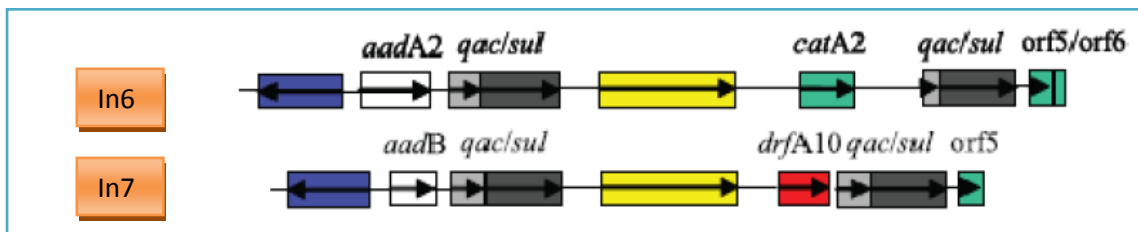


**Figura 24.** Integron de clase 1 y su asociación con Tn402 (Cantón, 2006).

Current Opinion in Microbiology

Hasta la fecha, se conocen al menos 60 genes de resistencia en formato gen casete (**Tabla 8**). El acúmulo de varios de estos genes en un único integrón, les convierte en integrones multirresistentes.

Los integrones compuestos de clase 1, son estructuralmente idénticos a un *Int11*, excepto que a continuación de la primera secuencia 3'CS existe una región de 2154 pb, denominada región común o *ISCR1*, compuesta por un *orf513* (que codifica una transposasa de 513 aminoácidos) y un sitio de recombinación de 33 pb localizado en su extremo derecho, seguido de genes que no son genes casete (no poseen la secuencia *attC*) aunque sí pueden ser genes de resistencia, finalizando el integrón con otra copia de 3'CS (*Rodríguez-Martínez, 2006*). El elemento *ISCR1* tiene capacidad propia para capturar otros genes de resistencia. Dos de los ejemplos más clásicos son *In6* e *In7*, ya que fueron los primeros donde se descubrió la presencia de *ISCR* y una segunda copia de 3'CS (*Toleman, 2006*) (**Figura 25**).

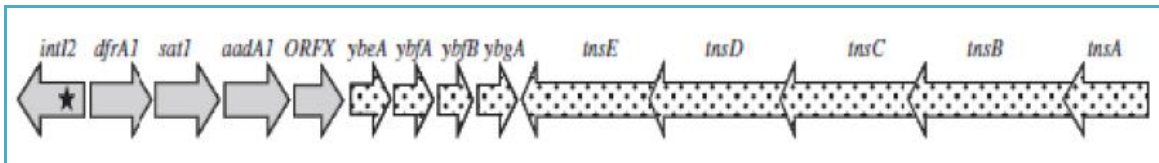


**Figura 25.** Estructura de *In6* y de *In7*. En azul *int1* y en amarillo *ISCR1*. (*catA2*: gen de resistencia a cloranfenicol y *drfA10*: gen de resistencia a trimetoprim) (*Toleman, 2006*)

### 3.3.2. Integrones de clase 2

Los integrones de clase 2 poseen una integrasa defectiva, *intI2\**, ya que el gen que la codifica tiene un codón de stop interno TAA. Para que esta integrasa sea funcional, el codón STOP ha de cambiar a traducible (*Hansson, 2002*). Los integrones de

clase 2 se encuentran vinculados a la familia Tn7 (**Figura 26**), que al igual que ocurre con los integrones de clase 1, contribuye a su diseminación entre la población bacteriana.



**Figura 26.** Integrón de clase 2 (flechas grises) y su asociación con Tn7 (flechas punteadas) (Rodríguez, 2008).

**Tabla 8.** Ejemplos de genes casete conocidos para algunos antibióticos (Modificada de Fernández, 2010).

Tipo de Resistencia	Denominación	Ejemplos Genes Casete
<b>β-lactámicos</b>	Clase A β-lactamasas	<i>bla<sub>P</sub></i>
	Clase B β-lactamasas	<i>bla<sub>IMP</sub></i> , <i>bla<sub>VIM</sub></i>
	Clase C β-lactamasas	<i>bla<sub>OXA</sub></i>
<b>Aminoglucósidos</b>	Aminoglucosidasa adeniltransferasa	<i>aadA1a</i> , <i>aadA1b</i> , <i>aadA2</i> , <i>aadB</i>
	Aminoglucosidasa acetiltransferasa	<i>aacA1</i> , <i>aacA4</i> , <i>aacA7</i> , <i>aacC1</i> , <i>aacC</i>
<b>Cloranfenicol</b>	Cloranfenicol acetiltransferasa	<i>catB2</i> , <i>catB3</i> , <i>catB5</i>
	Exportador de cloranfenicol	<i>CmlA</i>
<b>Trimetoprim</b>	Clase A dihidrofolato-reductasa	<i>dfrA1</i> , <i>dfrA5</i> , <i>dfrA7</i> , <i>dfrA12</i>
	Clase B dihidrofolato-reductasa	<i>dfrB1</i> , <i>dfrB2</i> , <i>dfrB3</i>
<b>Desinfectantes</b>	Compuestos de amonio cuaternario	<i>qacE</i> , <i>qacG</i>

#### 4. Resistencia plasmídica a fluoroquinolonas (RPFQs)

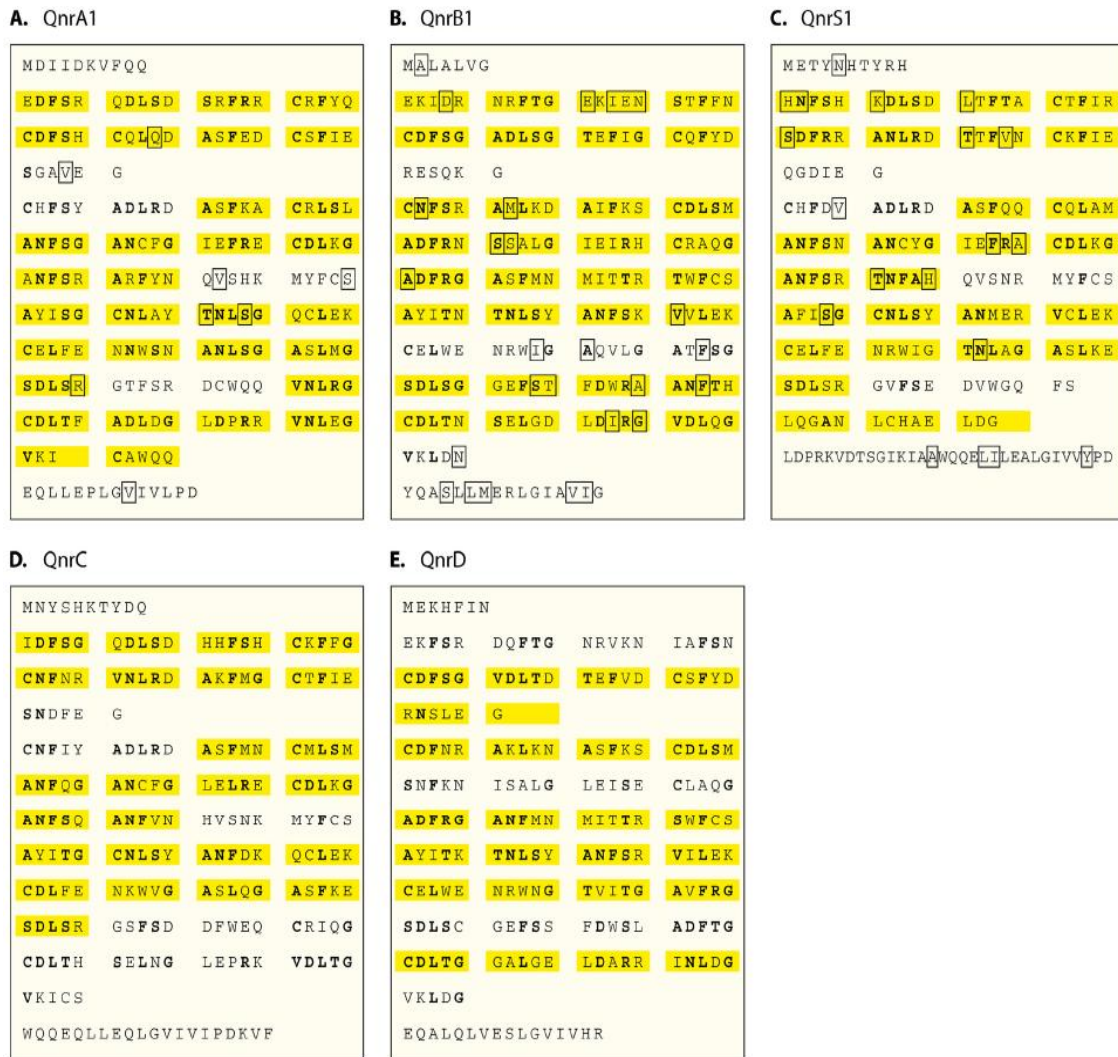
Se han descrito diversos determinantes plasmídicos de resistencia a fluoroquinolonas que disminuyen la sensibilidad a estos antibióticos, facilitando la selección de mutantes resistentes de alto nivel (Rodríguez-Martínez, 2011). Entre los determinantes de RPFQs descritos en enterobacterias hasta la fecha, se encuentran:

- ✓ Proteínas Qnr (QnrA, B, C, D y S)
- ✓ Variante de la aminoglucósido acetil transferasa aac(6')-Ib, denominada aac(6')-Ib-cr, capaz de acetilar ciprofloxacino y norfloxacino, además de amikacina, tobramicina y kanamicina
- ✓ Bombas de expulsión QepA y OqxAB.

##### 4.1. Proteínas Qnr

###### 4.1.1. Origen de las proteínas Qnr

Las proteínas Qnr pertenecen a la familia de los pentapéptidos repetidos, de la que hasta el momento se conocen más de 90 miembros. Esta familia se define por la presencia de repeticiones en tándem de motivos A(D/N)LXX, donde X es cualquier aminoácido (Bateman, 1998). De modo más preciso, este motivo está representado por [Ser, Thr, Ala or Val][Asp o Asn][Leu or Phe][Ser, Thr or Arg][Gly] (**Figura 27**) (Bateman, 1998; Kehrenberg, 2006). Estas proteínas se han encontrado en muchos géneros bacterianos, pero parece común en cianobacterias, pudiendo ser tanto proteínas de membrana como citoplasmáticas. Presentan una estructura en alfa-hélice en su circunferencia externa y hojas beta paralelas en su circunferencia interna (Kobe, 1995), una estructura apropiada para la interacción entre proteínas.



**Figura 27.** Secuencia de aminoácidos de distintas proteínas Qnr resaltando en amarillo los pentapéptidos repetidos con la secuencia consenso de S/T/A/V/C-D/N-L/F-S/T/R-G (Strahilevitz, 2009).

En esta familia de pentapéptidos existen dos miembros de especial relevancia en cuanto a la resistencia a quinolonas. El primero es McbG, una proteína que protege a las bacterias que sintetizan microcina B17 (MccB17) de su propia inhibición. MccB17 es un péptido modificado post-transcripcionalmente de 3.1 KDa que bloquea la replicación del ADN (Herrero, 1986), y que puede, como el ciprofloxacino, inhibir la acción de la ADN girasa (Zamble, 2001) y estabilizar el complejo ADN-ADN girasa en presencia de ATP (Hedde, 2001) y de extremos libres de ADN. El mecanismo de

autoinmunidad conferido por *mcbG* implica a otros genes: *mcbE* y *mcbF*, relacionados con el bombeo de MccB17 fuera de la célula (Garrido, 1988). Se ha comprobado que un plásmido que lleve el operón *mcbEFG* produce un aumento en la CMI de quinolonas de 2 a 8 veces (Lomovskaya, 1996). El segundo miembro de la familia de los pentapéptidos es MfpA, una proteína que se clonó del genoma de *Mycobacterium smegmatis* a partir de estudios sobre bombas de expulsión activa que contribuyen a la resistencia a quinolonas (Romanowski, 2002). Los plásmidos artificiales que codifican MfpA incrementan la resistencia a ciprofloxacino hasta 4 veces (Rodríguez-Martínez, 2005).

La relación de algunos de los miembros de esta familia de los pentapéptidos repetidos y Qnr es difícil de establecer, entre otras razones porque el porcentaje de homología entre Qnr y McbG o MfpA es del 19.6% y 18.9%, respectivamente (Tran, 2002). Con los datos existentes sólo se puede especular con la posibilidad de que Qnr apareciese a partir de alguna proteína de inmunidad diseñada para proteger a la ADN girasa de inhibidores naturales, o desde algún gen cromosómico de función desconocida que codificase una proteína de la familia de los pentapéptidos desde micobacterias, cianobacterias u otros grupos bacterianos (Rodríguez-Martínez, 2005).

#### 4.1.2. Mecanismo de acción de Qnr

Tras la purificación de la proteína codificada por el gen *qnr* del plásmido pMG252 (Martínez-Martínez, 1998), se estudió su interacción con las quinolonas y sus dianas (ADN-girasa y topoisomerasa IV) mediante estudios de movilidad electroforética (Rodríguez-Martínez, 2005). Este trabajo permitió demostrar que, al menos *in vitro*, la proteína Qnr protege a la ADN-girasa de *E. coli* de la inhibición por ciprofloxacino (Tran, 2002). Esta protección es proporcional a la concentración de Qnr, e inversamente proporcional a la concentración de ciprofloxacino (Tran, 2002). La

topoisomerasa IV, diana secundaria de las quinolonas en *E. coli*, parece también ser protegida de las quinolonas por Qnr (*Tran, 2004*).

El mecanismo de acción de Qnr basado en la protección de la ADN-girasa y de la topoisomerasa IV, se ha estudiado con mucho detalle en cepas que poseen el gen *qnrA1*, y aunque se presume un modo de acción similar para el resto de las proteínas Qnr, aún se requieren estudios que expliquen con detalle esta acción (*Tran, 2002*). Tal y como se espera de su estructura de pentapéptidos repetidos, QnrA no parece producir un cambio en la acumulación intracelular de quinolonas ni causar la inactivación de la mismas (*Robicsek, 2006A*). El efecto directo de QnrA sobre la inhibición de la actividad de la ADN-girasa por las quinolonas se estudió mediante un ensayo de superenrollamiento de ADN. En este ensayo se demostró que la inhibición de la ADN-girasa mediada por el superenrollamiento de ADN producido por ciprofloxacino era revertida de manera dosis dependiente por la proteína QnrA purificada. QnrA aislada, sin embargo, no lograba el superenrollamiento de ADN (*Tran, 2002*) ni tampoco, en contraste con MfpA, era capaz de producir inhibición de la ADN-girasa mediada por el superenrollamiento de ADN (*Tran, 2005*). Lo que sí se observó es que QnrA disminuyó la unión de la ADN-girasa al ADN y que la unión al enzima (ambas subunidades y holoenzima) era directa, igual que para la topoisomerasa IV en *E. coli*, protegiendo a ambas enzimas de la inhibición de las quinolonas (*Tran, 2005B*).

En resumen, las proteínas Qnr se unen a la ADN-girasa o topoisomerasa IV, inhibiendo la interacción entre el enzima y el ADN, lo que explica, al menos en parte, su mecanismo de protección frente a las quinolonas por minimizar las oportunidades de estos antibióticos para estabilizar el complejo quinolona-topoisomerasa-ADN (*Robicsek, 2006A*).



#### 4.1.3. Tipos de Qnr

Desde el descubrimiento de la RPFQs al final de los años 90 (Martínez-Martínez, 1998) se han descrito hasta la fecha cuatro tipos de genes *qnr*: *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* y *qnrD* con sus variantes correspondientes. La descripción masiva de variantes *qnr* en distintos grupos de investigación y zonas geográficas, especialmente de *qnrB*, llevó con relativa frecuencia a solapamientos de secuencias e incluso cambios en los números de alelos depositados en la base de datos GenBank. Con el fin de evitar confusiones de este calibre y establecer un orden en la numeración de las diferentes secuencias de *qnr*, Jacoby y colaboradores (Jacoby, 2008) crearon una base de datos fácilmente accesible (<http://www.lahey.org/qnrStudies>) que incluye la denominación de los diferentes alelos *qnr*, así como las diferencias aminoacídicas entre ellos. A continuación, se detalla brevemente, el origen de cada uno de los tipos de *qnr* descritos hasta la fecha.

##### *qnrA*

*qnrA1*, fue el primer gen de RPFQs descrito en un aislamiento clínico (Martínez-Martínez, 1998). Como se ha comentado previamente, se encontraba en el plásmido pMG252, y era capaz de aumentar la CMI de quinolonas entre 4 y 6 veces en aislamientos deficientes en porinas, pero incluso en *E. coli* con porinas intactas, aumentaba la CMI entre 8 y 64 veces. Aunque esta resistencia a quinolonas no alcanzaba el nivel designado para representar resistencia clínica (punto de corte de resistencia), facilitaba la selección de resistencia a quinolonas de alto nivel. Una cepa salvaje de *E. coli* portadora del plásmido pMG252 sembrada en agar conteniendo ácido nalidíxico o ciprofloxacino tenía una probabilidad 100 veces mayor de generar mutantes resistentes espontáneos que una cepa sin el plásmido. Sin embargo, resaltar que el plásmido no tenía un efecto mutante general ya que la frecuencia de otras mutaciones definidas genéticamente era equivalente a la de *E. coli* libre de plásmido

(Martínez-Martínez, 1998). Posteriormente, un aislamiento de *Klebsiella oxytoca* procedente de China, fue descrito como portador de la primera variante de *qnrA*, difiriendo del gen original en cuatro aminoácidos. Esta variante se denominó *qnrA2* (Nordmann, 2005).

### *qnrB*

Durante la investigación de cepas de *K. pneumoniae* procedentes de la India, algunas de las cuales contenían *qnrA*, Jacoby y colaboradores encontraron que varias de estas cepas eran capaces de transferir resistencia a quinolonas de bajo nivel, pero no se amplificaba el gen *qnrA* mediante PCR (Jacoby, 2006). El gen responsable de la RPFQ para este fenotipo codificaba para una proteína de 214 o 226 aminoácidos (dependiendo del codón de iniciación tomado como referencia) que se denominó *qnrB1*. Posteriormente, la determinación del sitio de inicio de la transcripción va a favor del péptido de longitud de 214 aminoácidos y la homología entre diferentes variantes *qnrB*, apoyan este hecho (Jeong, 2005; Vetting, 2006). La proteína QnrB1 comparte un 43% y un 44% de identidad aminoacídica con QnrA y QnrS, respectivamente (Jacoby, 2006).

El repertorio de variantes de *qnrB* es más amplio que para *qnrA* y *qnrS*. La primera variante, *qnrB2*, fue descrita en el primer estudio entre varios aislamientos de *Enterobacteriaceae* de Estados Unidos. El gen *qnrB2* codifica para una proteína de 214 aminoácidos que difiere de *qnrB1* en cinco codones (Jacoby, 2006).

### *qnrC*

Una cepa clínica de *Proteus mirabilis* procedente de Shangai, China, transfería resistencia de bajo nivel a quinolonas pero no se amplificaban otros genes *qnr*

conocidos hasta esa fecha mediante PCR. El plásmido pHS9, que mediante conjugación aumentaba la CMI de ciprofloxacino, transportaba un gen de 666 pb, denominado *qnrC1*, codificante para una proteína de 221 aminoácidos. QnrC comparte un 64%, 41%, 59% y 43% de identidad aminoacídica con QnrAq, QnrB1, QnrS1 y QnrD, respectivamente (Wang, 2009).

### *qnrD*

Cuatro aislamientos clínicos humanos de *Salmonella enteritidis* procedentes de China mostraban sensibilidad disminuida a ciprofloxacino, transferible en un pequeño plásmido de 4.3 Kb. Este plásmido en *E. coli* proporcionaba un aumento en la CMI de ciprofloxacino de 32 veces y en él no se consiguió amplificar mediante PCR *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6')-Ib-cr* ni *qepA* (Cavaco, 2009). Este plásmido codifica para una proteína también de 214 aminoácidos, denominada QnrD, que muestra un 48% de similitud con QnrA1, un 61% con QnrB1 y un 32% con QnrS1 (Cavaco, 2009).

### *qnrS*

En octubre de 2003, un único clon de *Shigella flexneri* 2b causó un brote de enterocolitis de origen alimentario en Japón. Una de las 8 cepas de este clon era resistente a ciprofloxacino y se comprobó que portaba un único plásmido conjugativo que transfería resistencia a quinolonas. La clonación de este plásmido identificó un ORF codificante para una proteína de 218 aminoácidos perteneciente a la familia de los pentapéptidos repetidos. Esta proteína sólo comparte el 59% de identidad aminoacídica con *qnrA1*, de modo que se nombró *qnrS* (Hata, 2005).

#### 4.1.4. Prevalencia de Qnr

Desde el descubrimiento de la transmisión horizontal del determinante de resistencia a quinolonas *qnr* (Martínez-Martínez, 1998) hasta la fecha se han realizado multitud de estudios con objeto de determinar la prevalencia real de este determinante de RPFQs. En un primer trabajo (Jacoby, 2003), de un total de 350 cepas de 13 géneros diferentes de bacterias Gram negativas en su mayoría procedentes de Estados Unidos, sólo presentaron el gen *qnr* un aislamiento de *E. coli*, cuatro de *K. pneumoniae* y una cepa de *Klebsiella* spp. de cultivo de orina y de esputo. En un segundo trabajo (Wang, 2003), sobre 78 cepas clínicas de *E. coli* resistentes a quinolonas recogidas de cinco hospitales de Shangai, China, entre marzo de 2000 y marzo de 2001, el 7.7%, es decir, 6 cepas, poseían el gen *qnr*. Un tercer estudio realizado en España (Rodríguez-Martínez, 2003), sobre un total de 266 cepas de *E. coli* y 159 cepas de *K. pneumoniae* con diferentes fenotipos de resistencia a betalactámicos y quinolonas detectó tres cepas de *K. pneumoniae* que contenían el gen *qnr*. Por el contrario, ninguna de las cepas de *E. coli* fueron positivas para este gen. Un año después, Wang y colaboradores (Wang, 2004) publicaron un trabajo sobre cepas clínicas de *K. pneumoniae* y *E. coli* de diferentes estados de Estados Unidos en el que la frecuencia de *qnr* es mayor del 11% en *K. pneumoniae* pero igual que en el trabajo expuesto anteriormente, no se detectó el gen en ninguna cepa de *E. coli*. Además, alguna de estas cepas producía SHV-7, siendo ésta la primera vez que se describe una asociación entre  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEEs) y Qnr en la misma cepa.

En estudios posteriores al establecimiento de la primera asociación entre BLEE y *qnr* en la misma cepa (Wang, 2004) se ha continuado estudiando la prevalencia de este determinante *qnr* en diferentes especies de enterobacterias, aunque con mayor frecuencia en las especies de *E. coli* y *K. pneumoniae*. Además, se confirma la

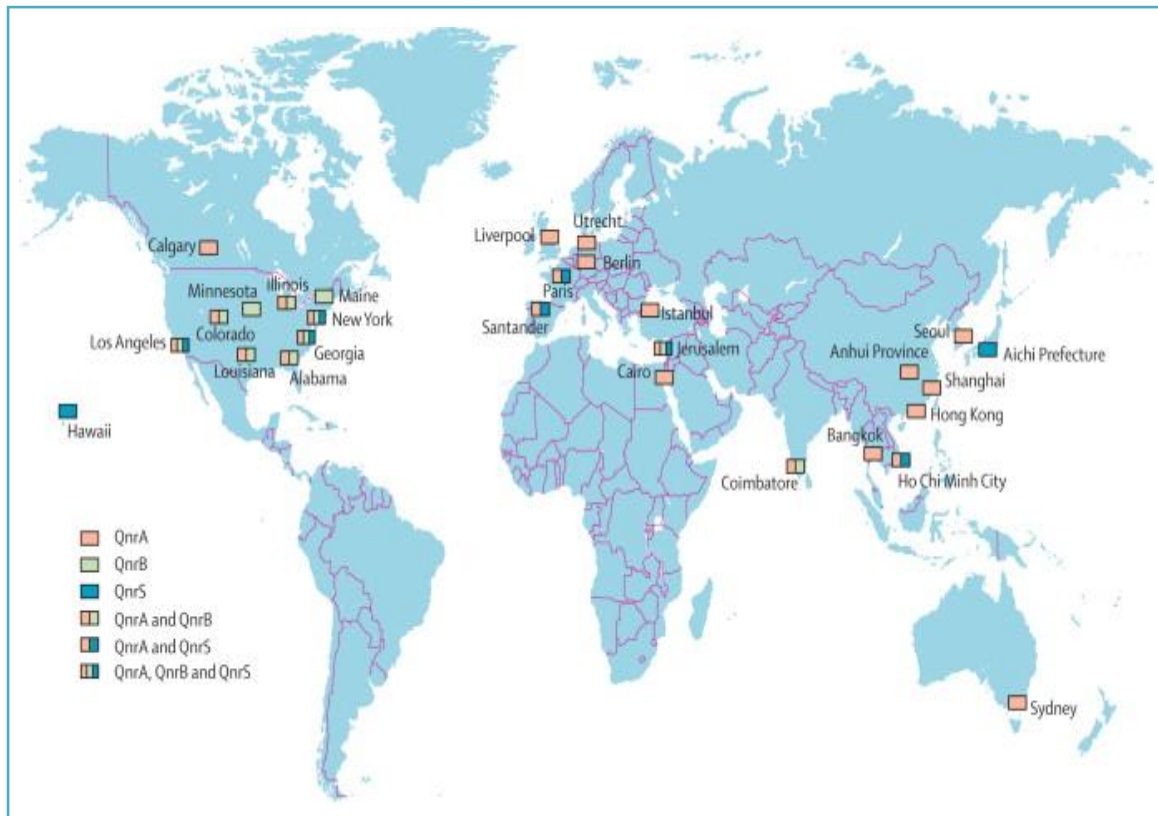
asociación de este determinante de RPFQs con la presencia de BLEE en todos ellos (**Tabla 11**).

#### 4.1.5. Epidemiología de *Qnr*

Después del descubrimiento de *qnrA* (Martínez-Martínez, 1998), se han realizado multitud de estudios en relación con la RPFQs en todo el mundo (**Figura 28** y **Tabla 11**). Aunque la prevalencia de determinantes de RPFQs aún no es elevada en aislamientos Gram negativos, sí se observa un aumento notable en las cepas productoras de BLEE, siendo mayor del 20% (Robicsek, 2006A). Entre las especies que contienen determinantes de RPFQs se incluyen *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. cloacae*, *C. freundii* y *Providencia stuartii*. De forma notable, no se han encontrado en *Proteus* spp y en otras bacterias Gram negativas clínicamente importantes como *P. aeruginosa* y *Acinetobacter* spp. Sin embargo, estos datos se han obtenido de estudios con un número muy pequeño de estos aislamientos (Jacoby, 2003; Poirel, 2005; Henrichfreise, 2005; Wang, 2005) de modo que si la no detección de determinantes de RPFQ en estos casos refleja una ausencia real o es debida a un número insuficiente de cepas incluidas debe comprobarse con estudios adicionales.

#### 4.1.6. Efecto de *Qnr* sobre la actividad de las quinolonas

La resistencia a quinolonas mediada por plásmido, aunque produce resistencia de bajo nivel, facilita la selección de resistencia de alto nivel a quinolonas (Martínez-Martínez, 1998). Así, se ha demostrado que cuando *qnr* se expresa en una cepa deficiente en porinas, las CMI para ciprofloxacino, levofloxacino y moxifloxacino aumentan de 8 a 32 veces (Rodríguez-Martínez, 2004), pasando de 0.25-0.5 a 4-8 mg/L. Además, existe un efecto aditivo de los distintos mecanismos de resistencia a quinolonas con la presencia de *qnr* (Martínez-Martínez, 2003).



**Figura 28.** Distribución global de Qnr (Robicsek, 2006A).

#### 4.2. Enzima *aac(6')-Ib-cr*

Varios años después del descubrimiento de QnrA, Strahilevitz y colaboradores investigaron el fenómeno de desigualdad en el nivel de resistencia a quinolonas transferido por diferentes plásmidos *qnr* (Strahilevitz, 2009). Las cepas salvajes de *E. coli* tienen una CMI de ciprofloxacino alrededor de 0.008  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , mientras que la mayoría de plásmidos *qnr* determinan una CMI de ciprofloxacino de 0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para *E. coli*. Observaron que algunos plásmidos de aislamientos clínicos de *E. coli* procedentes de Shanghai proporcionaban niveles de resistencia a ciprofloxacino de hasta 4 veces más (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Comprobaron que este alto nivel de resistencia no estaba causado por un incremento en el nivel de expresión de *qnrA*, como ocurría con otros plásmidos

(Rodríguez-Martínez, 2006; Xu, 2007). Mediante mutagénesis aleatoria en el transposón presente en el ADN plasmídico, observaron que el gen responsable del aumento en dicha resistencia era *aac(6′)-Ib*, codificante para una aminoglucósido acetiltransferasa, que confiere resistencia a tobramicina, amikacina y kanamicina (Robicsek, 2006B). La secuenciación de este enzima reveló que este alelo era único entre las aproximadamente 30 variantes conocidas de *aac(6′)-Ib* en dos cambios aminoacídicos: Trp102Arg y Asp179Tyr. Demostraron también que estos cambios son necesarios y suficientes para el fenotipo de resistencia a ciprofloxacino. Por otra parte, un ensayo de acetilación mostró la capacidad de esta variante de *aac(6′)-Ib* (denominada *aac(6′)-Ib-cr*, del inglés *ciprofloxacin resistance*) para acetilar a ciprofloxacino en el grupo nitrógeno amino sobre el sustituyente piperazínico (Robicsek, 2006B). El aumento en la CMI causado por *aac(6′)-Ib-cr* es menor que el observado por proteínas Qnr, y tal como se deduce de su diana específica en las quinolonas, esta enzima sólo es capaz de acetilar ciprofloxacino y norfloxacino, ambos con aminas secundarias piperazínicas (Strahilevitz, 2009).

#### **4.3. Bombas de expulsión activa**

Los mecanismos de expulsión activa de antibióticos pueden ejercer dicha acción sobre uno o varios fármacos y pueden encontrarse tanto en cromosomas como en plásmidos (Strahilevitz, 2009). Las bombas de expulsión tradicionales codificadas por genes cromosómicos están ampliamente distribuidas en bacterias Gram negativas y actúan eliminando al exterior aquellos compuestos extraños (antibióticos) para la bacteria. Más recientemente, se describieron dos nuevos sistemas de bombas de expulsión activa de quinolonas codificadas, en este caso, por plásmidos: OqxAB y QepA.

#### 4.3.1. *OqxAB*

Un plásmido conjugativo, pOLA52, que proporcionaba resistencia al antibiótico olaquinox (un derivado de quinoxalina usado en agricultura como promotor del crecimiento para animales) se encontró en cepas de *E. coli* procedentes de estiércol de cerdo (Sørensen, 2003). El mecanismo de resistencia identificado fue la bomba de expulsión, *OqxAB*, que confiere además resistencia a otros fármacos también, incluyendo cloranfenicol. pOLA52 producía un aumento en las CMI de ácido nalidíxico y ciprofloxacino de 8 y 16 veces, respectivamente (Hansen, 2007). En un único estudio de prevalencia realizado, se concluyó que la presencia de *OqxAB* es rara. Diez de 556 (1.8%) de cepas de *E. coli* aisladas entre 1995 y 1998 en Dinamarca y Suecia mostraron una CMI de olaquinox  $\geq 64$   $\mu\text{g/mL}$ ; en 9 de 10 cepas, se detectó el gen *oqxAB* (Hansen, 2005). La presencia de *OqxAB* mediada por plásmidos se ha detectado recientemente en un aislamiento clínico humano de *E. coli*, en Corea del Sur. Los genes *oqxAB* también se han localizado en el cromosoma de *K. pneumoniae*, con diferentes niveles de expresión, mostrando correlación con diferencias en la sensibilidad a olaquinox (Kim, 2009B).

#### 4.3.2. *QepA*

La bomba de expulsión *QepA* se encontró codificada en el plásmido pHPA, en un aislamiento clínico de *E. coli* de una muestra de orina en Japón, en el año 2002 (Yamane, 2007). Este plásmido mostraba un perfil de multirresistencia para aminoglucósidos, fluoroquinolonas y beta-lactámicos de amplio espectro. El gen *qepA* codifica para una proteína de 511 aminoácidos, perteneciente a la superfamilia de transportadores de 14 segmentos transmembrana (Strahilevitz, 2009). Yamane y colaboradores mostraron que el gen *qepA* clonado en pSTV28 aumentaba las CMI de varios antibióticos en un transconjugante de *E. coli* (Yamane, 2007). En el caso de las



fluoroquinolonas, las CMI de ácido nalidíxico, ciprofloxacino y norfloxacino aumentaban 2, 32 y 64 veces, respectivamente.

Desde el descubrimiento de QepA, se ha descrito una variante que posee dos sustituciones aminoacídicas, denominada QepA2. Esta variante confiere un fenotipo similar al del determinante QepA, denominado ahora QepA1 (Cattoir, 2008).

El análisis de la secuencia del gen *qepA* reveló que está localizado en una región de aproximadamente 10 Kb, flanqueada por una secuencia, que es en gran parte idéntica en diferentes plásmidos (Cattoir, 2008; Périchon, 2008; Yamane, 2007). Sin embargo, los aislamientos positivos para *qepA1* de Japón (Yamane, 2007; Yamane, 2008), Bélgica (Périchon, 2007) y Corea del Sur (Chong, 2008; Park, 2009), estaban flanqueados por dos copias de IS26 y asociados con el gen *rmtB*, codificante para una metilasa ribosómica aminoglucosídica, mientras que *qepA2* estaba flanqueado por una nueva secuencia de inserción (ISCR3C) y el gen *rmtB* no estaba presente (Cattoir, 2008).

