



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Facultat de Medicina.

Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries.

Programa 2000-2002 - Microbiologia Mèdica.

“Bases Moleculares de la Resistencia a  
Quinolonas en *Staphylococcus aureus*,  
*Streptococcus pneumoniae* y  
*Corynebacterium* spp.”

Projecte de Tesi Doctoral per optar al grau de  
Doctor en Biologia.

Presentada per: Josep M<sup>a</sup> Sierra i Ortigosa.

Sota la direcció del Dr. Jordi Vila Estapé.



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Dr. Jordi Vila Estapé, Professor Titular del Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries de la Universitat de Barcelona i Consultor del Servei de Microbiologia de l'Hospital Clínic de Barcelona.

CERTIFICA:

Que el projecte de tesi doctoral titulat: “**BASES MOLECULARES DE LA RESISTENCIA A QUINOLONAS EN *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* Y *Corynebacterium spp.*” presentat per Josep M<sup>a</sup> Sierra i Ortigosa, ha estat realitzat a la Unitat de Medicina del Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries, sota la seva direcció i que compleix tots els requisits establerts per a la seva tramitació i posterior defensa davant del tribunal corresponent.**

Dr. Jordi Vila Estapé

Director de la tesi Doctoral

Josep M Sierra i Ortigosa

Doctorant

Barcelona, juliol 2005

Als meus pares

i al meu germà

A la Irene

i la Laia

( i ¿?)

**AGRAIMENTS**

Aquest projecte de Tesi Doctoral, no hauria tingut lloc sense la col·laboració de i la participació de moltes persones.

Agrair a la Dra. M T Jiménez de Anta, Cap del Servei de Microbiologia de l'Hospital Clínic, el seu suport durant tots aquests anys, avalant-me també en l'obtenció de més d'una beca.

Al Dr. Jordi Vila, Director d'aquesta Tesi, per introduir-me en el camp de la recerca, per els seus consells per l'elaboració dels treballs així com per el seu suport i la confiança dipositada en mi.

A tot departament de Microbiologia, en general, no m'agradaria deixar-me a ningú, però en especial a tota aquella gent amb qui la col·laboració a estat més estreta.

Al departament d'infeccioses, amb els quals he tingut el plaer de treballar.

Als companys del laboratori, començant per aquells que actualment estan treballant en altres llocs, com la Mireia Arnedo, la Maty, en Quim, la Margarita, en Paco, en Francesc alguns dels quals han format part del grup de recerca . Als companys actuals, Sara S, Sara M, Javi, Marc, Roberto, i les recent incorporades Anna i Vero, tots ells han contribuït de forma diferent a aquesta Tesi. Un agraïment especial a tots el companys que han contribuït directament, ja sigui a la part experimental o a la redacció i correcció de la Tesi. També cal recordar a la resta de “becaris” d'altres grups de recerca (Cristina Gil, Cristina, Yolanda, Griselda, Anna Feliu... ) amb els quals he pogut compartir moltes estones divertides, i als quals he pogut empenyar demanant-los qualsevol cosa, un reactiu o un consell i sobretot dinars...

Per altra banda hi ha també un munt de gent que ha col·laborat en aquest treball però la seva col·laboració encara que hagi estat de manera indirecta el seu suport HA ESTAT, ES I SERA sempre indispensable.

Començaré doncs per agrair el suport d'uns bons amics, els quals vaig conèixer a la facultat la Miriam i en Pep, l'Anna, i la Marina i en Jordi els quals ha hagut de suportar-me durant tot aquest temps.

Als meus sogres qui també m'han donat el seu suport, en especial a l'ISABEL una persona que sense el seu suport i sobretot el seu ajut hauria estat difícil porta a terme aquest projecte.

Als meus PARES i al meu GERMA, per el seu suport incondicional, no només per arribar a assolir aquesta fita, sinó per estar sempre.

Per últim, a la IRENE, la LAIA (i ¿en/na?) , la meva dona i filla les quals m'han encoratjat des de el primer dia, persones insubstituïbles en la meva vida, i sense el suport d'elles no hagués estat possible arribar fins aquí.

A TOTS GRÀCIES, per l'ajut que m'heu donat.

# ***ÍNDICE***



---

1. <a href="#">INTRODUCCIÓN</a> .....	1
1.1. <a href="#">Introducción</a> .....	2
1.2. <a href="#">Estructura de las quinolonas</a> .....	7
1.2.1. <a href="#">Estructura básica</a> .....	7
1.2.2. <a href="#">Relación estructura actividad</a> .....	10
1.2.3. <a href="#">Estructura química de diversas quinolonas</a> .....	18
1.3. <a href="#">Clasificación de las quinolonas</a> .....	24
1.3.1. <a href="#">Clasificación química</a> .....	25
1.3.2. <a href="#">Clasificación biológica</a> .....	27
1.4. <a href="#">Farmacocinética</a> .....	28
1.4.1. <a href="#">Absorción</a> .....	28
1.4.2. <a href="#">Distribución</a> .....	26
1.4.3. <a href="#">Eliminación</a> .....	30
1.5. <a href="#">Utilización clínica</a> .....	32
1.5.1. <a href="#">Quinolonas en pediatría</a> .....	35
1.6. <a href="#">Efectos adversos</a> .....	36
1.6.1. <a href="#">Interacciones con otros fármacos</a> .....	38
1.7. <a href="#">Mecanismos de acción</a> .....	41
1.7.1. <a href="#">Modelo de acción</a> .....	42
1.7.2. <a href="#">Moléculas diana</a> .....	44
1.7.2.1. <a href="#">ADN girasa</a> .....	44
1.7.2.2. <a href="#">Topoisomerasa IV</a> .....	45
1.8. <a href="#">Mecanismos de resistencia</a> .....	47
1.8.1. <a href="#">Alteración de la diana</a> .....	48

---

---

1.8.1.1. <a href="#">ADN girasa</a> .....	48
1.8.1.1.1. <a href="#">Gen <i>gyrA</i></a> .....	48
1.8.1.1.2. <a href="#">Gen <i>gyrB</i></a> .....	51
1.8.1.2. <a href="#">Topoisomerasa IV</a> .....	52
1.8.1.2.1. <a href="#">Gen <i>parC</i> (Gen <i>grlA</i> en <i>Staphylococcus aureus</i>)</a> .....	52
1.8.1.2.2. <a href="#">Gen <i>parE</i> (Gen <i>grlB</i> en <i>Staphylococcus aureus</i>)</a> .....	55
1.8.1.3. <a href="#">Diana principal/ diana secundaria</a> .....	56
1.8.2. <a href="#">Sistemas de expulsión activa</a> .....	56
1.8.2.1. <a href="#">Resistencia mediada por sistemas de expulsión</a> .....	60
1.8.3. <a href="#">Otros mecanismos de resistencia</a> .....	61
1.8.3.1. <a href="#">Alteración de la expresión de las proteínas diana</a> .....	61
1.8.3.2. <a href="#">Mecanismos de resistencia mediados por plásmidos</a> .....	62
1.8.3.3. <a href="#">Alteración de las porinas</a> .....	63
1.9. <a href="#">Mecanismos de transferencia de la resistencia</a> .....	64
1.10. <a href="#">Efectos producidos por la propia molécula de quinolona</a> .....	66
1.10.1. <a href="#">Inducción de la movilidad de elementos genéticos</a> .....	66
1.10.2. <a href="#">Curación de plásmidos</a> .....	68
1.10.3. <a href="#">Mutagenicidad</a> .....	69
1.11. <a href="#">El problema de la multiresistencia</a> .....	70
1.11.1. <a href="#">Artículo I</a> .....	71
2. <a href="#">Staphylococcus aureus</a> .....	72
3. <a href="#">Streptococcus pneumoniae</a> .....	77
4. <a href="#">Corynebacterium spp.</a> .....	81

---

---

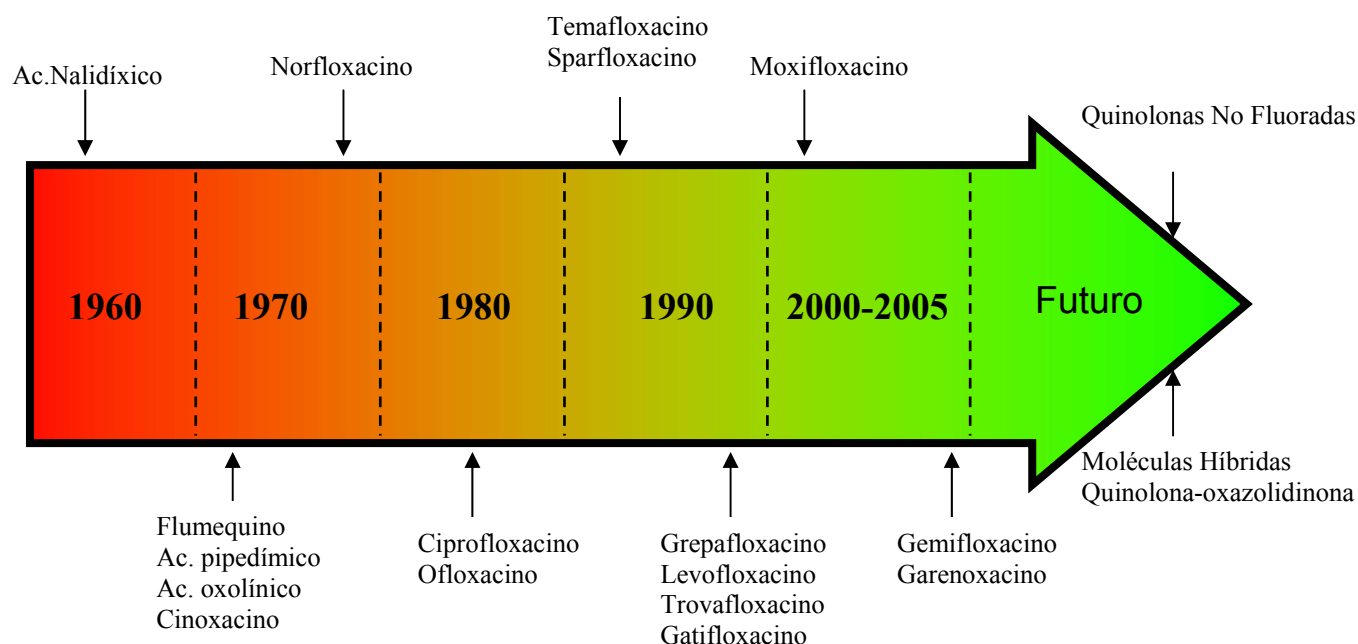
5. <u>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</u> .....	84
6. <u>RESULTADOS</u> .....	86
6.1. <u>ARTICULO II</u> .....	87
6.2. <u>ARTICULO III</u> .....	89
6.3. <u>ARTICULO IV</u> .....	91
6.4. <u>ANEXO</u> .....	92
6.5. <u>ARTICULO V</u> .....	99
6.6. <u>ARTICULO VI</u> .....	101
7. <u>DISCUSIÓN</u> .....	103
7.1. <u>Artículos II, III y IV. Bases moleculares de la resistencia a quinolonas en <i>S. aureus</i></u> .....	106
7.2. <u>ANEXO y Artículo V. Selección de cepas de <i>S.aureus</i> y <i>S.pneumoniae</i> resistentes y mutagenicidad de las quinolonas</u> .....	118
7.3. <u>Artículo VI. Mecanismo de resistencia a quinolonas en <i>Corynebacterium spp</i></u> .....	124
8. <u>CONCLUSIONES</u> .....	129
9. <u>BIBLIOGRAFÍA</u> .....	133

# **1 INTRODUCCIÓN**

## 1.1 Introducción

Las quinolonas son un grupo de antibacterianos sintéticos, en 1949 Price *et al.* (193), describió un derivado alcaloide, con una estructura parecida a las quinolonas pero sin actividad biológica. En 1960 Barton *et al.* (17), patentan unas 80 moléculas con estructura de quinolona (estructura que se detallará más adelante), una de las moléculas fue aislada de una solución líquida durante la síntesis de la cloroquina, un agente antimalárico, el ácido 6-cloro-1-*H*-4-oxoquinolina-3-carboxílico, este compuesto demostró tener actividad antimicrobiana (32). Posteriormente en 1962 se patentó lo que sería la primera quinolona, el ácido nalidíxico (137), el cual fue introducido en la práctica clínica en 1967 (53). El ácido nalidíxico presentaba una modesta actividad frente a microorganismos Gram-negativos, y algunas limitaciones en cuanto a sus parámetros farmacodinámicos y farmacocinéticos, aunque las concentraciones alcanzadas en el tracto urinario eran altas, lo que le hizo un buen candidato para utilizar en el tratamiento de las infecciones urinarias causadas por enterobacterias (10,53).

La aparición del ácido nalidíxico marcó el inicio del desarrollo de las quinolonas (Figura 1). Aunque no fue hasta mediados de los años 70, cuando aparecen nuevos compuestos, en primer lugar aparecieron el cinoxacino, y el ácido oxolínico, los cuales no aportaban mejoras substanciales en comparación con el ácido nalidíxico, estos dos compuestos también estaban indicados para su uso en infecciones urinarias. En 1973 apareció la primera quinolona fluorada (con un grupo flúor en la posición 6), el flumequino (10,198), esta quinolona es unas diez veces más activa en comparación con el ácido nalidíxico frente a bacterias Gram-negativas (32,198), además ya presentaba actividad frente a bacterias Gram-positivas (10,53,198). Aunque la primera molécula considerada como fluoroquinolona fue el norfloxacino que apareció años más tarde.

**Figura 1.** Cronología de la aparición de moléculas de quinolona

Concretamente, entre finales de la década de los 70 y principios en la década de los 80 apareció el norfloxacinó. Y muy rápidamente se desarrollaron nuevas fluoroquinolonas, pefloxacino, enoxacinó, lomefloxacino fleroxacinó, ciprofloxacino y ofloxacino de manera más o menos simultánea. Estas nuevas fluoroquinolonas presentaban un mayor espectro de actividad, ampliado a organismos Gram-positivos y con una gran actividad sobre Gram-negativos unas 1000 veces más que su antecesor, el ácido nalidíxico.

En el caso del norfloxacin, lomefloxacin y enoxacin, por ejemplo, al igual que el ácido nalidíxico los parámetros farmacocinéticos, las concentraciones del fármaco en tejidos y sangre no eran suficientemente altas, mientras que si eran suficientes para su uso en infecciones urinarias (114,131,163,179), también el norfloxacin fue utilizado para la descontaminación intestinal en pacientes sometidos a transplantes por su absorción a nivel del tracto digestivo (82). Por otro lado el ciprofloxacino y el ofloxacino, por ejemplo, si presentaban una mayor biodisponibilidad, lo que favorecía el alcanzar altos niveles de antibiótico en sangre, estas características permitieron el uso de estas moléculas para el tratamiento de infecciones sistémicas, además de las infecciones urinarias (163,263).

A principios de la década de los 90 aparecieron nuevas moléculas, el esparfloxacino y el temafloxacino (8,53), estas dos nuevas quinolonas mejoraban el espectro de actividad, especialmente frente a microorganismos Gram-positivos como los neumococos (41), y mejoraban su actividad frente a anaerobios (66,91,167), mientras que seguían manteniendo una cierta buena actividad frente a patógenos Gram-positivos como los estafilococos, parecida a la actividad del ciprofloxacino (10).

El desarrollo de nuevas moléculas se centró en mejorar la actividad frente a bacterias Gram-positivas, particularmente frente a neumococos, y bacterias anaerobias, a la vez que era condición que mantuvieran actividad frente a Gram-negativos. Esto llevó a finales de los años 90 hasta nuestros días el desarrollo de nuevas fluoroquinolonas: gemifloxacino, trovafloxacino, moxifloxacino, levofloxacino, grepafloxacino, tosufloxacino, y clinafloxacino (53,179). Estas moléculas son activas para todos los patógenos primarios del tracto respiratorio, por este motivo a este grupo de antimicrobianos también se le conoce con el

nombre de “respirolonas”, y se caracterizan por tener una gran actividad frente a cocos Gram-positivos así como frente a algunos patógenos intracelulares, manteniendo actividad frente a Gram-negativos (16,20,42,47,85,108,142,261,262). Cabe destacar, que no todas las moléculas de este grupo han llegado a usarse en la práctica clínica diaria, muchas de ellas suspendieron sus ensayos clínicos y otras fueron retiradas del mercado debido a problemas de toxicidad y/o efectos adversos, como fue el caso de gemifloxacino, clinafloxacino, trovafloxacino o grepafloxacino (204).

Recientemente, y gracias al mayor conocimiento que se tiene de la relación estructura-actividad de las quinolonas, se han desarrollado un nuevo grupo de quinolonas que se caracterizan por la ausencia del átomo de Flúor en posición 6, característico de las fluoroquinolonas. Estas nuevas moléculas son conocidas con el nombre de desfluoroquinolonas o quinolonas no fluoradas (QNF), siendo el garenoxacino el primer representante de este grupo (143), aunque esta molécula si presenta dos átomos de flúor en su estructura. El garenoxacino presenta un amplio espectro de acción y una muy buena actividad frente a Gram-positivos, superior a la del ciprofloxacino, asimismo también presenta actividad frente a Gram-negativos y anaerobios (143). Dentro de este grupo se están desarrollando nuevos compuestos, como el PGE-9262932, el PGE-9509924, el PGE-4175997, o el T-3912 entre otros (121,202,265), y si nos basamos en los datos de susceptibilidad “in vitro” estas QNFs son más activas que muchas fluoroquinolonas, como por ejemplo ciprofloxacino, trovafloxacino o gatifloxacino, siendo su actividad comparable al clinafloxacino (202).

Actualmente existen también nuevas fluoroquinolonas en proceso de desarrollo, así podemos encontrar la molécula WCK771 que se encuentran en fase I de desarrollo, la DK-507k o la ABT-492 (11,31,173). También se han descrito otras nuevas quinolonas E-4767 y E-5065



que como el clinafloxacino presentan un átomo de Cloro en su estructura (74). Todas ellas, como las anteriores, pretenden mejorar la actividad frente a patógenos Gram-positivos en especial frente a estafilococos y neumococos ya sean estos sensibles o resistentes a las anteriores quinolonas y frente a microorganismos fastidiosos.

Como consecuencia del aumento de aislamientos de bacterias multirresistentes, otro grupo de antimicrobianos que se está desarrollando son los antibióticos híbridos. Esta es una nueva aproximación, en lugar de buscar nuevas moléculas diana para el diseño de nuevos antibióticos, se unen dos núcleos de dos moléculas antibacterianas en una sola, de esta manera puede actuar sobre dos dianas distintas simultáneamente y ofrece la posibilidad de reducir la aparición de resistencias. Esta idea apareció por primera vez en 1994 al unir una molécula de quinolona con una sulfonamida, y aunque mejoraba la actividad “in vitro” respecto a ciprofloxacino o norfloxacino frente a cepas de estafilococo no se puede considerar como una molécula híbrida ya que ésta no retuvo la actividad como sulfonamida (5,111).

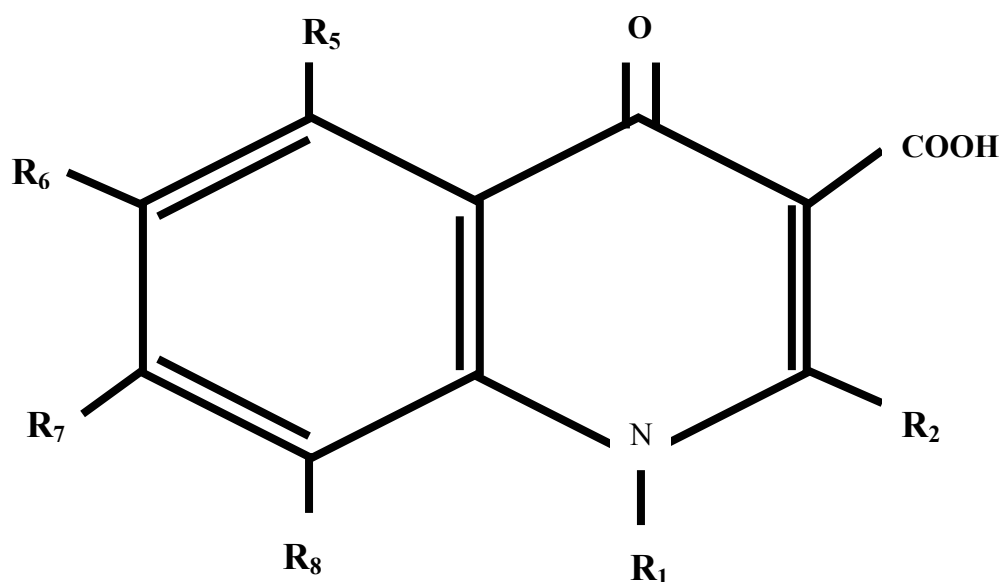
En este sentido se han diseñado y sintetizado recientemente moléculas híbridas, uniendo dos grupos de antimicrobianos, quinolonas y oxazolidinonas (86,110,111). Estas moléculas presentan una doble actividad, actuando sobre las mismas dianas que actuarían las moléculas de quinolona y oxazolidinona por separado. Estos híbridos muestran una buena actividad frente a gran variedad de bacterias, incluyendo a estafilococos multirresistentes, enterococos resistentes a vancomicina, estreptococos, bacterias Gram-negativas “fastidiosas”.