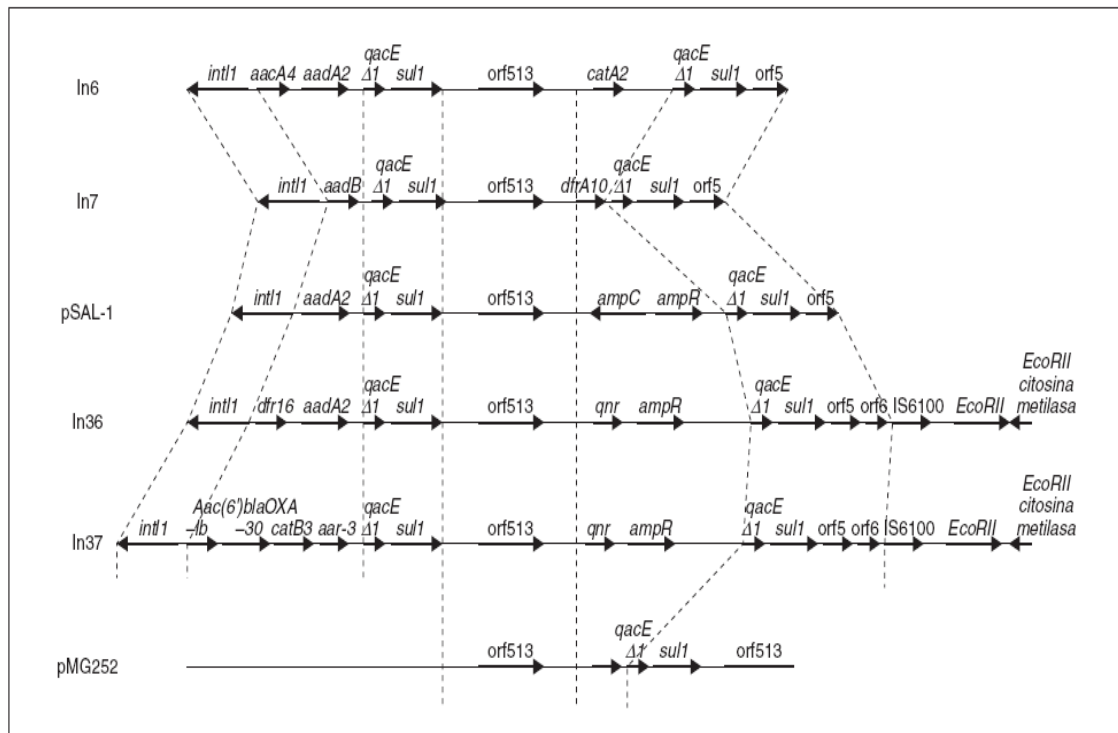
### 5. Entorno genético de *qnr*

El gen *qnr* se encuentra, en las cepas en las que se ha descrito, en plásmidos transmisibles por conjugación. Estudios realizados con el plásmido en que se describió por primera vez, pMG252, revelan que *qnr* se encuentra en un plásmido con amplio rango de hospedador transmisible por conjugación en especies como *K. pneumoniae*, *E. coli*, *C. freundii*, *S. typhimurium* o *P. aeruginosa* (Martínez-Martínez, 1998). El gen *qnr* se localiza en el plásmido original de donde se aisló formando parte de una secuencia nucleotídica característica originalmente de los integrones In6 (del plásmido pSa) e In7 (de pDGO100) (Stokes, 1993), sugiriendo su presencia en un integrón de clase 1 (Tran, 2002). Estos integrones poseen una región conservada común hacia 3' que contiene el

gen *qacE $\delta$ 1* (que confiere bajo nivel de resistencia a ciertos compuestos amónicos) (Paulsen, 1993) y *sull* (que confiere bajo nivel de resistencia a sulfamidas, pero que no se expresa en integrones al haber perdido su promotor) (Valentine, 1994). Un número inusual de integrones de clase 1, que contienen la región común de In6 e In7, llevan un elemento denominado *orf513* (actualmente, *ISCR1*) el cual se postula que codifica una recombinasa específica de sitio para la adquisición de genes de resistencia (Valentine, 1994).

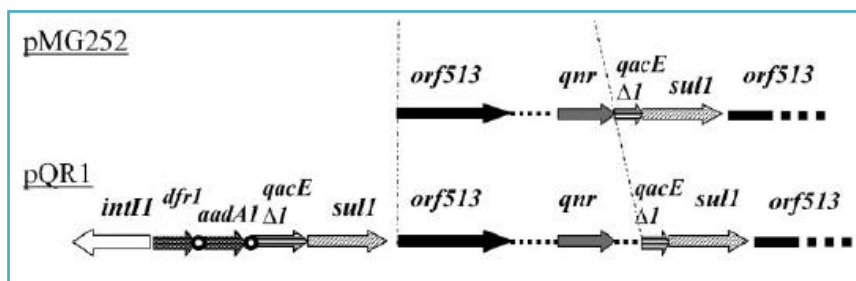
Muchos genes de resistencia, como los que codifican betalactamasas plasmídicas, se encuentran localizados dentro de elementos móviles de este tipo, y también dentro de transposones, lo cual, como es bien sabido potencia su diseminación (Arduino, 2002). En estos casetes de resistencia, incluido *qnr*, el elemento de 59 pb (Hall, 1995) se ha perdido, indicando que, efectivamente, *orf513* (*ISCR1*) debe estar implicado en la adquisición específica de sitio de genes. En un estudio posterior (Wang, 2003), se analizó el entorno genético de los transconjugantes de dos cepas de *E. coli* resistentes a quinolonas en las que se había identificado la presencia de *qnr*. En estas cepas se observó que *qnr* se encuentra formando parte de un integrón de clase 1, perteneciente a la familia In4, adyacente a *orf513* (*ISCR1*) y aguas arriba de *ampR*, *qacE $\delta$ 1* y *sull* (**Figura 30**).

El gen *qnr* del plásmido original pMG252 tiene una localización similar, pero en estos dos plásmidos descritos en China, el gen *ampR* se encuentra inmediatamente aguas debajo de *qnr*, mientras que en pMG252, *qacE $\delta$ 1* y *sull* están directamente aguas debajo de *qnr*. Además, en estos dos plásmidos, los integrones que contienen *qnr*, In36 e In37 (Wang, 2003), presentaban una estructura similar a la de pSAL-1 (Verdet, 2000), pero *ampC* se sustituye por *qnr* (**Figura 29**).



**Figura 29.** Entorno genético de cepas portadoras de *qnr* y comparación de la secuencia con otros integrones de clase 1 (Rodríguez-Martínez, 2005).

La primera descripción de transferencia plasmídica de quinolonas en Europa se hace en 2005 en un aislado de *E. coli* en Francia (Mammeri, 2005). El plásmido se denominó pQR1 y poseía una organización idéntica a la descrita para pMG252 (Figura 30).



**Figura 30.** Idéntico entorno genético de *qnr* en los plásmidos pMG252 y pQR1 (Mammeri, 2008).

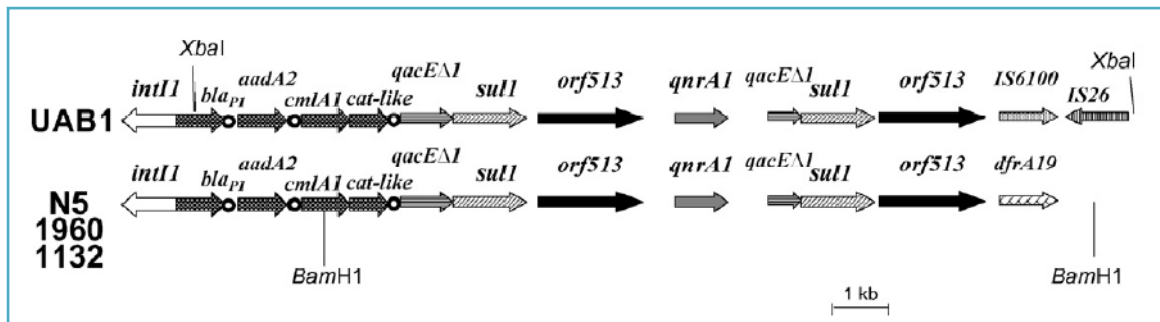
Todos los tipos de genes *qnr* descritos hasta la fecha se han encontrado en plásmidos que varían en tamaño así como en la especificidad del grupo de incompatibilidad, lo que indica que la diseminación de múltiples plásmidos ha sido la responsable de la extensión de este tipo de resistencia a quinolonas por todo el mundo (Strahilevitz, 2009). El entorno genético próximo a cada tipo de gen *qnr*, sin embargo, es bastante similar entre ellos, lo que sugiere que un número limitado de pasos de adquisición de material genético mediante fenómenos de transposición, recombinación, delección e inserción entre otros, ha sido suficiente para generar la diversidad de estructuras plasmídicas conocidas hasta la fecha (Strahilevitz, 2009).

### **5.1. Entorno genético de *qnrA***

La secuencia del integrón conteniendo *qnrA1* en pMG252 (en la cepa UAB1 aislada en 1994 en Alabama, EEUU) fue publicada en 2006 en EEUU (Robicsek, 2006A), y en 2007 en España (Rodríguez-Martínez, 2007) pero en este caso junto con otros tres aislamientos de *K. pneumoniae* (N5, 1960 y 1132) no relacionados clonalmente y aislados también en EEUU entre 1995-1997. La estructura del integrón conteniendo *qnrA1* en UAB1 había sufrido algunos cambios en el tiempo que había transcurrido hasta su secuenciación en España. La determinada por Robicsek y colaboradores es idéntica a las cepas N5, 1960 y 1132 mientras que la determinada por Rodríguez-Martínez y colaboradores presenta tras la segunda copia de *qac $\epsilon$ 1* y *sull* la inserción completa de dos secuencias de inserción, IS6100 e IS26 (**Figura 31**).

Los plásmidos *qnrA1* pueden variar en tamaño de 20 a 320 Kb (Cambau, 2006; Lavilla, 2008) y pertenecen al menos a tres grupos de incompatibilidad (Poirel, 2007). *qnrA1* está asociado normalmente con ISCR1 (anteriormente *orf513*) (Toleman, 2006), aunque un 6.2% de cepas *qnrA1*-positivas en un estudio de Corea del Sur fueron negativas para ISCR1 mediante PCR (Park, 2007). Normalmente, una única copia de

ISCR1 se encuentra aguas debajo de *qnrA1*, pero en pMG252 y plásmidos relacionados, el gen *qnrA1* está flanqueado por dos copias de ISCR1 (Robicsek, 2006A; Rodríguez-Martínez, 2007). Generalmente, el complejo *qnrA1* ISCR1 está insertado en un integrón complejo de clase 1 tipo *sul1* que contiene otros genes de resistencia casete (Figura 31).



**Figura 31.** Comparación de las dos diferentes estructuras para estos 4 aislamientos (Rodríguez-Martínez, 2007).

Otros muchos trabajos corroboran estas estructuras genéticas, incluso en otros tipos de genes *qnr* (Tabla 9):

- ✓ **Tipo UAB1/pMG252**, con la segunda copia de 3'CS inmediatamente tras *qnr* y finalizados por IS6100: "Tipo 1A"
- ✓ **Tipo N5, 1960 y 1132**, igual que el anterior pero sin IS6100 y en su lugar *dfrA19*: "Tipo 1B"
- ✓ **Tipo In36/37**, con la presencia de un gen *ampR* entre *qnr* y la segunda copia de 3'CS: "Tipo 2"

**Tabla 9** Características de determinantes de RPFQ, su asociación con BLEES y entorno genético de *qnr* en diferentes referencias bibliográficas y áreas geográficas durante los últimos años. CMI: Concentración mínima inhibitoria; CIP: ciprofloxacino; AN: ácido nalidíxico; ND: no determinado; S/R a FQs: sensible/resistente a fluoroquinolonas.

Referencia bibliográfica	Especie/s	Zona geográfica	Prevalencia RPFQs	Gen/es RPFQs	BLEE/s	Entorno genético
<b>Wang, 2004</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Escherichia coli</i>	Estados Unidos	7.3% (8/110 cepas con CMI de CIP $\geq 2$ mg/L) [Ninguna cepa de <i>E. coli qnr</i> -positiva; 11% (8/72) para <i>K. pneumoniae</i> ]	<i>qnrA</i>	SHV-7	ND
<b>Cheung, 2005</b>	<i>Salmonella enteritidis</i>	China	100% (4/4 cepas procedentes de un brote; 4 plásmidos diferentes)	<i>qnrA</i>	CTX-M-14	ND
<b>Jeong, 2005</b>	<i>Escherichia coli</i>	Corea del Sur	2.8% (13/466 cepas estudiadas) [0.7% (2/260 cepas de <i>E. coli</i> ); 5% (11/206 cepas de <i>E. cloacae</i> )]	<i>qnrA</i>	-	Tipo 1B pero con <i>dfrA3b</i>
<b>Jun, 2005</b>	<i>Enterobacter cloacae</i>					
<b>Robicsek, 2005</b>	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Proteus spp.</i>	Estados Unidos	14.4% (14/97 cepas estudiadas) 17% (12/71 <i>E. cloacae</i> ) [11/45 (24%) R a FQs vs 1/26 (4%) S a FQs] 10% (2/20 <i>K. pneumoniae</i> S a FQs)	<i>qnrA</i>	-	Tipo 1
<b>Garnier, 2006</b>	<i>Salmonella enterica</i> serovar Keurmassar	Francia	Única cepa para estudio genético	<i>qnrB2</i>	SHV-12	Tipo 1B
<b>Poirel, 2006</b>	<i>Escherichia coli</i>	Francia	3.7% (7/186 cepas productoras de BLEEs)	<i>qnrA1/S1</i>	VEB-1	Tipo 1/2
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		3.2% (6/185 cepas no productoras de BLEEs, resistentes a AN)	<i>qnrA1</i>	CTX-M-1	
	<i>Enterobacter cloacae</i>			<i>qnrA1/S1</i>	VEB-1/SHV-12	

**Tabla 9** Características de determinantes de RPFQ, su asociación con BLEES y entorno genético de *qnr* en diferentes referencias bibliográficas y áreas geográficas durante los últimos años. CMI: Concentración mínima inhibitoria; CIP: ciprofloxacino; AN: ácido nalidíxico; ND: no determinado; S/R a FQs: sensible/resistente a fluoroquinolonas. (Continuación)

Referencia bibliográfica	Especie/s	Zona geográfica	Prevalencia RPFQs	Gen/es RPFQs	BLEE/s	Entorno genético
<b>Pai, 2007</b>	<i>Escherichia coli</i>	Corea del Sur	23.4% (56/239 cepas productoras de BLEEs o de AmpC plasmídica)	<i>qnrB2/B4/B</i>	DHA-1, CTX-M-14, SHV-12	ND
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		2.5% (2/81) en <i>E. coli</i> y 34% (54/158) en <i>K. pneumoniae</i>	5		
<b>Quiroga, 2007</b>	Enterobacterias	Argentina	44% (8/18 cepas resistentes a CIP)	<i>qnrB10</i> <i>aac(6')-Ib-cr</i>	-	Tipo 1
<b>Shen, 2008</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	China	Única cepa para estudio genético	<i>qnrA1</i> + <i>aac(6')-Ib-cr</i>	CTX-M-24	Tipo 2
<b>Yang, 2008</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	China	38.5% (102/265 cepas con CMI de CIP ≥ 25 mg/L)	<i>qnrB4/B2/B</i> 6	CTX-M-14/ CTX-M-3	ND
	<i>Escherichia coli</i>			<i>qnrS1</i>	CTX-M-14	
	<i>Escherichia coli</i>			<i>qnrB6</i>	CTX-M-3	
	<i>Enterobacter cloacae</i>			<i>qnrB4</i>	SHV-12	
	<i>Enterobacter cloacae</i>			<i>qnrA1</i>	CTX-M-14 + SHV-12	
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>qnrA1</i>	CTX-M-14				

**Tabla 9** Características de determinantes de RPFQ, su asociación con BLEES y entorno genético de *qnr* en diferentes referencias bibliográficas y áreas geográficas durante los últimos años. CMI: Concentración mínima inhibitoria; CIP: ciprofloxacino; AN: ácido nalidíxico; ND: no determinado; S/R a FQs: sensible/resistente a fluoroquinolonas (Continuación).

Referencia bibliográfica	Especie/s	Zona geográfica	Prevalencia RPFQs	Gen/es RPFQs	BLEE/s	Entorno genético
<b>Lavilla, 2008</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	España	4.9% (15/305 cepas productoras de BLEEs)	<i>qnrA1</i>	CTX-M-9 + SHV-92/ SHV-12	Tipo 2
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>			<i>qnrS1</i>	SHV-12	
	<i>Escherichia coli</i>			<i>qnrA1</i>	CTX-M-9 + SHV-12	
	<i>Enterobacter cloacae</i>			<i>qnrA1</i>	CTX-M-9 + SHV-12	
<b>Cano, 2009</b>	<i>Enterobacter cloacae</i>	España	13.5% (27/200 cepas productoras de BLEE, hiperproducción de AmpC, sensibilidad disminuida/R a FQs o R a aminoglucósidos)	<i>qnrS1</i> <i>qnrB5/B2</i> <i>aac(6')-Ib-cr</i>	-	2 cepas <i>qnrS1</i> -positivas y 1 <i>qnrB2</i> -positiva asociadas con <i>ISCR1</i>
<b>Chen, 2009</b>	<i>Enterobacter cloacae</i>	Taiwán	Estudio del plásmido pEC-IMPQ	<i>qnrB2</i>	SHV-12	Tipo 1B
<b>Dionisi, 2009</b>	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	Italia		<i>qnrB19</i>	SHV-12	Flanqueado por <i>ISEcp1</i> e <i>IS26</i>
<b>Gutierrez, 2009</b>	<i>Salmonella enterica</i> serovar Bredeney	España	Única cepa para estudio genético	<i>qnrB2</i>	SHV-12	Tipo 1B (Similar a pEC-IMPQ pero importante delección)



**Tabla 9** Características de determinantes de RPFQ, su asociación con BLEES y entorno genético de *qnr* en diferentes referencias bibliográficas y áreas geográficas durante los últimos años. CMI: Concentración mínima inhibitoria; CIP: ciprofloxacino; AN: ácido nalidíxico; ND: no determinado; S/R a FQs: sensible/resistente a fluoroquinolonas (Continuación).

Referencia bibliográfica	Especie/s	Zona geográfica	Prevalencia RPFQs	Gen/es RPFQs	BLEE/s	Entorno genético
<b>Dahmen, 2009</b>	<i>Escherichia coli</i>	Túnez	16% (45 <i>qnr</i> -positivos/281 cepas resistentes a AN)	<i>qnrB1/B2/S1</i>	CTX-M-15	Tipo 1 en <i>qnrB2</i> , pero no en <i>qnrB1</i> ni <i>qnrA6</i>
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>			<i>qnrA6</i>	CTX-M-15/SHV-28	
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>			<i>qnrB1/B2</i>	CTX-M-15 + SHV-28	
	<i>Enterobacter cloacae</i>			<i>qnrB2</i>	CTX-M-15/SHV-12	
	<i>Enterobacter cloacae</i>			<i>qnrS1</i>	CTX-M-15/CTX-M-3	
	<i>Citrobacter freundii</i>		<i>qnrB2</i>	CTX-M-15, SHV-2a		
<b>Richter, 2010</b>	Enterobacterias	Italia	17% (40/232 cepas R a FQs o productoras de BLEE)	<i>qnrA1/S1</i>	CTX-M-1 + SHV-12	<i>qnrB19</i> asociado a <i>ISCR1</i> o <i>ISEcp1</i>
			68% (32/47 cepas <i>K. pneumoniae</i> )	<i>qnrB19</i>	SHV-12	
			5.1% (8/157 cepas <i>E. coli</i> )			
<b>Hordijk, 2011</b>	<i>Escherichia coli</i>	Países Bajos	Única cepa para estudio genético	<i>qnrB19</i>	-	Flanqueado por dos IS26 idénticas
<b>Herrera-León, 2011</b>	Enterobacterias	España	0.6% (123/19010 cepas; 122/18624 cepas de <i>Salmonella</i> spp.)	<i>qnrB2</i>	SHV-12	ND
				<i>qnrA1</i>	CTX-M-9, OXA-1	
				<i>qnrS1</i>	OXA-1, SHV-12	

**Tabla 9** Características de determinantes de RPFQ, su asociación con BLEES y entorno genético de *qnr* en diferentes referencias bibliográficas y áreas geográficas durante los últimos años. CMI: Concentración mínima inhibitoria; CIP: ciprofloxacino; AN: ácido nalidíxico; ND: no determinado; S/R a FQs: sensible/resistente a fluoroquinolonas (Continuación).

Referencia bibliográfica	Especie/s	Zona geográfica	Prevalencia RPFQs	Gen/es RPFQs	BLEE/s	Entorno genético
<b>Briales, 2012</b>	<i>Escherichia coli</i>	España	3.7% <i>qnr</i> (14/382 cepas)	<i>qnr</i>	CTX-M-9 + SHV-1/SHV-12 CTX-M-14 + SHV-1 CTX-M-1/CTX-M-32 + SHV-11	ND
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		16.2% <i>aac(6')-Ib-cr</i> (62/382 cepas)	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	SHV-1+ SHV-2 SHV-2/SHV-12 CTX-M-15	
<b>Ruiz, 2012</b>	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella spp</i>	España, México	100% (19 cepas portadoras de genes de RPFQ seleccionadas)	<i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>qnr</i> o <i>qepA</i>	CTX-M-15 (84% de las cepas estudiadas)	Tipo 1A ( <i>qnrB6</i> ) <i>aac(6')-Ib-cr</i> precedido de IS26
<b>Elgorriaga-Islas, 2012</b>	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Chile	64% (128/200 cepas resistentes a AN y/o susceptibilidad intermedia a CIP)	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	CTX-M-1 CTX-M-2	ND

## 5.2. Entorno genético de *qnrB*

*qnrB1* fue descubierto en un plásmido de multi-resistencia de 340 Kb procedente de la India (Jacoby, 2006). No está asociado con *ISCR1* pero si con otra transposasa putativa, Orf1005 (Jacoby, 2006; Soge, 2006). El alelo *qnrB2* tiene también una gran distribución, encontrándose originalmente en aislamientos procedentes de Estados Unidos (Jacoby, 2006) y posteriormente en diferentes zonas de la geografía mundial (Strahilevitz, 2009). *qnrB2* está vinculado a una única copia de *ISCR1* en algunos plásmidos (Espedido, 2008), mientras que en otros plásmidos, se han observado dos copias de *ISCR1* alrededor del gen (Garnier, 2006) (Figura 37). Igual que en el caso de plásmidos *qnrA1*, el complejo *ISCR1* puede estar insertado en un integrón tipo *sul1*.

En el caso del alelo *qnrB19*, algunos autores han demostrado la movilización, aunque no la expresión, de este gen por una *ISEcp1C* en una cepa clínica de *E. coli* (Cattoir, 2008B), denominando a esta estructura Tn2012 (Figura 32). El hecho de que *ISEcp1C* y *qnrB19* se hallen en direcciones opuestas es la razón por la que *ISEcp1C* no ejerza de promotor como en otras ocasiones.

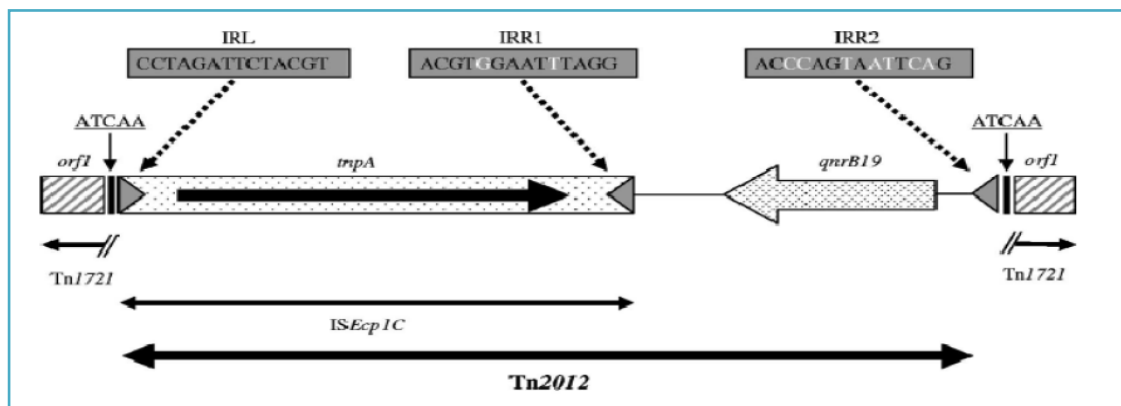


Figura 32. Tn2012 descrito por primera vez para *ISEcp1C* y *qnrB19* (Cattoir, 2008B).

Este mismo transposón Tn2012 fue hallado con posterioridad en una cepa de *Salmonella enterica* ser. Typhimurium incluido en un Tn3 portador de blaTEM-1 (Dionisi, 2009). Este Tn3 habría sido probablemente truncado en una primera fase por un par de IS26 portadoras del gen *aphI*. Posteriormente, Tn2012 se inserta en medio de estas dos IS26 (Figura 33). La presencia de IS26 atrae por último una blaSHV-12 quedando así en el interior del Tn3 cuatro genes de resistencia: *aphI*, blaTEM-1, *qnrB19* y blaSHV-12.

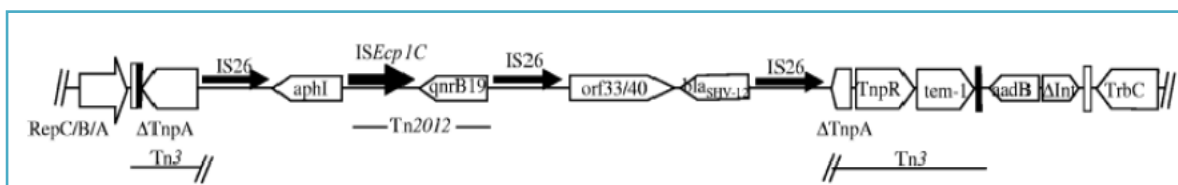
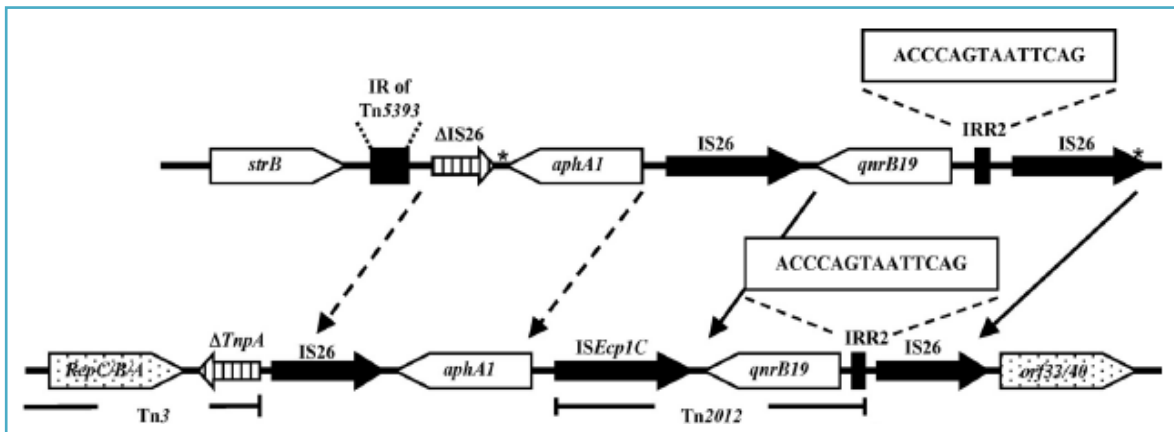


Figura 33. Estructura del plásmido p61/9 (Dionisi, 2009).

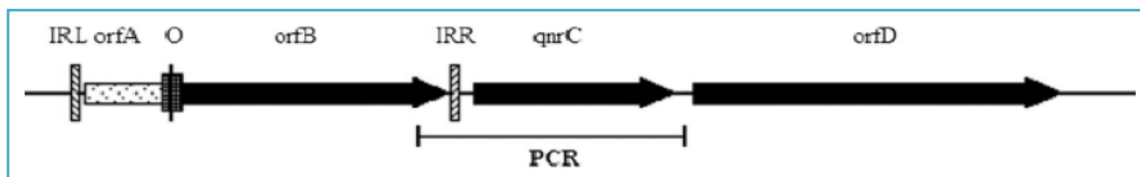
En un reciente estudio (Hordijk, 2011), se corrobora que el gen *qnrB19* está flanqueado por dos IS26 idénticas (Figura 34). Aguas abajo del gen *qnrB19*, identifican un gen *aphA1*, seguido de una secuencia parcial de IS26, la cual está truncada por elemento transponible Tn5393 portador de un gen *strB*. Las dos regiones, una constituida por *qnrB19*, IRR2 y una IS26 y la otra región por el gen *aphA1*, y la secuencia parcial de IS26, (Figura 34) presentan una diferencia en una mutación puntual en comparación con las secuencias para *qnrB19* publicadas previamente (Dionisi, 2009). ISEcp1C, descrito junto a *qnrB19* en Tn2012 por Cattoir y colaboradores (Cattoir, 2008B) (Figura 32), no se observó en este caso.

### 5.3. Entorno genético de *qnrC*

El primer entorno genético de *qnrC* descrito de un aislamiento clínico de *P. mirabilis* (Wang, 2009) muestra que se halla por detrás de un nuevo elemento de la familia IS3 ISPmi1 (Figura 35).



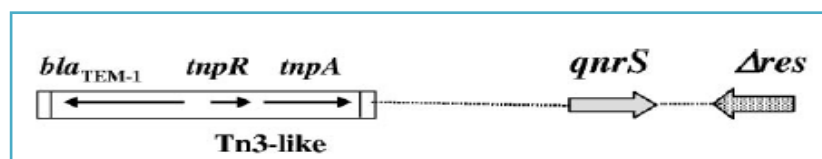
**Figura 34.** Entorno genético del gen *qnrB19*. Representación esquemática de los resultados de secuenciación comparados con las regiones flanqueantes halladas por Dionisi y colaboradores (Dionisi, 2009) Las flechas negras indican secuencias de inserción o secuencias repetidas. Las flechas blancas indican genes de resistencia antibiótica. Las flechas blancas ralladas indican secuencias parciales. El asterisco indica que la secuencia contiene una mutación puntual en comparación con la secuencia depositada en GenBank con el número de acceso: FJ790886. IR, repeticiones invertidas. (Hordijk, 2011).



**Figura 35.** ISpmi1 está comprendida entre las IRL e IRR marcadas. En su interior, *orfA* y *orfB*, solapados, contienen un centro activo DDE. *orfA* es una proteína tipo-amidasa (Wang, 2009).

#### 5.4. Entorno genético de *qnrS*

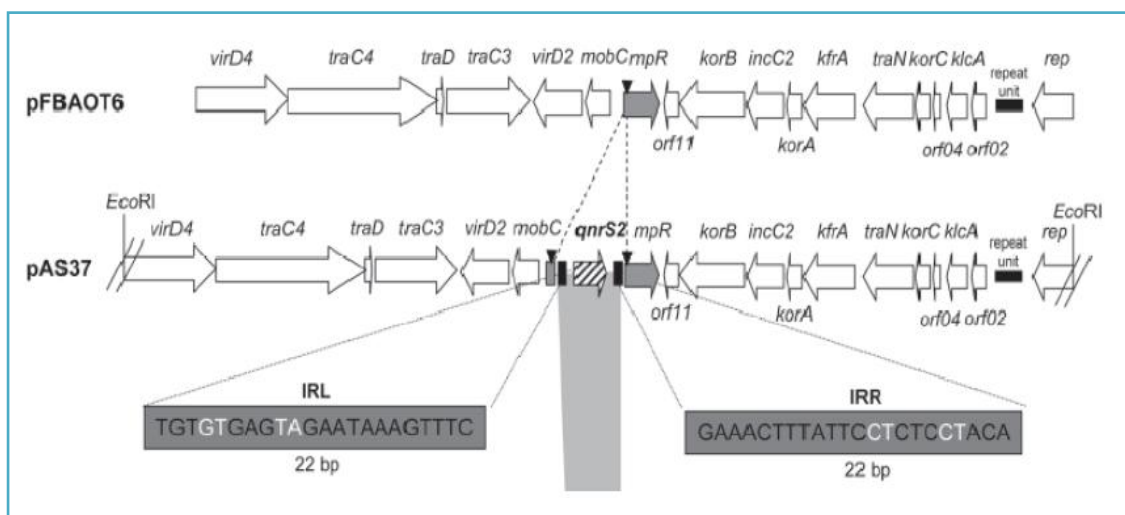
El entorno genético del primer determinante *qnrS1* identificado en un aislamiento clínico de *S. flexneri* 2b (Hata, 2005) muestra su relación con una estructura similar al transposón Tn3, el cual contiene el gen codificante para la  $\beta$ -lactamasa TEM-1, así como los genes para la resolvasa (*tnpR*) y transposasa (*tnpA*) (Figura 36).



**Figura 36.** Entorno genético descrito en *Shigella flexneri* 2b (Hata, 2005).

En el año 2008 se describe de forma inesperada el entorno genético de un gen *qnrS2* en una cepa ambiental de *Aeromonas punctata*, donde *qnrS2* forma parte de una estructura de 1375 pb flanqueada por dos IR imperfectas de 22 pb y sus correspondientes DR de 5 pb (**Figura 37**), recordando a la estructura de un transposón, pero sin transposasa en el fragmento (Cattoir, 2008A). Dada la presencia de DR, la estructura parece haberse adquirido por transposición. De este modo, lo descrito en este caso se denomina *mic* (*mobile insertion cassette*), esto es, como si fuese una IS pero sustituyendo la transposasa por un gen de resistencia.

A diferencia de *qnrA* y *qnrB*, los genes *qnrS* no están asociados con *ISCR1*, y tampoco forman parte de integrones complejos. Además, los plásmidos *qnrS* son más pequeños, no conjugativos y se encuentran con más probabilidad en aislamientos de *S. enterica* serovars no productores de BLEE o AmpC (Bönemann, 2006; García-Fernández, 2009; Kehrenberg, 2007; Wu, 2007; Wu, 2008). En varios plásmidos *qnrS1* (Kehrenberg, 2006), incluyendo pAH0376, en el que *qnrS* fue descubierto (Hata, 2005), el gen se localiza cerca de una estructura Tn3 que codifica  $\beta$ -lactamasas TEM-1.



**Figura 37.** Comparación de la estructura del plásmido pFBAOT6 de una cepa de *Aeromonas punctata* vs. pA3S7 portador de *qnrS2*, insertado en medio de *mpR* (metalopeptidasa). Dos barras negras señalan las IR y dos triángulos pequeños las DR (CCTCC) las dos diferentes estructuras para estos 4 aislamientos (Cattoir, 2008A).

### 5.5. Entornos genéticos de cepas *qnr*-positivas productoras de BLEE

La detección de BLEE en cepas de enterobacterias portadoras al mismo tiempo de algún determinante *qnr* es frecuente. La asociación de determinantes QnrA con diferentes BLEEs como SHV-7 (Wang, 2004), CTX-M-9 (Wang, 2004) y CTX-M-14 (Cheung, 2005) se ha descrito repetidamente desde el año 2004 (Nordmann, 2005). En cambio, aislamientos de *S. flexneri* y *E. cloacae* positivos para genes *qnrS* se describieron en un principio junto con la penicilinasa de espectro reducido TEM-1 (Hata, 2005; Poirel, 2006). Publicaciones más recientes muestran también una clara asociación del determinante *qnrS* con BLEEs como CTX-M-14 (Yang, 2008) y CTX-M-15 y CTX-M-3 (Dahmen, 2009).

En la **Tabla 9** se muestran diferentes publicaciones donde claramente se observa la relación entre ambos tipos de determinantes de resistencia, *qnr* y/o *aac(6′)-Ib-cr* con BLEEs. En algunos de estos trabajos, se ha estudiado el entorno genético de los diferentes tipos de *qnr* y de su BLEE acompañante

### 6. Entorno genético de *aac(6′)-Ib-cr*

El gen *aac(6′)-Ib-cr*, al igual que su predecesor *aac(6′)-Ib*, se localiza en un integrón casete asociado con un sitio *attC* (Strahilevitz, 2009). De hecho, se ha encontrado en varios integrones, algunos de los cuales se muestran en la **Figura 38**, pero especialmente en plásmidos IncF11 que además expresan CTX-M-15. *aac(6′)-Ib-cr* se ha asociado también con otros genes de RPFQs como *qnrA1* (Jiang, 2008; Robicsek, 2006B; Xu, 2007), *qnrB2* (Pomba, 2009; Yang, 2008), *qnrB4* (Jiang, 2008; Ma, 2009), *qnrB6* (Jiang, 2008; Ma, 2009), *qnrB10* (Quiroga, 2007), *qnrS1* (Jiang, 2008; Ma, 2009), *qnrS2* (Picão, 2008) y *qepA* (Ma, 2009), junto con otras  $\beta$ -lactamasas como CTX-M-1 (Soge, 2006), CTX-M-14 (Jiang, 2008), CTX-M-24 (Jiang, 2008), DHA-1 (Ma, 2009), SHV-12 (Ma, 2009) y KPC-2 (Chmelnitsky, 2009).