También se han diseñado moléculas híbridas entre quinolonas y cetólidos (2). Estas moléculas presentan alguna ventaja y mejoran la actividad de los cetólidos aunque no se ha demostrado que también actúen como quinolona.

## 1.2 Estructura de las quinolonas

### 1.2.1 Estructura básica.

El nombre de quinolona se ha establecido y generalizado para favorecer la comparación entre moléculas de este grupo, dado que todas ellas comparten el mismo mecanismo de acción. De este modo podemos ver que todas estas moléculas poseen la misma estructura básica, es decir, el mismo núcleo (figura 2).



**Figura 2.** Estructura básica o núcleo de las quinolonas.

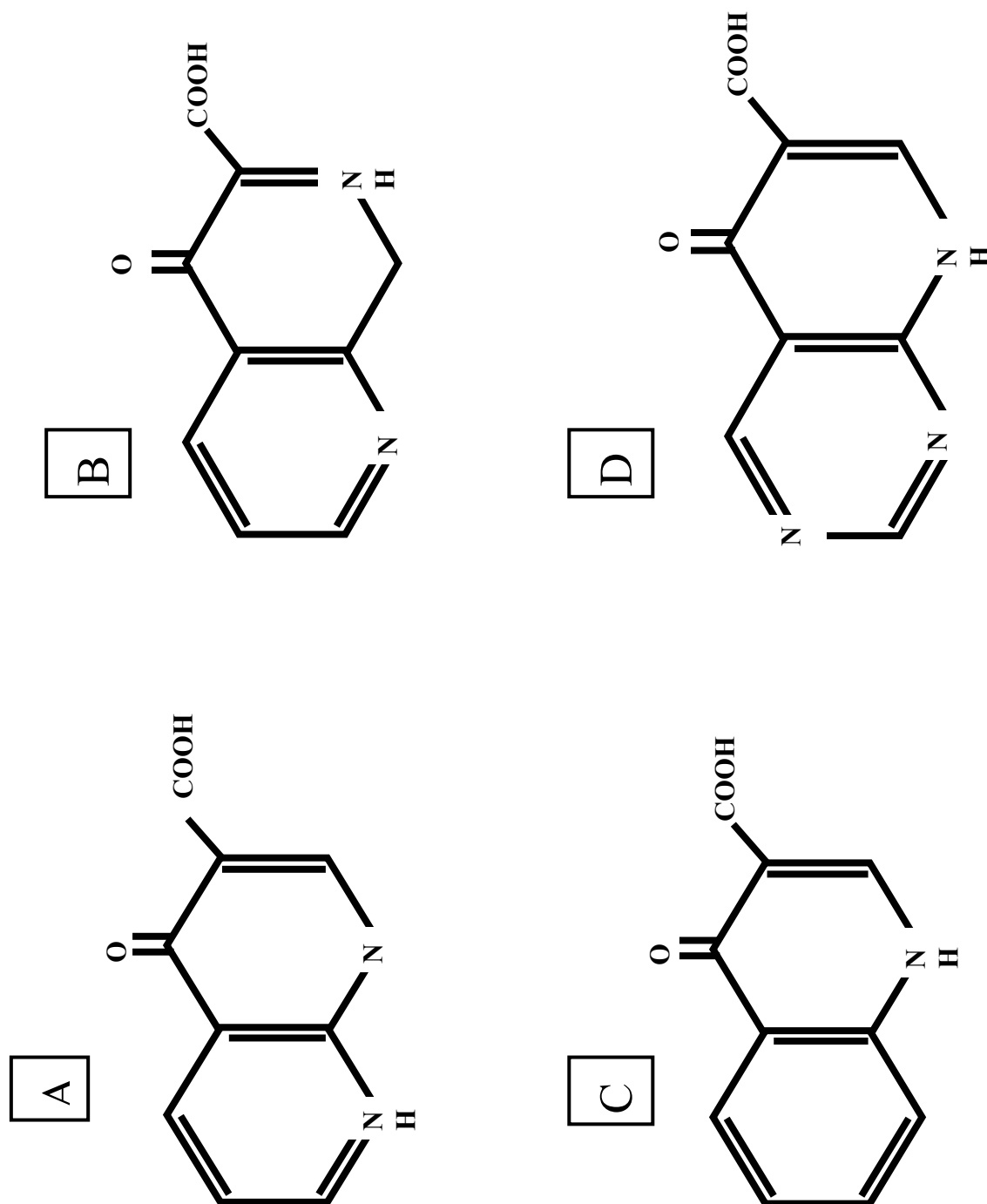
Aunque, desde el punto de vista químico todas las quinolonas sintetizadas se engloban o derivan de 4 grupos (Figura 3):

1. 4-oxo-cinolinas o 4-cinolonas. (Figura 3A)
2. 4-oxo-piridopirimidinas o 4-pirimidonas. (Figura 3B)
3. 4-oxo-quinolinas o 4-quinolonas. (Figura 3C)
4. 4-oxo-naftiridinas o 4-naftiridonas. (Figura 3D)

De todas estas, solo las 4-quinolonas y las 4-naftiridonas han sido desarrolladas, ya que la presencia de un nitrógeno en posición 2 (figura 3A) o en posición 6 (figura 3B) dan lugar a una reducción notable de la actividad (88).

El desarrollo de las quinolonas se ha visto favorecido, no solo por la posibilidad de modificar su estructura básica, sino también por la posibilidad de alterar seis radicales, es decir, todas las posiciones de la molécula, excepto 2, la posición 3 que presenta un radical carboxilo y la posición 4 con un radical ceto. Todas estas posibilidades de modificar o alterar la molécula va a dar lugar a variaciones en la actividad de las quinolonas frente a los microorganismos y a modificaciones en los parámetros farmacocinéticos, así como también se puede ver alterada la toxicidad de la molécula y las interacciones que presente con otros fármacos.

De esta forma y por su fácil síntesis se han desarrollado una gran cantidad de compuestos, hasta el día de hoy hay unas 10.000 moléculas patentadas (8). Aunque la gran mayoría de ellas no han proliferado y no se han investigado debido a problemas de toxicidad o por el contrario no aportan ventajas sustanciales sobre las quinolonas existentes.



**Figura 3.** Diferentes estructuras químicas que conforman el grupo de las quinolonas.

(A) 4-oxo-cinolin-2(1H)-one-3-carboxylic acid (4-cinolonas). (B) 4-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyridopyrimidin-2(1H)-one-3-carboxylic acid (4-pirimidonas)

(C) 4-oxo-quinolin-2(1H)-one-3-carboxylic acid (4-quinolonas). (D) 4-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyridopyrimidin-2(1H)-one-3-carboxylic acid (4-naftiridonas).

### 1.2.2 Relación entre estructura y actividad.

La actividad antibacteriana de la molécula de quinolona depende no solo de que posea el núcleo intacto, sino también de la naturaleza de los radicales periféricos que conforman la molécula así como también de su relación espacial. Estos sustituyentes ejercen influencia sobre algunos parámetros, como la actividad antibacteriana de la molécula incrementando su afinidad por los enzimas diana, alterando la penetración de la quinolona al interior celular o alterando los parámetros farmacocinéticos. En la Figura 4 se muestra un esquema donde se relacionan los diferentes radicales con las propiedades que pueden modificar.

**Posición 3 y 4.** En estas dos posiciones encontramos un grupo carboxilo y un grupo ceto, respectivamente (Figura 2). Estos dos grupos son indispensables para que la molécula presente actividad antibacteriana, ya que son parte importante en la formación del complejo Quinolona-Enzima-ADN. Su función es la de unirse al ADN, de manera que fijan el complejo y no dejan que las topoisomerasas ejerzan su función. Si el radical en posición 3 se sustituye la molécula ve reduce notablemente su actividad salvo en los casos *in vivo* que este radical se vuelve a convertir en carboxilo (38,98)

**Posición 2.** No existe mucha información sobre cual es su papel, ya que no se han realizado muchos cambios sobre esta posición. Se postula que este radical debe ser pequeño ya que se sitúa muy cerca del sitio de unión con el ADN y que un radical de gran tamaño no permitiría la unión de la molécula al ADN. La práctica totalidad de las quinolonas presentan un Hidrógeno en esta posición, una alternativa sería sustituir el H<sub>2</sub> por un átomo de Nitrógeno, el cinoxacino, aunque esta sustitución no determina un aumento de actividad, por lo que esta alternativa no se ha desarrollado (38,88).

**Posición 5.** Esta posición parece “controlar” la actividad de la molécula, así como su espectro de acción, concretamente modificaciones en este radical se ha visto que incrementan la actividad de la molécula frente a bacterias Gram-positivas, aunque está fuertemente influenciado a sustituciones presentes en el resto de la molécula (10). Yoshida y col (267) encontraron que un grupo metilo en esta posición aumentaba la actividad frente a bacterias Gram-positivas y no en bacterias Gram-negativas.

La mayoría de las quinolonas presentan un hidrogeno en esta posición, aunque un grupo amino (esparfloxacino), o un grupo hidroxilo o metilo (grepafloxacino) incrementan la actividad frente a Gram-positivos (8,88,189). En estas dos quinolonas anteriormente citadas se han asociado los efectos adversos que producían con el radical en esta posición (98).