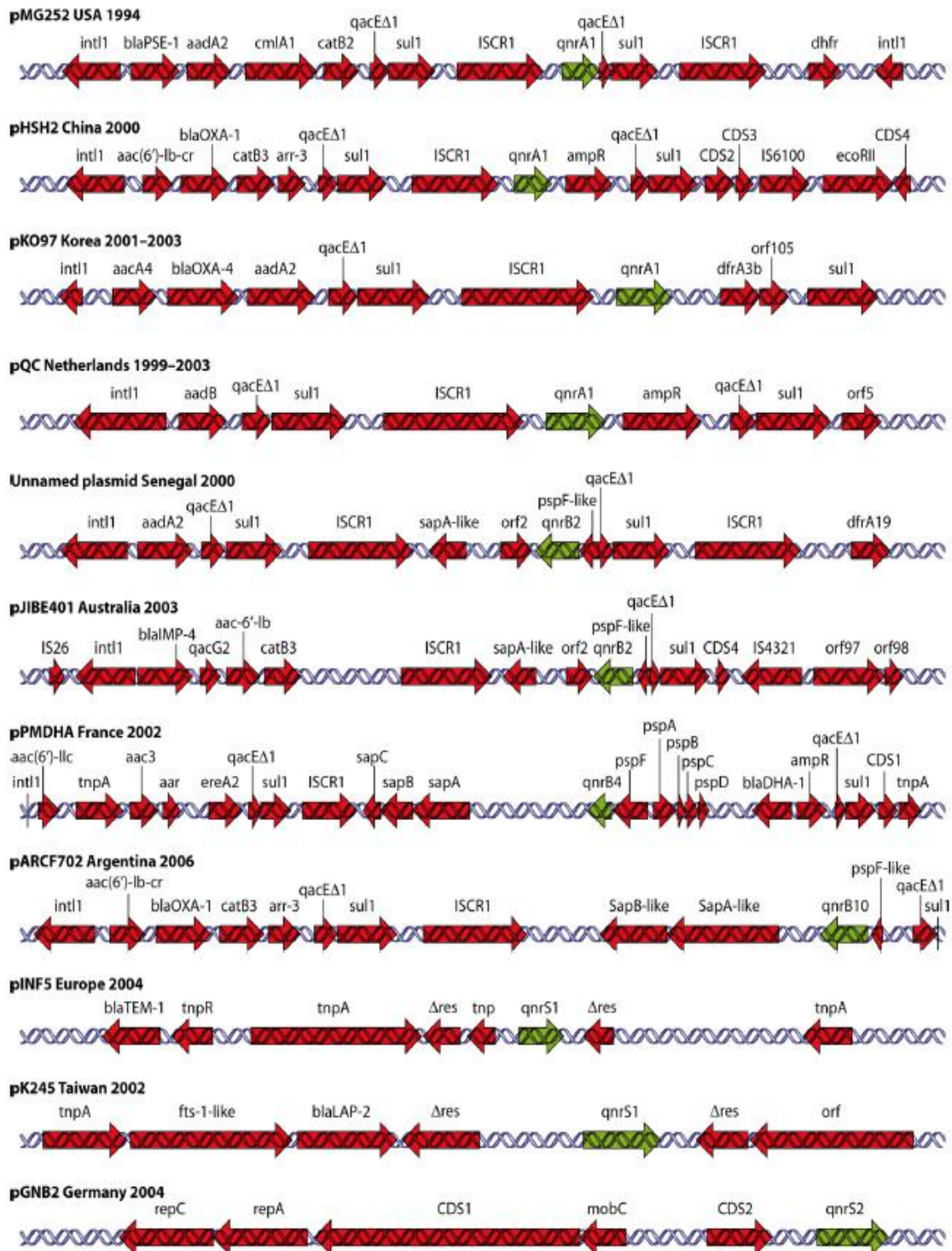


Figura 38. Entorno genético de diferentes alelos de *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* y *aac(6')-Ib-cr* en asociación con *qnrA1* (pHSH2 China 2000) y *qnrB10* (pARCF702 Argentina 2006) (Strahilevitz, 2009).



## 7. Relación de los determinantes de RPFQs con las BLEEs

Las BLEEs se definen como enzimas capaces de hidrolizar las cefalosporinas de amplio espectro y las monobactams, pero no las cefamicinas ni las carbapenemas. Se caracterizan por ser inhibidas por los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas de clase A, por encontrarse generalmente en plásmidos, y por derivar de otras  $\beta$ -lactamasas de menor espectro hidrolítico o de ciertas  $\beta$ -lactamasas cromosómicas (Cantón, 2007). En la **Tabla 10** se detallan las principales características de las BLEEs conocidas en Gram negativos (Jacoby, 2005).

**Tabla 10.** Principales características de BLEEs en Gram negativos (Modificada de Fernández, 2010).

Familia BLEE	Sustratos principales	Inhibición por ácido clavulánico	Clase molecular
TEM	Oximino-cefalosporinas	+++++	A
SHV	Monobactams		
CTX-M	Oximino-cefalosporinas	++++	A
	Monobactams		
OXA	Incluye para algunas enzimas, cefepime	+	D
	Oximino-cefalosporinas		
	Monobactams		
	Incluye para algunas enzimas, cefepime		

Las BLEEs tipo SHV y TEM están universalmente distribuidas, y se conocen actualmente más de 100 y 160 variantes respectivamente ([www.lahey.org](http://www.lahey.org)). Las de tipo OXA, a diferencia de las anteriores, se encuentran mayoritariamente en *P. aeruginosa* y *A. baumannii*. En cuanto al grupo de las BLEEs tipo CTX-M, se sabe que no guardan

relación con otras BLEEs descritas. Diferentes  $\beta$ -lactamasas cromosómicas de algunas especies de *Kluyvera* han sido identificadas como fuentes potenciales de estas BLEEs. Los genes codificantes de las mismas podrían haberse movilizado desde su ubicación original gracias a diferentes secuencias de inserción (*ISCR1*, *ISEcp1*) o a algún bacteriófago. En la actualidad se conocen hasta 65 variantes de blaCTX-M que se agrupan en 5 *clusters* según su secuencia aminoacídica (**Tabla 11**).

**Tabla 11.** Principales BLEEs tipo CTX-M según *cluster* (Modificada de Fernández, 2010).

<i>Cluster 1</i>	<i>Cluster 2</i>	<i>Cluster 8</i>	<i>Cluster 9</i>	<i>Cluster 25</i>
blaCTX-M-1	blaCTX-M-2	blaCTX-M-8	blaCTX-M-9	blaCTX-M-25
blaCTX-M-3	blaCTX-M-4	blaCTX-M-40	blaCTX-M-13	blaCTX-M-26
blaCTX-M-10	blaCTX-M-5		blaCTX-M-14/18	
blaCTX-M-11	blaCTX-M-6		blaCTX-M-16	
blaCTX-M-12	blaCTX-M-7		blaCTX-M-17	
blaCTX-M-15	blaCTX-M-20		blaCTX-M-19	
blaCTX-M-32			blaCTX-M-21	
			blaCTX-M-24	
			blaCTX-M-27	

Actualmente, las blaCTX-M son el tipo predominante y se encuentran mayoritariamente en *E. coli*, y en menor grado en *K. pneumoniae*. Su prevalencia está aumentando de manera global, tanto a nivel hospitalario como a nivel comunitario, sobre todo en aislamientos de origen urinario. Los factores de riesgo parecen haberse modificado, y otros antibióticos, entre los que se encuentran las quinolonas, podrían estar desempeñando un papel relevante en su selección (Cantón, 2007).

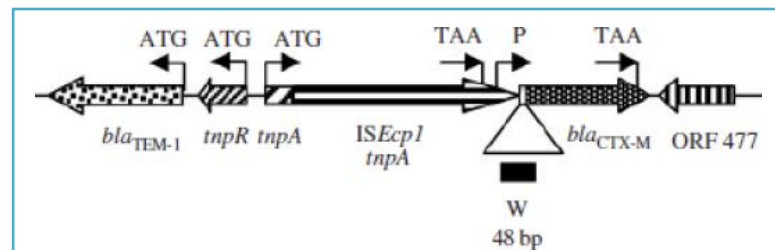
La diseminación de los genes codificadores de las blaCTX-M es mayor en comparación con la de sus semejantes blaSHV y blaTEM. La adquisición de las blaCTX-M involucra a elementos genéticos diferentes a los de aquellas, como son ISCR1 (blaCTX-M-1, blaCTX-M-2 y blaCTX-M-9) e ISEcp1 (clusters 1, 2 y 9), así como a determinados bacteriófagos (en España sólo se ha descrito en blaCTX-M-10) (Poirel, 2008; Cantón, 2006). Las blaCTX-M asociadas a ISCR1 suelen encontrarse en integrones de clase 1 dentro, a su vez, de transposones. Estos integrones e incluso los propios transposones suelen contener genes de resistencia adicionales en forma de genes casete, hecho que provoca una selección a favor de las cepas portadoras (Cantón 2009; Cantón, 2007). La diseminación de algunas BLEEs de esta familia, como blaCTX-M-9, blaCTX-M-14, blaCTX-M-15 y blaCTX-M-32, se ha asociado a brotes epidémicos.

### **ISEcp1**

ISEcp1 es una secuencia de inserción asociada con frecuencia con las BLEE tipo CTX-M (Poirel, 2003) que es capaz de movilizar estos genes a través de un proceso especial de transposición. Moviliza secuencias adyacentes a su extremo 3' por transposición después de haber reconocido una variedad de secuencias cortas de ADN a modo de IRR. Es decir, una sola copia de ISEcp1 situada por delante de la BLEE tipo CTX-M con su IRL fija, es suficiente para movilizar el gen, primero desde un ADN cromosómico progenitor y posteriormente a un plásmido conjugativo capaz de diseminarlo. A este peculiar proceso se le denomina transposición "one-ended" (Fernández, 2010). Además esta peculiar IS proporciona secuencias promotoras -35 y -10 que potencian la expresión del gen BLEE. El hallazgo de secuencias repetidas directas de 5 pb en cada extremo es la firma del movimiento de transposición de ISEcp1 y nos señala los límites de pseudo-transposón (Lartigue, 2006; Poirel, 2008). Hasta la fecha se conocen tres variantes de esta transposasa, ISEcp1, ISEcp1B e ISEcp1C aunque las IRL

de las tres son idénticas. *ISEcp1B* difiere de *ISEcp1* en un aminoácido, mientras que *ISEcp1C* difiere en un aminoácido con *ISEcp1* y en dos con *ISEcp1B* (Cattoir, 2008).

En resumen, la vinculación directa de las *bla*<sub>CTX-M</sub> con estas IS particulares, que participan tanto en su movilización como en la promoción de su expresión, se suma al hecho de que las propias IS están a su vez contenidas en transposones y plásmidos conjugativos (**Figura 39**). En relación a los determinantes de RPFQ, se ha descrito, recientemente, la presencia de la transposasa *ISEcp1C* en el extremo 3' de cepas portadoras de *qnr*, concretamente de *qnrB19* (Richter, 2010), sugiriendo su implicación en la movilidad de estos genes de modo similar a los de BLEEs.



**Figura 39.** *bla*<sub>CTX-M-15</sub> en una estructura Tn3 (Eckert, 2006).

En estudios posteriores al establecimiento de la primera asociación entre BLEEs y *qnr* en la misma cepa (Wang, 2004) se ha continuado estudiando la prevalencia de este determinante *qnr* en diferentes especies de enterobacterias, aunque con mayor frecuencia en las especies de *E. coli* y *K. pneumoniae*. Además, se confirma la asociación de este determinante de RPFQ con la presencia de BLEEs en todos ellos (**Tabla 9**).

## 8. Implicación clínica de la resistencia plasmídica a fluoroquinolonas (RPFQs)

El descubrimiento de la RPFQs, podría explicar cómo clones independientes de enterobacterias inicialmente sensibles a quinolonas, desarrollan una resistencia de alto nivel a las mismas (Robicsek, 2006A).

En general, la adquisición de un plásmido portador de *qnr* no se traduce en resistencia a fluoroquinolonas en la cepa salvaje, de acuerdo con los puntos de corte clínicos del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). El término de “resistencia” en el contexto de RPFQs se utiliza para hacer referencia a cualquier aumento en la CMI a fluoroquinolonas (definición biológica) más que un aumento en la misma sobre un punto de corte de sensibilidad (definición clínica) (Strahilevitz, 2009). Ante concentraciones clínicas de quinolonas, los microorganismos con incluso una única mutación de resistencia (resistencia de primer escalón) pueden sobrevivir y dar lugar a mutantes cada vez más resistentes (Robicsek, 2006A). Estos microorganismos sensibles a quinolonas portadores del gen *qnr* pero que carecen de suficientes mutaciones cromosómicas como para calificarlos resistentes, son desde el punto de vista clínico preocupantes, ya que *in vitro*, adquieren fácilmente resistencia. Los puntos de corte del CLSI se desarrollaron en base a datos de una mayoría de aislamientos de enterobacterias no resistentes que tenían CMIs muy bajas para quinolonas. Si los plásmidos portadores de *qnr* se infiltran ampliamente en una población de patógenos, la exposición de los mismos a quinolonas podría estimular el rápido desarrollo de resistencias (Robicsek, 2006A). Este fenómeno ha sido documentado en un contexto clínico; una cepa de *E. coli* sensible portadora de *qnrA* pero no de las mutaciones de resistencia a quinolonas clásicas desarrolló mutaciones cromosómicas y en consecuencia resistencia de alto nivel después de 5 días de terapia con norfloxacin (Robicsek, 2006A). Por tanto, es fundamental establecer la seguridad o no de usar

fluoroquinolonas para el tratamiento de aislamientos portadores de *qnr* que presentan CMI para fluoroquinolonas por debajo de los puntos de corte establecidos.

Como predecir la repercusión clínica de la RPFQs desde un punto de vista asistencial, a partir de datos *in vitro*, es un aspecto primordial a estudiar para evitar fracasos clínicos, posibles complicaciones de la ineffectividad del tratamiento con quinolonas y por supuesto, evitar la diseminación de los aislamientos portadores de esta resistencia. Algunos autores proponen que valores de CMI de 0.25 mg/L y 16 mg/L para ciprofloxacino y ácido nalidíxico, respectivamente, sugieren la presencia de mecanismos de resistencia plasmídica a quinolonas (Gay, 2006; Strahilevitz, 2009).

El grado de protección de las proteínas Qnr en aislamientos de enterobacterias frente a las fluoroquinolonas se ha estudiado habitualmente midiendo la diferencia en las CMI de quinolonas para un aislamiento de *E. coli* con y sin el plásmido portador del gen *qnr* o bien otro determinante de RPFQ. También se ha descrito que la presencia de determinantes de RPFQs en aislamientos clínicos de diferentes especies de enterobacterias, disminuyen la sensibilidad a este grupo de antibióticos, facilitando la selección de mutantes resistentes de alto nivel (Rodríguez-Martínez, 2011).

La localización de estos determinantes de RPFQs en elementos genéticos móviles, que a su vez transportan otros determinantes de resistencia, en especial BLEE tipo CTX-M y SHV, favorece la extensa diseminación de aislamientos clínicos que los portan. Para otros aislamientos, el número de copias del determinante de RPFQs y especialmente el nivel transcripcional de los genes *qnr* afectan al nivel de resistencia a quinolonas (Rodríguez-Martínez, 2006; Xu, 2007). Además de la asociación de determinantes de RPFQs y BLEEs, la presencia de algún gen de resistencia a aminoglucósidos potencia aún más la resistencia, de modo que desde el punto de vista clínico la prescripción de una quinolona, no sólo puede seleccionar resistencia a quinolonas, sino también a

betalactámicos, aminoglucósidos o cualquier otro grupo de antibióticos, cuyo gen de resistencia se encuentre en los plásmidos que portan los genes de RPFQs (*Robicsek, 2006A*).

En resumen, la selección de cepas que presentan una combinación de genes de resistencia (RPFQs + BLEE) en los hospitales constituye una seria amenaza desde el punto de vista clínico, disminuyendo las posibilidades terapéuticas. Por tanto, es fundamental mantener una activa vigilancia que estime la prevalencia real de estos mecanismos de resistencia, así como también implantar medidas de control con el fin de evitar su selección y diseminación.





---

#### *IV. MATERIAL Y MÉTODOS*



### 1. Selección, obtención y conservación de los aislamientos clínicos

Durante un período de dos meses (noviembre-diciembre 2010) se recogieron, de forma aleatoria, las primeras 10 enterobacterias identificadas diariamente entre los aislamientos clínicos del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca (Murcia). Al cabo de este período se recopilaron un total de 300 aislamientos clínicos de enterobacterias. Debido a la aleatoriedad del proceso de selección, tras la revisión de los datos demográficos de los pacientes se comprobó que algunas cepas pertenecían al mismo paciente. Se eliminaron estas duplicidades, ampliándose la selección con 32 enterobacterias adicionales obtenidas igualmente del trabajo asistencial diario. Finalmente, se estudiaron un total de 312 aislamientos clínicos no duplicados de enterobacterias.

La obtención de los aislamientos puros primarios se realizó a partir de la placa de agar Mac Conkey (*bioMérieux, La Balme Les Grottes, France*) utilizado como control de inóculo en el estudio de sensibilidad antibiótica. La conservación de los aislamientos se realizó a  $-20^{\circ}\text{C}$  en tubos estériles de tapón de rosca conteniendo 1 mL de leche descremada hasta su posterior estudio.

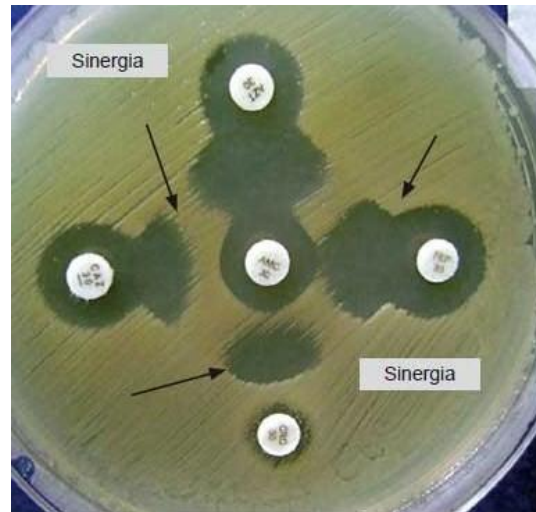
### 2. Identificación y sensibilidad antibiótica

La identificación y sensibilidad antibiótica de todos los aislamientos se realizó mediante el sistema automatizado *Vitek 2* (*bioMérieux, La Balme Les Grottes, France*). Para la identificación se utilizó la tarjeta de Gram negativos, excepto en los aislamientos de *E. coli* procedentes de muestras de orina, cuya identificación se realizó por el color rosado de la colonia en el medio cromogénico CPS-3 (*bioMérieux, La Balme Les Grottes, France*).

Para estudiar la sensibilidad antibiótica se utilizó la tarjeta AST-112 que contiene los siguientes antibióticos: ampicilina, amoxicilina/clavulánico, cefazolina, cefoxitina, ácido nalidíxico, ciprofloxacino, cefotaxima, ceftazidima, cefepime, imipenem, piperacilina/tazobactam, gentamicina, tobramicina, amikacina, ertapenem y tigeciclina. En los aislamientos procedentes de muestras de orina se empleó la tarjeta AST-113 que incluye además fosfomicina. Posteriormente, en las cepas con presencia de determinantes de RPFQs se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de ciprofloxacino mediante Etest (*AB Biodisk, Solna, Sweden*). La interpretación de los resultados se realizó de acuerdo a los criterios del *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2010 (CLSI, 2010)*.

*Detección y confirmación de la producción de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEEs)*

La detección de la producción de BLEEs, se realizó por el sistema automatizado *Vitek2 (bioMérieux, La Balme Les Grottes, France)* y se confirmó fenotípicamente en los casos dudosos con el método de sinergia con doble-disco basado en el efecto inhibitorio del ácido clavulánico, método de referencia de acuerdo a los criterios del CLSI 2010 (*CLSI, 2010*). Para ello, una suspensión bacteriana ajustada al patrón de 0.5 de la escala de McFarland fue inoculada sobre una placa de agar Mueller-Hinton (*bioMérieux, La Balme Les Grottes, France*), disponiéndose sobre ella un disco de amoxicilina/clavulánico en el centro de la placa y discos de ceftazidima, cefotaxima, cefepime y aztreonam a una distancia de 20 mm del disco de amoxicilina/clavulánico. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas. La presencia de una ampliación o distorsión del halo de inhibición (sinergia) entre el disco de amoxicilina/clavulánico y alguno de los otros antibióticos se consideró indicativo de la producción de una BLEE (**Figura 40**).



**Figura 40.** Método de doble difusión con discos para la confirmación fenotípica de la producción de beta-lactamasa de espectro extendido (BLEE). Distorsión del halo de inhibición debido a la inhibición de la BLEE por la acción del ácido clavulánico (en el centro de la placa).

### 3. Amplificación y caracterización de diferentes genes mediante técnicas moleculares basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

#### 3.1. Extracción del ADN

A partir de una resiembra de las colonias puras en el medio de cultivo sólido agar Mueller-Hinton (*bioMérieux, La Balme Les Grottes, France*) se realizó la extracción del ADN total en todos los aislamientos según el siguiente protocolo, basado en la centrifugación y en un proceso de choque térmico:

- Se resuspendieron de 3 a 4 colonias en 100  $\mu$ l de agua destilada estéril contenida en un tubo *ependorf* estéril de 1.5 mL.
- A continuación, el tubo se calentó durante 15 min a 95°C en un termobloque.
- Inmediatamente, se enfrió en hielo durante 10 min.

- Después de centrifugar el tubo a 15000 rpm durante 30 segundos, se recogió con mucho cuidado el sobrenadante y se depositó en un nuevo tubo *ependorf* estéril de 1.5 mL.
- El ADN total estaba listo para usar o conservar a -20°C para posterior estudio.

### 3.2. Detección de genes codificantes de mecanismos de RPFQs

En cada uno de los aislamientos se realizó la detección de los diferentes determinantes de RPFQs mediante amplificación por PCR de diferentes fragmentos intragénicos a partir de ADN total. En cada reacción de PCR realizada se incluyeron controles positivos (aislamientos clínicos en los que está confirmada la presencia de diferentes variantes de los genes *qnr*, de *aac(6′)-Ib-cr* y de *qepA*) y controles negativos (agua libre de nucleasas). En una primera reacción (PCR1), se amplificaron conjuntamente los genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*. En la PCR2, PCR3 y PCR4, se amplificaron el gen *qnrC*, *aac(6′)-Ib-cr* y *qepA*, respectivamente. En total, por cada aislamiento se realizaron 4 reacciones de PCR. Los oligonucleótidos utilizados se muestran en la **Tabla 12** y las condiciones de PCR para la detección de cada determinante RPFQs fueron las siguientes:

- **PCR1 (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*):** desnaturalización a 95°C (5 min), 30 ciclos de 95°C (30 s), 51°C (30 s) y 72°C (30 s), y una extensión final a 72°C (5 min).
- **PCR2 (*qnrC*):** desnaturalización a 95°C (5 min), 30 ciclos de 95°C (30 s), 46°C (30 s) y 72°C (30 s), y una extensión final a 72°C (5 min).
- **PCR3 (*aac(6′)-Ib-cr*):** desnaturalización a 95°C (5 min), 30 ciclos de 95°C (30 s), 56°C (30 segundos) y 72°C (30 s), y una extensión final a 72°C (5 min).

- **PCR4 (*qepA*):** desnaturalización a 95°C (5 min), 30 ciclos de 95°C (30 s), 54°C (30 s) y 72°C (30 s), y una extensión final a 72°C (5 min).

**Tabla 12.** Oligonucleótidos utilizados para la detección de determinantes de RPFQs.

Gen	Oligonucleótido (secuencia 5' → 3')	Tamaño amplificado (pb)
<i>qnrA</i>	<i>qnrA</i> -F ATTTCTCACGCCAGGATTTG	516
	<i>qnrA</i> -R GATCGGCAAAGGTTAGGTCA	
<i>qnrB</i>	<i>qnrB</i> -F GATCGTGAAAGCCAGAAAGG	476
	<i>qnrB</i> -R ATGAGCAACGATGCCTGGTA	
<i>qnrC</i>	<i>qnrC</i> -F GGGTTGTACATTTATTGAATCG	307
	<i>qnrC</i> -R CACCTACCCATTTATTTCA	
<i>qnrS</i>	<i>qnrS</i> -F GCAAGTTCATTGAACAGGGT	428
	<i>qnrS</i> -R TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG	
<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>aac(6')-Ib</i> -F TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	482
	<i>aac(6')-Ib</i> -R CTCGAATGCCTGGCGTGTTC	
<i>qepA</i>	<i>qepA</i> -F AACTGCTTGAGCCCGTAGAT	596
	<i>qepA</i> -R GTCTACGCCATGGACCTCAC	

### 3.3. Caracterización de alelos específicos de determinantes de RPFQs

Para conocer el tipo concreto o variante específica del determinante de RPFQs, se realizó la secuenciación de los amplificados obtenidos, así como la interpretación de los resultados utilizando la herramienta informática BLAST. Sin embargo, en determinados aislamientos positivos para el gen *qnrB* no fue posible concretar exactamente el tipo de *qnrB* con los oligonucleótidos utilizados en el estudio (**Tabla 12**). En estos aislamientos las variaciones aminoacídicas de los diferentes alelos *qnrB* posibles se mostraban, según los criterios de Lahey ([www.lahey.org/qnrStudies/](http://www.lahey.org/qnrStudies/)) al

principio y final del gen *qnrB*. Con objeto de amplificar el gen completo y detectar así los cambios en los aminoácidos clave para discernir entre las posibles variantes *qnrB*, se diseñaron los siguientes oligonucleótidos (**Tabla 13**) que permitieron amplificar el fragmento comprendido entre los codones 15 y 213 (último aminoácido de la secuencia del gen *qnrB* según Lahey).

**Tabla 13.** Oligonucleótidos diseñados para la amplificación del gen *qnrB* completo.

Gen	Oligonucleótido (secuencia 5' → 3')
<i>qnrB</i> completo-F	ATGACTCTGGCATTAGTTAGCGAAA
<i>qnrB</i> completo-R	CTAGCCAATCACCGCGATGC

#### 3.4. Caracterización de BLEEs en cepas con y sin determinantes de RPFQs

En los aislamientos con y sin determinantes de RPFQs y que presentaban producción de BLEE confirmada mediante métodos fenotípicos se realizó la caracterización genotípica de la misma en los tipos SHV, CTX-M, y TEM mediante amplificación por PCR de los genes *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>CTX-M</sub>* y *bla<sub>TEM</sub>*. En cada PCR realizada, se incluían controles positivos (aislamientos clínicos en los que está confirmada la presencia de diferentes tipos de BLEE) y controles negativos (agua libre de nucleasas). Para conocer el tipo concreto de BLEE, se realizó la secuenciación de los amplificados obtenidos, así como la interpretación de los resultados utilizando la herramienta informática BLAST. Los oligonucleótidos utilizados se muestran en la **Tabla 14** y las condiciones de PCR para la detección de cada tipo de BLEE fueron las siguientes:

- **PCR1 (*bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>CTX-M</sub>*):** desnaturalización a 95°C (5 min), 30 ciclos de 95°C (30 s), 52°C (30 s) y 72°C (1 min), y una extensión final a 72°C (5 min).



- **PCR2 (*bla<sub>TEM</sub>*):** desnaturalización a 95°C (5 min), 30 ciclos de 95°C (30 s), 49°C (30 s) y 72°C (1 min), y una extensión final a 72°C (5 min).

**Tabla 14.** Oligonucleótidos utilizados para caracterizar las BLEEs presentes en aislamientos con determinantes de RPFQs.

Gen	Oligonucleótido (secuencia 5' → 3')	Tamaño amplificado (pb)
<i>bla<sub>SHV</sub></i>	SHV-F ATGCGTTATATTCGCCTGTG	850
	SHV-R TTAGCGTTGCCAGTGCTCT	
<i>bla<sub>CTX-M</sub></i>	CTX-M-F SCSATGTGCAGYACCGTAA	650
	CTX-M-R CCGCRATATGRTTGGTGGTG	
<i>bla<sub>TEM</sub></i>	TEM-F ATGAGTATTCAACATTTCCGTG	850
	TEM-R TTACCAATGCTTAATCAGTGAG	

### 3.5. Estudio de mutaciones en la QRDR de las topoisomerasas tipo II (ADN girasa y topoisomerasa IV) en aislamientos con determinantes de RPFQs

El estudio de mutaciones en la subunidades A y B de la ADN girasa y la topoisomerasa IV se realizó mediante PCR convencional a partir de ADN total. Las secuencias obtenidas se analizaron en base a una cepa de referencia (ATCC 9637 *E. coli*). Los oligonucleótidos utilizados se muestran en la **Tabla 15** y las condiciones de PCR fueron:

- ***gyrA*:** desnaturalización a 94°C (5 min), 35 ciclos de 94°C (1 min), 55°C (1 min) y 72°C (1 minuto) y una extensión final a 72°C (7 min).
- ***gyrB*, *parC* y *parE*:** desnaturalización a 95°C (5 min), 30 ciclos de 95°C (30 s), 49°C (30 s) y 72°C (1 min) y una extensión final a 72°C (5 min).

**Tabla 15.** Oligonucleótidos utilizados para la detección de mutaciones en la ADN girasa y la topoisomerasa IV.

Gen	Oligonucleótido (secuencia 5' → 3')	Tamaño amplificado (pb)
<i>gyrA</i>	<i>gyrA</i> -F AAATCTGCCCGTGTCTGTTGGT	344
	<i>gyrA</i> -R GCCATACCTACGGCGATACC	
<i>gyrB</i>	<i>gyrB</i> -F GGACAAAGAAGGCTACAGCA	850
	<i>gyrB</i> -R CGTCGCGTTGTACTCAGATA	
<i>parC</i>	<i>parC</i> -F CTGAATGCCAGCGCCAAATT	168
	<i>parC</i> -R GCGAACGATTCGGATCGTC	
<i>parE</i>	<i>parE</i> -F GACCGAAAGCTACGTCAACC	932
	<i>parE</i> -R GTTCGGATCAAGCGTGGTTT	

### 3.6. Detección y separación de los amplificados en gel de agarosa. Purificación, secuenciación e interpretación de los amplificados.

#### ✓ Detección y separación de los amplificados

En todas las técnicas de PCR utilizadas, los productos de amplificación se separaron y detectaron mediante electroforesis convencional en geles de agarosa al 1.5 % en TBE 0.5x. Se utilizó SYBR® Green (*Invitrogen*) a una concentración de 10000x como agente intercalante fluorescente entre las dos cadenas de ADN en el momento de fusión de la agarosa. Una vez solidificado el gel, se cargaron los pocillos con las muestras, constituidas por 10 µL del amplificado con 10 µL del tampón de carga Blue/Orange Loading Dye 6X (*Promega, Madison, WI, USA*), previamente diluido según instrucciones del fabricante. Como marcador del peso molecular se utilizó PCR Marker® (100-1000 pb) de Sigma-Aldrich. La visualización de los amplificados se realizó en un transiluminador de luz ultravioleta.

✓ *Purificación de los amplificados*

Tras la amplificación por PCR, permanecen en la mezcla de reacción unto con las copias del amplificado muchos dNTPs y oligonucleótidos sin consumir. Todos estos restos pueden interferir en la posterior reacción de secuenciación. Para evitarlo, los amplificados fueron purificados mediante un preparado comercial que hidroliza todos estos restos utilizando enzimas hidrolíticas, una exonucleasa y fosfatasa alcalina (*ExoSAP-IT® Clean up, USB Corporation, Ohio, USA*) siguiendo las instrucciones del fabricante.

✓ *Secuenciación de los amplificados*

La secuenciación automática de los amplificados se realizó según el método de Sanger, mediante electroforesis capilar y terminadores fluorescentes BigDye™ de *Applied Biosystems* en un laboratorio externo (Sistemas Genómicos®, Valencia).

✓ *Interpretación de los amplificados*

La visualización e interpretación de las secuencias obtenidas se realizó con el software *Chromas Lite v.2.01*. La herramienta informática BLAST disponible en <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov> se utilizó para comparar dichas secuencias con las depositadas en la base de datos <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez> (NCBI, *Nacional Center for Biotechnology*).

#### 4. Tipificación molecular de los aislamientos con determinantes de RPFQs

La relación clonal entre las cepas portadoras de genes codificantes de RPFQs se determinó mediante diferentes métodos de tipificación molecular.

##### 4.1. REP-PCR (*Repetitive Extragenic Palindromic-PCR*)

La REP-PCR utiliza oligonucleótidos diseñados a partir de secuencias palindrómicas extragénicas altamente conservadas y que se repiten a lo largo del genoma (*Stern, 1984*). La técnica se basa en que este tipo de secuencias se encuentran dispersas en el cromosoma, presentando orientaciones diferentes y separadas por distancias variables. La amplificación se realizó a partir de ADN total, los oligonucleótidos empleados se muestran en la **Tabla 16** y las condiciones de PCR fueron las siguientes: desnaturalización a 95°C (5 min), 30 ciclos de 95°C (30 s), 52°C (30 s) y 72°C (1 min), y una extensión final a 72°C (5 min).

**Tabla 16.** Oligonucleótidos utilizados en la REP-PCR.

Gen	Oligonucleótido (secuencia 5' → 3')
REP-1	IIIGCGCCGICATCAGGC
REP-2	ACGTCTTATCAGGCCTAC

Esta técnica de tipificación molecular se caracteriza por su simplicidad (no requiere el uso de enzimas de restricción, ni técnicas electroforéticas especiales), rapidez (menos de 24 horas) y su relativo bajo coste. Los patrones de bandas suelen ser sencillos, como en *Acinetobacter baumannii*, aunque en otros microorganismos, como *E. coli*, la interpretación de los patrones es algo más dificultosa, debido a la proximidad que existe entre algunas bandas y al mayor número de bandas. Esta técnica posee un poder de discriminación y reproducibilidad inferiores a los de la PFGE,

aunque para algunas bacterias, como *A. baumannii*, se ha visto que la REP-PCR presenta un poder de discriminación similar al de la PFGE (Fernández-Cuenca, 2004).

#### 4.2. ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR)

La ERIC-PCR utiliza oligonucleótidos diseñados a partir de secuencias consenso repetitivas intragénicas de enterobacterias (secuencias ERIC) (Fernández-Cuenca, 2004). La amplificación se realizó a partir de ADN total y los oligonucleótidos empleados se muestran en la **Tabla 17**. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: desnaturalización a 95°C (3 min), 35 ciclos de 95°C (30 s), 51°C (1 min) y 72°C (2 min), y una extensión final a 72°C (5 min). La amplificación de secuencias ERIC proporciona patrones de bandas que suelen ser menos complejos que los generados mediante REP-PCR (Fernández-Cuenca, 2004).

**Tabla 17.** Oligonucleótidos utilizados en la ERIC-PCR.

Gen	Oligonucleótido (secuencia 5' → 3')
ERIC 1	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC
ERIC-2	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG

#### 4.3. RFLP-PFGE (Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción Electroforesis en campo pulsante)

La RFLP-PFGE es la técnica de referencia en la caracterización clonal de microorganismos. Posee un elevado poder de discriminación y una excelente reproducibilidad (Van Belkum, 1994). El principal inconveniente de esta técnica de tipificación molecular es que es muy laboriosa y larga, ya que la mayoría de los protocolos requieren más de 4 días para poder obtener y analizar los patrones de

bandas (Fernández-Cuenca, 2004). En este trabajo, se utilizó el método descrito por Gautom (Gautom, 1997), con ligeras modificaciones, que brevemente se describen a continuación.

✓ *Extracción del ADN*

A partir de una resiembra de los aislamientos en el medio de cultivo sólido agar Mueller-Hinton (MH) (*bioMérieux, La Balme Les Grottes, France*) se realizó la extracción del ADN con el siguiente protocolo:

- Se resuspendieron de 3 a 4 colonias en un tubo falcon de pico que contenía 3 mL de tampón de lavado SE [75 mM NaCl (pH 8), 25 mM EDTA (pH 8)].
- A continuación, se centrifugó a 13000 rpm durante 15 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 3 mL de tampón de lavado SE.
- Se repitió la centrifugación, se descartó de nuevo el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 3 mL de tampón de lavado SE.
- Finalmente, se ajustó la concentración celular bacteriana mediante espectrofotómetro, obteniendo un valor de densidad óptica entre 1.4 y 1.5 a una longitud de onda de 600 nm.

✓ *Elaboración de bloques de agarosa*

Para elaborar los bloques de agarosa se tomaron 500 µL de la solución celular bacteriana ajustada a un tubo *ependorf* de 1.5 mL. A continuación, se añadieron 500 µL de agarosa para bloques al 1.2% fundida. Se mezcló muy bien y rápidamente se vertió la mezcla en los moldes. La cantidad de mezcla resultante (1 mL) nos permitió realizar dos bloques por cada muestra. Para facilitar la solidificación de los bloques, se expuso el molde a 4°C durante 10 min.

✓ *Lisis celular*

La lisis celular se llevó a cabo en tubos falcon de 50 mL en los que se añadieron los bloques y a continuación 3 mL del tampón de lisis [50 mM de Tris-HCl (pH 8), 50 mM EDTA (pH 8), 1% Sarkosyl] y 1 mg/mL (150 µL) de proteinasa-K (20 mg/mL) (Promega®). Los tubos se incubaron a 50°C en baño durante aproximadamente 20 horas.

✓ *Lavados de los bloques*

Con el fin de eliminar posibles interferencias tras el proceso de lisis celular, se realizaron 5 lavados de los bloques a temperatura ambiente:

1º Lavado: 3 mL de agua destilada durante 5 min.

2º Lavado: 3 mL de tampón TE [10mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA (pH 8)] durante 5 min.

3º, 4º y 5º Lavado: 3 mL de tampón TE durante 20 min.

En esta etapa era posible detener el procedimiento manteniendo los bloques lavados en tampón TE a 4°C.

✓ *Digestión del ADN con enzima de restricción*

La digestión del ADN se realizó con el enzima de restricción *SpeI* (10U/µL) (Promega®), que es un enzima de baja frecuencia de corte. Para ello, se cortó un fragmento del bloque (aproximadamente medio cm o menos) y se añadió en un tubo *ependorf* de 1.5 mL, que contenía 200 µL del tampón a concentración 1x del enzima de restricción (10 µL BSA, 100 µL de tampón 10x y 890 µL de agua destilada). Se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 min. A continuación, se retiró este

tampón y se añadieron de nuevo 200  $\mu$ L del tampón 1x. Finalmente, se añadieron lentamente 5  $\mu$ L (50U) del enzima *SpeI*. Es importante mantener el enzima en hielo durante todo el proceso. Para mejorar la eficacia de corte del enzima se añadieron en primer lugar 3  $\mu$ L y tras 2 horas y 30 min de incubación el resto.

✓ *Electroforesis en campo pulsante*

Se preparó un gel de agarosa al 1% en tampón TBE (Tris/Borate/EDTA) a una concentración 0.5x. Una vez solidificado, se introdujo en cada pocillo del gel el fragmento de bloque correspondiente. A continuación, se rellenó el espacio libre de cada pocillo con agarosa al 1%. Finalmente, se separaron los fragmentos digeridos por el enzima de restricción usando una unidad de CHEF-DR™ II (*Bio-Rad, Hercules, CA, USA*). Las condiciones electroforéticas fueron las siguientes:

- Temperatura: 14 °C
- Pulsos de tiempo: intervalos desde 2.2 a 54.2 s
- Voltaje: 6 V/cm
- Tiempo: 20 horas

✓ *Tinción del gel y revelado*

Para la tinción de los fragmentos obtenidos, sumergimos el gel en una solución de bromuro de etidio en tampón TBE 0.5x a una concentración de 0.5  $\mu$ g/mL durante 15-20 min, a temperatura ambiente y protegido de la luz. A continuación, se lavó el gel en tampón TBE 0.5x durante 20 min y se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta.



✓ Lectura e interpretación de los resultados

La lectura e interpretación de los patrones de bandas obtenidos se llevó a cabo sobre la fotografía del gel según los criterios definidos por Tenover y colaboradores (Tenover, 1995). Mediante esta técnica se compara la similitud genética de una serie de cepas, de modo que para la interpretación de los resultados comparamos cada cepa con el resto de la serie. Una banda de diferencia se interpreta como relación clonal, dos bandas de diferencia como posiblemente relacionados y un número mayor de tres bandas distintas se interpreta como aislados no relacionados clonalmente.

## 5. Ensayos de conjugación en cepas con determinantes de RPFQs

El ensayo de conjugación permite transferir ADN entre diferentes células. En este trabajo, el objetivo fue comprobar que el determinante de resistencia a ciprofloxacino forma realmente parte de un elemento genético extracromosómico móvil (plásmido) y que por tanto, presenta capacidad de transferencia horizontal desde una cepa portadora del determinante de resistencia (cepa donadora) a otra que no lo presenta (cepa receptora).

### 5.1. Material específico

El material específico necesario para realizar este ensayo fue el siguiente:

- ✓ Cepas seleccionadas a estudio (cepas donadoras) y la cepa receptora *E. coli* J53 Az<sup>R</sup>, resistente a azida sódica (Az<sup>R</sup>).
- ✓ Tubos con caldo MH y solución agar MH autoclavados.

- ✓ Placas de agar MH preparadas manualmente con una concentración de 100 mg/L de azida sódica (Sigma-Aldrich Co.) y 0.5 mg/L de ciprofloxacino (Ciprofloxacino Normon 2 mg/mL, solución inyectable vía intravenosa).
- ✓ Stericup® Filter MILLIPORE Express™ PLUS 0.22 µm y bomba de vacío.
- ✓ Paneles de identificación y microdilución MIC Gram negativos del sistema WIDER (Francisco Soria Melguizo, S.A.).

### 5.2. Descripción de la cepa receptora *E. coli* J53 Az<sup>R</sup>

La cepa receptora utilizada para los ensayos de conjugación, *E. coli* J53 Az<sup>R</sup>, se emplea también habitualmente en otros trabajos relacionados con estudios de conjugación (Jacoby, 1996). Esta cepa presenta un perfil bioquímico determinado en cuanto a la acidificación de carbohidratos en los paneles WIDER utilizados en la identificación de la misma. Acidifica sorbitol, rhamnosa, arabinosa y melódiosa pero no presenta actividad frente a rafinosa, inositol, adonitol y sacarosa. Requiere metionina y prolina. Es sensible a todos los antimicrobianos analizados por este sistema, excepto a azida sódica (CMI= 250 µg/mL).

### 5.3. Procedimiento

Para llevar a cabo el ensayo, se inoculó una colonia de cada una de las cepas donadoras y otra colonia de la cepa receptora de forma independiente en tubos que contenían 8 mL de caldo MH. Se mantuvieron a 37°C toda la noche con agitación suave. Al día siguiente, se inocularon, en tubos con 8 mL de caldo, ambas suspensiones en una proporción 1:10 (donadora/receptora) y se incubaron a 37°C sin agitación. Tras 24 horas, se filtró la mezcla utilizando los soportes *Millipore* conectándolos a una bomba de vacío. Inmediatamente, la membrana se retiró y se incubó sobre una placa

de agar Chocolate-PolyViteX (*bioMérieux, La Balme Les Grottes, France*) a 37°C toda la noche. Tras la incubación pertinente, se introdujo la membrana en un tubo falcon cónico de 50 mL de volumen que contenía 8 mL de caldo. Se agitó vigorosamente para desprender todas las UFC de la superficie del filtro y se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min.

Para seleccionar las cepas receptoras que habían adquirido el plásmido que confiere resistencia a ciprofloxacino se sembró el sedimento resultante en placas de agar MH (*bioMérieux, La Balme Les Grottes, France*) que contenían azida sódica y ciprofloxacino, preparadas previamente de forma manual. Se incubaron a 37°C hasta 48 horas. Las colonias que crecían en este medio selectivo se resembraron a una placa de agar Mac Conkey (*bioMérieux, La Balme Les Grottes, France*) y se incubaron a 37°C toda la noche. A la mañana siguiente, se identificarían dichas colonias utilizando los paneles WIDER, comprobando que el perfil bioquímico pertenece a la cepa receptora *E. coli* J53 Az<sup>R</sup> y que el perfil de sensibilidad antibiótica corresponde a una cepa resistente a ciprofloxacino y, por supuesto, a azida sódica.

## 6. Entorno genético de cepas con determinantes de RPFQs

### 6.1. Detección de *ISEcp1*

*ISEcp1* es una secuencia de inserción asociada con frecuencia con las BLEE tipo CTX-M que es capaz de movilizar estos genes a través de un proceso especial de transposición. Recientemente, se ha descrito la presencia de la transposasa *ISEcp1C* en el extremo 3' de cepas portadoras de *qnr*, concretamente de *qnrB19* (*Richter, 2010*), sugiriendo su implicación en la movilidad de estos genes de modo similar a los de BLEE. En este trabajo investigamos la presencia de *ISEcp1* en todos los aislamientos con

determinantes de RPFQ mediante PCR a partir de ADN total. Los resultados positivos fueron confirmados por secuenciación y la determinación de la variante concreta mediante el uso de la herramienta informática BLAST. Los oligonucleótidos utilizados (Richter, 2010) se muestran en la **Tabla 18** y las condiciones de PCR fueron: desnaturalización a 95°C (5 min), 30 ciclos de 95°C (30 s), 58°C (30 s) y 72°C (1 min), y una extensión final a 72°C (5 min).

**Tabla 18.** Oligonucleótidos utilizados para la detección de *ISEcp1* (Richter, 2010).

Gen	Oligonucleótido (secuencia 5' → 3')
<i>ISEcp1-F</i>	CGACATGGCGGTGGGTCATC
<i>ISEcp1-R</i>	CTGCTTGTCACACATTGTAAC

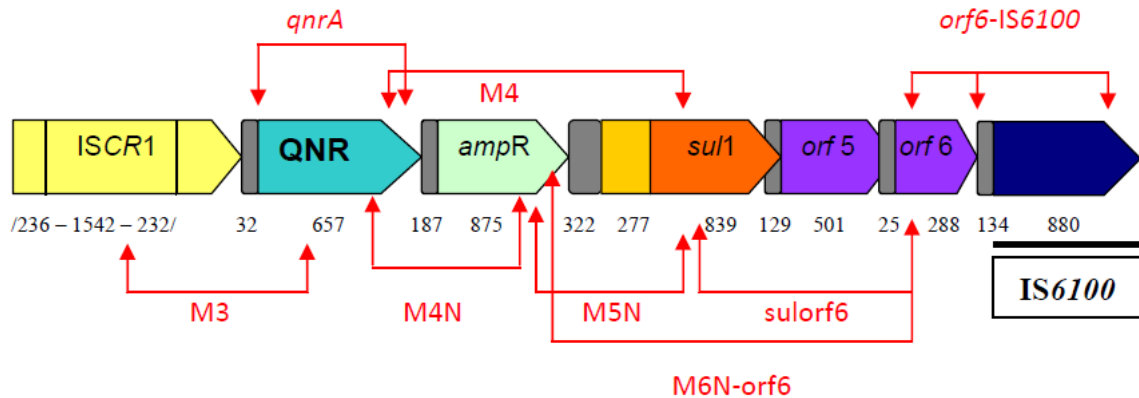
## 6.2. Entorno genético de *qnr*

Para determinar la localización genética del gen *qnrA1* estudiamos la cepa 305, *E. cloacae* productora de BLEE CTX-M-9, sin mutaciones en la QRDR de ADN-girasa y topoisomerasa IV y sensible a ácido nalidixico y ciprofloxacino. Tomando como base la descripción del entorno genético de *qnr* en In36 y In37 (Wang, 2003), se utilizaron una serie de oligonucleótidos cuya combinación podía cubrir las regiones adyacentes al determinante de *qnr* y de la BLEE acompañante. Se utilizó una estrategia de *gene-walking* para el análisis de los resultados puesto que las parejas de oligonucleótidos utilizadas generan amplificadas solapados, que permiten conocer posteriormente mediante secuenciación, la continuidad entre unos y otros genes dentro del elemento genético. En la **Tabla 19** se muestran estos oligonucleótidos y en la **Figura 41** la representación esquemática de los puntos de unión sobre estos genes próximos. Dado que el gen *qnr* se localiza habitualmente en integrones de clase 1, los oligonucleótidos utilizados para el primer segmento 3'CS se muestran en dicha tabla. Las condiciones de

PCR fueron las siguientes: desnaturalización a 95°C (5 min), 30 ciclos de 95°C (30 s), 58°C (30 s) y 72°C (1 min), y una extensión final a 72°C (5 min).

**Tabla 19.** Oligonucleótidos utilizados en primer lugar para el estudio del entorno genético de las 3 cepas con determinantes de RPFQs. Se muestra la pareja de oligonucleótidos usada en la detección de *qnrA* (estudio entorno genético cepa 305) (Modificada de Fernández, 2010).

Fragmento amplificado	Oligonucleótidos (secuencia 5' → 3')		Tamaño amplificado aproximado (pb)
<i>qnrA</i>	<i>qnrA</i> -F	GATAAAGTTTTTCAGCAAGAG G: posición 13/657 de <i>qnr</i>	516
	<i>qnrA</i> -R	TAACCTTTGCCGATCTGGAT T: posición 536/657 de <i>qnr</i>	
M3	M3-F	GTGAGCTGCCACCAGA G: posición 1466/1542 de <i>ISCR1</i>	720
	M3-R	CAGGTTGCAACCTGAGA C: posición 372/657 de <i>qnr</i>	
M4	M4-F	AGATCTGTGCCTGGCAA A: posición 593/657 de <i>qnr</i>	2000
	M4-R	GAAACACGGTGCATCTGA G: posición 237/840 de <i>sul1</i>	
M4N	M4N-F	AGATCTGTGCCTGGCAA A: posición 593/657 de <i>qnr</i>	1100
	M4N-R	CCGCCGTATTCAGCA C: posición 868/876 de <i>ampR</i>	
M5N	M5N-F	GTCAGGCGCACTGGTA G: posición 741/876 de <i>ampR</i>	850
	M5N-R	GGTCCGACATCCACGA G: posición 137/840 de <i>sul1</i>	
M6N- <i>orf6</i>	M6N-F	GCGGTTACAGTCCCGTA G: posición 876/801 de <i>ampR</i>	2200
	<i>sulorf6</i> -R	GGTCGGACTGCAAGTGA G: posición 50/288 de <i>orf6</i>	
<i>sulorf6</i>	<i>sulorf6</i> -F	CGGAAACCTCGCGAA C: posición 779/840 de <i>sul1</i>	750
	<i>sulorf6</i> -R	GGTCGGACTGCAAGTGA G: posición 50/288 de <i>orf6</i>	
IS6100	IS6100-F	ACCAGTTGATTGGGCGTA A: posición +35 tras final de <i>orf6</i>	
	IS6100-R	CGAAATGGTGGTTGAGCA C: posición 812/880 de IS6100	
<i>orf6</i> -IS6100	<i>orf6</i> -F	TCCATCATCAACCCTGGA T: posición 93/288 de <i>orf6</i>	
	IS6100-R	CGAAATGGTGGTTGAGCA C: posición 812/880 de IS6100	



**Figura 41.** Representación esquemática de la región correspondiente a *qnr* en un integrón compuesto de clase 1. En rojo, los nombres de los oligonucleótidos. Las flechas indican de forma aproximada los puntos de anclaje. Depositada en GenBank, *accession* AF174129 (Fernández, 2010).

Se estudió también la localización genética del gen *qnrB2* en la cepa 142, *E. coli* no productora de BLEE, con una única mutación en la QRDR de la subunidad *gyrA* de la ADN-girasa, resistente a ácido nalídixico y sensible a ciprofloxacino aunque con una CMI de 1 mg/L. Dado que el entorno genético próximo a cada tipo de gen *qnr* es bastante similar entre ellos (Strailivitz, 2009) utilizamos las mismas parejas de oligonucleótidos y las mismas condiciones de PCR que para la cepa 305 *qnrA1*-positiva, exceptuando el uso en este caso de la pareja de oligonucleótidos correspondientes al gen *qnrB* (Tabla 13).

## 7. Selección de mutantes resistentes en cepas con determinantes de RPFQs

La presencia de mecanismos plasmídicos de resistencia a fluoroquinolonas podría influir de forma similar a la existencia de mutaciones cromosómicas en la QRDR, condicionando resistencia a quinolonas de nivel medio/bajo y pudiendo facilitar la selección de mutantes con altos niveles de resistencia a las mismas. En este trabajo, el objetivo fue comprobar si la presencia de estos mecanismos plasmídicos de resistencia

a fluoroquinolonas puede influir en la selección de resistencias cromosómicas de alto nivel en aislamientos carentes inicialmente de mutaciones en las topoisomerasas.

### 7.1. Procedimiento

Se tomaron 10 aislamientos de las diferentes especies de enterobacterias portadoras de cada uno de los determinantes de RPFQs (cepas 2, 14, 52, 95, 273, 290, 305, 309 y 329) y en un caso de combinaciones de los mismos (cepa 170), todos ellos sensibles a ácido nalidíxico y ciprofloxacino y libres de mutaciones en las topoisomerasas. No obstante, incluimos también en el ensayo un aislamiento con una mutación única en *gyrA* (cepa 142) resistente a ácido nalidíxico y con una CMI a ciprofloxacino de 1 mg/L con objeto de observar posibles diferencias en el proceso de selección de mutantes.

Los aislamientos fueron sometidos a selección de mutantes resistentes mediante pases a placas de agar MH preparadas manualmente con concentraciones de ciprofloxacino (Ciprofloxacino Normon 2 mg/mL, solución inyectable vía intravenosa) a partir de 4, 8 y 16 veces su CMI original (4xCMI, 8xCMI y 16xCMI, respectivamente) en una primera etapa. Se determinó la CMI a ciprofloxacino mediante Etest (*AB Biodisk, Solna, Sweden*) en las colonias crecidas en las placas con una o varias de estas concentraciones de antibiótico. Tras la confirmación del incremento en la CMI correspondiente, las cepas mutantes se enfrentaron nuevamente a concentraciones de ciprofloxacino a 4xCMI, 8xCMI y 16xCMI en este caso calculada a partir de la CMI obtenida en la etapa anterior. Las placas de agar MH con las diferentes concentraciones de ciprofloxacino se elaboraron manualmente de la misma manera que en la primera etapa.

En todos los casos se realizó de una suspensión de una colonia de la cepa original en caldo MH sin antibiótico. Tras 24 horas de incubación a 37°C se ajustó dicha concentración a aproximadamente un 4 de turbidez en la escala McFarland para obtener una concentración equivalente a  $10^9$ - $10^{10}$  bacterias/mL. Una vez ajustada la suspensión, se realizó una dilución 1:10000 en agua. A continuación, se sembró 1  $\mu$ L de la suspensión ajustada en una placa de agar MH sin antibiótico y 1 mL en las placas de agar MH preparadas con las diferentes concentraciones de ciprofloxacino. Se incubaron a 37°C hasta 48 y 72 horas en la primera y segunda etapa, respectivamente. Tras el periodo de incubación pertinente en cada caso, se realizó el recuento de las colonias mutantes seleccionadas con ciprofloxacino.

### *7.2. Interpretación de resultados*

El estudio se realizó en dos etapas (mutantes de primer escalón y de segundo escalón), hasta no obtener mutantes resistentes viables en los pases realizados. Los mutantes verdaderos se definieron como aquellos en los que la CMI de ciprofloxacino (antibiótico con el que se seleccionaron las cepas mutantes) aumentó al menos 4 veces con respecto a la cepa original. La frecuencia de selección de mutantes se calculó para cada aislamiento como la razón entre el número de colonias de las placas de agar MH que contienen 4xCMI, 8xCMI y en su caso 16xCMI de ciprofloxacino y el número de colonias del inóculo original crecidas en agar MH sin antibiótico. También se determinó para cada cepa mutante el perfil y nivel de resistencia alcanzados mediante la determinación de la CMI a ciprofloxacino y ofloxacino mediante Etest (*AB Biodisk, Solna, Sweden*).



## 8. Estudio de mutaciones de topoisomerasas en los mutantes seleccionados

En los mutantes seleccionados se estudió el posible mecanismo de resistencia a ciprofloxacino. Se determinaron posibles mutaciones en topoisomerasas asociadas a esta resistencia mediante PCR y secuenciación con oligonucleótidos específicos para *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE* (**Tabla 15**) según el protocolo realizado en el apartado 7.



---

## V. RESULTADOS



---

## 1. Descripción de los aislamientos clínicos

### 1.1. Aislamientos clínicos

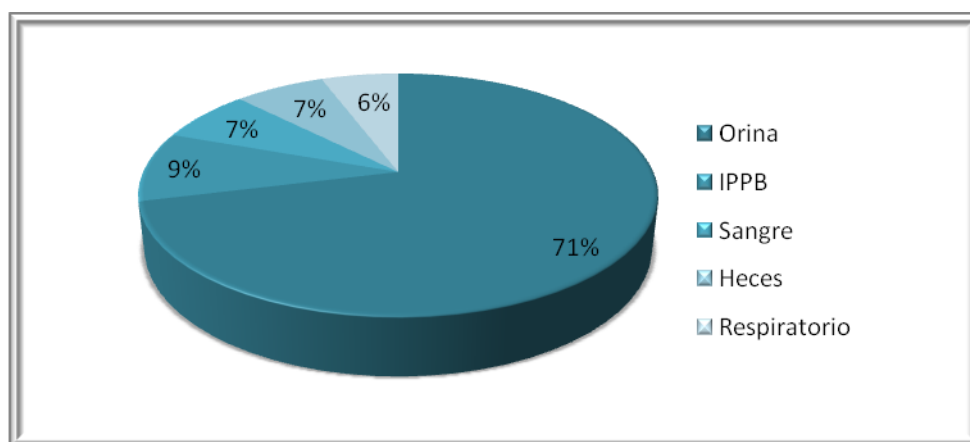
Se estudiaron un total de 312 aislamientos de enterobacterias no duplicados, procedentes de muestras clínicas recibidas en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca (Murcia) durante un período de 2 meses. Un 56.7% de los aislamientos procedían de pacientes intrahospitalarios. El 62.8% (116/312) de los pacientes eran mujeres y el 78.2% (230/294) era población adulta. La mediana de edad de la población adulta y pediátrica fue 67 años [rango: 11 – 98 años] y 11.5 meses [rango: 8 días (0.26 meses) – 10 años (120 meses)], respectivamente.

### 1.2. Procedencia e identificación de los aislamientos clínicos

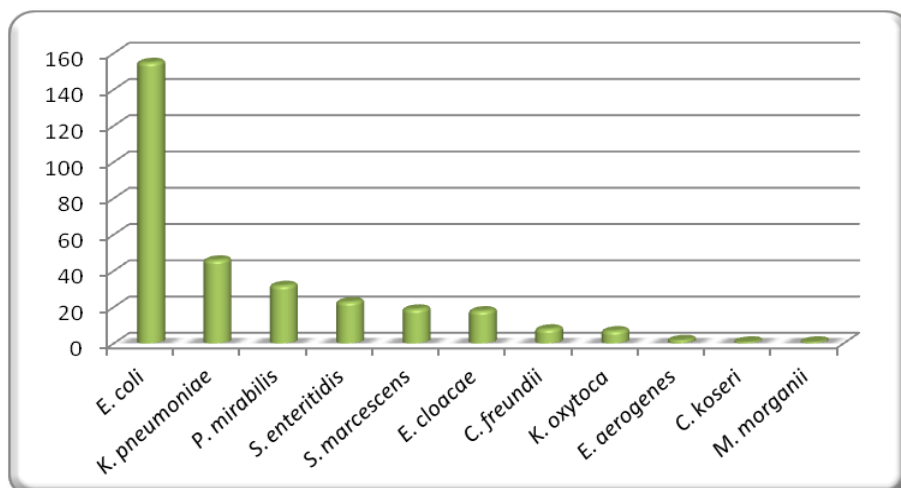
La mayoría de los aislamientos clínicos procedían de muestras de orina (221/312, 71%) seguido, en orden decreciente, de muestras de infecciones de piel y partes blandas (IPPB) (29/312), de sangre (22/312), de heces (21/312) y de muestras respiratorias (18/312) (**Figura 42**).

Se identificaron 11 especies de enterobacterias diferentes (**Figura 43**), siendo la más prevalente *Escherichia coli* que representó el 49.7% del total de aislamientos, seguida de las siguientes especies, por orden decreciente en frecuencia: *Klebsiella pneumoniae* (14.7%), *Proteus mirabilis* (10.2%), *Salmonella enteritidis* (7.4%), *Serratia marcescens* (6.1%), *Enterobacter cloacae* (5.8%), *Citrobacter freundii* (2.6%), *Klebsiella oxytoca* (2.2%), *Enterobacter aerogenes* (0.6%), *Citrobacter koseri* (0.3%) y *Morganella morganii* (0.3%).

El origen de las diferentes especies aisladas del estudio se refleja en la **Tabla 20**. Un 87%, 74% y 81% de las cepas de *E. coli*, *K. pneumoniae* y *P. mirabilis*, respectivamente, se aislaron de muestras de orina. La mitad de los aislamientos de *S. marcescens* procedían de muestras respiratorias y un 91% (21/23) de las cepas de *S. enteritidis* se aislaron de muestras de heces. Las otras dos procedían de muestras de sangre y de IPPB.



**Figura 42.** Procedencia de los aislamientos clínicos. IPPB: infección de piel y partes blandas, Respiratorio: muestras relacionadas con infecciones respiratorias de vías altas y bajas.



**Figura 43.** Distribución por especies de los aislamientos clínicos.

**Tabla 20.** Distribución de la procedencia de las cepas clínicas según especie.

	Orina	IPPB	Sangre	Heces	Respiratorio	Total
<i>E. coli</i>	135	11	5	0	4	155
<i>K. pneumoniae</i>	34	7	3	0	2	46
<i>P. mirabilis</i>	26	2	3	0	1	32
<i>S. enteritidis</i>	0	1	1	21	0	23
<i>S. marcescens</i>	2	4	3	0	10	19
<i>E. cloacae</i>	10	4	4	0	0	18
<i>C. freundii</i>	5	0	2	0	1	8
<i>K. oxytoca</i>	6	0	1	0	0	7
<i>E. aerogenes</i>	2	0	0	0	0	2
<i>C. koseri</i>	1	0	0	0	0	1
<i>M. morgani</i>	1	0	0	0	0	1
<b>Total</b>	<b>222</b>	<b>29</b>	<b>22</b>	<b>21</b>	<b>18</b>	<b>312</b>

### 1.3. Sensibilidad antibiótica global

Se estudió la actividad de diferentes antibióticos frente a todos los aislamientos clínicos incluidos en el estudio (**Tabla 21**).

Los antibióticos más activos frente a todas las especies estudiadas fueron amikacina e imipenem, en los que la sensibilidad fue del 100% independientemente de la especie.

En los aislamientos de *E. coli* el porcentaje de resistencia a diferentes antibióticos fue elevado, especialmente en las cepas productoras de BLEEs pero se debe considerar que, tal y como se comenta en el apartado de material y métodos, los aislamientos se seleccionaron de forma aleatoria, de modo que los porcentajes de

---

resistencia obtenidos pueden no representar a los globales reales. En el caso de las cefalosporinas de tercera generación, se observó un porcentaje considerablemente alto de resistencia, dado que un 18% de los aislamientos fueron resistentes a cefotaxima. Este elevado porcentaje de resistencia se debió a la producción de BLEEs (28/155 de cepas de *E. coli*) puesto que no se detectó la presencia de ningún otro mecanismo de resistencia como la hiperproducción de AmpC en estos aislamientos. Respecto a la actividad de los aminoglucósidos en esta especie, destacó una tasa de resistencia a tobramicina muy elevada (17.4%), siendo para gentamicina menor (6.5%). En general, entre el total de enterobacterias estudiadas se observó un porcentaje global elevado de resistencia para gentamicina (10.6%), aunque esta resistencia aparecía exclusivamente en las especies de *E. coli*, *K. pneumoniae* y *P. mirabilis*.

En cuanto a la actividad de quinolonas, cabe destacar que el 41% (129/312) de las cepas fueron resistentes a ácido nalidíxico y de éstas, según el método utilizado para estudiar la sensibilidad antibiótica (sistema automatizado *Vitek 2*, *bioMérieux*, *La Balme Les Grottes*, *France*), el 23.2% (30/129) fueron sensibles a ciprofloxacino, el 10% (13/129) presentaron sensibilidad intermedia y la mayoría, un 66% (86/129), fueron resistentes a ciprofloxacino. Es importante señalar que el sistema automatizado sólo detectó resistencia a ciprofloxacino en las especies de *E. coli*, *K. pneumoniae* y *P. mirabilis*, siendo la tasa de resistencia global a este antibiótico de 27.6% (86/312). En el resto de especies como *S. enteritidis*, *S. marcescens* y *C. freundii*, a pesar de existir resistencia a ácido nalidíxico, no se detectó resistencia a ciprofloxacino en ningún aislamiento. Finalmente, comentar que en los aislamientos de *E. cloacae* y de otras especies con escaso número de aislamientos estudiados (*K. oxytoca*, *E. aerogenes*, *C. koseri* y *M. morgani*) no se encontró resistencia a ácido nalidíxico.

En el resto de especies estudiadas, en su mayoría, las resistencias encontradas fueron las correspondientes a sus fenotipos de resistencias intrínsecas, es decir, en el



---

caso de *Klebsiella* spp., el 100% resistentes a ampicilina, y *Enterobacter* spp., *C. freundii*, y *S. marcescens*, el 100% resistentes a ampicilina, amoxicilina/clavulánico y cefoxitina y cefuroxima.

Dentro de los aislamientos de *K. pneumoniae*, es de destacar el elevado porcentaje de resistencia a cefotaxima, con un 15% de las cepas resistentes, estando representado este dato por las cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEEs (7/46). En esta especie también se observó un porcentaje de resistencia elevado a gentamicina (6.5%).

## 2. Prevalencia y descripción de determinantes de RPFQs

### 2.1. Prevalencia global de determinantes de RPFQs

Del total de los 312 aislamientos de enterobacterias estudiados, 20 presentaron algún determinante de RPFQs, siendo, por tanto, la prevalencia global de los mecanismos plasmídicos de resistencia a fluoroquinolonas del 6.4%. Al estudiar la distribución por especie, se observó que estos determinantes se detectaron en el 5.8% del total de cepas de *E. coli* (9/155), en un 10.8% 5 de *K. pneumoniae* (5/46), en un 25% de *C. freundii* (2/8), en un 16.7% de *E. cloacae* (3/18) y en un 4.3% de *S. enteritidis* (1/23).

El 65% (13/20) de los cepas portadoras de genes de RPFQs procedían de pacientes intrahospitalarios. En el estudio de la distribución por procedencia, se observó que el 65% (13/20) de los aislamientos se aislaron de muestras de orina, el 20% (4/20) de sangre, el 10% (2/20) de muestras de IPPB y el 5% (1/20) de heces.

**Tabla 21.** Porcentaje (%) de cepas resistentes a diferentes antibióticos según especie. AMP: ampicilina; AMC: amoxicilina/ácido clavulánico; FOX: cefoxitina; AN: ácido nalidíxico; CIP: ciprofloxacino; CTX: cefotaxima; GM: gentamicina; TOB: tobramicina; AK: amikacina; IPM: imipenem

Especie	N	AMP	AMC	FOX	AN	CIP	CTX	GM	TOB	AK	IPM
<i>E. coli</i>	155	73	8.4	6.5	63	24	19	6.5	17.4	0	0
<i>K. pneumoniae</i>	46	100^	4.3	6.5	15	8.7	15	6.5	2.4	0	0
<i>P. mirabilis</i>	32	43.8	6.3	3.2	43.8	18.8	6.2	9.4	0	0	0
<i>S. enteritidis</i>	23	52.2	17.4	ND	13	0	0	ND	ND	ND	ND
<i>S. marcescens</i>	19	100^	100^	0	21	0	0	0	0	0	0
<i>E. cloacae</i>	18	100^	100^	100^	0	0	22.2	0	0	0	0
<i>C. freundii</i>	8	100^	100^	100^	25	0	0	0	0	0	0
<i>K. oxytoca</i>	7	100^	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. aerogenes</i>	2	100^	100^	100^	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. koseri</i> *	1	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>M. morgani</i> *	1	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>TOTAL</b>	<b>312</b>	<b>71.7</b>	<b>8.3</b>	<b>6.2</b>	<b>41</b>	<b>27.6</b>	<b>14.3</b>	<b>10.6</b>	<b>3.5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

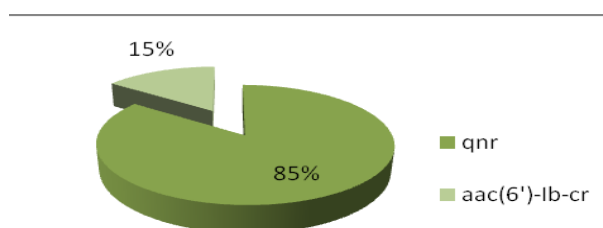
ND: no determinado

\*Datos relativos a una única cepa

^Resistencia intrínseca

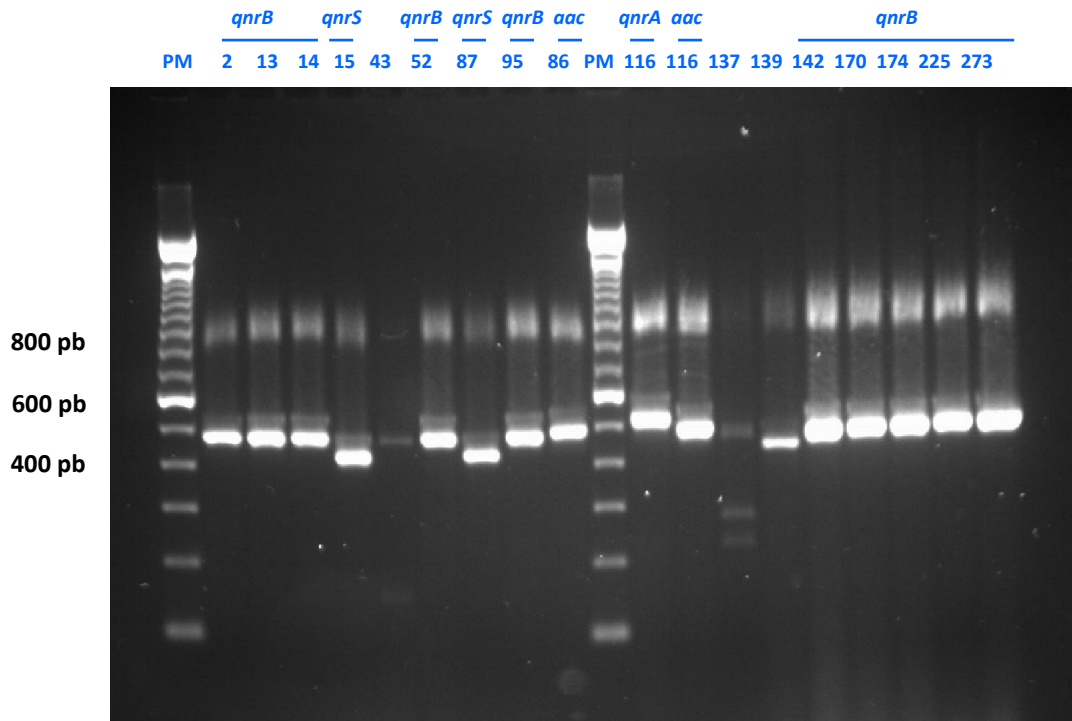
## 2.2. Caracterización de los mecanismos plasmídicos de resistencia a fluoroquinolonas

De los tres diferentes mecanismos de RPFQs estudiados en los aislamientos de este trabajo, se detectaron dos: los determinantes *qnr* y la enzima *aac(6')-Ib-cr*. No se amplificó el gen que codifica la bomba de expulsión *qepA* en ningún aislamiento. Un 85% (17/20) de los aislamientos presentaron determinantes *qnr* y en los 3 aislamientos restantes se observó el gen *aac(6')-Ib-cr* (**Figura 44**). Además, se detectó coexistencia de ambos tipos de mecanismos de RPFQs en 4 cepas (20%).