**Posición 6.** La adición de un grupo flúor en esta posición mejoró la actividad intrínseca de la molécula de 5 a 100 veces comparado con las anteriores moléculas que no poseían esta sustitución. La incorporación de este átomo de flúor dio lugar a lo que conocemos como fluoroquinolonas. En un principio se relacionaba la posesión de este átomo de flúor con la mayor actividad de la molécula (38,202) y con una mayor penetración de la molécula al interior celular, aunque hoy en día se están desarrollando un nuevo grupo de quinolonas, las QNFs, cuyo principal representante es el garenoxacino (BMS-284756), y que no presentan este grupo flúor. En este caso las QNFs presentan un Hidrógeno en esta posición. Estas nuevas quinolonas mantienen o mejoran poco su actividad frente a bacterias Gram-negativas y patógenos atípicos, y aumentan mucho su actividad frente a patógenos Gram-positivos (121,202). Este grupo de nuevas moléculas se encuentra actualmente en pleno desarrollo.

**Posición 8.** Las sustituciones en este radical van a dar lugar a cambios en la estructura tridimensional de las moléculas (88). Además de modificar los parámetros farmacocinéticos y favorecer una mayor actividad frente a anaerobios (10,98). Este radical se ha relacionado con la mutagenicidad de la molécula (**artículo V**).

Las quinolonas derivadas de las 4-naftiridonas (Figura 3D) no permiten ningún cambio en esta posición (98), pero la presencia de este átomo de Nitrogeno en posición 8 confiere a estos derivados una gran actividad *in vitro* e *in vivo* (38). En este grupo podemos encontrar al gemifloxacino o al trovafloxacino.

En cambio, las moléculas derivadas de las 4-quinolonas, si permiten el modificar este radical, así pues podemos encontrar un radical halógeno en esta posición, (cloro o flúor) como sería el caso del clinafloxacino o esparfloxacino, que presentan un gran aumento de actividad frente a anaerobios (10). También podemos encontrar en esta posición un grupo metoxi o metilo (moxifloxacino y gatifloxacino respectivamente) que mejoran su actividad frente a bacterias Gram-positivas y anaerobios, incluso aunque estos sean resistentes a las quinolonas más antiguas (88,189). Otro radical que podemos encontrar es un puente entre los radicales 1 y 8, una benzoxacina, como por ejemplo el levofloxacino.

La presencia de estos diferentes radicales en la molécula de quinolona parece determinar qué topoisomerasa será la diana principal de dicha quinolona (al menos en Gram-positivos). Así pues, las moléculas con un halógeno en esta posición parecen tener como diana principal a la ADN girasa, mientras sustituyentes como un simple hidrógeno o un puente entre la posición 1 y 8 actuarían principalmente sobre la topoisomerasa IV. Por otro lado, los derivados de las 4-naftiridonas y los derivados de la 4-quinolona con radical metoxi

en posición 8 parece que actuarían indistintamente sobre cualquiera de las dos topoisomerasas (88,189).

Se han dejado **las posiciones 1 y 7** para el final, debido a que estas posiciones han sido las más modificadas y las más diferentes entre las quinolonas actuales. Además estas dos posiciones son fundamentales para la unión de las quinolonas con las topoisomerasas y poder formar el complejo Quinolona-Enzima-ADN y poder bloquear la función de dichos enzimas.

**Posición 1.** Los radicales ubicados en esta posición van a ser los responsables de una de las uniones de la molécula de quinolona con la topoisomerasa, por lo que este radical va a tener un papel importante en la actividad del fármaco. También cabe decir que dependiendo del tipo de radical se puede variar el espectro de acción y la farmacocinética del fármaco. En esta posición encontramos básicamente tres radicales distintos, las primeras quinolonas como el ácido nalidíxico o el norfloxacinó presentaban un grupo etilo. Posteriormente, se añadieron grupos más voluminosos que mejoraron la actividad frente a patógenos tanto Gram-negativos como Gram-positivos (38,88,189).

En concreto la adición de un grupo ciclopropilo, mejoró la actividad frente a Gram-negativos, y es este grupo el que presentan la mayor parte de las quinolonas como el ciprofloxacino, esparfloxacino, grepafloxacino, gemifloxacino o el sitafloxacino entre otras (10). Este radical está considerado como el que ofrece mayor potencia a la molécula (189).



El tercer radical que se encuentra generalmente en esta posición en un 2,4-difluorofenilo, este sustituyente presente en quinolonas como el tosufloxacino, trovafloxacino o temafloxacino aumenta la actividad frente a bacterias Gram-positivas (38,88,189).

Otros radicales en esta posición parecen dar lugar a un descenso de la actividad de la molécula, probablemente por un menor número de enlaces entre la molécula y el enzima (88).

**Posición 7.** Las modificaciones en esta posición también van a ser importantes, igual que la posición 1, ésta va a ser responsable, también, de la unión de la quinolona a la topoisomerasa (como se verá en el apartado de mecanismo de acción de las quinolonas), de la actividad y espectro de acción, y de algunos parámetros farmacocinéticos como serían la vida media o la solubilidad de la molécula (38).

En general, las quinolonas con sustituyentes pequeños o lineales en esta posición (H, Cl, CH<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>) muestran poca actividad bactericida, por otro lado está bien establecido que la presencia de grupos heterocíclicos nitrogenados de 5 (aminopirrolidinas) o 6 (piperazinas) átomos de carbono se corresponde con una mayor actividad. Dependiendo del radical la mejor actividad se produce frente a Gram-negativos (piperazina) o frente a Gram-positivos (aminopirrolidina). De la misma manera, metil-derivados de las aminopirrolidinas (esparfloxacino, grepafloxacino, o levofloxacino) o piperazinas (gatifloxacino) también muestran una gran mejora en la actividad frente a Gram-positivos. Otra de las modificaciones, es la presencia de un segundo anillo fusionado a la pirrolidina (moxifloxacino, trovafloxacino) y ambas moléculas también muestran muy buena actividad sobre Gram-positivos (10,88,98,189).

Recientemente se ha observado que un radical de “gran tamaño” parece tener influencia en la protección de la molécula frente a mecanismos de expulsión activa, además de prevenir la aparición de resistencias (189).

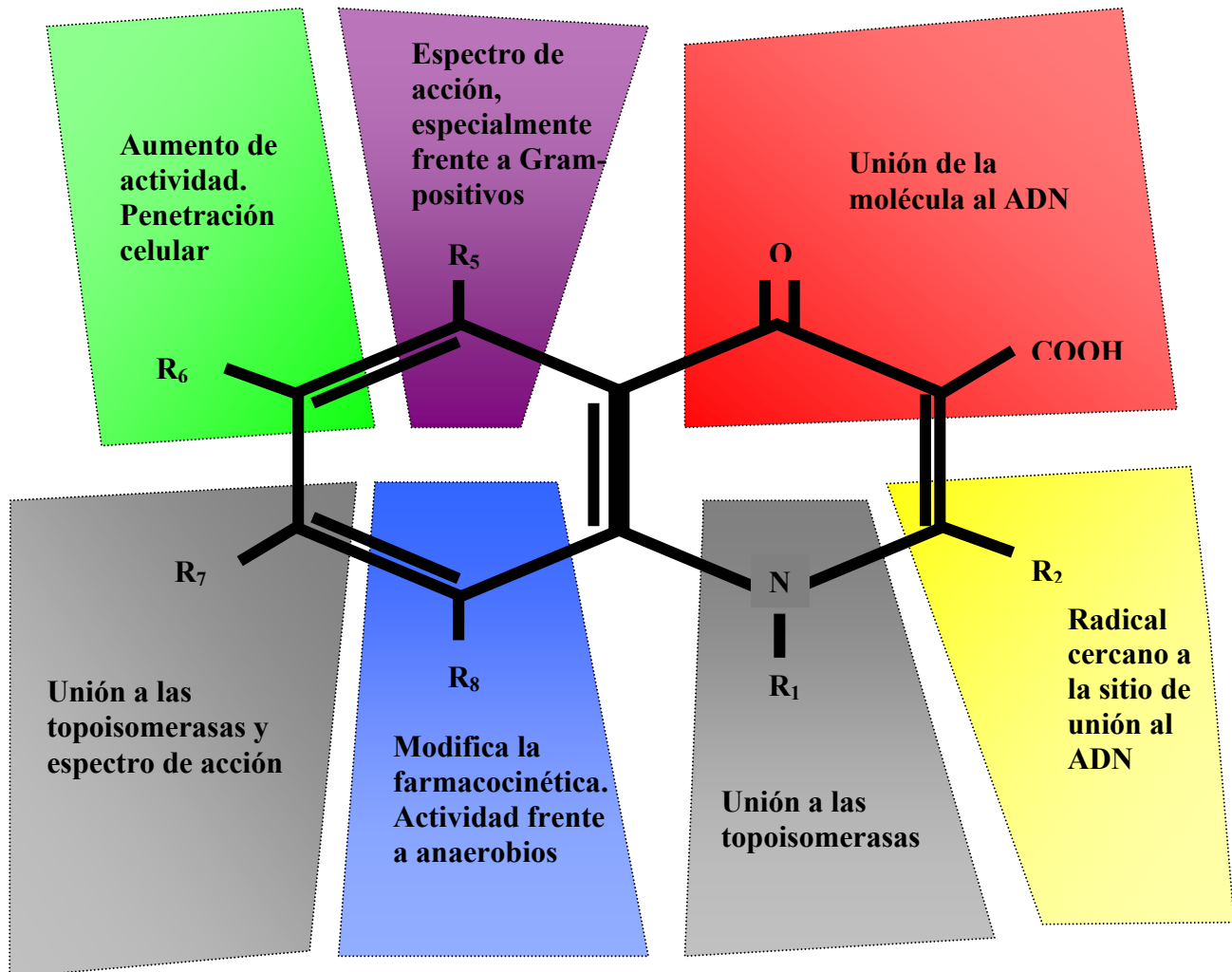
Otra sustitución con actividad frente a Gram-positivos, en concreto frente a *S. pneumoniae* es la adición de un grupo benzenosulfonamida a la molécula de ciprofloxacino, por lo que esta nueva molécula en posición 7 presenta un grupo 4-(4-amonifenilsulfonil)-1-piperazinil (7), esta quinolona presenta una actividad de 4 a 8 veces superior al ciprofloxacino.