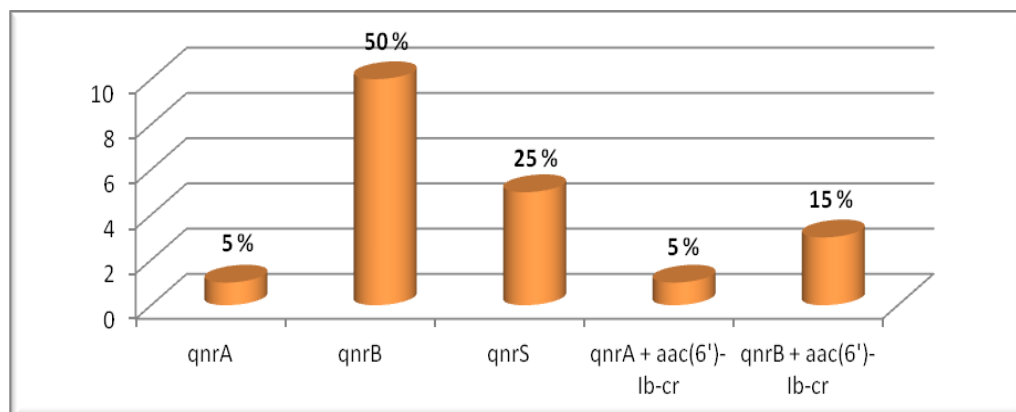
**Figura 44.** Descripción global de los determinantes RPFQs detectados.

En la **Figura 45** se muestra el resultado de la electroforesis de los productos amplificados de algunos aislamientos del estudio. De forma preliminar, en función del tamaño de la banda del producto amplificado (516 pb para *qnrA*, 476 pb para *qnrB*, 428 pb para *qnrS* y 482 pb para *aac(6')-Ib-cr*) se clasificaron en un grupo específico de determinante de RPFQs.



**Figura 45.** Electroforesis del producto amplificado en algunos aislamientos con RPFQs (*aac*: *aac(6′)-Ib-cr*). Calle 1 y 11: peso molecular (PM). En las calles 6, 14 y 15, tras secuenciación se comprobó que el amplificado obtenido no correspondió a ninguno de los genes estudiados.

El mecanismo plasmídico más frecuentemente detectado fue el gen *qnrB* amplificado en un 50% (10/20) de los aislamientos (**Figura 46**). Un 35% (7/20) presentaron el gen *aac(6′)-Ib-cr*, un 25% (5/20) portaban genes *qnrS* y en un 10% (2/20) se amplificó el gen *qnrA*. No se detectaron genes *qnrC*. En tres cepas se detectaron genes *qnrB* + *aac(6′)-Ib-cr* y en un aislamiento el gen *qnrA* + *aac(6′)-Ib-cr*.



**Figura 46.** Prevalencia de los distintos determinantes de RPFQ y sus combinaciones.

### 2.3. Determinación de los alelos específicos de los determinantes de RPFQs

Los amplificadores obtenidos de cada determinante de RPFQs fueron secuenciados y analizados utilizando la base de datos BLAST. Todos los genes *qnrA* y *qnrS* fueron compatibles con el alelo *qnrA1* y *qnrS1*, respectivamente. En el 50% de los genes *qnrB* (correspondientes a las cepas número 2, 13, 52, 170 y 273) fue necesario diseñar oligonucleótidos específicos para determinar el alelo concreto (ver **Tabla 13** de material y métodos), permitiendo analizar una secuencia aminoacídica mayor. En la **Tabla 22** se muestran para estos aislamientos los diferentes tipos posibles de *qnrB* obtenidos por comparación con las secuencias depositadas en la base de datos BLAST con un 99% de identidad, los aminoácidos correspondientes a los codones clave para diferenciar entre dichos alelos similares (datos obtenidos de las tablas Lahey, ver material y métodos), así como en color rojo el alelo definitivo de los aislamientos tras el análisis correspondiente de la secuencia.

Una vez finalizada la identificación de todos los alelos de los aislamientos que presentaban genes *qnrB*, se observó una heterogeneidad considerable en la distribución de los mismos. Se encontraron seis alelos *qnrB* distintos, siendo los

mayoritarios *qnrB2* (3/10), *qnrB1* (2/10) y *qnrB27* (2/10). El resto de alelos fueron *qnrB6*, *qnrB9* y *qnrB19*, presentes en sólo un aislamiento en cada caso. Los 3 aislamientos que presentaron coexistencia de *qnrB* y *aac(6′)-Ib-cr* fueron en dos casos *qnrB1* + *aac(6′)-Ib-cr*, y en el tercero fue *qnrB6* + *aac(6′)-Ib-cr*. En la **Tabla 23** se muestran todos los determinantes específicos de RPFQs obtenidos en el estudio, sus combinaciones así como la especie.

**Tabla 22.** Descripción de los codones y sus correspondientes aminoácidos claves para diferenciar los diferentes alelos de QnrB. En color rojo se muestra el alelo definitivo de los aislamientos tras el análisis correspondiente de la secuencia.

		Codon 37	Codon 79			Codon 212
Cepa 2 Cepa 52	<b>QnrB27</b>	<b>Glicina</b>	<b>Alanina</b>	Cepa 13 Cepa 170	<b>QnrB1</b>	<b>Valina</b>
	QnrB33	Serina	Alanina		QnrB42	Isoleucina
	QnrB28	Glicina	Valina			
				Codon 198	Codon 212	
		Cepa 273	<b>QnrB19</b>	<b>Serina</b>	<b>Valina</b>	
			QnrB5	Serina	Isoleucina	
			QnrB10	Asparagina	Valina	

#### 2.4. Distribución de los determinantes de RPFQs por especie

Analizando la presencia de los diferentes determinantes de RPFQs en las diferentes especies de enterobacterias estudiadas se encontraron algunas diferencias (**Figura 47**). La más significativa fue que todos los aislamientos (4/20) que presentaron

**Tabla 23.** Características de los aislamientos con determinantes de RPFQs del estudio (WT: *wildtype*, cepa salvaje; BLEE: beta-lactamasa de espectro extendido; AN: ácido nalidíxico; CIP: ciprofloxacino; CTX: cefotaxima; GM: gentamicina; TOB: tobramicina; AK: amikacina; NA: no aplica).

Cepa	Especie	Genes RPFQs	<i>gyrA</i>	<i>gyrB</i>	<i>parC</i>	<i>parE</i>	BLEE	AN	CIP	CTX	GM	TOB	AK
2	<i>C. freundii</i>	<i>qnrB27</i>	WT	WT	WT	WT		4	0.12	S	S	S	S
13	<i>K. pneumoniae</i>	<i>qnrB1 + aac(6')-Ib-cr</i>	WT	WT	WT	WT	CTX-M-15	≥32	≥32	R	R	I	S
14	<i>C. freundii</i>	<i>qnrB9</i>	WT	WT	WT	WT		8	0.25	S	S	S	S
15	<i>E. coli</i>	<i>qnrS1</i>	S83L	WT	E84K	WT	CTX-M-1	≥32	≥32	R	S	S	S
52	<i>E. cloacae</i>	<i>qnrB27</i>	WT	WT	WT	WT		≤2	0.01	S	S	S	S
86	<i>E. coli</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	S83L, D87N	WT	S80I	S458A	CTX-M-15	≥32	≥32	R	R	R	S
87	<i>E. coli</i>	<i>qnrS1</i>	S83L, D87N	WT	S80I	L416F	CTX-M-14	≥32	≥32	R	S	S	S
95	<i>K. pneumoniae</i>	<i>qnrB2</i>	WT	WT	WT	WT		16	0.5	S	S	S	S
114	<i>E. coli</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	S83L, D87N	WT	S80I, E84V	I529L	CTX-M-15	≥32	≥32	R	S	R	S
116	<i>K. pneumoniae</i>	<i>qnrA1 + aac(6')-Ib-cr</i>	S83I	WT	S80I	WT	CTX-M-9	≥32	≥32	R	R	R	S

**Tabla 23.** Características de los aislamientos con determinantes de RPFQs del estudio (WT: *wildtype*, cepa salvaje; BLEE: beta-lactamasa de espectro extendido; AN: ácido nalidíxico; CIP: ciprofloxacino; CTX: cefotaxima; GM: gentamicina; TOB: tobramicina; AK: amikacina; NA: no aplica) (Continuación).

Cepa	Especie	Genes RPFQs	<i>gyrA</i>	<i>gyrB</i>	<i>parC</i>	<i>parE</i>	BLEE	AN	CIP	CTX	GM	TOB	AK
142	<i>E. coli</i>	<i>qnrB2</i>	S83L	WT	WT	WT		≥32	1	S	R	I	S
168	<i>E. coli</i>	<i>aac(6′)-Ib-cr</i>	S83L, D87N	WT	S80I, E84V	I529L	CTX-M-15	≥32	≥32	R	S	R	S
170	<i>K. pneumoniae</i>	<i>qnrB1 + aac(6′)-Ib-cr</i>	WT	WT	WT	WT	CTX-M-15	16	4	R	S	I	S
174	<i>E. coli</i>	<i>qnrB2</i>	S83L, D87N	WT	S80I, E84V	I529L		≥32	≥32	S	S	S	S
225	<i>K. pneumoniae</i>	<i>qnrB6 + aac(6′)-Ib-cr</i>	S83F, D87A	WT	WT	WT	SHV-2	≥32	≥32	R	R	I	S
273	<i>E. coli</i>	<i>qnrB19</i>	WT	WT	WT	WT		8	0.5	S	S	S	S
290	<i>E. coli</i>	<i>qnrS1</i>	WT	WT	WT	WT		16	0.5	S	S	S	S
305	<i>E. cloacae</i>	<i>qnrA1</i>	WT	WT	WT	WT	CTX-M-9	16	0.03	R	S	S	S
309	<i>S. enteritidis</i>	<i>qnrS1</i>	WT	WT	WT	WT		16	1	S	NA	NA	NA
329	<i>E. cloacae</i>	<i>qnrS1</i>	WT	WT	WT	WT		16	1	R	S	S	S



dos determinantes de RPFQs, *qnrA* o *qnrB* junto con el gen *aac(6')-Ib-cr*, pertenecían a la especie *K. pneumoniae*. Tan sólo una cepa de esta especie, de las 5 con genes de RPFQs, presentó *qnrB* aislado. En los 9 aislamientos de *E. coli*, se observó una distribución homogénea de todos los determinantes de RPFQ: 3 cepas presentaron *qnrB*, 3 *qnrS* y 3 *aac(6')-Ib-cr*. Resaltar que en esta especie, a diferencia de *K. pneumoniae*, el gen *aac(6')-Ib-cr* se detectó como único determinante plasmídico sin asociación a *qnr*. En el resto de especies de enterobacterias, no se amplificó el gen *aac(6')-Ib-cr*. En *E. cloacae*, se detectaron tres tipos de determinantes *qnr* (*qnrA*, *qnrB* y *qnrS*) mientras que en *C. freundii* sólo se encontró el gen *qnrB*. El único aislamiento de *S. enteritidis* portador de determinantes de RPFQs, presentó el gen *qnrS*.

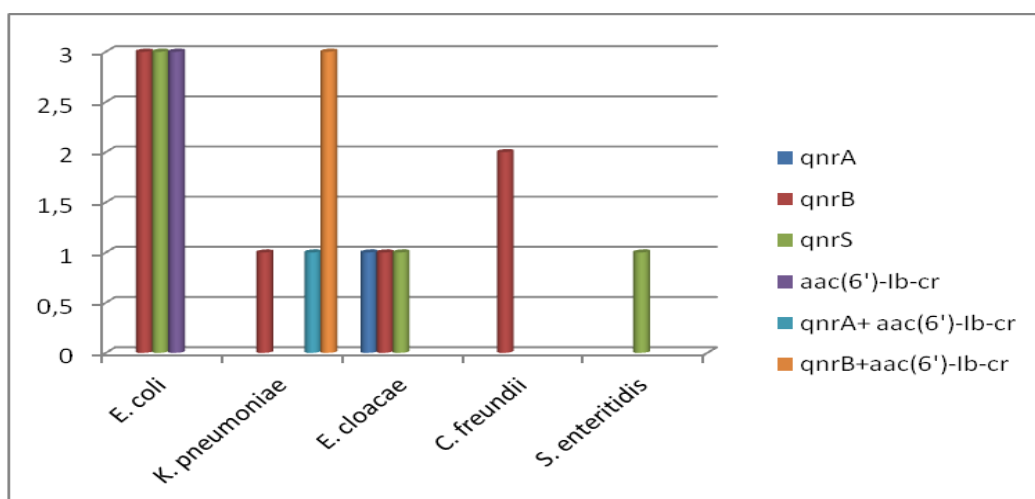


Figura 47. Distribución de los determinantes de RPFQs por especie.

### 3. Prevalencia y caracterización de BLEEs

#### 3.1. Prevalencia y caracterización global de BLEEs

Del total de 312 aislamientos clínicos del estudio, 37 (11.8%) fueron productores de BLEEs (28 *E. coli*, 7 *K. pneumoniae*, un aislamiento de *S. enteritidis* y

otro de *E. cloacae*). La caracterización del tipo de BLEE se realizó en 35 aislamientos (Tabla 24). No se encontró asociación de diferentes tipos de BLEE en un mismo aislamiento. El tipo de BLEE predominante fue CTX-M, presente en un 80% (28/35) de los aislamientos mientras que sólo 7 aislamientos fueron productores de BLEE tipo SHV. Un 54% (15/28) de los aislamientos con CTX-M presentaron conjuntamente la beta-lactamasa TEM-1. Entre las CTX-M detectadas, más de la mitad (54%) fueron CTX-M-14, un 21% CTX-M-1, un 21% CTX-M-15 y un 3.6% CTX-M-9. Todas las SHV caracterizadas, excepto una (SHV-2), fueron SHV-12.

**Tabla 24.** Aislamientos clínicos de enterobacterias productoras de BLEEs detectadas en el estudio.

BLEE	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>S. enteritidis</i>	TOTAL
CTX-M-14	13	0	0	1	14
CTX-M-15	3	3	0	0	6
CTX-M-1	4	2	0	0	6
CTX-M-9	0	1	1	0	2
<b>TOTAL CTX-M</b>	<b>20</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>28</b>
SHV-12	6	0	0	0	6
SHV-2	0	1	0	0	1
<b>TOTAL SHV</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>7</b>
<b>TOTAL</b>	<b>26</b>	<b>7</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>35</b>

No se detectaron BLEEs tipo TEM

### 3.2. Relación entre producción de BLEEs y presencia de determinantes de RPFQs

En el 27% (10/37) de los aislamientos productores de BLEE se detectó además algún determinante de RPFQs. Un 50% de las cepas fueron productoras de BLEE tipo CTX-M-15. Es importante destacar que la BLEE tipo CTX-M-15, a pesar de no ser el tipo

más frecuente detectado en este estudio, se relaciona mayormente con la presencia de determinantes de RPFQs. En el resto de las cepas productoras de BLEE y portadoras de genes de RPFQs el tipo de beta-lactamasa encontrado fue CTX-M-9 (20%), CTX-M-14 (10%) y CTX-M-1 (10%). En relación al tipo SHV, a pesar de que el enzima SHV-12 fue el más prevalente entre los aislamientos, en éstos no se detectaron mecanismos de RPFQs. La única cepa productora de SHV-2 si fue portadora de determinantes de RPFQs. Finalmente, comentar que todas las cepas de *E. coli* portadoras sólo del gen *aac(6′)-Ib-cr* como mecanismo de RPFQs fueron productoras de BLEE CTX-M-15.

Por otra parte, un 73% de los aislamientos BLEE positivos, no fueron portadores de determinantes de RPFQs. Un 50% (13/27) portaban CTX-M-14 como tipo de BLEE predominante seguido de CTX-M-1 (18.5%) y CTX-M-15 (3.7%). En un 22% de estas cepas se detectó la BLEE tipo SHV-12.

#### 4. Estudio de mutaciones en ADN girasa y topoisomerasa IV en aislamientos con determinantes de RPFQ

En los 20 aislamientos en los que se detectó la presencia de algún determinante de RPFQs se secuenció un fragmento de la QRDR de las topoisomerasas tipo II, de los genes *gyrA* y *gyrB* en el caso de la ADN-girasa y de *parC* y *parE* en el caso de la topoisomerasa IV. En 9 (45%) aislamientos portadores de genes de RPFQs, se detectaron también mutaciones en la QRDR de las topoisomerasas (**Tabla 23**). Las mutaciones sólo se observaron en las especies de *E. coli* (7 cepas, 77.8% del total de cepas de *E. coli*) y *K. pneumoniae* (2 cepas, 40% de las cepas de *K. pneumoniae* estudiadas). En el resto de especies de enterobacterias estudiadas portadoras de determinantes de RPFQs no se detectó ninguna mutación en las topoisomerasas.

Todas las mutaciones detectadas en *gyrA* dieron lugar a cambios aminoacídicos en las posiciones 83 y 87, aunque observamos que el cambio de aminoácido en ambas posiciones fue diferente según la especie. El cambio aminoacídico más frecuentemente detectado en GyrA, S83L, se detectó en los 7 aislamientos de *E. coli*. Además, 5 de estos aislamientos también presentaron una segunda mutación en *gyrA* responsable del cambio D87N. En los aislamientos de *K. pneumoniae* el cambio en la posición 83 de GyrA resultó ser S83I y S83F mientras que el cambio en la posición 87 fue D87A. En el análisis de las secuencias del gen *gyrB*, las mutaciones detectadas fueron silentes y no dieron lugar a cambios aminoacídicos.

Un 35% de los aislamientos (6 cepas de *E. coli* y una de *K. pneumoniae*) presentaron al menos una mutación en el gen *parC*, siendo S80I el cambio aminoacídico más común, presente en 6 de estos 7 aislamientos. En el aislamiento restante el cambio encontrado fue en la posición 84, en la que se detectó la sustitución de ácido glutámico por lisina. Adicionalmente, tres de los aislamientos de *E. coli* portadores del cambio S80I, presentaron también el cambio aminoacídico E84V. En el gen *parE* se detectaron mutaciones en un 25% (5/20) de los aislamientos (**Tabla 23**). En todos los casos la mutación fue única y sólo se detectó en cepas de *E. coli*. La mutación más frecuente fue I529L en 3 de los 5 aislamientos.

Finalmente destacar que en el caso de *E. coli*, un 55.6% de los aislamientos fueron portadores de 4 o incluso 5 mutaciones afectando a *gyrA*, *parC* y *parE*. Por otra parte, una cepa de *K. pneumoniae*, presentó una doble mutación (S83F, D87A) en *gyrA*, sin ninguna mutación en *parC*, por lo que no se observó el patrón habitual de adquisición de mutaciones cromosómicas en las topoisomerasas, que generalmente aparecen de forma escalonada en *gyrA*, *parC* y posteriormente de nuevo en *gyrA*.

---

## 5. Epidemiología molecular de los aislamientos con determinantes de RPFQs

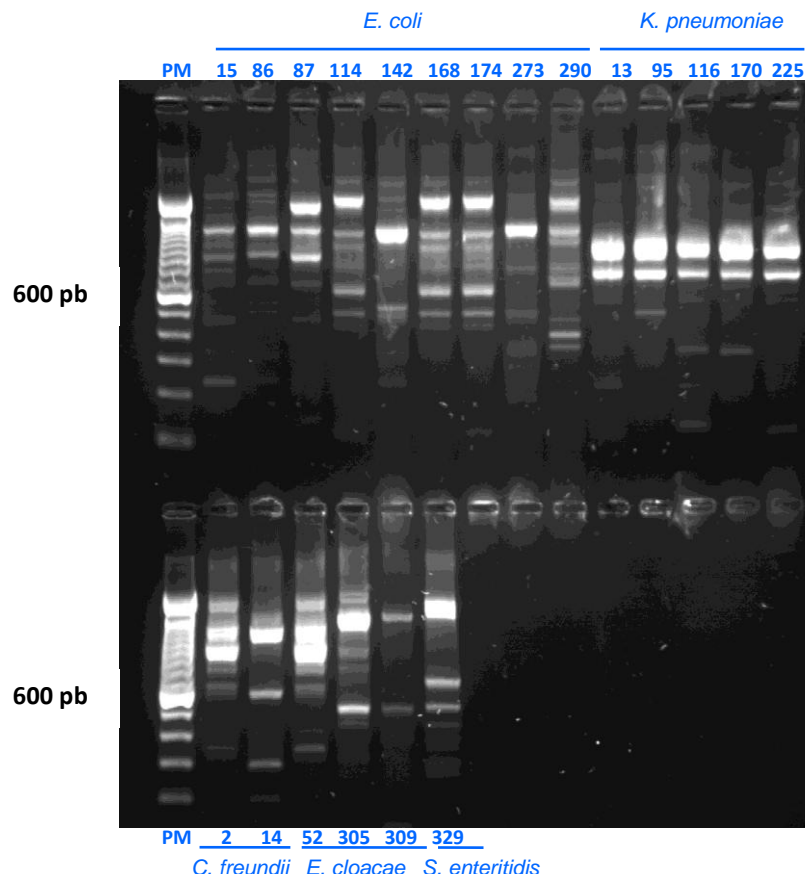
Para conocer la relación clonal entre los aislamientos portadores de genes de RPFQs se realizaron tres métodos diferentes de tipificación molecular.

### 5.1. REP-PCR

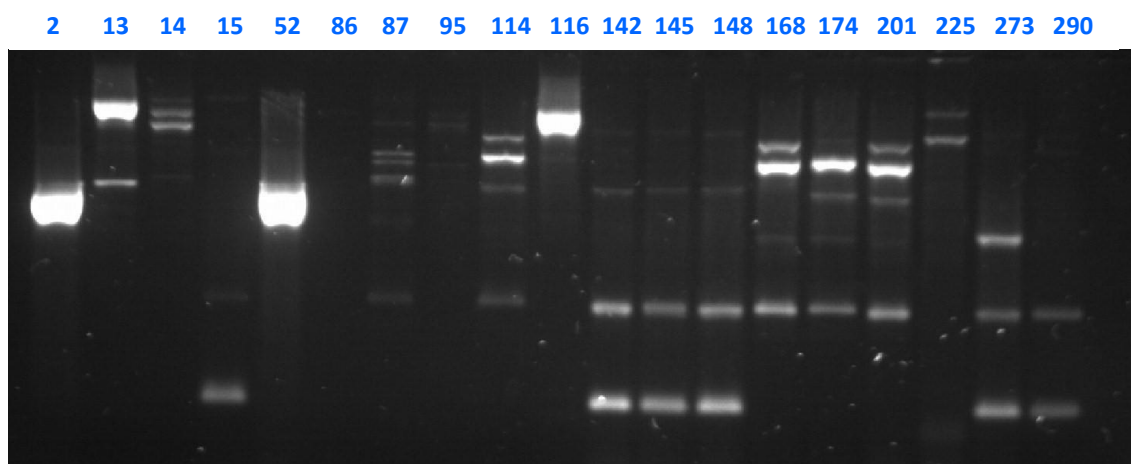
La relación clonal entre los aislamientos con RPFQs se analizó inicialmente mediante REP-PCR (**Figura 48**). La mayoría de los aislamientos mostraron patrones de DNA diferentes, indicando que no estaban clonalmente relacionados. Sin embargo, 3 cepas de *E. coli* (114, 168 y 174) mostraron idénticos patrones de DNA, realizándose posteriormente su confirmación con la técnica de referencia, RFLP-PFGE. Estos 3 aislamientos presentaron el mismo perfil de mutaciones en las topoisomerasas [S83L/D87N/S80I/E84V/I529L] aunque diferentes mecanismos de RPFQs y tipos de BLEEs. En dos de ellos (cepas 114 y 168), se detectó el gen *aac(6')-Ib-cr* y BLEE tipo CTX-M-15. La cepa 174 portaba el gen *qnrB2* y no era productora de BLEE. Los patrones de DNA de los 5 aislamientos de *K. pneumoniae* no mostraron resultados concluyentes (**Figura 48**), ya que la única diferencia entre ellos fue una banda débil. A todos ellos se les realizó el estudio de RFLP-PFGE para determinar la relación clonal.

### 5.2. ERIC-PCR

Los patrones de ADN obtenidos mediante ERIC-PCR no fueron lo suficientemente discriminativos para los aislamientos portadores de determinantes de RPFQs de este estudio (**Figura 49**).



**Figura 48.** Patrones de bandas obtenidos por REP-PCR de los aislamientos con RPFQs. Calle 1: peso molecular (PM).

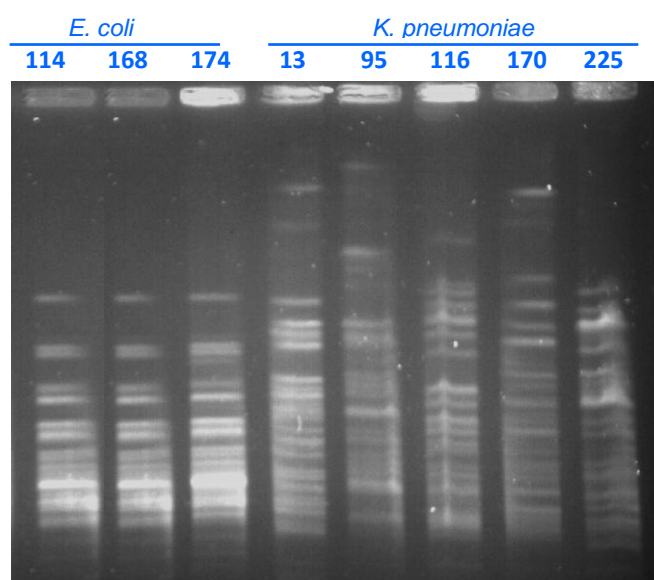


**Figura 49.** Patrones de bandas obtenidos mediante ERIC-PCR de los aislamientos con RPFQs.

### 5.3. RFLP-PFGE

El método de RFLP-PFGE es de referencia en la tipificación molecular de enterobacterias. Dado su elevado poder discriminativo se utilizó esta técnica para confirmar los resultados no concluyentes obtenidos por los otros métodos de tipificación molecular.

Los 3 aislamientos de *E. coli* que mostraron idénticos patrones de ADN por REP-PCR, fueron confirmados mediante análisis de RFLP-PFGE, considerándose, por tanto, clonalmente relacionados. Estas cepas fueron aisladas de pacientes diferentes que procedían del ámbito extrahospitalario. Dos procedían de atención primaria y la otra de un paciente atendido en el servicio de urgencias de nuestro hospital. Por otra parte, los patrones de bandas de ADN de los aislamientos de *K. pneumoniae* que mediante REP-PCR mostraron dudosa relación clonal, presentaron al menos tres bandas distintas entre ellos en el estudio de RFLP-PFGE, de modo que, según los criterios definidos por Tenover y colaboradores (Tenover, 1995), estos aislamientos no estaban relacionados clonalmente (**Figura 50**).



**Figura 50.** Patrones de bandas obtenidos de determinados aislamientos con RPFQs mediante RFLP-PFGE.

## 6. Relación entre aislamientos con determinantes de RPFQs, la producción de BLEEs, la presencia de mutaciones en las topoisomerasas y la actividad de ácido nalídixico (AN) y ciprofloxacino (CIP)

### 6.1. Relación entre aislamientos con RPFQs y la producción de BLEEs

Cuando se analizó la prevalencia y distribución de genes codificantes de mecanismos de RPFQs en aislamientos productores y no productores de BLEE, se observó que fue claramente diferente (**Tabla 23**). Entre los aislamientos no productores de BLEE, sólo un 3.6% portaba mecanismos de RPFQs (10/275, 4 *E. coli*, 2 *E. cloacae*, 2 *C. freundii*, 1 *K. pneumoniae* y 1 *S. enteritidis*). Sin embargo, un 27% de los aislamientos productores de BLEE (10/37, 5 *E. coli*, 4 *K. pneumoniae* y 1 *E. cloacae*) portaba uno o más genes codificantes de mecanismos de RPFQs.

El mecanismo de RPFQs más frecuentemente detectado en las enterobacterias no productoras de BLEE fue *qnrB*, presente en 7 cepas, seguido de genes *qnrS* en 3 cepas. En cambio, entre los aislamientos productores de BLEE, el mecanismo de RPFQs más prevalente fue *aac(6')-Ib-cr*, presente en 7 de 10 aislamientos. Este mecanismo de resistencia en cepas de *K. pneumoniae* aparecía siempre combinado con genes *qnr*.

En general, observamos una clara asociación entre la presencia de RPFQs, y en particular de genes *qnr* y/o *aac(6')-Ib-cr*, y la presencia de BLEEs puesto que un 50% de los aislamientos con determinantes de RPFQs, presentaban simultáneamente genes codificantes de BLEEs.



**Tabla 25.** Distribución de genes de RPFQs en aislamientos productores y no productores de BLEEs.

Gen RPFQs	BLEE	No BLEE	Total
<i>qnrA</i>	1	-	1
<i>qnrB</i>	-	7	7
<i>qnrS</i>	2	3	5
<i>aac(6')-Ib-cr</i>	3	-	3
<i>qnrA + aac(6')-Ib-cr</i>	1	-	1
<i>qnrB + aac(6')-Ib-cr</i>	3	-	3
<b>Total</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>20</b>

### 6.2. Relación entre aislamientos con RPFQs y la presencia de mutaciones en las topoisomerasas

El 55% (11/20) de los aislamientos con genes de RPFQs no presentaron mutaciones en ninguna de las subunidades de las topoisomerasas tipo II incluyendo a todos los aislamientos de *C. freundii*, *E. cloacae* y *S. enteritidis*. De éstos, 9 (82%) presentaron determinantes *qnr* y los otros dos aislamientos fueron *K. pneumoniae* portadores de *qnrB1* y *aac(6')-Ib-cr* (**Tabla 26**).

Del resto de aislamientos que presentaban como único mecanismo de RPFQs genes *qnr*, un 25% era portador de una única mutación en *gyrA*, un 25% en *gyrA* y *parC* y en un 50% se detectaron mutaciones en *gyrA*, *parC* y *parE*. Por otra parte, el 100% de los aislamientos portadores del enzima *aac(6')-Ib-cr* como mecanismo de RPFQs presentaron mutaciones en *gyrA*, *parC* y *parE*. En los aislamientos con genes *qnr* y *aac(6')-Ib-cr* se observó que el 50% era portador de doble mutación en *gyrA* y en el 50% una mutación en *gyrA* y *parC* (**Tabla 26**).

Finalmente, señalar que dos aislamientos presentando ambos únicamente el enzima *aac(6')-Ib-cr*, mostraron el mismo patrón de mutaciones: doble mutación en *gyrA* (S83L/D87N) y *parC* (S80I/E84V) y una mutación simple (I529L) en *parE*.

En resumen, un 30% de los aislamientos con genes *qnr*, el 100% de los aislamientos con *aac(6')-Ib-cr* y un 50% en los aislamientos con *qnr + aac(6')-Ib-cr* presentó al menos una mutación en las topoisomerasas.

**Tabla 26.** Relación entre mutaciones en las subunidades de la ADN girasa y la topoisomerasa IV y presencia de determinantes de RPFQs (WT:wildtype, cepa salvaje; aac: *aac(6')-Ib-cr*).

<i>gyrA</i>	<i>gyrB</i>	<i>parC</i>	<i>parE</i>	<i>qnr</i>	<i>aac</i>	<i>qepA</i>	TOTAL n=20
WT	WT	WT	WT	+	-	-	9 (45%)
WT	WT	WT	WT	+	+	-	2 (10%)
S83L	WT	WT	WT	+	-	-	1 (5%)
S83F/D87A	WT	WT	WT	+	+	-	1 (5%)
S83L	WT	E84K	WT	+	-	-	1 (5%)
S83I	WT	S80I	WT	+	+	-	1 (5%)
S83L/D87N	WT	S80I	S458A	-	+	-	1 (5%)
S83L/D87N	WT	S80I	L416F	+	-	-	1 (5%)
S83L/D87N	WT	S80I/E84V	I529L	+	-	-	1 (5%)
S83L/D87N	WT	S80I/E84V	I529L	-	+	-	2 (10%)
9 (45%)	0%	7 (35%)	5 (25%)	17 (85%)	7 (35%)	0%	TOTAL

### 6.3. Relación entre aislamientos con RPFQs y la actividad de ácido nalidíxico (AN) y ciprofloxacino (CIP)

De los 11 aislamientos portadores de genes de RPFQs pero no de mutaciones en las topoisomerasas, los 9 aislamientos en los que se detectaron exclusivamente genes *qnr*, fueron sensibles tanto a AN como a CIP, con unos rangos de CMI de <2 a 16 mg/L (moda: 16 mg/L) y 0.01 a 1 mg/L (moda: 0.5 mg/L), respectivamente, pero, a pesar de estar dentro de los rangos de sensibilidad según los puntos de corte del CLSI (CLSI, 2010), se observó un aumento en las CMI de CIP (0.12-1 mg/L) en la mayoría de estos aislamientos (7/9) respecto a los valores esperables para cepas totalmente salvajes. De hecho, si se consideran los puntos de corte del CLSI aceptados para *Salmonella* spp. en el 2013 (CLSI, 2013) y que según algunos autores deberían extenderse al resto de enterobacterias, 5 de estos aislamientos presentarían sensibilidad disminuida a ciprofloxacino y 2 serían resistentes. Por otra parte, los otros 2 aislamientos de este grupo fueron claramente sensibles a AN (CMI <8 mg/L) y CIP (CMI <0.12 mg/L).

De forma sorprendente, los otros dos aislamientos con topoisomerasas salvajes y portadores de *qnrB1 + aac(6')-Ib-cr* presentaron una clara afectación en la actividad de quinolonas. Fueron dos cepas de *K. pneumoniae* (13 y 170) productoras de BLEE CTX-M-15. Una de ellas presentó tanto para AN como para CIP, valores de CMI  $\geq 32$  mg/L, mientras que la otra (*K. pneumoniae* 170) era sensible a AN (CMI, 16 mg/L) y claramente resistente a CIP con una CMI de 4 mg/L (**Tabla 23**).