En el Departamento de Microbiología y Parasitología Sanitarias de la Facultad de Medicina de la Universitat de Barcelona, en colaboración con la empresa CENAVISA S.A. y el Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Química de la Universitat de Barcelona, se han llevado a cabo también un proyecto para desarrollar nuevas moléculas de quinolonas que fueran más activas frente a patógenos Gram-positivos o Gram-negativos. Teniendo como base de la molécula al ciprofloxacino o al norfloxacino, se han introducido variaciones en el radical 7 con el fin de mejorar la actividad de las moléculas (253). Se crearon alrededor de 40 moléculas nuevas de quinolona las cuales se testaron “in vitro” sobre una colección de cepas, ya fueran bacterias Gram-positivas o Gram-negativas, bien caracterizadas en cuanto a su sensibilidad o resistencia a quinolonas ya que lo que se pretende es encontrar moléculas activas frente a bacterias resistentes a las moléculas precursoras. Se encontró una molécula que fue activa frente a *S. aureus* y *Acintebacter baumannii*. Esta molécula presentaba en el radical en posición 7 una piperazina. Se obtuvieron derivados de esta nueva molécula, en concreto una molécula a la que se llamó UB-

8902 que presentó muy buena actividad frente *A. baumannii* y *Stenotrophomonas maltophilia* (253).

Recientemente, ha aparecido un nuevo grupo de agentes antimicrobianos donde las quinolonas parecen tener un papel importante, los híbridos entre quinolonas y oxazolidinonas. Este grupo se caracteriza por la unión de dos núcleos activos de dos grupos antimicrobianos, los cuales actúan de forma dual sobre las dos dianas que tienen las moléculas de las cuales derivan (110,111). La unión de las dos moléculas se hace a través de la posición 7 de la molécula de quinolona, y entre los dos núcleos se encuentra un espaciador. La actividad de la nueva molécula y de su espectro de acción es altamente dependiente de la naturaleza de este espaciador (110).

Un aspecto importante a tener en cuenta, es que la molécula actúa como un conjunto, y a pesar de conocer cuales serían a priori los mejores radicales en cada posición para una mejor actividad de la molécula, hay otros elementos que también influyen: como la estructura tridimensional de la molécula, la interacción entre sus radicales (el tamaño, la carga, etc.) y todo en su conjunto es el responsable de la actividad y propiedades de la molécula.

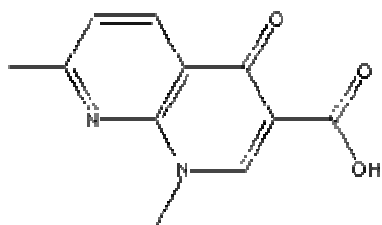


**Figura 4.** Esquema de la relación entre estructura y actividad de la molécula de quinolona.

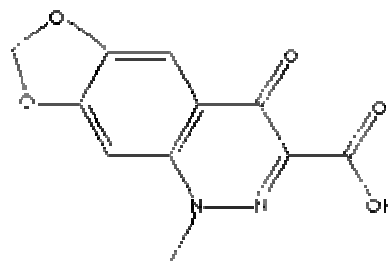
### 1.2.3 Estructura química de diversas quinolonas.

Ordenandas alfabeticamente.