En los aislamientos con genes codificantes de RPFQs y mutaciones en las topoisomerasas, se observó resistencia a AN y CIP con valores de CMI  $\geq 32$  mg/L para ambos en todos los casos excepto en un aislamiento (*E. coli* 142) portador de una única mutación en *gyrA* y con una CMI de 4 mg/L para CIP. En resumen, la resistencia

clínica a fluoroquinolonas (ciprofloxacino) observada en el 50% de los aislamientos con RPFQs (10/20 cepas), estaba asociada al menos con una mutación en *gyrA* en el 80% de las cepas (**Tabla 23**).

## 7. Ensayos de conjugación en cepas con determinantes de RPFQs

Tras la realización por triplicado de los ensayos de conjugación en 9 cepas con CMI a ciprofloxacino >32 mg/L (cepas 13, 15, 86, 87, 114, 116, 168, 174 y 225) y comprobación de la viabilidad de la cepa receptora *E. coli* J53 resistente a azida sódica así como su estabilidad frente a diferentes concentraciones de azida sódica, no fue posible la obtención de transconjugantes de las cepas mencionadas.

## 8. Entorno genético de cepas con determinantes de RPFQs

### 8.1. Detección de *ISEcp1*

*ISEcp1* es una secuencia de inserción asociada con frecuencia con las BLEE tipo CTX-M y, recientemente, se ha detectado la variante *ISEcp1C* en el extremo 3' de cepas portadoras de *qnr*, concretamente del gen *qnrB19* (Richter, 2010). No obstante, en este trabajo se investigó la presencia de *ISEcp1* en todos los aislamientos con RPFQs.

La transposasa *ISEcp1* fue amplificada en un 25 % (5/20) de los aislamientos portadores de mecanismos de RPFQs (3 *E. coli* y 2 *K. pneumoniae*). Todos los aislamientos eran productores de BLEE tipo CTX-M. De éstos, sólo las cepas de *K. pneumoniae* portaban determinante *qnrB* (*qnrB1* junto con *aac(6')-Ib-cr*), generalmente asociado a esta transposasa. Sin embargo, en la cepa 273, *E. coli*

portadora de *qnrB19*, no se detectó *ISEcp1* a diferencia de otros autores (Cattoir, 2008B, Richter, 2010).

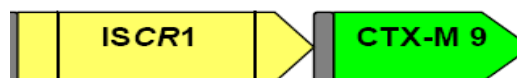
## 8.2. Entorno genético de *qnr*

Se estudió el entorno genético de la cepa 305 (*E. cloacae*), portadora del gen *qnrA1* y productora de la BLEE tipo CTX-M-9 (Figura 51). La estructura que precede al gen de resistencia a fluoroquinolonas, *qnrA1* es, como en la mayoría de los estudios publicados (Wang 2003; Nordmann, 2005) un *ISCR1*. Inmediatamente aguas abajo de *qnrA1*, se localiza un gen *ampR* lo que coincide con lo descrito ya para In36 y In37 en aislamientos procedentes de Shanghai y Australia (Robiseck, 2006; Tran, 2005). El tándem del gen *qacE $\delta$ 1-sul1* se localiza aguas abajo del gen *ampR*, tal y como se observa en la mayoría de los integrones tipo *sul1*



**Figura 51.** Representación esquemática del entorno genético de *qnrA1* de la cepa 305.

En cuanto a la localización de la BLEE CTX-M-9 de esta cepa, se observó que estaba precedida por la transposasa de un *ISCR1* (Figura 52).



**Figura 52.** Representación esquemática de la localización de la BLEE CTX-M-9 de la cepa 305 *qnrA1*-positiva.

En el estudio del entorno genético de la cepa 142 (*E. coli*) portadora de *qnrB2* (Figura 53) no encontramos el elemento *ISCR1*, sistemáticamente descrito para esta variante de *qnrB* (Dahmen, 2009) pero sí su asociación con integrón tipo *sul1*. Se amplificó tras el fragmento correspondiente al *orf6*, la misma secuencia de inserción (IS6100) encontrada en *qnrA1*.

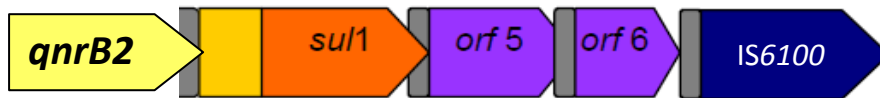


Figura 53. Representación esquemática del entorno genético de *qnrB2* de la cepa 142.

## 9. Selección de mutantes resistentes a ciprofloxacino (CIP) en cepas con determinantes de RPFQs

En las Tablas 27 y 28 se reflejan los datos correspondientes a la frecuencia de selección de mutantes de primer y segundo escalón, respectivamente. Este estudio se realizó en aislamientos con genes de RPFQs y topoisomerasas salvajes, excepto un aislamiento (*E. coli* 142) portador del gen *qnrB2* que presentó una mutación única en *gyrA*. Todos los mutantes obtenidos fueron estables, manteniendo el nivel de resistencia a ciprofloxacino cuando se sembraron en medio de cultivo sin antibiótico durante dos pases sucesivos de 24 horas.

### 9.1. Selección de mutantes de primer escalón

En 3 de los 11 aislamientos estudiados, no se logró seleccionar mutantes resistentes a las concentraciones de ciprofloxacino utilizadas. Estos aislamientos correspondían a especies de *C. freundii* y *E. cloacae*, portaban un gen *qnrB*, no producían BLEE y presentaban CMI de CIP iniciales bajas (0.25 mg/L, 0.12 mg/L y 0.01

mg/L) (**Tabla 27**). En el resto de aislamientos (73%, 8/11), la frecuencia de selección de mutantes resistentes fue entre  $1.4 \times 10^{-6}$  y  $2.2 \times 10^{-8}$ . En 3 de los aislamientos estudiados la CMI de CIP inicial fue 0.5 mg/L (**Tabla 27**). De forma sorprendente, en una cepa de *E. cloacae* con CMI de 0.03 mg/L se lograron mutantes a 4xCMI, 8xCMI y 16xCMI con una frecuencia de selección de  $10^{-6}$ . A diferencia de los otros aislamientos con CMIs de CIP bajas en los que no fue posible la selección, esta cepa de *E. cloacae* portaba un gen *qnrA1* y era productora de BLEE CTX-M-9. En el resto de cepas con CMI a CIP  $\geq 1$  mg/L se consiguió seleccionar mutantes en todos los casos, si bien en todos excepto uno la selección tuvo lugar a concentración de CIP 4xCMI inicial. En este grupo se incluye una cepa de *E. coli qnrB*-positiva que ya de partida presentaba una mutación simple en *gyrA*. Se observó que la frecuencia de selección es más baja ( $10^{-8}$ ) que en el resto. En resumen, se lograron mutantes de primer escalón a 4xCMI, 8xCMI y 16xCMI en un 73%, 27% y 18% de los casos, respectivamente.

Finalmente, se comprobó que las CMIs para ciprofloxacino de los mutantes resistentes seleccionados en un primer escalón fueron de 4 a 128 veces más altas que para la cepa original. En el caso de ofloxacino, las CMIs resultantes fueron de 16 a 256 veces más elevadas que el valor inicial.

### 9.2. Selección de mutantes de segundo escalón

De los 8 aislamientos candidatos para realizar el ensayo de selección de mutantes de segundo escalón, sólo se logró en una cepa de *K. pneumoniae* portadora de *qnrB1 + aac(6')-Ib-cr*, productora de BLEE CTX-M-15 y cuya CMI a CIP del ensayo de mutantes de primer escalón ya resultó ser  $> 32$  mg/L (**Tabla 28**). La frecuencia de selección de mutantes fue la misma a 4xCMI y 8xCMI.

### 9.3. Estudio de mutaciones de topoisomerasas tipo II en los mutantes obtenidos

En todas las cepas mutantes obtenidas de primer y según escalón se amplificaron y secuenciaron la QRDR de todos los genes codificantes de la ADN-girasa (*gyrA* y *gyrB*) y la topoisomerasa IV (*parC* y *parE*). Tras analizar las secuencias obtenidas se comprobó que en los fragmentos amplificados no aparecieron ninguna de las mutaciones habitualmente implicadas en la resistencia cromosómica a fluoroquinolonas.

## 10. Evaluación de la sensibilidad antibiótica a ciprofloxacino en cepas con determinantes de RPFQs por el método automatizado Vitek 2.

Los resultados de la sensibilidad a ciprofloxacino (CIP) obtenidos con el sistema automático Vitek 2 (*bioMérieux, La Balme Les Grottes, France*) en las cepas portadoras de genes de RPFQs se evaluaron tomando como referencia el método E-test (*AB Biodisk, Solna, Sweden*) (**Tabla 29**). La interpretación de los resultados se realizó de acuerdo a los criterios del *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2010 (CLSI, 2010)*.

Mediante el sistema automatizado Vitek 2, 10 de las 11 cepas portadoras de genes codificantes de RPFQs sin mutaciones en las topoisomerasas fueron clasificadas como sensibles, si bien en 8 de ellas las CMI's estaban cerca del punto de corte de sensibilidad, entre 8 y 16 mg/L. Un aislamiento fue claramente resistente. En cuanto a los valores de CMI para ciprofloxacino, estas 10 cepas aparecen también como sensibles pero con CMI's algo elevadas, tal y como se ha comentado en el apartado 6.3. Cuando se determinó en estos aislamientos la CMI exacta de ciprofloxacino mediante



**Tabla 27.** Frecuencia de selección de mutantes de primer escalón y su CMI (mg/L) a Ciprofloxacino (CIP) y Ofloxacino (OF). (NP: No procede)

Cepa	Especie	CMI inicial CIP	Frecuencia	4x CMI		8x CMI			16x CMI		
				CMI (CIP)	CMI (OF)	Frecuencia	CMI (CIP)	CMI (OF)	Frecuencia	CMI (CIP)	CMI (OF)
95	<i>K. pneumoniae</i>	<b>0.5</b>	$6 \times 10^{-7}$	16	16	$6 \times 10^{-7}$	16	16	$6 \times 10^{-9}$	16	32
273	<i>E. coli</i>	<b>0.5</b>	$8 \times 10^{-7}$	2	16	No detección	NP	NP	No detección	NP	NP
290	<i>E. coli</i>	<b>0.5</b>	$1.2 \times 10^{-7}$	2	8	No detección	NP	NP	No detección	NP	NP
142	<i>E. coli</i>	<b>1</b>	$2.2 \times 10^{-8}$	4	16	No detección	NP	NP	No detección	NP	NP
309	<i>S. enteritidis</i>	<b>1</b>	$1.6 \times 10^{-6}$	8	16	No detección	NP	NP	No detección	NP	NP
329	<i>E. cloacae</i>	<b>1</b>	$4 \times 10^{-7}$	8	16	$2 \times 10^{-7}$	8	32	No detección	NP	NP
170	<i>K. pneumoniae</i>	<b>4</b>	$8 \times 10^{-7}$	>32	>32	NP	NP	NP	NP	NP	NP
2	<i>C. freundii</i>	<b>0.12</b>	No detección	NP	NP	No detección	NP	NP	No detección	NP	NP
14	<i>C. freundii</i>	<b>0.25</b>	No detección	NP	NP	No detección	NP	NP	No detección	NP	NP
52	<i>E. cloacae</i>	<b>0.01</b>	No detección	NP	NP	No detección	NP	NP	No detección	NP	NP
305	<i>E. cloacae</i>	<b>0.03</b>	$1.4 \times 10^{-6}$	4	8-16	$1.4 \times 10^{-6}$	4	8-16	$9 \times 10^{-6}$	4	16-32

**Tabla 28.** Frecuencia de selección de mutantes de segundo escalón y su CMI (mg/L) a Ciprofloxacino (CIP) y Ofloxacino (OF). (NP: No procede).

Cepa	Especie	CMI inicial (CIP)	Frecuencia	4x CMI		8x CMI		16x CMI			
				CMI (CIP)	CMI (OF)	Frecuencia	CMI (CIP)	CMI (OF)	Frecuencia	CMI (CIP)	CMI (OF)
95	<i>K. pneumoniae</i>	32	No detección	NP	NP	No detección	NP	NP	NP	NP	NP
273	<i>E. coli</i>	16	No detección	NP	NP	No detección	NP	NP	No detección	NP	NP
290	<i>E. coli</i>	8	No detección	NP	NP	No detección	NP	NP	No detección	NP	NP
142	<i>E. coli</i>	16	No detección	NP	NP	No detección	NP	NP	No detección	NP	NP
309	<i>S. enteritidis</i>	16	No detección	NP	NP	No detección	NP	NP	No detección	NP	NP
329	<i>E. cloacae</i>	32	No detección	NP	NP	No detección	NP	NP	NP	NP	NP
170	<i>K. pneumoniae</i>	>32	10 <sup>-7</sup>	>32	>32	10 <sup>-7</sup>	>32	>32	NP	NP	NP
305	<i>E. cloacae</i>	16-32	No detección	NP	NP	No detección	NP	NP	No detección	NP	NP

E-test, los valores fueron similares a los obtenidos con el sistema Vitek 2, excepto en 4 cepas que, mediante el Vitek 2 tenían CMI <0.5 mg/L pero, según los resultados de E-test, dos de ellas presentaron valores de CMI de cepas claramente sin mutaciones (0.01 y 0.03 mg/L) y las otras dos CMI en las que se puede inferir la presencia de algún mecanismo de resistencia (0.12 y 0.25 mg/L) y que algunos autores considerarían como aislamientos con sensibilidad disminuida a ciprofloxacino.

De forma global, en los aislamientos portadores de genes codificantes de RPFQs pero carentes de mutaciones en la QRDR de las topoisomerasas, el sistema automatizado Vitek 2 detectó al menos un valor de CMI de CIP  $\geq$  0.5 mg/L en un 54.5% (6/11) de los aislamientos. Por otra parte, todos los aislamientos, excepto uno, portadores de determinantes de RPFQs y que presentaron varias mutaciones en la QRDR de las topoisomerasas fueron considerados según el sistema Vitek 2 como resistentes con un valor de CMI de CIP  $\geq$  4 mg/L (> 32 mg/L según el método de referencia E-test). La excepción en este grupo fue un aislamiento de *E. coli* portador de *qnrB2* con una única mutación en *gyrA*. El valor de CMI de ciprofloxacino en este caso fue 1 mg/L por ambos métodos.

En resumen, si se aplican los puntos de corte de enterobacterias del CLSI del año 2010 (CLSI, 2010), la correlación entre la categoría clínica para ciprofloxacino obtenida por ambos sistemas fue de un 95%, detectándose sólo un caso de discordancia (error menor, resistente según el método de referencia e intermedio por el sistema automatizado).

**Tabla 29.** Comparación de las CMI (mg/L) de ciprofloxacino (CIP) obtenidas por el método de referencia (E-test) y el sistema automatizado Vitek 2. AN:ácido nalidíxico; R: resistente; I: intermedio; S: sensible

Cepa	RPFQ	Mutaciones QRDR	CMI AN (Vitek 2)	CMI CIP (Vitek 2)	Categoría clínica	CMI CIP (Etest)	Categoría clínica
2	<i>qnrB27</i>	No	≤ 4	≤ 0.25	S	0.12	S
13	<i>qnrB1</i> <i>aac(6′)-Ib-cr</i>	No	≥ 32	≥ 4	R	> 32	R
14	<i>qnrB9</i>	No	8	≤ 0.25	S	0.25	S
15	<i>qnrS1</i>	S83L, E84K	≥ 32	≥ 4	R	> 32	R
52	<i>qnrB27</i>	No	≤ 2	≤ 0.25	S	0.01	S
86	<i>aac(6′)-Ib-cr</i>	S83L, D87N, S80I, S458A	≥ 32	≥ 4	R	> 32	R
87	<i>qnrS1</i>	S83L, D87N, S80I, L416F	≥ 32	≥ 4	R	> 32	R
95	<i>qnrB2</i>	No	16	0.5	S	0.5	S
114	<i>aac(6′)-Ib-cr</i>	S83L, D87N, S80I, E84V, I529L	≥ 32	≥ 4	R	> 32	R
116	<i>qnrA1</i> <i>aac(6′)-Ib-cr</i>	S83I, S80I	≥ 32	≥ 4	R	> 32	R
142	<i>qnrB2</i>	S83L	≥ 32	1	S	1	S
168	<i>aac(6′)-Ib-cr</i>	S83L, D87N, S80I, E84V, I529L	≥ 32	≥ 4	R	> 32	R
170	<i>qnrB1</i> <i>aac(6′)-Ib-cr</i>	No	16	2	I	4	R
174	<i>qnrB2</i>	S83L, D87N, S80I, E84V, I529L	≥ 32	≥ 4	R	> 32	R
225	<i>qnrB6</i> <i>aac(6′)-Ib-cr</i>	S83F, D87A	≥ 32	≥ 4	R	> 32	R
273	<i>qnrB19</i>	No	8	0.5	S	0.5	S
290	<i>qnrS1</i>	No	16	0.5	S	0.5	S
305	<i>qnrA1</i>	No	16	≤ 0.25	S	0.03	S
309	<i>qnrS1</i>	No	16	1	S	1	S*
329	<i>qnrS1</i>	No	16	1	S	1	S

\* Resistente según los criterios aceptados en CLSI, 2013

---

## *VI. DISCUSIÓN*



Como consecuencia del frecuente uso de las fluoroquinolonas, la selección de microorganismos Gram negativos, especialmente de la familia *Enterobacteriaceae*, resistentes a estos antibióticos está incrementándose a nivel mundial. Inicialmente, la resistencia a fluoroquinolonas se atribuyó a la adquisición de mutaciones en los genes cromosómicos que codifican para las topoisomerasas tipo II (ADN-girasa y/o topoisomerasa IV), hasta que en 1998 se describió por primera vez la resistencia a quinolonas transmisible horizontalmente mediante un plásmido conjugativo (*Martínez-Martínez, 1998*), facilitando de este modo una vía rápida de extensión de la resistencia a este grupo de antimicrobianos. Se han descrito tres mecanismos plasmídicos de resistencia a fluoroquinolonas (RPFQs) diferentes: genes *qnr* (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC* y *qnrS*), genes que codifican para una variante de la aminoglucosidasa acetiltransferasa denominada *aac(6′)-Ib-cr* y genes *qepA*, que codifican una bomba de expulsión.

Multitud de estudios epidemiológicos han informado del aumento de la prevalencia de estos elementos genéticos plasmídicos en aislamientos clínicos de todo el mundo. Sin embargo, la mayoría de los estudios se han centrado en enterobacterias con fenotipos específicos de resistencia, como presencia de BLEEs y/o sensibilidad disminuida a ácido nalidíxico o fluoroquinolonas. En España, existen pocos datos sobre la prevalencia de estos mecanismos de resistencia plasmídicos y los estudios disponibles se refieren sobre todo a su frecuencia en cepas productoras de BLEEs. Además, la mayor parte de los datos se refieren a *Escherichia coli* y *Klebsiella spp.*, pero son escasos en otras especies de enterobacterias. Por tanto, el objetivo principal de este estudio fue conocer la prevalencia real de estos determinantes de RPFQs (genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrS*, *aac(6′)-Ib-cr* y *qepA*) en aislamientos clínicos de diferentes especies de enterobacterias consecutivos y de forma aleatoria, sin realizar una selección previa en base a la presencia de fenotipos específicos de resistencia, en la región de Murcia. Recientemente se han informado, aunque con muy poca

---

frecuencia, aislamientos clínicos portadores de la nueva variante *qnrD* y genes *oqxAB* (Ruiz, 2012), que codifican también para una bomba de expulsión.

En un 6.4% (20/312) de los aislamientos clínicos estudiados detectamos la presencia de al menos un determinante de RPFQs. Un 65% (13/20) portaba genes *qnr* como único mecanismo de RPFQs. El gen *qnr* más frecuente en nuestro estudio fue *qnrB*, presente en un 50% de los aislamientos portadores de determinantes de RPFQs. *qnrS1* fue el segundo más frecuente, en 5 aislamientos (25% de aislamientos *qnr*-positivos), mientras que *qnrA1* sólo se encontró en dos aislamientos. Los resultados de este trabajo coinciden con los publicados en estudios recientes, observando que QnrA, a pesar de representar el determinante Qnr identificado inicialmente, no es el más prevalente a nivel mundial (Cattoir, 2007; Minarini, 2008; Dahmen, 2009). Encontramos algunas diferencias con respecto a otros estudios españoles donde los genes *qnr* más prevalentes eran *qnrA1* (Lavilla, 2008) o *qnrS1* (Cano, 2009) y *qnrB* estaba ausente. Estas diferencias están probablemente asociadas con las distintas áreas geográficas en las que se realizaron los 3 estudios. El primero de ellos (Lavilla, 2008) se llevó a cabo en Barcelona y el segundo (Cano, 2009) en Santander y Sevilla aunque todos los aislamientos *qnrS1*-positivos se detectaron en Santander. Este estudio se ha realizado en Murcia. Otra de las posibles causas de estas diferencias en los resultados, es el hecho que los estudios previos comentados se centraron en mecanismos de RPFQs en enterobacterias productoras de BLEE (Lavilla, 2008) y, en algunos casos, sólo se estudiaron en un género como *Enterobacter* spp. (Cano, 2009). Sin embargo, incluso considerando sólo las enterobacterias productoras de BLEEs encontradas en este estudio, se observó que ningún determinante *qnr* fue claramente prevalente. *qnrA* y *qnrS* se detectaron en un 20% de los aislamientos y *qnrB* en un 30%. *aac(6')-Ib-cr* fue mucho más prevalente (70%) que cualquier otro determinante de RPFQs.



Analizando la distribución de determinantes de RPFQs por especies, encontramos que los genes *qnr* aparecen ampliamente distribuidos en la mayoría de las especies incluidas en el estudio, mientras que *aac(6′)-Ib-cr* sólo se encontró en aislamientos de *E. coli* y *K.pneumoniae*. Además, *aac(6′)-Ib-cr* siempre aparece como único determinante de RPFQs en *E.coli*, mientras que en un 80% de los aislamientos de *K. pneumoniae* aparece asociado a diferentes genes *qnr* (*qnrA1*, *qnrB1*, *qnrB6*), sugiriendo una posible asociación en un elemento genético transferible común. Es también interesante señalar que no se han detectado determinantes de RPFQs en especies como *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens* o *Klebsiella oxytoca*, a pesar de representar un porcentaje considerable de la población en estudio. Estos resultados apuntan a una posible distribución de los genes de RPFQs en determinadas especies.

Estudios previos (Jacoby, 2003; Poirel, 2005; Henrichfreise, 2005; Wang, 2005; Robicsek, 2005) han obtenido resultados similares, concretamente en *Proteus* spp y en otras bacterias Gram negativas como *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter* spp. Estos estudios se llevaron a cabo con un número muy pequeño de aislamientos, pero en este trabajo centrado en enterobacterias, el número de aislamientos incluidos de *Proteus mirabilis* ha sido suficiente (32, 10.2%) como para obtener resultados concluyentes en esta especie. Por otra parte, Xu y colaboradores (Xu, 2007) realizaron un estudio con un número relativamente grande de bacilos Gram negativos no fermentadores, incluyendo 128 aislamientos de *P. aeruginosa* y 77 de *Acinetobacter baumannii*, no encontrando genes *qnrA* en ninguno de ellos. Sin embargo, para descartar de forma más fiable la presencia de genes *qnr* en estas especies, sería necesario completar el estudio con la detección de otras variantes adicionales a *qnrA*. Finalmente comentar que, en especies como *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter koseri* o *Morganella morganii* estudiadas en este trabajo, debido al pequeño porcentaje de cada una de ellas es necesario el desarrollo de estudios adicionales para determinar la ausencia real o no de mecanismos de RPFQs en las mismas.

En general, observamos una clara asociación entre la presencia de determinantes de RPFQs (genes *qnr* y/o *aac(6′)-Ib-cr*) y la producción de BLEE puesto que un 50% de los aislamientos con determinantes de RPFQs, presentaban simultáneamente genes codificantes de BLEE. Este hecho ha sido demostrado en varios estudios previos. En trabajos donde los aislamientos clínicos eran seleccionados en base a su producción de BLEE, todos aquellos *qnr*-positivos eran también productores de BLEE (Lavilla, 2008). Richter y colaboradores (Richter, 2010) encontraron que mientras el 33% de 232 aislamientos clínicos iniciales eran productores de BLEE, este valor aumentaba hasta el 75% en el caso de aislamientos *qnr*-positivos. Con los resultados de este estudio en una población de enterobacterias no seleccionadas, confirmamos que los mecanismos de RPFQs son claramente más prevalentes en aislamientos productores de BLEE que no productores (28.6% vs 3.6%). Esta prevalencia concuerda con la obtenida en recientes estudios desarrollados en otros países. La prevalencia de determinantes de RPFQs descrita en *E. coli* y *K. pneumoniae* productores de BLEE en Corea es del 36.5% y 22% respectivamente (Park, 2012). Por otra parte, estudios desarrollados en España mostraron una prevalencia de genes de RPFQs en enterobacterias productoras de BLEE, similar a la prevalencia global (6.4%) detectada en este estudio (Lavilla, 2008).

Al igual que en otros estudios (Rodríguez-Baño, 2004; Romero, 2004; Ryoo, 2005; Valverde, 2007), las BLEEs tipo CTX-M son las más prevalentes (80%, 28/35). CTX-M-14, CTX-M-9 y CTX-M-1 también detectadas en este trabajo, figuran entre las más frecuentes en los estudios citados. Comparando la distribución de los diferentes tipos de BLEE CTX-M producidas por aislamientos con y sin determinantes de RPFQs de este trabajo, se observó que, CTX-M-14 fue la más frecuente en global (50%) pero también la más prevalente en aislamientos carentes de genes de RPFQs. Por el contrario, en cepas portadoras de mecanismos de RPFQs se observó la BLEE tipo CTX-M-15 como prevalente. Además, se encontró que todas las cepas de *E. coli* portadoras del gen

---

*aac(6')-Ib-cr* como único mecanismo de RPFQs eran productoras de BLEE CTX-M-15. Este hallazgo es igual al obtenido en un reciente estudio (Ruiz, 2012), donde un 84% (16/19) de las cepas estudiadas (10 aislamientos de *E. coli* y 6 de *Klebsiella* spp.) eran productoras de BLEE tipo CTX-M-15. Además, todas las cepas de *E. coli* excepto una, fueron portadoras del gen *aac(6')-Ib-cr* como único mecanismo de RPFQs, igual que en este trabajo, mientras que en las cepas de *Klebsiella* spp. estaba asociado con genes *qnrB6/B4*, *qnrS1* o genes *oqxAB* (Ruiz, 2012). Estos resultados sugieren la existencia en algunas especies, tales como *E. coli*, de una asociación de tipos concretos de BLEE CTX-M (CTX-M-15) con determinados genes de RPFQs (*aac(6')-Ib-cr*) en un mismo elemento genético transferible.

La mayoría de los genes de RPFQs presentes en los aislamientos de enterobacterias se localizan en plásmidos, que frecuentemente contienen otros genes de resistencia. Estos genes pueden ser transferidos mediante experimentos de conjugación (especialmente en *E. coli*) o transformación (principalmente en cepas de *K. pneumoniae*). Ruiz y colaboradores (Ruiz, 2012), mediante experimentos de conjugación y transformación demostraron la localización de un gen de RPFQs y el gen *bla<sub>CTX-M-15</sub>* en el mismo plásmido en todas las cepas portadoras de ambos genes. Una limitación de este trabajo fue la no obtención de transconjugantes en ninguna de las cepas ensayadas (6 *E. coli* y 3 *K. pneumoniae*) a pesar de la idoneidad del procedimiento y de la estabilidad de la cepa receptora *E. coli* J53 AZ<sup>R</sup>. Una posible explicación es la baja tasa de éxito de conjugación obtenida en determinados casos en la práctica y, especialmente, en el caso de especies diferentes a la cepa receptora como *K. pneumoniae*. Sin embargo, este hecho podría indicar, tal como sugieren Ruiz y colaboradores (Ruiz, 2012), que asumir que los genes *qnr* y *aac(6')-Ib-cr* detectados en estos aislamientos son genes de resistencia plasmídica puede no ser completamente adecuado en base únicamente la detección de los mismos mediante PCR. Precisamente, estos investigadores informan por primera vez de la integración del gen

---

*aac(6′)-Ib-cr* en el cromosoma de algunos aislamientos de *E. coli*, *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*. En estudios previos, también se describe la localización de varios genes *qnrB* y *qnr-like* en el cromosoma de cepas de *Citrobacter* spp. (Sánchez-Céspedes, 2009; Jacoby, 2011), *Stenotrophomonas maltophilia* (Sánchez, 2010), *Vibrionaceae* (Poirel, 2005) o *Serratia marcescens* (Velasco, 2010). Por tanto, además de la detección de los genes de RPFQs mediante PCR y secuenciación, se requieren estudios genéticos y moleculares adicionales que permitan corroborar la localización plasmídica de estos genes, de suma importancia clínica y epidemiológica considerando la posibilidad de transmisión horizontal de estos genes.

Un dato muy interesante aportado por este trabajo, dada la aleatoriedad en el proceso de selección de los aislamientos, es la diferente distribución de los genes de RPFQs en cepas productoras y no productoras de BLEE. El mecanismo de RPFQs más prevalente en los aislamientos BLEE positivos fue *aac(6′)-Ib-cr*, presente en 7 de los 10 aislamientos (70%). En el caso de cepas de *K. pneumoniae*, este mecanismo de resistencia aparecía siempre combinado con genes *qnr*. En el caso de cepas no productoras de BLEE, se observó de forma sorprendente la ausencia del gen *aac(6′)-Ib-cr*, siendo en este grupo el gen *qnrB* (7 cepas, 70%) el mecanismo de RPFQs más frecuente seguido de genes *qnrS* (3 cepas, 30%). Estos resultados apoyan la hipótesis planteada anteriormente de una asociación de tipos concretos de BLEE CTX-M (CTX-M-15, CTX-M-9) con determinados genes de RPFQs (*aac(6′)-Ib-cr*, *qnrA1*) en un mismo elemento genético transferible.

La resistencia clínica a ciprofloxacino observada en el 50% de los aislamientos con RPFQs (10/20 cepas), estaba asociada al menos con una mutación en *gyrA* en el 80% de los casos. Sin embargo, dos aislamientos de *K. pneumoniae* resistentes a ciprofloxacino no mostraron mutaciones en las topoisomerasas. En ellos se detectaron dos mecanismos de RPFQs (genes *qnrB1* + *aac(6′)-Ib-cr*), eran productores de BLEE

---

CTX-M-15, y las CMI de ciprofloxacino fueron claramente diferentes (>32 and 4 mg/l, respectivamente). Dado que ninguno de los aislamientos portaba ninguno de estos genes de RPFQs aislados, estos resultados sugieren que la combinación de estos dos mecanismos (*qnrB* + *aac(6')-Ib-cr*) puede conducir a resistencia a fluoroquinolonas en ausencia de mutaciones en las topoisomerasas. No obstante, una posible limitación de este estudio es el hecho de que no se amplificó la QRDR completa en *gyrA*, puesto que la mayoría de las mutaciones más frecuentes están en las regiones amplificadas con los oligonucleótidos habituales. Por tanto, se debería amplificar la región completa de *gyrA* para explicar la resistencia a ciprofloxacino en los aislamientos sin mutaciones en las topoisomerasas.

Por otra parte, resaltar que una de estas cepas de *K. pneumoniae* (*qnrB1* + *aac(6')-Ib-cr*) resistentes a ciprofloxacino (CMI, 4 mg/L) mostró sensibilidad a ácido nalidíxico (CMI, 16 mg/L). Este patrón de resistencia es inusual, ya que tal y como multitud de estudios previos indican, las enterobacterias con sensibilidad disminuida o resistencia intermedia a fluoroquinolonas son altamente resistentes a ácido nalidíxico. Un estudio realizado en España (Cano, 2009) encontró 3 aislamientos de *E. cloacae* portadores en este caso de *qnrS1*, con estas excepcionales características de sensibilidad. Dos de ellos, mostraron sensibilidad disminuida a ciprofloxacino (CMI 1 y 2 mg/L) pero eran claramente sensibles a ácido nalidíxico (CMI 16 y 8mg/L, respectivamente). El tercer aislamiento presentó exactamente las mismas características que el aislamiento de *K. pneumoniae* detectado en este trabajo: idénticos valores de CMI de ciprofloxacino y ácido nalidíxico y ausencia de mutaciones en la QRDR de *gyrA* y *parC*. En otros estudios, previos y más recientes (Cano, 2007; Herrera-León, 2011), también se observó que los genes de RPFQs se detectan más frecuentemente en aislamientos con estas peculiares características de sensibilidad a quinolonas: resistencia (CMI 4 mg/L) o sensibilidad disminuida a ciprofloxacino (CMI 0.12-0.5 mg/L) y sensibilidad a ácido nalidíxico (CMI 8-16 mg/L). Por tanto, se ha

---

propuesto que la detección de aislamientos con estos valores de CMI para ciprofloxacino y ácido nalidíxico puede indicar la presencia de genes de RPFQs (Herrera-León, 2011).

Nueve de los 11 aislamientos con RPFQs que no contenían mutaciones en las subunidades de las topoisomerasas tipo II eran exclusivamente portadores de genes *qnr* (incluyendo a todos los aislamientos de *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae* y *Salmonella enteritidis*) y sensibles a ácido nalidíxico y ciprofloxacino. Aunque sensibles, las CMIs de ambos eran, en la mayoría de estos aislamientos (5/9), más elevadas de lo esperado para cepas totalmente salvajes (CMIs de 0.5-1 mg/L para ciprofloxacino), de modo que en estos aislamientos los genes *qnr* están asociados con la disminución en la sensibilidad a fluoroquinolonas en ausencia de otros mecanismos explicativos. Por otra parte, no se observaron mecanismos específicos de RPFQs asociados con valores de CMI más elevados a fluoroquinolonas en este grupo. Este comportamiento ha sido previamente descrito por otros autores. Para Lavilla y colaboradores (Lavilla, 2008), 14 de 15 aislamientos *qnr*-positivos (93.3%) eran sensibles a ciprofloxacino, con valores de CMI variando en el rango de 0.06 a 0.75 mg/L. A pesar de la sensibilidad de estas cepas, observaron que las CMIs de ciprofloxacino en estos microorganismos estaban aumentadas en comparación con cepas sin ningún mecanismo de RPFQs. Al igual que en este estudio, se observó que las CMIs de ciprofloxacino más elevadas aparecieron asociadas con mutaciones en las QRDR.

Otros autores (Kim, 2009), han informado que la presencia de genes de RPFQs no está asociada siempre con un incremento en la resistencia a ciprofloxacino. Encontraron que, del total de aislamientos estudiados, aquellos que contenían determinantes de RPFQs presentaban significativamente una resistencia a ciprofloxacino más elevada pero dependiendo de la especie. En sus cepas de *E. coli*, observaron que la presencia de determinantes de RPFQs no estaba asociada con un

aumento en la resistencia a ciprofloxacino. En este trabajo se ha observado este hecho aunque en aislamientos de otras especies (2 *C. freundii* y 2 *E. cloacae*), en los que no se detectaron mutaciones en las topoisomerasas, portaban genes *qnr* y fueron claramente sensibles a ácido nalidíxico (CMI <16 mg/L) y ciprofloxacino (CMI <0.5 mg/L). Estos resultados coinciden para estas especies con los aislamientos de *E. coli* del estudio de Kim y colaboradores (Kim, 2009). En este punto es fundamental remarcar que la presencia de genes de RPFQs en determinadas especies no está asociada con sensibilidad disminuida a quinolonas, tal y como se podría esperar. Los datos obtenidos de este trabajo apoyan a previos estudios, demostrando que la presencia de genes *qnr* no conlleva necesariamente un aumento de la CMI a ciprofloxacino por encima de los puntos de corte de resistencia (Martínez-Martínez, 1998). Sin embargo, son necesarios estudios adicionales para establecer exactamente el papel de los genes de RPFQs en estos aislamientos.

Un dato importante a destacar en este trabajo, es la tasa de aislamientos que acumularon 4 o más mutaciones en las diferentes subunidades de las topoisomerasas (5/9, 55%). Todos los aislamientos fueron *E. coli*. Todos excepto eran productores de BLEE tipo CTX-M (CTX-M-15 en 3/4 casos) y 3 de ellos portaban el gen *aac(6')-Ib-cr* como único mecanismo de RPFQs. El resto de aislamientos portadores de genes *aac(6')-Ib-cr* detectados en este estudio, fueron cepas de *K. pneumoniae* que también portaban genes *qnr* y una BLEE (CTX-M en 3/4 casos). Sin embargo, estos aislamientos no mostraban más de dos mutaciones en las topoisomerasas e incluso en dos casos (cepas 13 y 170) no se observó ninguna mutación.

En resumen, la RPFQs en especies diferentes de *E. coli* y *K. pneumoniae*, no parece estar asociada a mutaciones en los genes de las topoisomerasas mientras que casi el 80% y 40% de los aislamientos de *E. coli* y *K. pneumoniae* portadores de genes de RPFQs, respectivamente, sí portaban mutaciones en las topoisomerasas. Sin

---

embargo, entre estas dos especies también se observó una clara diferencia, ya que la mayoría de estas cepas de *E. coli* contenían 4 ó 5 mutaciones en las topoisomerasas mientras que las cepas de *K. pneumoniae* no portaban más de 2 mutaciones.

La relación clonal entre los aislamientos con RPFQs se evaluó inicialmente mediante REP-PCR. La mayoría de los aislamientos mostraron patrones de bandas de DNA diferentes, indicando que no estaban clonalmente relacionados. Sin embargo, 3 cepas de *E. coli* mostraron idénticos patrones de bandas de DNA, que fueron confirmados con la técnica de referencia, RFLP-PFGE. Estos 3 aislamientos portaban el mismo perfil de mutaciones en las topoisomerasas [Ser83Leu/Asp87Asn/Ser80Ile/Glu84Val/Ile529Leu] aunque diferente mecanismo de RPFQs y presencia de BLEEs. En dos de ellos, se detectó el gen *aac(6′)-Ib-cr* y BLEE tipo CTX-M-15. El aislamiento restante portaba el gen *qnrB2* y no era productor de BLEE. Esto sugiere que en este caso, la resistencia a quinolonas mediada por plásmidos está asociada al intercambio de elementos genéticos móviles más que a una difusión clonal de cepas portadoras de determinantes de RPFQs.

En cuanto al estudio del entorno genético de *qnr*, se realizó, en primer lugar, la detección de la secuencia de inserción *ISEcp1*, presente frecuentemente junto con las BLEE tipo CTX-M y recientemente descrita en el extremo 3′ de cepas portadoras de *qnr*, concretamente del gen *qnrB19* (Richter, 2010). En este trabajo se investigó la presencia de *ISEcp1* en todos los aislamientos con RPFQs, dado que la mitad de los aislamientos con genes de RPFQs eran productores de BLEE tipo CTX-M y el determinante detectado mayoritariamente fue *qnr*. La transposasa *ISEcp1* fue amplificada en un 25 % de los aislamientos portadores de mecanismos de RPFQs (3 *E. coli* y 2 *K. pneumoniae*). Todos eran productores de BLEE tipo CTX-M pero de éstos, sólo las cepas de *K. pneumoniae* portaban determinante *qnrB* (*qnrB1* junto con *aac(6′)-*



*lb-cr*), generalmente asociado a esta transposasa. El resto de aislamientos portaban el gen *aac(6′)-lb-cr* aislado o el gen *qnrS1*. Sin embargo, en la cepa 273, *E. coli* portadora de *qnrB19*, no se detectó *ISEcp1* a diferencia de otros autores (Cattoir, 2008B, Richter, 2010).

Con el fin de conocer la localización del gen *qnrA1* en los aislamientos clínicos de la región de Murcia y ver la existencia de cambios o no respecto a otros estudios publicados acerca de este gen, se estudió el entorno genético de la cepa 305 (*E. cloacae*) portadora de *qnrA1* y productora de la BLEE tipo CTX-M-9. El gen *qnrA1* ha sido identificado formando parte de integrones tipo *sul1* de la familia In4 (Tran, 2002). Estos integrones contienen la secuencia de inserción *ISCR1* (Toleman, 2006) que codifica para una recombinasa implicada en la movilización de genes de resistencia antibiótica próximos a ella. En este trabajo, se observó que el gen *qnrA1* se localiza en una estructura semejante a las que se han ido describiendo en diferentes publicaciones. Al igual que en los casos descritos inicialmente en China (Wang, 2003) y en otros estudios posteriores (Nordmann, 2005; Toleman, 2006), *qnrA1* se localiza en un integrón compuesto de la familia In4, adyacente a *ISCR1*. A diferencia del plásmido descrito originalmente, pMG252, y al igual que en In36 e In37, inmediatamente aguas debajo de *qnrA1* se encuentra un gen *ampR*. El tándem del gen *qacE $\delta$ 1-sul1* se localiza aguas abajo del gen *ampR*, tal y como se observa en la mayoría de los integrones tipo *sul1*. Finalmente, se encontró tras las secuencias *orf5-orf6* la secuencia de inserción IS6100.

El gen *qnrB* se ha descrito también asociado con *ISCR1* en un integrón tipo *sul1* (Cano, 2009; Dahmen, 2009), con IS26 (Hopjick, 2011) así como con otras recombinasas tipo *orf1005* (Jacoby, 2006; Garnier, 2006) o la transposasa *ISEcp1* (Dionisi, 2009; Richter, 2010). En el estudio del entorno genético de la cepa 142 (*E. coli*) portadora de *qnrB2* no se encontró adyacente el elemento *ISCR1*, sistemáticamente descrito para esta variante de *qnrB* en otros estudios recientes (Cano, 2009; Dahmen, 2009), pero sí su asociación con

un integrón tipo *sul1*. Algunos autores (*Garnier, 2006; Quiroga, 2007; Strahilevitz, 2009*) han descrito que el gen *qnrB2* se localiza en un integrón tipo *sul1*, pero en orientación contraria a *ISCR1*, de modo que en estos aislamientos se requieren estudios adicionales para descartar realmente la ausencia de *ISCR1*. Tampoco se detectó adyacente la transposasa *ISEcp1*. Sin embargo, se amplificó, tras el fragmento correspondiente al *orf6*, la misma secuencia de inserción (*IS6100*) detectada en *qnrA1*.

En un estudio reciente (*Ruiz, 2012*), se observó que todas las estructuras relacionadas con los genes de RPFQs mostraron rasgos genéticos implicados en la adquisición de o diseminación de genes de resistencia. Entre ellos, *IS26* está presente en la mayoría de las estructuras (*Dionisi, 2009*), especialmente en torno al gen *aac(6′)-Ib-cr* (*Ruiz, 2012*), pero también *IS6100*, *ISEcp1* así como los integrones de clase 1. Según estos autores, algunas de estas secuencias de inserción podrían estar implicadas en la integración cromosómica de genes de RPFQs (*aac(6′)-Ib-cr* en el estudio de Ruiz y colaboradores y *qnrB19* en Dionisi y colaboradores) en diferentes especies, asegurando su continuidad en la progenie. En las dos cepas estudiadas en este trabajo, portadoras de *qnrA1* y *qnrB2*, se detectó la *IS6100*. Además, se comenzó de forma preliminar el estudio del entorno genético de una cepa de *E. coli* portadora del gen *aac(6′)-Ib-cr*, y se amplificó también esta misma secuencia de inserción. Dado que en ninguna de estas cepas fue posible obtener transconjugantes y la posible implicación de *IS6100* en la integración de los genes de RPFQs en el cromosoma, son necesarios estudios adicionales para confirmar que los genes de resistencia a fluoroquinolonas de los aislamientos de este trabajo son realmente de localización plasmídica.

La RPFQs se asocia, de forma prácticamente sistemática, a resistencia de bajo nivel; sin embargo, la presencia de estos determinantes en una situación de uso masivo de fluoroquinolonas, puede favorecer el desarrollo de resistencia de alto nivel a las mismas con mayor frecuencia que en cepas que no poseen dichos determinantes.

Esto se demostró claramente en el trabajo de de Robicsek y colaboradores (Robicsek, 2005), donde la frecuencia de selección de mutantes en un aislamiento clínico de *Enterobacter* spp. portador de *qnrA* fue de  $3.4 \times 10^{-7}$  mientras que en la misma cepa pero portadora de una variante del mismo plásmido que había perdido espontáneamente *qnrA*, la frecuencia fue inferior a  $2.9 \times 10^{-9}$ .

En este trabajo se estudió la influencia real que la presencia de estos genes plasmídicos puede tener sobre la frecuencia de selección de mutantes con alto nivel de resistencia a ciprofloxacino en aislamientos libres de mutaciones en las topoisomerasas. El estudio de selección de mutantes se realizó en dos etapas. En un 73% (8/11) de los aislamientos estudiados, se seleccionaron mutantes de primer escalón resistentes a ciprofloxacino con una frecuencia entre  $1.4 \times 10^{-6}$  y  $2.2 \times 10^{-8}$ . En todos los aislamientos, excepto uno, la CMI de ciprofloxacino inicial fue  $\geq 0.5$  mg/L. Sin embargo, de forma sorprendente, en una cepa de *E. cloacae* con CMI de 0.03 mg/L se lograron mutantes a 4xCMI, 8xCMI y 16xCMI con una frecuencia de selección de  $10^{-6}$ . A diferencia de los otros aislamientos con CMIs de CIP bajas en los que no fue posible la selección, esta cepa de *E. cloacae* portaba un gen *qnrA1* y era productora de BLEE CTX-M-9.

Como se ha comentado, el estudio de selección de mutantes se realizó en aislamientos con determinantes de RPFQs sin mutaciones en las topoisomerasas pero se incluyó también una cepa de *E. coli qnrB2*-positiva con una mutación única en *gyrA*, resistente a ácido nalidíxico y con una CMI a ciprofloxacino de 1 mg/L, con objeto de advertir posibles diferencias en el proceso de selección de mutantes. Se observó que en esta cepa la frecuencia de selección fue más baja ( $10^{-8}$ ) que en el resto.

La selección de mutantes de segundo escalón, se logró en una única cepa de *K. pneumoniae* portadora de *qnrB1 + aac(6')-Ib-cr*, productora de BLEE CTX-M-15 y cuya

CMI de ciprofloxacino del ensayo de mutantes de primer escalón ya resultó ser > 32 mg/L.

Las CMIs para ciprofloxacino de los mutantes resistentes seleccionados fueron de 4 a 128 veces más altas que para la cepa original. En el caso de ofloxacino, las CMIs resultantes fueron de 16 a 256 veces más elevadas que el valor inicial. Sin embargo, el análisis de las secuencias de la QRDR de todos los genes codificantes de la ADN-girasa y la topoisomerasa IV reveló la ausencia total de mutaciones habitualmente implicadas en la resistencia cromosómica a fluoroquinolonas. Una justificación posible para estos resultados es la hipótesis descrita también por otros autores (*Cesaro, 2008*) donde las proteínas Qnr unidas a sus dianas dificultaría el acceso de la fluoroquinolona a las mismas, incluyendo la QRDR, evitando así la aparición de mutaciones de resistencia. Como limitación de este estudio, no se analizaron posibles mutaciones en las regiones externas a las QRDRs. Sin embargo, Cesaro y colaboradores (*Cesaro, 2008*) realizaron este análisis y no detectaron mutación alguna en las topoisomerasas en dichas zonas externas. De este modo, otro mecanismo diferente a la presencia de mutaciones en las topoisomerasas debe estar implicado en la producción de aumentos significativos en los valores de las CMIs a ciprofloxacino y ofloxacino de las cepas mutantes de este estudio. Otra posible hipótesis para el desarrollo de resistencia a fluoroquinolonas de alto nivel en estos aislamientos sin mutaciones en las topoisomerasas sería una sobreproducción de la proteína Qnr.

Un resultado importante de este estudio, que coincide con los datos obtenidos en el trabajo de Cesaro y colaboradores (*Cesaro, 2008*) es la ausencia (en su caso muy baja frecuencia) de mutaciones en la QRDR de las topoisomerasas en cepas mutantes portadoras de genes *qnr* como principal determinante de RPFQs. Este hecho apoya la hipótesis del papel protector de las proteínas Qnr al impedir el acceso de las fluoroquinolonas a la QRDR de las topoisomerasas. Sin embargo, se requieren más

estudios para confirmar la causa real de la resistencia a fluoroquinolonas de alto nivel a ciprofloxacino obtenida en las cepas mutantes seleccionadas, ya que de demostrarse, podría conllevar un replanteamiento en la capacidad de detección de estos aislamientos con los sistemas actuales con el fin de minimizar el riesgo de selección de mutantes en los mismos.

En este trabajo se observó que la mayoría de los aislamientos portadores de genes *qnr* como único mecanismo de RPFQs y sin mutaciones en las topoisomerasas, son clasificados como sensibles por los sistemas de detección habituales pero son capaces de experimentar una fácil transmisión a cepas totalmente resistentes ante concentraciones elevadas de ciprofloxacino. Estos resultados coinciden con los publicados por Robicsek y colaboradores (*Robicsek, 2005*), donde la presencia de *qnrA* en un aislamiento clínico de *Enterobacter* spp. facilitó la selección de mutantes resistentes a fluoroquinolonas a una concentración de ciprofloxacino de 2 mg/L, la cual se alcanza durante el tratamiento antibiótico. Por tanto, cómo predecir la repercusión clínica de la presencia de genes de RPFQs desde un punto de vista asistencial, a partir de datos *in vitro*, es un aspecto primordial a estudiar para evitar fracasos clínicos, posibles complicaciones de la ineffectividad del tratamiento con quinolonas y por supuesto, evitar la diseminación de los aislamientos portadores de esta resistencia. La detección de cepas portadoras de mecanismos de RPFQs habitualmente depende de métodos genotípicos (con frecuencia amplificación de estos genes mediante PCR y secuenciación) ya que actualmente los métodos fenotípicos no son completamente fiables para detectar estas cepas (*Calvo, 2011*).

Estudios previos muestran que los sistemas automatizados para el estudio de sensibilidad (Vitek, MicroScan y BD Phoenix) son fiables en la detección de enterobacterias resistentes a fluoroquinolonas (*Doern, 1996; Rittenhouse, 1996; Sanders, 2001; Menozzi, 2006*), pero existe información muy limitada sobre la precisión de estos

sistemas en aislamientos que expresan mecanismos de RPFQs. En el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca (Murcia), la sensibilidad antibiótica de las enterobacterias se estudia mediante el sistema automatizado Vitek 2 (*bioMérieux, La Balme Les Grottes, France*). De este modo, se decidió evaluar la capacidad de este sistema para detectar aislamientos de enterobacterias portadores de genes de RPFQs.

Con los puntos de corte aceptados actualmente para enterobacterias todas las cepas con *qnr* sin mutaciones en las topoisomerasas, excepto dos que portaban además el gen *aac(6′)-Ib-cr*, fueron clasificadas como sensibles a ciprofloxacino aunque se observó un ligero aumento de la CMI respecto a los valores esperados en cepas totalmente salvajes. Debido a esto, quizá se deberían replantear los puntos de corte y hacer extensivo los aceptados actualmente para *Salmonella* spp. (*CLSI, 2013*) al resto de enterobacterias. Si aplicamos estos puntos de corte, excepto dos cepas sensibles, el resto de aislamientos con RPFQs de este trabajo serían considerados como intermedios o resistentes a ciprofloxacino, lo que evitaría el tratamiento de las infecciones producidas por estos microorganismos con fluorquinolonas y la selección de mutantes resistentes tal como se ha comprobado “*in vitro*” en este trabajo.

---

## *VII. CONCLUSIONES*





1. La prevalencia de genes de RPFQs en aislamientos clínicos de diferentes especies de enterobacterias no seleccionados previamente y recogidos de forma consecutiva en la Región de Murcia fue del 6.4%.
2. Los determinantes de RPFQs son mucho más frecuentes en enterobacterias productoras de BLEE (28.6%) que en las no productoras (3.6%) pero con diferentes características. En las productoras de BLEE, se encuentran en la mayoría de los casos en cepas de *E. coli* o *K. pneumoniae* portadoras de genes *qnr* y/o *aac(6')-Ib-cr*. En las no productoras de BLEE aparecen en un grupo de especies más heterogéneo (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *C. freundii*, *E. cloacae*, *S. enteritidis*) y se observan únicamente genes *qnr*.
3. Un 50% de los aislamientos con genes de RPFQs presentaron resistencia clínica a ciprofloxacino y en un 80% de éstos se detectaron mutaciones en los genes de las topoisomerasas. Los aislamientos productores de BLEE, presentaron múltiples mutaciones en las topoisomerasas y elevadas CMI de ciprofloxacino. En los no productores de BLEE, las mutaciones en las topoisomerasas son infrecuentes (sólo aparecen en *E. coli*) y son en la mayoría de los casos sensibles a ciprofloxacino.
4. La mayoría de los aislamientos no estaban relacionados clonalmente. Sólo 3 cepas de *E. coli* mostraron idénticos patrones de bandas de DNA, portaban el mismo perfil de mutaciones en las topoisomerasas aunque diferente mecanismo de RPFQs y presencia de BLEEs. Estos datos sugieren que la RPFQs está asociada al intercambio de elementos genéticos móviles más que a una difusión clonal de cepas portadoras de determinantes de RPFQs.

5. La transposasa *ISEcp1* está presente en el 50% de los aislamientos portadores de BLEE CTX-M y portadores de genes *qnr*, *aac(6')-Ib-cr* o ambos. El gen *qnrA1* se localiza en un integrón compuesto de la familia In4, adyacente a *ISCR1*, igual al descrito por la mayoría de autores. El gen *qnrB2* no se encuentra adyacente a *ISCR1* pero sí se observan elementos característicos del integrón tipo *sul1*. En ambos casos, se detectó *IS6100*.
6. La frecuencia de selección de mutantes resistentes a ciprofloxacino fue entre  $1.4 \times 10^{-6}$  y  $2.2 \times 10^{-8}$  y se observó un aumento en los valores de CMI de ciprofloxacino y ofloxacino de 4 a 128 y de 16 a 256 veces, respectivamente.
7. Los determinantes de RPFQs no parecen producir resistencia a fluoroquinolonas por ellos mismos, excepto cuando dos mecanismos de RPFQs diferentes (genes *qnr* + *aac(6')-Ib-cr*) aparecen combinados en el mismo aislamiento.
8. Los sistemas automatizados aplicando los puntos de corte actuales clasifican a la mayoría de los aislamientos con determinantes de RPFQs como sensibles a fluoroquinolonas.

---

## *VIII. RESUMEN*



**Objetivos:** El principal objetivo de este estudio fue conocer la prevalencia de los mecanismos plásmidicos de resistencia a fluoroquinolonas (RPFQs) en aislamientos clínicos de enterobacterias tanto productoras como no productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEEs) en la región de Murcia.

**Metodología:** Se estudiaron 312 aislamientos clínicos de enterobacterias consecutivos, no duplicados obtenidos en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia durante noviembre y diciembre de 2010. Los genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrS*, *qepA* y *aac (6') Ib-cr* fueron amplificados mediante PCR. Las BLEEs fueron caracterizadas mediante PCR y secuenciación del ADN. En todos los aislamientos portadores de genes de RPFQs se estudiaron mutaciones en la QRDR de los genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE*. La relación clonal entre los aislamientos con genes de RPFQs se evaluó mediante REP-PCR y RFLP-PFGE. Se realizaron experimentos de selección *in vitro* de mutantes resistentes a fluoroquinolonas de primer y segundo escalón en aislamientos portadores de determinantes de RPFQs pero sin mutaciones en los genes de las topoisomerasas.

**Resultados:** Un 11.2% (35/312) de los aislamientos fueron productores de BLEEs. CTX-M-14 fue el tipo de BLEE más frecuente (14/35 aislamientos, 40%). Los mecanismos de RPFQs se detectaron en 20 aislamientos (6.4%) (9 *E.coli*, 5 *K. pneumoniae*, 2 *C. freundii*, 3 *E. cloacae* y 1 *S. enteritidis*), y fueron claramente más prevalentes en aislamientos productores de BLEEs (28.6% vs. 3.6%). Un 65% de los aislamientos fueron portadores de genes *qnr* como único mecanismo de RPFQs, en 3 aislamientos (15%) se detectó *aac(6')-Ib-cr* y 4 aislamientos presentaron genes *qnr* y *aac(6')-Ib-cr* combinados. Las enterobacterias no productoras de BLEEs fueron portadoras siempre de genes *qnr*, mientras que en los aislamientos productores de BLEEs, se detectó *aac(6')-Ib-cr* en 7 de 10 aislamientos (70%), sólo o combinado con genes *qnr*. Las dos cepas de *K. pneumoniae* portadoras de genes *aac(6')-Ib-cr* y *qnr* en ausencia de mutaciones en las topoisomerasas, fueron resistentes a ciprofloxacino. Un

45% (9/20) de los aislamientos con genes de RPFQs mostraron mutaciones en las topoisomerasas y un 55% de ellos acumuló 4 o más mutaciones. El estudio de relación clonal entre los aislamientos portadores de determinantes de RPFQs mostró diferentes patrones de bandas de ADN en la mayoría de ellos, indicando que no estaban relacionados clonalmente. Sin embargo, 3 cepas de *E. coli* mostraron idénticos patrones de bandas, portaban el mismo perfil de mutaciones en las topoisomerasas pero diferente mecanismo de RPFQs y diferentes BLEE. La frecuencia de selección de mutantes a ciprofloxacino fue de  $1.4 \times 10^{-6}$  a  $2.2 \times 10^{-8}$ . No se detectaron mutaciones en las topoisomerasas en los aislamientos seleccionados portadores de genes de RPFQs pero se observó un incremento significativo en los valores de CMI de ciprofloxacino (de 4 a 128 veces) y de ofloxacino (de 16 a 256 veces).

**Conclusiones:** Los determinantes de RPFQs son mucho más frecuentes en enterobacterias productoras de BLEEs (28.6% vs. 3.6%) pero con diferentes características. Las productoras de BLEEs y portadoras de genes de RPFQs se localizan en la mayoría de casos en las especies de *E. coli* or *K.pneumoniae* portando determinantes *qnr* y/o *aac(6')-Ib-cr*, múltiples mutaciones en los genes de las topoisomerasas y elevadas CMIs de ciprofloxacino. Sin embargo, los determinantes de RPFQs en ausencia de BLEEs aparecen en un grupo de especies más heterogéneo, los determinantes *qnr* son predominantes, las mutaciones en los genes de las topoisomerasas son infrecuentes (aparecen sólo en *E. coli*) y son normalmente sensibles a ciprofloxacino. Los determinantes de RPFQs no conducen a resistencia a fluoroquinolonas de alto nivel por sí mismos, pero la asociación de dos determinantes de RPFQs diferentes en el mismo aislamiento podría derivar en ella.

---

## *IX. SUMMARY*





**Objectives:** The main objective of this study was to know the prevalence of plasmid-mediated quinolone-resistance (PMQR) in extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL)–non-producing enterobacteria clinical isolates obtained in Murcia (Spain), and determine the differences with ESBL-producing enterobacteria.

**Methods:** We studied 312 consecutive, non-duplicated enterobacteria clinical isolates, obtained in the Department of Microbiology of University Hospital Virgen de la Arrixaca of Murcia during November and December 2010. *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrS*, *qepA* and *aac(6′)-Ib-cr* genes were amplified by PCR. ESBLs were characterized by PCR and DNA sequencing. Mutations in the *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE* genes QRDR were studied in PMQR-positive isolates. Clonal proximity among PMQR-positive isolates was evaluated by REP-PCR and RFLP-PFGE. First and second-step *in vitro* selection of fluoroquinolone-resistant mutants experiments were performed in PMQR-positive isolates with no mutations in topoisomerases genes.

**Results:** Thirty-five isolates (11.2%) were ESBL-producers. CTX-M-14 was the most frequent ESBL (14/35 isolates, 40%). PMQR mechanisms were detected in 20 isolates (6.4%) (9 *E.coli*, 5 *K. pneumoniae*, 2 *C. freundii*, 3 *E. cloacae* y 1 *S. enteritidis*), and were clearly more prevalent in ESBL-producing isolates (28.6% vs. 3.6%). Thirteen isolates (65%) harbored *qnr* genes as the only PMQR mechanism, 3 isolates (15%) harbored *aac(6′)-Ib-cr* and 4 isolates combined *qnr* and *aac(6′)-Ib-cr* genes. ESBL-non producing enterobacteria harbored always *qnr* genes, while ESBL-producing isolates, harboured *aac(6′)-Ib-cr* in 7 out of 10 isolates (70%), alone or combined to *qnr* genes. The two *K. pneumoniae* isolates combining *aac(6′)-Ib-cr* and *qnr* genes in absence of topoisomerases mutations, were shown ciprofloxacin-resistant. Nine (45%) PMQR-positive isolates showed topoisomerases mutations. 55% of them accumulated 4 or more topoisomerase mutations. Clonal relatedness study among the PMQR-positive isolates showed different DNA patterns in most isolates, indicating that they were not

clonally related. However, three *E. coli* isolates showed identical DNA patterns, harboring the same topoisomerase mutations profile but different PQMR mechanism and ESBLs presence. Ciprofloxacin-mutants selection frequency was from  $1.4 \times 10^{-6}$  to  $2.2 \times 10^{-8}$ . Topoisomerases mutations were absent after fluoroquinolone selection from PMQR-positive strains but it was observed a significant increase in quinolones MICs (4 to 128-fold for ciprofloxacin and 16 to 256-fold for ofloxacin).

**Conclusions:** PMQR determinants are much more frequent in ESBL-producing enterobacteria (28.6% vs. 3.6%) but with different features. PMQR-, ESBL-harboring enterobacteria are in most cases *E. coli* or *K.pneumoniae* harboring *qnr* and/or *aac(6′)-Ib-cr* determinants, multiple topoisomerase genes mutations and high MICs of ciprofloxacin. Meanwhile, PMQR determinants in absence of ESBLs appear in a more heterogeneous group of species, *qnr* determinants are largely predominant, topoisomerases genes mutations are infrequent (appear only in *E. coli*) and are usually ciprofloxacin-susceptible. PMQR determinants do not lead to fluoroquinolone resistance by themselves, but two different PMQR determinants combined in the same isolate might do it.

---

## X. BIBLIOGRAFÍA



- Actis LA, Tolmasky ME, Crosa HS.** Bacterial plasmids: replication of extrachromosomal genetic elements encoding resistance to antimicrobial compounds. *Front Biosci* **1999**; 3: d43-62.
- Alekshun MN, Levy SB.** Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell* **2007**; 128: 1037-50.
- Alghasham AA, Nahata MC.** Clinical use of fluoroquinolones in children. *Ann Pharmacother* **2000**; 34: 347-59.
- Alós, JI.** Quinolonas. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **2009**; 27(5): 290-7.
- Ambrose PG, Grasela DM, Grasela TH, Passarel J et al.** Pharmacodynamics of fluoroquinolones against *Streptococcus pneumoniae* in patients with community-acquired respiratory tract infections. *Antimicrob Agents Chemother* **2001**; 45: 2793-7.
- Amsden GW, Balow CH, Bertino Jr JS.** Pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-infective agents. En Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. Principles and practice of infectious diseases. 5<sup>th</sup> ed. New York: Churchill Livingstone **2000**; p. 253-61.
- Arakawa Y, Murakami M, Suzuki K, Ito H et al.** A novel integron-like element carrying the metallo- $\beta$ -lactamase gene *bla<sub>IMP</sub>*. *Antimicrob Agents Chemother* **1995**; 39: 1612-15.
- Arduino SM, Roy PH, Jacoby GA, Orman BE, Pineiro SA, Centron D.** blaCTX-M-2 is located in an unusual class 1 integron (In35) which includes Orf513. *Antimicrob Agents Chemother* **2002**; 46: 2303-6.
- Ball P, Mandell L, Niki Y, Tillotson G.** Comparative tolerability of the newer fluoroquinolone antibacterials. *Drug Safety* **1999**; 21: 407-21.
- Barlow RS, Pemberton JM, Desmarchelier PM, Gobius KS.** Isolation and Characterization of Integron-Containing Bacteria without Antibiotic Selection. *Antimicrob Agents Chemother* **2004**; 48(3): 838-42.
- Bateman A, Murzin AG, Teichmann SA.** Structure and distribution of pentapeptide repeats in bacteria. *Protein Sci* **1998**; 7: 1477-80.
- Bennet PM.** Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. *J Antimicrob Chemother* **1999**; 43: 1-4.
- Bennett PM.** Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br J Pharmacol* **2008**: 1-11.
- Bergogne-Berezin E.** Clinical role of protein binding of quinolones. *Clin Pharmacokinet* **2002**; 41: 741-50.
- Bönemann G, Stiens M, Pühler A, Schlüter A.** Mobilizable IncQ-related plasmid carrying a new quinolone resistance gene, *qnrS2*, isolated from the bacterial community of a wastewater treatment plant. *Antimicrob Agents Chemother* **2006**; 50: 3075-80.
- Briales A, Rodríguez-Martínez JM, Velasco C, Díaz de Alba P, Rodríguez-Baño J et al.** Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr* and *aac(6')-Ib-cr* in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Spain. *Int J Antimicrob Agents* **2012**; 39: 431-4.
- Bryskier A, Chantot JF.** Classification and structure-activity relationships of fluoroquinolones. *Drugs* **1995**; 49 (Suppl2): 16-28.

- Burrus V, Pavlovic G, Decaris B, Guèdon G.** Conjugative transposon: the tip of the iceberg. *Mol Microbiol* **2002**; 43(6): 601-10.
- Calvo J, Cano ME, Pitart C, Marco F, Rodríguez-Martínez JM, Pascual A, Martínez-Martínez L.** Evaluation of three automated systems for susceptibility testing of enterobacteria containing *qnrB*, *qnrS*, and/or *aac(6′)-Ib-cr*. *J Clin Microbiol* **2011**; 49:3343-5.
- Cambau E, Lascols C, Sougakoff W, Bebear C, Bonnet R et al.** Occurrence of *qnrA*-positive clinical isolates in French teaching hospitals during 2002-2005. *Clin Microbiol Infect* **2006**; 12: 1013-20.
- Cano ME, Calvo J, Agüero J, Rodríguez-Martínez JM et al.** Plasmid-mediated quinolone resistance among enterobacteria with reduced susceptibility or resistant to ciprofloxacin but susceptible to nalidixic acid. Abstr. 47<sup>th</sup> Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother, **2007**, Chicago, IL.
- Cano ME, Rodríguez-Martínez, JM, Agüero J, Pascual A, Calvo J et al.** Detection of plasmid-mediated quinolone resistance gene in clinical isolates of *Enterobacter* spp. In Spain. *J Clin Microbiol* **2009**; 47: 2033-9.
- Cantón R, Coque TM, Baquero F.** Multi-resistant Gram-negative bacilli: from epidemics to endemics. *Curr Opin Infect Dis* **2003**; 16: 315-25.
- Cantón R, Coque TM.** The CTX-M  $\beta$  lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol* **2006**; 9: 466-75.
- Cantón R, Valverde A, Novais A, Baquero F, Coque T.** Evolución y panorama actual de las BLEE. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **2007**; 25(Suppl 2): 2-10.
- Cantón R.** Antibiotic resistance genes from the environment: a perspective through newly identified antibiotic resistance mechanisms in the clinical setting. *Clin Microbiol Infect* **2009**; 15 (Suppl 1): 20-25.
- Cattoir V, Nordmann P, Silva-Sánchez J, Espinal P, Poirel L.** *ISEcp1*-Mediated Transposition of *qnrB*-Like Gene in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **2008B**; 52(8): 2929-32.
- Cattoir V, Poirel L and Nordmann P.** Plasmid-mediated quinolone resistance pump QepA2 in an *Escherichia coli* isolate from France. *Antimicrob Agents Chemother* **2008**; 52: 3801-4.
- Cattoir V, Poirel L, Aubert C, Soussy CJ, Nordmann P.** Unexpected Occurrence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants in Environmental *Aeromonas* spp. *Emerg Infect Dis* **2008A**; 14(2): 231-7.
- Cattoir V, Poirel L, Rotimi V, Soussy CJ, Nordmann P.** Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *J Antimicrob Chemother* **2007**; 60: 394-7.
- Cavaco LM, Hasman H, Xia S, Aarestrup FM.** *qnrD*, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella* enteric serovars Kentucky and Bovismorbificans of human origin. *Antimicrob Agents Chemother* **2009**; 53: 603-8.
- Centers for Disease Control Prevention (CDC).** Update to CDC's sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2006: fluoroquinolones no longer recommended for treatment of gonococcal infections. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* **2007**; 56: 332-6.
- Cesaro A, Dit Bettoni RR, Lascols C, Mérens A, Soussy CJ, Cambau E.** Low selection of topoisomerase mutants from strains of *Escherichia coli* harbouring plasmid-borne *qnr*

genes. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61: 1007-15.

**Chen YT, Liao TL, Liu YM, Lauderdale TL, Yan JJ, Tsai SF.** Mobilization of *qnrB2* and *ISCR1* in plasmids. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 1235-7.

**Cheung TK, Chu YW, Chu MY, Ma CH, Yung RW, Kam KM.** Plasmid-mediated resistance to ciprofloxacin and cefotaxime in clinical isolates of *Salmonella enteric* serotype Enteritidis in Hong Kong. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56: 586-9.

**Chmelnitsky I, Hermesh O, Navon-Venezia S, Strahilevitz J, Carmeli Y.** First detection of *aac(6')-Ib-cr* in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from Tel Aviv, Israel. *J Antimicrob Chemother* 2009; 64: 718-22.

**Chong YP, Kim ES, Park SJ, Jeong J, Choi S, Lee S et al.** Plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump gene, *qepA*, in *Escherichia coli* clinical isolates from Korea, *abstr. C2-3903*. *Abstr. 48<sup>th</sup> Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother-Infect Dis Soc Am. 46<sup>th</sup> Annu Meet American Society for Microbiology and Infectious Diseases Society of America, Washington, DC. 2008*

**Cisneros-Herreros JM, Cobo-Reinoso J, Pujol-Rojo M, Rodríguez Baño J, Salaver-Lletí M.** Guías de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Guía para el diagnóstico y tratamiento del paciente con bacteriemia. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2007; 25: 111-30.

**Clinical and Laboratory Standards Institute.** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twentieth informational supplement. Document M100-S20. Wayne, PA: CLSI; 2010.

**Clinical and Laboratory Standards Institute.** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twentieth informational supplement. Document M100-S20. Wayne, PA: CLSI; 2013.

**Courvalin P.** Plasmid-mediated 4-quinolone resistance: a real or apparent absence? *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 681-4.

**Couturier M, Bex F, Bergquist PL, Maas WK.** Identification and classification of bacterial plasmid. *Microbiol Rev* 1988; 52(3): 375-95.

**Dahmen S, Poirel L, Mansour W, Bouallègue O, Nordmann P.** Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in *Enterobacteriaceae* in Tunisia. *Clin Microbiol Infect* 2009; 16: 1019-23.

**Deshpande A, Pant C, Jain A, Fraser TG, Rolston DD.** Do fluoroquinolones predispose patients to *Clostridium difficile* associated diseases? A review of the evidence. *Curr Med Res Opin* 2008; 24: 329-33.