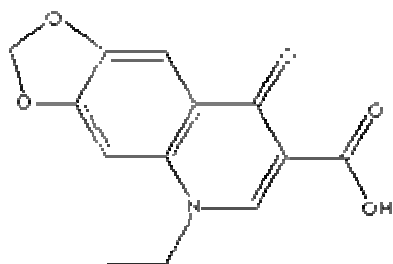
Ac.Nalidixico



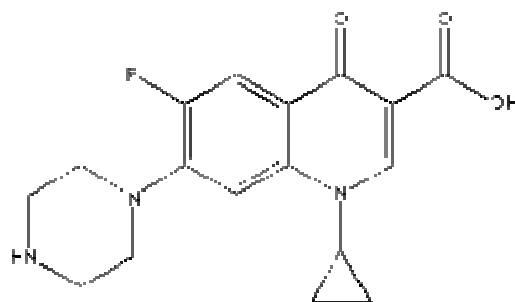
Cinoxacino



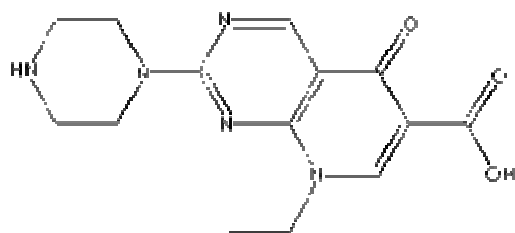
Ac.oxolínico



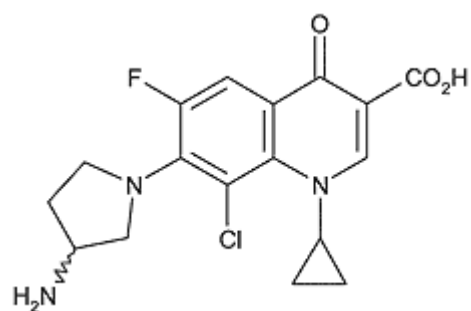
Ciprofloxacino



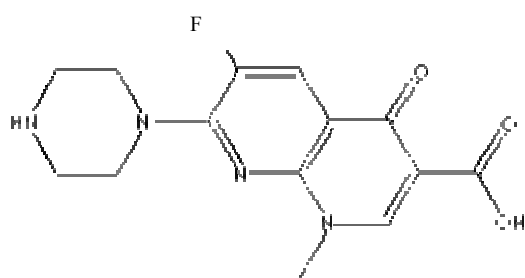
Ac. Pipedímico



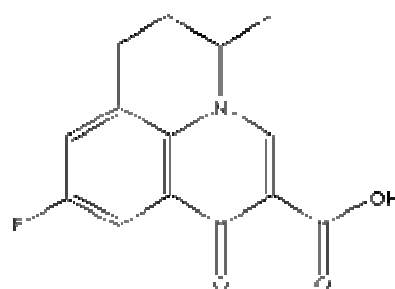
Clinafloxacino



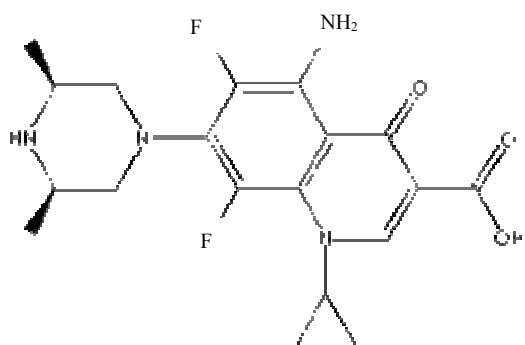
Enoxacino



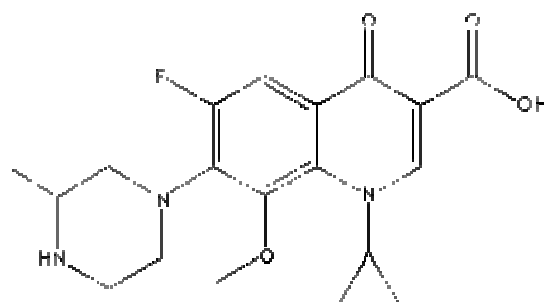
Flumequino



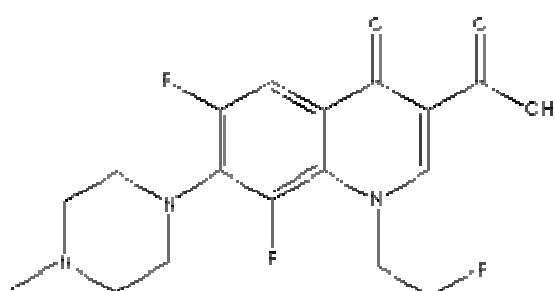
Esparfloxacino



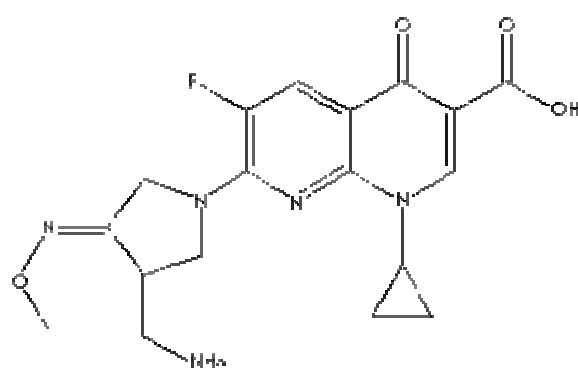
Gatifloxacino



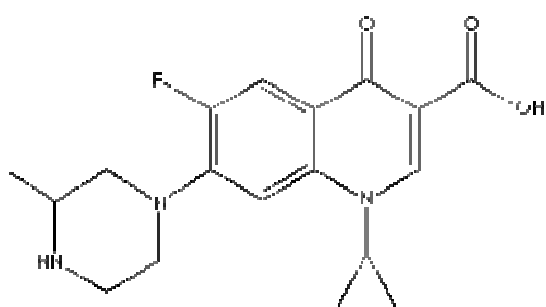
Fleroxacino



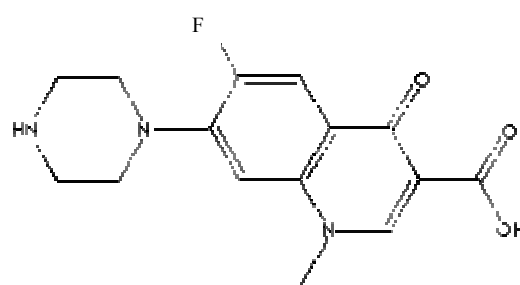
Gemifloxacino



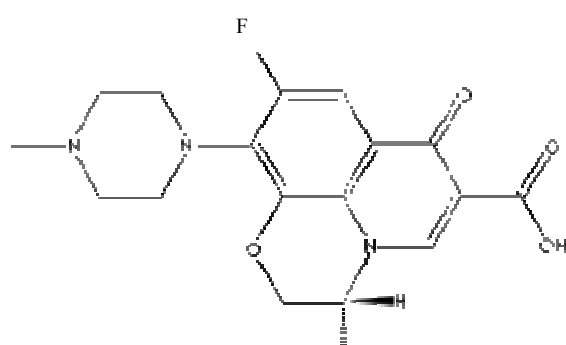
Grepafloxacin



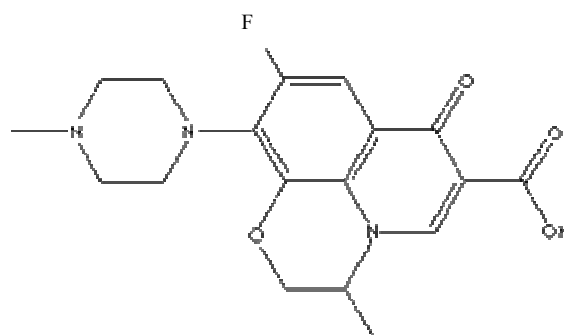
Norfloxacin



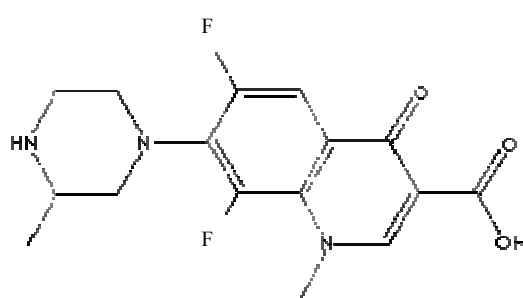
Levofloxacin



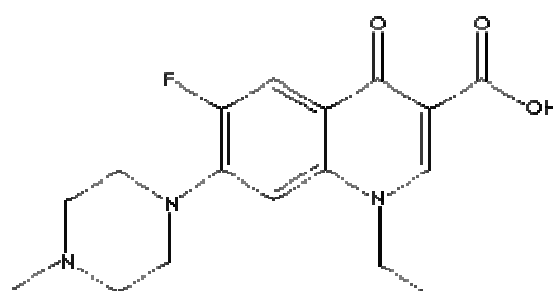
Ofloxacin



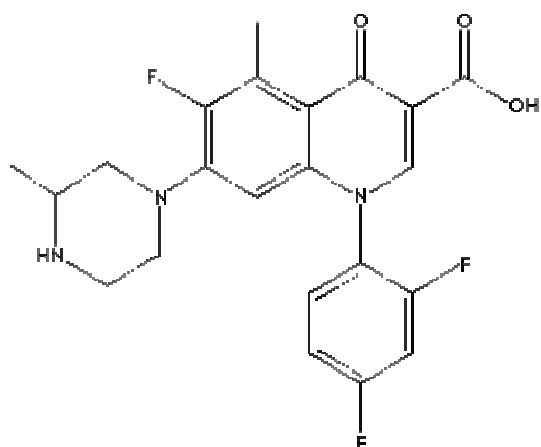
Lomefloxacin



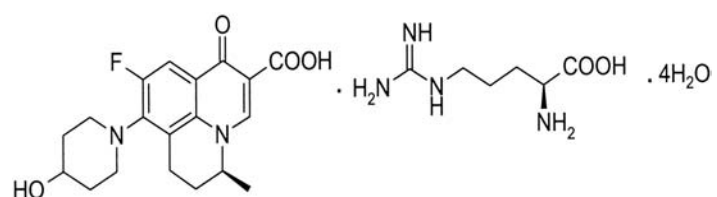
Pefloxacin



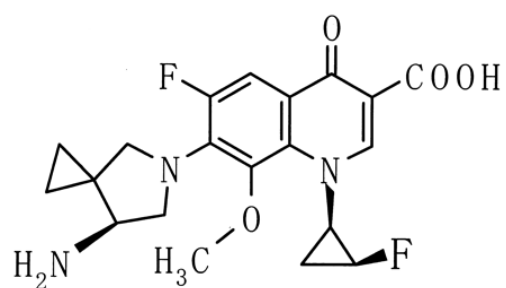
Terafloxacino



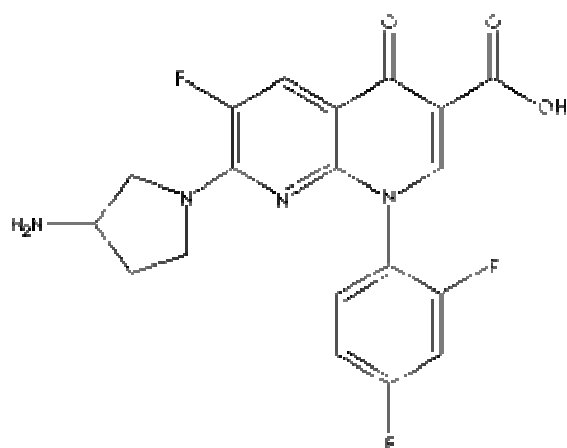
WCK 771



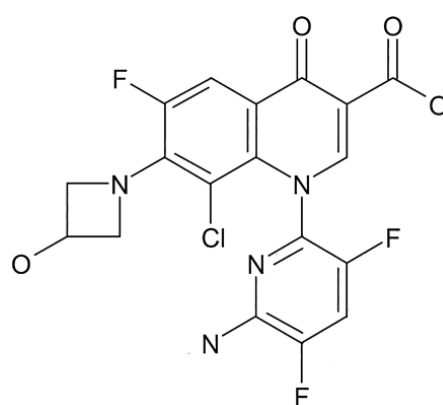
DK507k



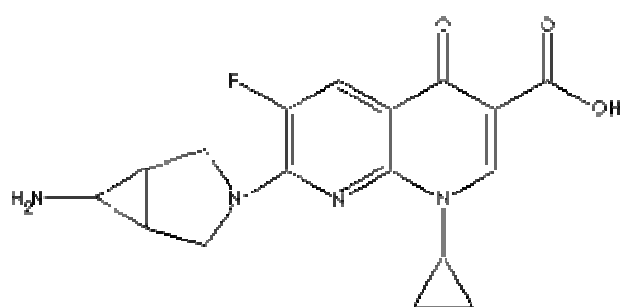
Tosufloxacino



ABT-492



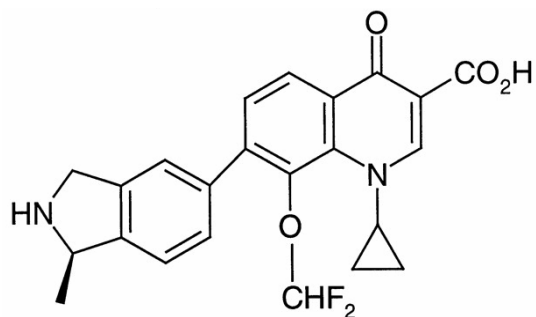
Trovafoxacino



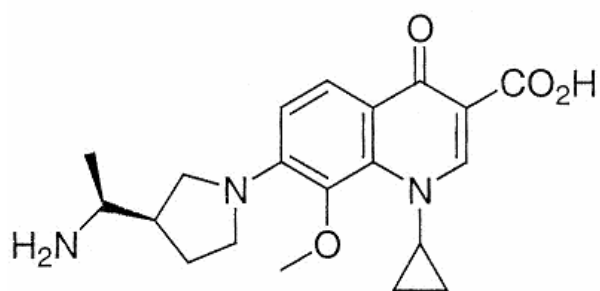


## QUINOLONAS NO FLUORADAS

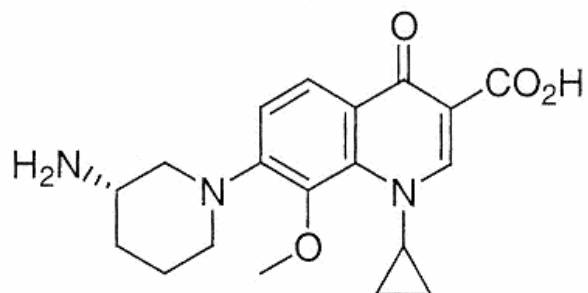
Garenoxacino



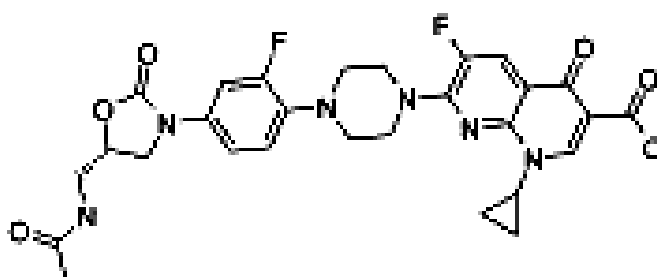
PGE 9262932



PGE 9509924



ESQUEMA DE LA ESTRUCTURA DE LOS HIBRIDOS  
ENTRE QUINOLONA-OXAZOLIDINONA



### 1.3 Clasificación de las quinolonas.

Existen diferentes sistemas de clasificación de las quinolonas, el más sencillo de ellos es agruparlas por la fecha de licencia para su uso clínico, otros como los que se detallarán a continuación se basan en la estructura química, o por el contrario, y quizá sea la más utilizada, se basa en su actividad y farmacocinética.

#### 1.3.1 Clasificación química.

Esta clasificación se realiza en función de la estructura química de la quinolona, es decir, depende del núcleo del cual deriva. Además, se pueden diferenciar dentro de cada grupo dependiendo de los átomos de flúor que presenta la molécula sin tener en cuenta la posición de éstos. Así pues tendríamos 4 clases distintas de quinolonas, 4-oxo-quinolinas, 4-oxo-naftiridinas, 4-oxo-cinolinas, 4-oxo-piridopirimidinas. Esta última clase de quinolonas son las únicas que no presenta ningún sub-grupo de quinolonas fluoradas, ya que el Nitrógeno en posición 6 no permite ningún radical, mientras que las cinolinas no se muestra en la tabla ninguna molécula fluorada debido a que se han desarrollado moléculas de interés derivadas de este núcleo.

En la Tabla 1 se muestra la clasificación de las moléculas de quinolona, se puede observar que el núcleo 4-quinolona ha sido el más ampliamente modificado y en consecuencia el más estudiado, cabe decir también, que dentro de este grupo ha sido el sub-grupo de quinolonas monofluoradas el que ha proporcionado un mayor número de moléculas.

	4-piridonas	4-cinolonas	4-naftiridonas	4-quinolonas
<b>No Fluorada</b>				Ac oxolínico
				PGE-9262932
	Ac.Pipedímico	Cinoxacino	Ac.Nalidíxico	PGE-9509924
				PGE-4175997 T-3912
<b>Monofluorada</b>				Flumequino
				Norfloxacino
				Pefloxacino
				Ciprofloxacino
				Ofloxacino
			Enoxacino	Levofloxacino
			CI-990	Moxifloxacino
			PD-131628	Clinafloxacino*
			PD-138312	Gatifloxacino
				Grepafloxacino
				WCK-771 E-4767* E-5065*
<b>Bifluorada</b>				Esparfloxacino
				Lomefloxacino
				Garenoxacino <sup>#</sup> DK-507k
<b>Trifluorada</b>			Tosufloxacino	Fleroxacino
			Trovafloxacino	ABT-492*
			Temafloxacino	

\* Estas moléculas poseen un átomo de cloro en posición 8.

<sup>#</sup> Esta molécula es una quinolona no fluorada y aunque posee dos átomos de flúor ninguno se sitúa en posición 6, característico de las fluoroquinolonas.

**Tabla 1.** Clasificación de las quinolonas atendiendo a su estructura química y a la incorporación de átomos de flúor en su estructura.

### 1.3.2 Clasificación biológica.

Esta clasificación agrupa las quinolonas por generaciones al igual que nos encontramos con los  $\beta$ -lactámicos, en función de los parámetros farmacocinéticos que presenta la molécula y de su espectro de acción. Quizá esta sea la clasificación que se use más frecuentemente en el ámbito hospitalario. Aunque no existe un consenso sobre ello, hay moléculas que se agrupan en una generación u otra dependiendo del autor, (13,132,164,175,179), pero en lo que se coincide es en agruparlas en 4 generaciones distintas, aunque estas clasificaciones no tienen en cuenta a las QNF ni a los híbridos entre quinolona y oxazolidinona.

Por lo que sí tenemos en cuenta a estos dos grupos de quinolonas de reciente aparición podríamos hablar de una quinta generación para las QNF y de una sexta para las moléculas híbridas o considerar estas últimas como un nuevo grupo de antimicrobianos distinto de las quinolonas, como va a ser en nuestro caso.

Existen otras clasificaciones como las propuestas por Bryskier *et al.* (32) bastante más complejas y no utilizadas.

Generación	Quinolona	Actividad Microbiológica	Características farmacocinéticas	Indicaciones
PRIMERA	Ac Nalixíxico	Enterobacteriáceas	Administración oral.	Infecciones urinarias.
	Ac oxolinico		Baja concentración en plasma y tejido	
	Cinoxacino			
	Ac pipedímico			
SEGUNDA Clase I	Lomefloxacino	Enterobacteriáceas	Administración oral.	Infecciones urinarias.
	Enoxacino		Baja concentración en plasma y tejido.	
	Norfloxacino			
Clase II	Ofloxacino	Enterobacteriáceas, Patógenos atípicos, <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Administración oral y intravenosa. Altas concentraciones en plasma y tejidos.	Infecciones sistémicas y urinarias.
	Ciprofloxacino			
TERCERA	Esparfloxacino	Enterobacteriáceas, Patógenos atípicos, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	Administración oral y intravenosa. Altas concentraciones en plasma y tejidos	Infecciones sistémicas y urinarias
	Levofloxacino			
	Gatifloxacino			
CUARTA	Trovafloxacino	Enterobacteriáceas, Patógenos atípicos, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , Patógenos respiratorios, anaerobios	Administración oral y intravenosa. Altas concentraciones en plasma y tejidos	Infecciones sistémicas y urinarias, (infecciones respiratorias)
	Moxifloxacino			
	Gemifloxacino			
	Clinafloxacino			
	Sitafloxacino			
QUINTA Quinolonas no Fluoradas	Garenoxacino	Enterobacteriáceas, Patógenos atípicos, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , anaerobios, incremento de actividad especialmente en Gram-positivos	En desarrollo	En desarrollo
	PGE-9262932			
	PGE-9509924			
	PGE-4175997 T-3912			

**Tabla 2.** Clasificación de las quinolonas en función de su actividad microbiológica y de su farmacocinética.

## 1.4 Farmacocinética.

Un buen antibiótico debería cumplir con varias condiciones: ser fácilmente absorbible, tener una muy buena biodisponibilidad y alto volumen de distribución, así como tener una vida media larga.

En el caso de las quinolonas, todos estos parámetros se han ido mejorando al mismo tiempo que aparecían nuevas moléculas (8). En la Tabla 3 se resumen algunos parámetros de algunas quinolonas para su comparación.

### 1.4.1 Absorción.

La absorción de las quinolonas se da casi en su totalidad a nivel del intestino, concretamente en el duodeno y yeyuno . Esta absorción llega casi a valores que en algunos casos ronda el 100%. Algunas quinolonas parecen ver alterada su absorción con la ingesta de alimentos ya que parece que en presencia de algunos como  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  disminuyen su absorción. Esta absorción se realiza en un tiempo que oscila entre 1 o 3 horas y no se ve afectada por la edad del paciente, disfunciones renales o por la presencia de alguna enfermedad de base como la fibrosis quística.

En algunos casos los niveles de quinolona alcanzados en suero después de una administración oral del fármaco son muy parecidos a los conseguidos por vía intravenosa.

### 1.4.2 Distribución.

Las quinolonas en general tienen una moderada biodisponibilidad, es decir, su porcentaje de unión a proteínas séricas es de alrededor de un 40%, siendo por ejemplo el norfloxacin que posee una menor unión a estas proteínas plasmáticas con un 15% o en el otro extremo estarían otras quinolonas, el ácido nalidíxico como representante de las quinolonas de 1ª generación o el garenoxacin una QNF con unos índices del 90 y 85% respectivamente (8). La vida media puede variar entre 1,5 h hasta 18h.

El volumen de distribución suele ser alto, lo que supone concentraciones de antibiótico altas en tejidos periféricos, fluidos orgánicos, líquido articular, etc. Algunas quinolonas alcanzan niveles terapéuticos en el líquido cefalorraquídeo. Estos valores que rondan de 1 l/Kg hasta los 3 l/Kg implican una gran distribución extravascular, y la farmacocinética de estos compuestos se puede explicar mediante un modelo tricompartmental. De todos modos quinolonas como el norfloxacin o el Ac. nalidíxico presentan valores inferiores a 0,6 l/Kg.

Esta distribución del antibiótico permite la acumulación del mismo en el interior de células eucariotas, ya sean células sanguíneas como los macrófagos o células epiteliales por lo que la actividad de las quinolonas también es útil en patógenos intracelulares (14,71-73).



### 1.4.3 Eliminación.

Todas las quinolonas debido a su buena absorción presentan niveles terapéuticos de antibiótico en plasma, pero en cambio, al menos las de primera generación y algunas de la segunda no son útiles en infecciones sistémicas debido a su rápida eliminación.

La gran mayoría de las quinolonas se eliminan por vía renal, esto hace que se encuentren en altas concentraciones, y que su primera indicación fuera destinada a las infecciones urinarias, favorecido también por que no son metabolizadas. Existen también otras vías de eliminación de las quinolonas como sería la vía hepática u otras.

Como parte de la eliminación de las quinolonas, estas son modificadas, en mayor o menor grado a nivel hepático, y en algunos casos los metabolitos siguen teniendo cierta actividad bactericida, como sería el caso del ciprofloxacino (48). En este punto hay que hacer mención una clasificación de las quinolonas que proponen Bryskier *et al.* (32) que agrupa las quinolonas en función de su espectro de actividad y éstas las subdivide en función de si se metabolizan o no.

Quinolona	Dosis (mg)	C <sub>máx</sub> (mg/L)	T <sub>½</sub> (h)	Vd (l Kg)	Unión a proteínas (%)	Via de eliminación
Ac.Nalidíxico	400	Variable	1.5	--	90	Renal
Ac. Pipedímico	400	4.0	3.0	1.4-2.0	--	Renal
Norfloxacinó	400	1.5	3.3	0.6	15	Renal y hepática
Ciprofloxacino	750	3.0	3.6	2.0-3.0	40	Renal y enteral
Ofloxacino	400	4.4	5.5	1.2-1.4	40	Renal
Levofloxacino	500	5.1	7.0	1.4	40	Renal
Temafloxacino	600	7.0	8.0	--	25	Renal
Trovafloxacino	300	2.5	12.0	--	85	Hepática
Clinafloxacino	200	1.6	6.0	--	40	Renal
Esparfloxacino	400	1.0	18.0	--	40	Renal y hepática
Grepafloxacino	400	1.4	14.0	--	50	Hepática
Moxifloxacino	400	3.1	13.0	3.0	50	Hepática
Gatifloxacino	400	4.0	9.0	--	20	Renal
Gemifloxacino	320	1.0	7.0	--	60	Renal y otros
Garenoxacino	400	5.8	15.0	--	87	Renal y otros

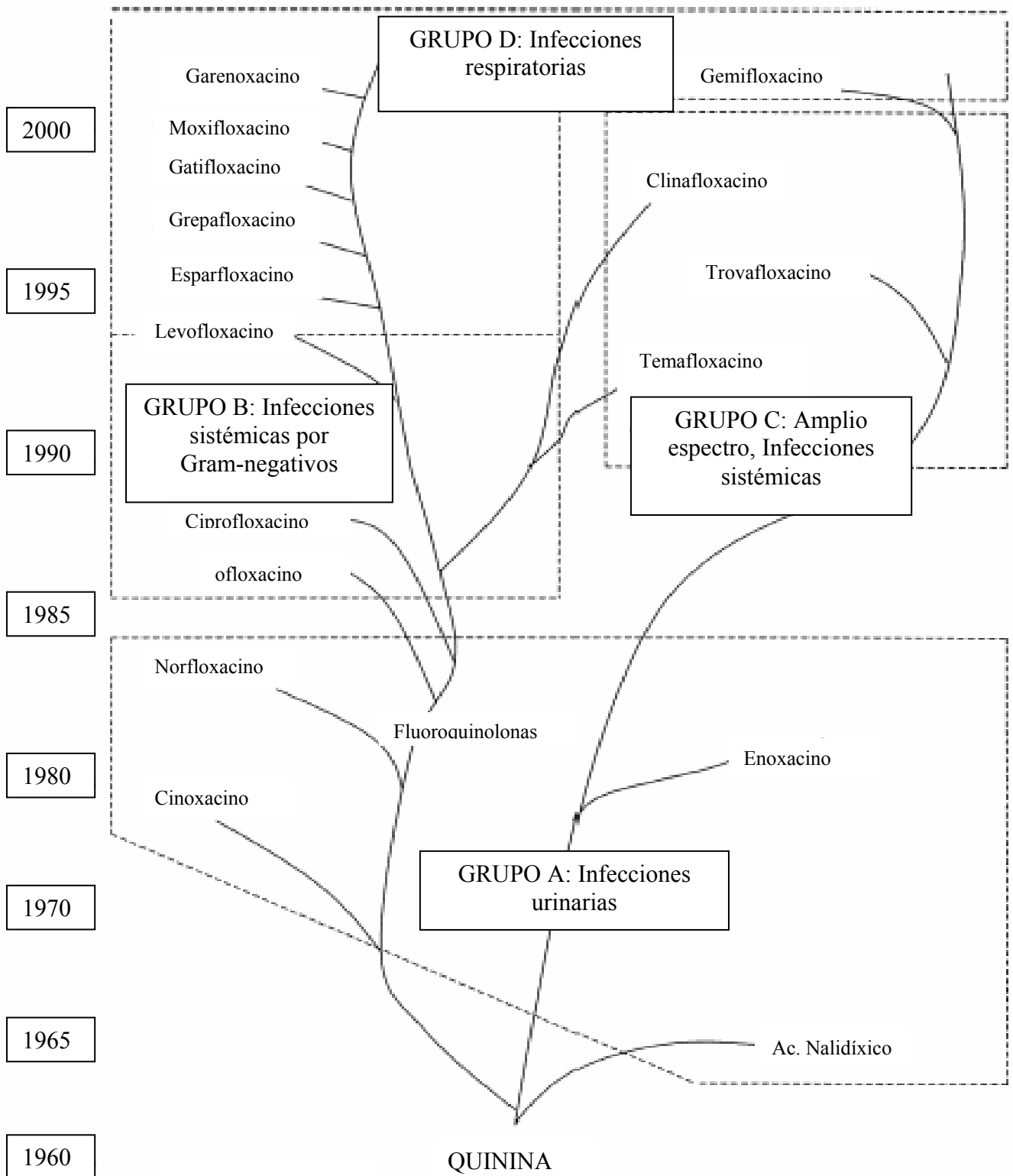
**Tabla 3.** Resumen de algunos parámetros farmacocinéticos de las quinolonas. Modificado de Bryskier *et al* (32) y de Alós *et al* (6).