**Dionisi AM, Lucarelli C, Owczarek S, Luzzi I, Villa L.** Characterization of the Plasmid-Borne Quinolone Resistance Gene *qnrB19* in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(9): 4019-21.

**Dobrindt U, Hacker J.** Whole genome plasticity in pathogenic bacteria. *Curr Opin Infect Dis* 2001; 4: 550-7.

**Documento de consenso** sobre el tratamiento antimicrobiano de las infecciones en el pie del diabético. *Rev Esp Quimioterap* 2007; 20: 77-92.

**Doern GV, Torres BB, Jankins M, Jones RN.** Accurate characterization of ofloxacin susceptibility with *Enterobacteriaceae* using a modified GNS F6 card and the bioMerieux Vitek

System. *Diagn Microbiol Infect Dis* **1996**; 25: 133-5.

**Domagala JM.** Structure-activity and structure side-effect relationships for the quinolone antibacterials. *J Antimicrob Chemother* **1994**; 33: 685-706.

**Drlica K, Malik M.** Fluoroquinolones: action and resistance. *Curr Top Med Chem* **2003**; 3: 249-82.

**Drlica K, Zhao X.** DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol Mol Biol Rev* **1997**; 61: 377-92.

**Eckert C, Gautier V, Alert G.** DNA sequence analysis of the genetic environment of various bla<sub>CTX-M</sub> genes. *J Antimicrob Chemother* **2006**; 57: 14-23.

**Elgorriaga-Islas E, Guggiana-Nilo P, Domínguez-Yévenes et al.** Prevalencia del determinante de resistencia plasmídica a quinolonas aac(6')-Ib-cr en cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE aisladas en diez hospitales de Chile. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **2012**; 30(8): 466-8.

**Engberg J, Aarestrup M, Taylor DE, 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* **2001**; 7: 24-34.

**Espedido BA, Partridge SR, Iredell JR.** bla<sub>IMP-4</sub> in different genetic contexts in Enterobacteriaceae isolates from Australia. *Antimicrob Agents Chemother* **2008**; 52: 2984-7.

**Fernández-Cuenca F.** Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **2004**; 22(6): 355-60.

**Fernández-Vázquez, M.** Entorno genético de  $\beta$ -lactamasas de Espectro Extendido en Enterobacterias. Tesis doctoral. **2010**.

**Fluit AC, Schmitz FJ.** Class 1 integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **1999**; 18: 761-70.

**Fukuda H, Hiramatsu, K.** Primary targets of fluoroquinolones in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **1999**; 43: 410-2.

**García-Fernández A, Fortini D, Veldman K, Mevius D, Carattoli A.** Characterization of plasmids harbouring *qnrS1*, *qnrB2* and *qnrB19* genes in *Salmonella*. *J Antimicrob Chemother* **2009**; 63: 274-81.

**García-Rodríguez JA.** Antimicrobianos en medicina 2ª ed. Sociedad Española de Quimioterapia **2006**. Cantón R, Morosini MI, Valdezate S. Resistencia bacteriana a los antimicrobianos. ISBN: 978-84-8124-240-9.

**García-Sánchez JE, López R, Prieto J.** Antimicrobianos en medicina. *Proas Science* (Barcelona) **1999**.

**Garnier F, Raked N, Gassama A, Denis F, Ploy MC.** Genetic environment of quinolone resistance gene *qnrB2* in a complex *sul1*-type integron in the newly described *Salmonella enterica* serovar Keurmassar. *Antimicrob Agents Chemother* **2006**; 52: 3200-2.

**Garrido MC, Herrero M, Kolter R, Moreno F.** The export of the DNA replication inhibitor Microcin B17 provides immunity for the host cell. *EMBO J* **1988**; 7: 1853-62.

**Gatto B, Capranico G, Palumbo M.** Drugs acting on DNA topoisomerases: recent advances and future perspectives. *Curr Pharm Des* **1999**; 5: 195-215



- Gautom, RK.** Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* O157:H7 and other Gram-negative organisms in 1 Day. *J Clin Microbiol* **1997**; 35: 2977-80.
- Gay K, Robicsek A, Strahilevitz J, Park CH, Jacoby G, Barrett TJ et al.** Plasmid-mediated quinolone resistance in non-Typhi serotypes of *Salmonella enteric*. *Clin Infect Dis* **2006**; 43: 297-304.
- Gootz TD, Brighty KE.** The Quinolones. Academia Press **1998** (ed) pp. 29-80 (Andriole, VT, San Diego, California).
- Gutierrez B, Herrera-León S, Escudero JA, Hidalgo L, González-Sanz R, Arroyo M et al.** Novel genetic environment of *qnrB2* associated with TEM-1 and SHV-12 on pB1004, and IncHI2 plasmid, in *Salmonella* Bredeney BB1047 from Spain. *J Antimicrob Chemother* **2009**.
- Hall RM, Collins CM.** Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol Microbiol* **1995**; 15:593-600.
- Halliwell RF, Davey PG, Lambert JJ.** Antagonism of GABA<sub>A</sub> receptors by 4-quinolones. *J Antimicrob Chemother* **1993**; 31: 457-62.
- Hansen LH, Jensen LB, Sørensen HI, Sørensen SJ.** Substrate specificity of the OqxAB multidrug efflux pump conferring resistance to olaquinox in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **2007**; 60: 145-7.
- Hansen LH, Sørensen SJ, Jørgensen HS, Jensen LB.** The prevalence of the OqxAB multidrug efflux pump amongst olaquinox-resistant *Escherichia coli* in pigs. *Microb Drug Resist* **2005**; 11: 378-82.
- Hansson K, Sundström L, Pelletier A, Roy PH.** *IntI2* integron integrase in Tn7. *J Bacteriol* **2002**; 1184(6): 1712-21.
- Hata M, Suzuki M, Matsumoto M, Takahashi M, Sato K et al.** Cloning of a novel gene for quinolone resistance from a transferable plasmid in *Shigella flexneri* 2b. *Antimicrob Agents Chemother* **2005**; 49: 801-3.
- Heddle JG, Barnard FM, Wentzell LM, Maxwell A.** The interaction of drugs with DNA gyrase: a model for the molecular basis of quinolone action. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2000**; 19: 1249-64.
- Heddle JG, Blance SJ, Zamble DB, Hollfelder F et al.** The antibiotic microcin B17 is a DNA gyrase poison: characterization of the mode of inhibition. *J Mol Biol* **2001**; 307: 1223-34.
- Henrichfreise B, Pfister W, Wiegand I, Wiedemann B.** Resistance mechanisms and epidemiology of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from Germany. 45<sup>th</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy; Washington, DC, USA; Dec 16-19 **2005**. Abstract C2-1423.
- Herrera-León S, González-Sanz R, Herrera-León L, Echeita MA.** Characterization of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* carrying plasmid-mediated quinolone resistance mechanisms in Spain. *J Antimicrob Chemother* **2011**; 66: 287-90.
- Herrero M, Moreno F.** Microcin B17 blocks DNA replication and induces the SOS system in *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* **1986**; 132(Pt 2); 393-402.
- Hiasa H, Yousef DO, Mariani KJ.** DNA strand cleavage is required for replication fork arrest by a frozen topoisomerase-quinolone-DNA ternary complex. *J Biol Chem* **1996**; 271: 26424-9.

- Hooper DC.** Bacterial topoisomerases, anti-topoisomerases, and anti-topoisomerase resistance. *Clin Infect Dis* **1998**; 27 (Suppl 1): S54-63.
- Hooper DC.** Emerging mechanisms of fluorquinolone resistance. *Emerg Infect Dis* **2001**; 7:337-41.
- Hooper DC.** New uses for new and old quinolones and the challenge of resistance. *Clin Infect Dis* **2000**; 27 (Suppl 1): S54-63.
- Hordijk J, Bosman AB, van Essen-Zandbergen A, Veldman K et al.** *qnrB19* gene bracketed by IS26 on a 40-kilobase IncR plasmid from an *Escherichia coli* isolate from a veal calf. *Antimicrob Agents Chemother* **2011**; 55: 453-4.
- Jacoby G, Cattoir V, Hooper D, Martínez-Martínez L, Nordmann P et al.** *qnr* gene nomenclature. *Antimicrob Agents Chemother* **2008**; 52: 2297-9.
- Jacoby GA, Chow N, Waites KB.** Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **2003**; 47: 559-62.
- Jacoby GA, Griffin CM, Hooper DC.** *Citrobacter* spp. as a source of *qnrB* alleles. *Antimicrob Agents Chemother* **2011**; 55: 4979-84.
- Jacoby GA, Han P.** Detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* **1996**; 34: 908-11.
- Jacoby GA, Muñoz-Price LS.** The new beta-lactamases. *N Engl J Med* **2005**; 352: 380-91.
- Jacoby GA, Walsh KE, Mills DM, Walker VJ, Oh H et al.** *qnrB*, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **2006**; 50: 1178-82.
- Jeong JY, Yoon HJ, Kim ES, Lee Y, Choi SH, Kim NJ et al.** Detection of *qnr* in clinical isolates of *Escherichia coli* from Korea. *Antimicrob Agents Chemother* **2005**; 49: 2522-24.
- Jiang Y, Zhou Z, Qian Y, Wei Z, Yu Y, Hu S, Li L.** Plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr* and *aac(6′)-Ib-cr* in extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in China. *J Antimicrob Chemother* **2008**; 61: 1003-6.
- Jones RN.** Microbiology of newer fluoroquinolones: focus on respiratory pathogens. *Diagn Microbiol Infect Dis* **2002**; 44: 213-20.
- Jun J, Kwak Y, Kim S, Kim E, Lee J, Choi S, Jeong J et al.** Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* from Korea, abstr. C2-787. Abstr. 45th *Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother* **2005**. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Karamanis EM, Matthaiou DK, Moraitis LI, Falagas ME.** Fluoroquinolones versus beta-lactam based regimens for the treatment of osteomyelitis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Spine* **2008**; 33: 297-304.
- Kato J, Nishimura Y, Imamura R, Niki H et al.** New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli*. *Cell* **1990**; 63: 393-404.
- Kehrenberg C, Friederichs S, de Jong A, Michael GB, Schwarz S.** Identification of the plasmid-borne quinolone resistance gene *qnrS* in *Salmonella enterica* serovar Infantis. *J Antimicrob Chemother* **2006**; 58: 18-22.
- Kehrenberg C, Hopkins KL, Threlfall EJ, Schwarz S.** Complete nucleotide sequence of a small *qnrS1*-carrying plasmid from *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Typhimurium DT193. *J Antimicrob Chemother* **2007**; 60: 903-5.

- Khaliq Y, Zhanel GG.** Fluoroquinolone-associated tendinopathy: a critical review of the literature. *Clin Infect Dis* **2003**; 36: 1404-10.
- Kim HB, Park CH, Kim CJ, Kim EC, Jacoby GA, Hooper DC.** Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants over a 9-year period. *Antimicrob Agents Chemother* **2009**; 53: 639-45.
- Kim HB, Wang M, Park CH, Kim CJ, Kim EC, Jacoby GA, Hooper DC.** *oqxAB* encoding a multidrug efflux pump in human clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* **2009**; 53: 3582-4.
- Kobe B, Deisenhofer J.** A structural basis of the interactions between leucine-rich repeats and protein ligands. *Nature* **1995**; 374: 183-6.
- Lartigue MF, Poirel L, Aubert D, Nordmann P.** In vitro analysis of *ISEcp1B*-mediated mobilization of naturally occurring-lactamase gene *bla<sub>CTX-M</sub>* of *Kluyvera ascorbata*. *Antimicrob Agents Chemother* **2006**; 50(4): 1282-6.
- Lavilla S, González-López JJ, Sabate M, García-Fernández A et al.** Prevalence of *qnr* genes among extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing enterobacterial isolates in Barcelona, Spain. *J Antimicrob Chemother* **2008**; 61: 291-5.
- Leibovici L, Paul M, Cullen M, Bucaneve G, Gafter-Gvili A et al.** Antibiotic prophylaxis in neutropenic patients: new evidence, practical decisions. *Cancer* **2006**; 107: 1743-51.
- Leshner GY, Froelich EJ, Gruett MD, Bailey JH, Brundage RP.** 1,8-Naphthyridine derivatives. A new class of chemotherapeutic agents. *J Med Pharm Chem* **1962**; 91: 1063-5.
- Lietman PS.** Fluoroquinolones toxicities. An updated. *Drugs* **1995**; 49 (Suppl 2): 159-63.
- Lomovskaya O, Kawai F, Matin A.** Differential regulation of the *mcb* and *emr* operons of *Escherichia coli*: role of *mcb* in multidrug resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **1996**; 40: 1050-2.
- Ma J, Zeng Z, Chen Z, Xu X, Wang X, Deng Y et al.** High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr*, *aac(6')*-*lb-cr*, and *qepA* among ceftiofur-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from companion and food-producing animals. *Antimicrob Agents Chemother* **2009**; 53: 519-24.
- Mahillon J, Chandler M.** Insertion sequences. *Microbiol Mol Biol Rev* **1998**; 62(3): 725-74.
- Mammeri H, Van De Loo M, Poirel L, Martínez-Martínez L, Nordmann P.** Emergence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance in *Escherichia Coli* in Europe. *Antimicrob Agents Chemother* **2005**; 49(1): 71-6.
- Martínez-Martínez L, Pascual A, García I, Tran J, Jacoby GA.** Interaction of plasmid and host quinolone resistance. *J Antimicrob Chemother* **2003**; 51: 1037-9.
- Martínez-Martínez L, Pascual A, Jacoby GA.** Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* **1998**; 351: 797-9.
- Mazzariol A, Tokue Y, Kanegawa TM, Cornaglia G, Nikaido H.** High-level fluoroquinolone-resistant isolates of *Escherichia coli* overproduce multidrug efflux protein AcrA. *Antimicrob Agents Chemother* **2000**; 44: 3441-3.
- Menozi MG et al.** Two-center collaborative evaluation of performance of the BD Phoenix automated microbiology system for identification and antimicrobial susceptibility testing of Gram-negative bacteria. *J Clin Microbiol* **2006**; 44: 4085-94.

- Minarini L, Poirel L, Cattoir V, Darini AL, Nordmann P.** Plasmid-mediated quinolone resistance determinants among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil. *J Antimicrob Chemother* **2008**; 62: 474-8.
- Mitscher LA.** Bacterial topoisomerase inhibitors: quinolone and pyridine antibacterial agents. *Chem Rev* **2005**; 105: 559-592.
- Morais Cabral JH, Jackson AP, Smith CV, Shikotra N, Maxwell A et al.** Crystal structure of the breakage-reunion domain of DNA gyrase. *Nature* **1997**; 388: 903-6.
- Morrissey I, Hoshino K, Sato K, Yoshida A, Hayakawa I et al.** Mechanism of differential activities of ofloxacin enantiomers. *Antimicrob Agents Chemother* **1996**; 40: 1775-84.
- Munshi MH, Sack DA, Haider K, Ahmed ZU, Rahaman MM, Morshed MG.** Plasmid-mediated resistance to nalidixic acid in *Shigella dysenteriae* type 1. *Lancet* **1987**; 2: 419-21.
- Muñoz-Bellido JL, Alonzo MM, Martínez Andrés JA, Gutiérrez Zufiaurre MN et al.** Efflux pump-mediated quinolone resistance in *Staphylococcus aureus* strains wild type for *gyrA*, *gyrB*, *grlA*, and *norA*. *Antimicrob Agents Chemother* **1999**; 43: 354-6.
- Naber KB, Adam D.** Classification of fluorquinolones. *Int J Antimicrob Agents* **1998**; 10: 255-7.
- Nield BS, Holmes AJ, Gillings MR, Recchia GD, Mabbutt BC et al.** Recovery of new integron classes from environmental DNA. *FEMS Microbiol Lett* **2001**; 195: 59-65.
- Nikaido H, Thanassi DG.** Penetration of lipophilic agents with multiple protonation sites into bacterial cells: tetracyclines and fluoroquinolones as examples. *Antimicrob Agents Chemother* **1993**; 37: 1393-9.
- Noble CG, Barnard FM, Maxwell A.** Quinolone DNA-interaction: sequence-dependent binding to single stranded-DNA reflects the interaction within the gyrase-DNA complex. *Antimicrob Agents Chemother* **2003**; 47: 854-62.
- Nordmann P, Poirel L.** Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother* **2005**; 56: 463-69.
- Novick RP.** Plasmid Incompatibility. *Microbiol Rev* **1987**; 51(4): 381-95.
- Pai H, Seo MR, Choi TY.** Association of QnrB determinants and production of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases or plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **2007**; 51: 366-68.
- Pan XS, Fisher LM.** Targeting of DNA gyrase in *Streptococcus pneumoniae* by sparfloxacin: selective targeting of gyrase o topoisomerase IV by quinolones. *Antimicrob Agents Chemother* **1997**; 41: 471-4.
- Park KS, Kim MH, Park TS, Nam YS, Lee HJ, Suh JT.** Prevalence of the plasmid-mediated quinolone resistance genes, *aac(6)-Ib-cr*, *qepA*, and *oqxAB* in clinical isolates of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Korea. *Ann Clin Lab Sci* Spring **2012**; 42(2):191-7.
- Park YJ, Yu JK, Kim SI, Lee K, Arakawa Y.** Accumulation of plasmid-mediated fluoroquinolone resistance genes, *qepA* and *qnrS1*, in *Enterobacter aerogenes* co-producing RmtB and class A beta-lactamase LAP-1. *Ann Clin Lab Sci* **2009**; 39: 55-9.
- Park YJ, Yu JK, Lee S, Oh EJ, Woo GJ.** Prevalence and diversity of *qnr* alleles in AmpC-producing *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter*

*aerogenes*, *Citrobacter freundii* and *Serratia marcescens*: a multicentre study from Korea. *J Antimicrob Chemother* **2007**; 60: 868-71.

**Paulsen IT, Littlejohn TG, Radstrom P, Sundstrom L et al.** The 3' conserved segment of integrons contains a gene associated with multidrug resistance to antiseptics and disinfectants. *Antimicrob Agents Chemother* **1993**; 37: 761-8.

**Peloquin CA, Cumbo TJ, Nix DE, Sands MF, Shentag JJ.** Evaluation of intravenous of ciprofloxacin in patients with nosocomial lower respiratory tract infections. Impact of plasma concentrations, organism, minimum inhibitory concentration, and clinical condition on bacterial eradication. *Arch Intern Med* **1989**; 149: 2269-73.

**Périchon B, Bogaerts P, Lambert T, Frangeul L et al.** Sequence of conjugative plasmid pIP1206 mediating resistance to aminoglycosides by 16S rRNA methylation and to hydrophilic fluoroquinolones by efflux. *Antimicrob Agents Chemother* **2008**; 52: 2581-92.

**Périchon B, Courvalin P, Galimand M.** Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by QepA-mediated efflux in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **2007**; 51: 2464-69.

**Peterson J, Kaul S, Khashab M, Fisher AC, Kahn JB.** A double-blind randomized comparison of levofloxacin 750 mg once-daily for five days with ciprofloxacin 400/500 mg twice daily for 10 days for the treatment of complicated urinary tract infections and acute pyelonephritis. *Urology* **2008**; 71: 17-22.

**Peterson LR.** Quinolone molecular structure-activity relationships: what we have learned

about improving antimicrobial activity. *Clin Infect Dis* **2001**; 33 (Suppl 3): S180-6.

**Picão, RC, Poirel L, Demarta A, Silva CS, Corvaglia, AR et al.** Plasmid-mediated quinolone resistance in *Aeromonas allosaccharophila* recovered from a Swiss lake. *J Antimicrob Chemother* **2008**; 62: 948-50.

**Ploy MC, Lambert T, Couty JP, Denis F.** Integrons: an antibiotic resistance gene capture and expression system. *Clin Chem Lab Med* **2000**; 38: 483-7.

**Poirel L, Decusser JW, Nordmann P.** Insertion Sequence *ISEcp1B* is involved in expression and mobilization of a blaCTX-M beta-lactamase gene. *Antimicrob Agents Chemother* **2003**; 47(9): 2938-45.

**Poirel L, Leviandier C, Nordmann P.** Prevalence and genetic analysis of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QnrA and QnrS in *Enterobacteriaceae* isolates from a French University Hospital. *Antimicrob Agents Chemother* **2006**; 50: 3392-7.

**Poirel L, NaasT, Nordmann P.** Genetic support of extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect* **2008**; 14 (Suppl 1): 75-81.

**Poirel L, Van De LM, Mammeri H, Nordmann P.** Association of plasmid-mediated quinolone resistance with extended-spectrum beta-lactamase VEB-1. *Antimicrob Agents Chemother* **2005**; 49: 3091-4.

**Poirel L, Villa L, Bertini A, Pitout JD, Nordmann P, Carattoli A.** Expanded-spectrum  $\beta$ -lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance. *Emerg Infect Dis* **2007**; 13: 803-5.

**Poirel L, Vu N'Guyen T, Weintraub A, Leviandier C, Nordmann P.** Plasmid-mediated quinolone resistance determinant qnrS in

Enterobacter cloacae. *Clin Microbiol Infect* **2006**; 12: 1021-3.

**Pomba C, da Fonseca JD, Baptista BC, Correia JD, Martínez-Martínez L.** Detection of the pandemic O25-ST131 human virulent *Escherichia coli* CTX-M-15-producing clone harboring the *qnrB2* and *aac(6′)-Ib-cr* genes in a dog. *Antimicrob Agents Chemother* **2009**; 53: 327-8.

**Preston SL, Drusano GL, Berman AL, Fowler CL et al.** Pharmacodynamics of levofloxacin: a new paradigm for early clinical trials. *JAMA* **1998**; 279: 125-9.

**Quiroga MP, Andres P, Petroni A, Soler Bistué AJ, Guerriero L et al.** Complex class 1 integrons with diverse variable regions, including *aac(6′)-Ib-cr*, and a novel allele, *qnrB10*, associated with *ISCR1* in clinical enterobacterial isolates from Argentina. *Antimicrob Agents Chemother* **2007**; 51: 4466-70.

**Richter SN, Frasson I, Bergo C, Manganelli R, Cavallaro A, Palù G.** Characterisation of *qnr* plasmid-mediated quinolone resistance in *Enterobacteriaceae* from Italy: association of the *qnrB19* allele with the integron element *ISCR1* in *Escherichia coli*. *Int J Antimicrob Agents* **2010**; 35: 578-83.

**Rissing JP.** Antimicrobial therapy for chronic osteomyelitis in adults: role of the quinolones. *Clin Infect Dis* **1997**; 25: 1327-33.

**Rittenhouse SF, Miller LA, Utrup LJ, Poupard JA.** Evaluation of 500 Gram negative isolates to determine the number of major susceptibility interpretation discrepancies between the Vitek and MicroScan Walkaway for 9 antimicrobial agents. *Diagn Microbiol Infect Dis* **1996**; 26: 1-6.

**Robicsek A, Jacoby GA, Hooper DC.** The worldwide emergence of plasmid-mediated

quinolone resistance. *Lancet Infect Dis* **2006A**; 6(10): 629-40.

**Robicsek A, Sham DF, Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC.** Broader distribution of plasmid-mediated quinolone resistance in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* **2005**; 49(7): 3001-3.

**Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macielag M et al.** Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med* **2006B**; 12: 83-8.

**Rodríguez-Baño J, Navarro MD, Romero L, Martínez-Martínez L, Muniain MA, Perea EJ, Pérez-Cano R, Pascual A.** Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in nonhospitalized patients. *J Clin Microbiol* **2004**; **42**:1089–94.

**Rodríguez-Martínez JM, Cano ME, Velasco C, Martínez-Martínez L, Pascual A.** Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. *J Infect Chemother* **2011**; 17: 149-82.

**Rodríguez-Martínez JM, Pascual A, García I, Martínez-Martínez L.** Detection of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnr* among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing AmpC-type beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother* **2003**; 52: 703-6.

**Rodríguez-Martínez JM, Pascual A, Matin D, García I, Pachón J, Martínez-Martínez L.** Bactericidal activity of fluoroquinolones (FQ) against *Klebsiella pneumoniae* containing the plasmid-mediated resistance determinant *qnr*. 13<sup>th</sup> ESCMID (Glasgow, Escocia) **2004**; P1555.

**Rodríguez-Martínez JM, Poirel L, Cantón R, Nordmann P.** Common region CR1 for expression of antibiotic resistance genes.

*Antimicrob Agents Chemother* **2006**; 50(7): 2544-6.

**Rodríguez-Martínez JM, Velasco C, García I, Cano ME, Martínez-Martínez L, Pascual A.** Characterisation of integrons containing the plasmid-mediated quinolone resistance gene *qnrA1* in *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Antimicrob Agents* **2007**; 29(6): 705-9.

**Rodríguez-Martínez JM, Velasco C, Pascual A, García I, Martínez-Martínez L.** Correlation of quinolone resistance levels and differences in basal and quinolone-induced expression from three *qnrA*-containing plasmids. *Clin Microbiol Infect* **2006**; 12: 440-5.

**Rodríguez-Martínez JM.** Mecanismos de Resistencia a quinolonas mediada por plásmidos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **2005**; 23(1): 25-31.

**Rodríguez-Martínez, JM.** Resistencia a quinolonas mediada por plásmido en *Enterobacteriaceae*. Tesis doctoral. **2006**.

**Romanowski MJ, Gibney SA, Burley SK.** Crystal structure of the *Escherichia coli* SbmC protein that protects cells from the DNA replication inhibitor microcin B17. *Proteins* **2002**; 47: 403-7.

**Romero L, López L, Martínez-Martínez L, Guerra B, Hernández JR, Pascual A.** Characterization of the first CTX-M 14-producing *Salmonella enterica* serotype Enteritidis isolate. *J Antimicrob Chemother* **2004**; 53:1113-14.

**Rowe-Magnus DA, Guerout AM, Mazel D.** Super-integrons. *Res Microbiol* **1999**; 150: 641-51.

**Rowe-Magnus DA, Mazel D.** Integrons: natural tools for bacterial genome evolution. *Curr Opin Microbiol* **2001**; 4: 565-9.

**Ruiz E, Sáenz Y, Zaragoza M, Rocha-Gracia R, Martínez-Martínez L et al.** *qnr*, *aac(6′)-Ib-cr* and *qepA* genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp.: genetic environments and plasmid and chromosomal location. *J Antimicrob Chemother* **2012**; 67: 886-97.

**Ryoo NH, Kim EC, Hong SG, Park YJ, Lee K, Bae IK, Song EH, Jeong SH.** Dissemination of SHV-12 and CTX-M-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* and emergence of GES-3 in Korea. *J. Antimicrob. Chemother.* **2005**; 56:698–702.

**Sabaté M, Prats G.** Estructura y función de los integrones. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **2002**; 20(7): 341-5.

**Sánchez MB, Martínez JL.** SmQnr contributes to intrinsic resistance to quinolones in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother* **2010**; 54: 580-1.

**Sánchez-Céspedes J, Marti S, Toto SM et al.** Two chromosomally located *qnrB* variants, *qnrB6* and the new *qnrB16*, in *Citrobacter* spp. Isolates causing bacteraemia. *Clin Microbiol Infect* **2009**; 15: 1132-8.

**Sanders CC et al.** Potential impact of the VITEK 2 system and the advanced expert system on the clinical laboratory of a university-based hospital. *J Clin Microbiol* **2001**; 39: 2379-85.

**Sanders CC.** Microbiology of fluoroquinolones. In: Sanders WE Jr, Sanders CC, editors. Fluoroquinolones in the treatment of infectious diseases. *Glenview: Physicians and Scientists Publishing* **1990**; p. 1-28.

**Sendzik J, Lode H, Stalhmann R.** Quinolone-induced arthropathy: an update focusing on new mechanistic and clinical data. *Int J Antimicrob Agents* **2008**; 33: 194-200.

- Shea ME, Hiasa H.** Interactions between DNA helicases and frozen topoisomerase IV-quinolone-DNA ternary complexes. *J Biol Chem* **1999**; 274: 22747-54.
- Shen LL, Mitscher LA, Sharma PN, O'Donell TJ, Chu DW, Cooper CS et al.** Mechanism of inhibition of DNA gyrase by quinolone antibacterials: a cooperative drug-DNA binding model. *Biochemistry* **1989**; 3886-94.
- Shen P, Jiang Y, Zhou Z, Zhang J, Yu Y, Li L.** Complete nucleotide sequence of pKP96, a 67 850 bp multiresistance plasmid encoding *qnrA1*, *aac(6')-Ib-cr* and *bla<sub>CTX-M-14</sub>* from *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* **2008**. 62: 1252-6.
- Snyder L, Champness W.** Molecular genetics of bacteria. ASM Press: 1<sup>a</sup> ed. 1997; 3<sup>a</sup> ed. **2007**. ISBN: 978-1-55581-399-4.
- Soge OO, Adeniyi BA, Roberts MC.** New antibiotic resistance genes associated with CTX-M plasmids from uropathogenic Nigerian *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* **2006**; 58: 1048-53.
- Sørensen AH, Hansen LH, Johannesen E, Sørensen SJ.** Conjugative plasmid conferring resistance to olaquinox. *Antimicrob Agents Chemother* **2003**; 47: 798-9.
- Spangler SK, Visalli MA, Jacobs MR, Appelbaum PC.** 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* **1996**; 40: 772-5.
- Stern MJ, Ames GF, Smith NH, Robinson EC, Higgins CF.** Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. *Cell* **1984**; 37: 1015-26.
- Stevens DL, Bisno AL, Chambers HF, Everett ED, Dellinger P et al.** Practice guidelines for the diagnosis and management of skin and soft-tissue infections. *Clin Infect Dis* **2005**; 41: 1373-406.
- Stokes HW, Hall RM.** A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol Microbiol* **1989**; 3: 1669-83.
- Stokes HW, Tomaras C, Parsons Y, Hall RM.** The partial 3'-conserved segment duplications in the integrons In6 from pSa and In7 from pDGO100 have a common origin. *Plasmid* **1993**; 30: 39-50.
- Strahilevitz J, Hooper DC.** 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* **2005**; 49: 1949-56.
- Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A.** Plasmid-Mediated Quinolone Resistance: a Multifaceted Threat. *Clin Microbiol Rev* **2009**; 22(4): 664-89.
- Takei M, Fukuda H, Kishii R, Hosaka M.** Target preference of 15 quinolones against *Staphylococcus aureus*, based on antibacterial activities and target inhibition. *Antimicrob Agents Chemother* **2001**; 45: 3544-7.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA et al.** Interpreting Electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* **1995**; 33: 2233-9.
- Toleman MA, Bennett PM, Walsh TR.** ISCR elements: novel gene-capturing systems of the



21<sup>st</sup> century? *Microbiol Mol Biol Rev* **2006**; 70: 296-316.

**Tran JH, Jacoby GA, Hooper DC.** Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicrob Agents Chemother* **2005**; 49: 118-25.

**Tran JH, Jacoby GA, Hooper DC.** Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein QnrA with *Escherichia coli* topoisomerase IV. *Antimicrob Agents Chemother* **2005B**; 49: 3050-2.

**Tran JH, Jacoby GA, Hooper DC.** The plasmid-mediated protein Qnr protects topoisomerase IV from ciprofloxacin inhibition and interacts with the ParE subunit. **2004**; C1-604.

**Tran JH, Jacoby GA.** Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* **2002**; 99: 5638-42.

**Tuma J, Connors WH, Stitelman DH, Richert C.** On the effect of covalently appended quinolones on termini of DNA duplexes. *J Am Chem Soc* **2002**; 124: 4236-46.

**Valentine CR, Heinrich MJ, Chisoe SL, Roe BA.** DNA sequence of direct repeats of the *sull* gene of plasmid pSa. *Plasmid* **1994**; 32: 222-7.

**Valverde Romero ED, Parras Padilla T, Herrero Hernández A, Pérez Grande R, Fernández Vázquez M, García García MI, García-Rodríguez JA, Muñoz Bellido JL.** 2007. Prevalence of clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. producing multiple extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Diagnostic Microbiology & Infectious Disease* **2007**; 59:433-437.

**Van Belkum A.** DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR. *Clin Microbiol Rev* **1994**; 7: 174-8.

**Velasco C, Rodríguez-Martínez J, Briales A et al.** Smaqnr, a new chromosome-encoded quinolone resistance determinant in *Serratia marcescens*. *J Antimicrob Agents Chemother* **2010**; 65: 239-42.

**Verdet C, Arlet G, Barnaud G, Lagrange PH, 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* **2000**; 44: 222-5.

**Vetting MW, Hegde SS, Fajardo JR, Fiser A, Roderick SL et al.** Pentapeptide repeat proteins. *Biochemistry* **2006**; 45: 1-10.

**Walker RC.** The fluoroquinolones. *Mayo Clin Proc* **1999**; 74: 1030-7.

**Wang JC.** Interaction between DNA and an *Escherichia coli* protein omega. *J Mol Biol* **1971**; 55: 523-33.

**Wang M, Guo Q, Xu X, Wang X, Ye X et al.** New Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Gene, *qnrC*, Found in a Clinical Isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother* **2009**; 53(5): 1892-7.

**Wang M, Sahm DF, Jacoby GA, Hooper DC.** Emerging plasmid-mediated quinolone resistance associated with the *qnr* gene in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* **2004**; 48: 1295-9.

**Wang M, Tran JH, Jacoby GA, Zhang Y, Wang F, Hooper DC.** Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. *Antimicrob Agents Chemother* **2003**; 47: 2242-8.

**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. 45<sup>th</sup> *Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; Washington, DC, USA; Dec 16-19 **2005**. Abstract C2-785.

**Wang, JC.** DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem* **1996**; 65: 635-92.

**Willmott CJ, Critchlow SE, Eperon IC, Maxwell A.** The complex of DNA gyrase and quinolone drugs with DNA forms a barrier to transcription by RNA polymerase. *J Mol Biol* **1994**; 242: 351-63.

**Willmott CJ, 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* **1993**; 37: 126-7.

**Wolfson JS, Hooper DC.** Fluoroquinolone antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* **1989**; 2: 378-424.

**Wu JJ, Ko WC, Chiou CS, Chen HM, Wang LR, Yan JJ.** Emergence of Qnr determinants in human *Salmonella* isolates in Taiwan. *J Antimicrob Chemother* **2008**; 62: 1269-72.

**Wu JJ, Ko WC, Tsai SH, Yan JJ.** Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QnrA, QnrB, and QnrS among clinical isolates of *Enterobacter cloacae* in a Taiwanese hospital. *Antimicrob Agents Chemother* **2007**; 51: 1223-7.

**Xu X, Wu S, Ye X, Liu Y, Shi W, Zhang Y, Wang M.** Prevalence and expression of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnrA1*. *Antimicrob Agents Chemother* **2007**; 51: 4105-10.

**Yamane K, Wachino J, Suzuki S and Arakawa Y.** Plasmid-mediated *qepA* gene among *Escherichia coli* clinical isolates from Japan.

*Antimicrob Agents Chemother* **2008**; 52: 1564-6.

**Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Kimura K, Shibata N et al.** New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* **2007**; 51: 3354-60.

**Yang H, Chen H, Yang Q, Chen M, Wang H.** High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance genes *qnr* and *aac(6′)-Ib-cr* in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from nine teaching hospitals in China. *Antimicrob Agents Chemother* **2008**; 52: 4268-73.

**Zamble DB, Miller DA, Heddle JG, Maxwell A et al.** In vitro characterization of DNA gyrase inhibition by microcin B17 analogs with altered bisheterocyclic sites. *Proc Natl Acad Sci USA* **2001**; 98: 7712-7.