## 1.5 Utilización clínica

Las indicaciones clínicas de las quinolonas han ido variando al mismo ritmo que iban evolucionando, mejorando su espectro de actividad y sus propiedades farmacocinéticas (Figura 5). Por lo que actualmente, las fluoroquinolonas se usan en una gran variedad de infecciones, ya sean en el ámbito hospitalario como en el ámbito extrahospitalario.

Así pues, una de las principales indicaciones de las quinolonas fueron las infecciones urinarias, debido a su actividad frente a enterobacterias, las principales causantes de este tipo de infecciones, así como por que debido a su eliminación por vía renal acumulaban grandes concentraciones de antibióticos en el tracto genitourinario. De este modo las quinolonas se usan de manera frecuente para el tratamiento de cistitis, prostatitis o pielonefritis (6,105,175), la quinolonas más comúnmente utilizada es el norfloxacin, aunque otras quinolonas como el ciprofloxacino o el ofloxacino entre otras pueden ser utilizadas.

Las infecciones gastrointestinales, y abdominales también se encuentran entre las indicaciones de las quinolonas, éstas presentan una muy buena actividad sobre los principales patógenos, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *E.coli*, o *Campylobacter* spp. Por este motivo algunos autores proponían el uso de estos antimicrobianos como profilaxis para viajeros a países en vías de desarrollo, con el fin de evitar la aparición de la llamada “diarrea del viajero” (239). Hay estudios que establecen que un 65% de los viajeros desarrollan una diarrea durante o a los pocos días de la vuelta del viaje (75,76), por lo que la profilaxis con quinolonas sería efectiva (122).



**Figura 5.** Relación entre el año de introducción de las quinolonas y su uso en clínica.

No obstante, debido a la selección de resistencias por parte de las quinolonas (como se verá más adelante) y que las bacterias de la microbiota intestinal con resistencia adquirida pasarían a formar parte de la ecología de estos países en vías de desarrollo (lo que añadiría un nuevo problema de resistencias a estos países que ya presentan altas tasas de resistencia a otros grupos de antimicrobianos) (225,227,254,255), esta opción no sería una buena elección(6). También se han usado las quinolonas como descontaminantes del aparato digestivo en pacientes sometidos a transplantes con el fin de evitar posteriores infecciones, así como en protocolos de prevención de peritonitis bacteriana espontánea en pacientes cirróticos (19,105).

Con la llegada de las nuevas fluoroquinolonas, sus indicaciones se fueron diversificando, así pues, actualmente las quinolonas se utilizan en el tratamiento de infecciones sistémicas graves (6,26). Debido al amplio espectro de acción, su administración oral y su tolerabilidad se utilizan en infecciones óseas que necesitan un tratamiento prolongado. En este punto se están consolidando las nuevas quinolonas como el levofloxacino.

Actualmente, una de las indicaciones de las modernas quinolonas son las infecciones respiratorias, especialmente para el tratamiento de la neumonía ya sea nosocomial o adquirida en la comunidad. Los patógenos más comunes causantes de este tipo de infección (especialmente los neumococos) estarían cubiertos (serían susceptibles al tratamiento con estos antibióticos) (6). Aunque en los últimos años se han empezado a surgir cepas resistentes (45).

Las quinolonas no son antimicrobianos de uso exclusivo en humanos, su uso se extiende también a nivel veterinario, en este caso la quinolona usada es el enrofloxacino (1,233). El enrofloxacino se usa para el tratamiento de infecciones en animales ya sean de granja o de compañía. Otro uso que se le da a este antibiótico es el de mezclarlo con los piensos para utilizarlo como profilaxis o como promotor para el engorde de los animales de granja como por ejemplo pollos. Esto comporta un alto riesgo de selección de cepas resistentes que posteriormente pueden pasar a causar infección en humanos (211). Ya en 1991 existen estudios (54) que correlacionan el aumento de cepas resistentes de *Campylobacter* spp con la introducción y uso de las fluoroquinolonas en veterinaria así como en su uso en la industria avícola. (1,54).

### **1.5.1 Quinolonas en pediatría**

Existe mucha controversia acerca del uso pediátrico de quinolonas. En general se acepta que las quinolonas no deben usarse en niños, debido a que uno de los efectos secundarios que presentan las quinolonas afectan a los cartílagos en crecimiento, y aunque esto no se ha demostrado en niños, si se ha observado en estudio con animales jóvenes (231), por lo que por motivos de precaución se evita la administración pediátrica de quinolonas (145). De todos modos, hay autores que apoyan el uso de quinolonas en niños basados en pocos estudios donde este grupo de antimicrobianos, básicamente ciprofloxacino, se ha utilizado en niños de modo “compasivo” (4) y deducen que los efectos secundarios en este grupo de población son muy similares a los que se presentan en la población adulta.

## 1.6 Efectos adversos.

El perfil de seguridad de las quinolonas está basado en datos obtenidos de estudios con animales, y estudios preclínicos y clínicos, básicamente realizados por las empresas que comercializan estos fármacos y por un seguimiento después de aceptarse para su uso clínico por lo que se conoce como farmacovigilancia. Como regla general y pese a los efectos secundarios que se describirán a continuación hay que destacar que las quinolonas que actualmente se encuentran en el mercado para su uso en clínica humana son seguras y muy bien toleradas.

Igual que la mayoría, por no decir todas, las familias de antibióticos, las quinolonas presentan algunos efectos secundarios, entre los más frecuentes se encuentran los asociados al aparato digestivo, en concreto al tracto gastrointestinal, como son náuseas, vómitos, diarreas. Este último se asocia a una colitis por *Clostridium difficile* (228), cabe destacar que con las nuevas fluoroquinolonas la diarrea asociada a *C. difficile* habría aumentado (130,141).

Las quinolonas producen también efectos secundarios sobre el sistema nervioso central (SCN), generalmente producen dolor de cabeza, insomnio, cansancio, vértigo (230). También se han descrito casos de efectos neurotóxicos graves como psicosis, delirios, y convulsiones (141,228). El mecanismo por el cual las quinolonas provocan efectos secundarios de SNC, no se conocen en profundidad pero se sabe que se encuentra involucrado el GABA (ácido gamma-aminobutírico) (141,231). Parece que las quinolonas inhiben la unión del GABA con su receptor, lo que produce una estimulación del SNC. Esta unión de la quinolona al receptor del GABA parece depender de cual es el radical en posición 7 de la molécula de quinolona (141,230).

Existen por otro lado efectos secundarios de las quinolonas que si son importantes, los cuales han llevado a retirar alguno de estos fármacos del mercado y/o a suspender los ensayos clínicos y su posterior desarrollo. Uno de los más importantes y que comparten la mayor parte de las quinolonas es la fototoxicidad. Los síntomas que se pueden presentar son urticarias, eritemas, quemaduras solares etc. De todas formas no todas las moléculas presentan el mismo grado de fototoxicidad, existen diferencias significativas entre ellas, así pues, bajo condiciones terapéuticas moléculas como el moxifloxacino o gatifloxacino no presentan o presentan muy poca fototoxicidad, mientras que otras moléculas como clinafloxacino, esparfloxacino o lomefloxacino han sido retiradas debido a sus efectos secundarios (141,194). Esta fototoxicidad se ha relacionado con los radicales situados en la posición 8 de las moléculas de quinolona (95,228). Estas reacciones de fototoxicidad se producen debido a que las moléculas de quinolonas se degradan cuando se encuentran expuestas a la radiación ultravioleta, y generan “oxígeno libre” y radicales que causan daño tisular (194,230).

Otro de los efectos adversos que también han motivado la retirada del mercado de algunas moléculas de quinolona son de tipo cardiotóxico. Se han registrado casos de hipotensión y taquicardias, y como en el caso de la fototoxicidad, también depende mucho de la molécula de quinolona. Se ha observado que las quinolonas pueden alterar el ritmo cardiaco concretamente prolongar el intervalo QT (231). Varios estudios *in vitro* con animales han demostrado que las quinolonas inhiben un gen, *eag*, relacionado con los canales de potasio (HERG) que se relacionan con arritmias (178,228,230). Dos de las quinolonas que se retiraron por efectos cardiotóxicos son esparfloxacino y grepafloxacino. Este tipo de efecto adverso debe tenerse en cuenta sobre todo en aquellos pacientes o enfermos que presenten una



enfermedad de base cardíaca o que tomen fármacos que puedan alterar el ritmo cardíaco ya que se pueden presentar interacciones entre los distintos fármacos.

Otro efecto adverso relacionado con la administración de quinolonas son artropatías, concretamente alteraciones de los cartílagos de las articulaciones. El efecto tóxico se ha observado principalmente en estudios animales y se presenta más frecuentemente en animales jóvenes (231). Además las dosis necesarias para inducir lesiones se encuentran en rango de las usadas en la clínica habitual. Por este motivo el uso de quinolonas en pediatría está contraindicado. También se han descrito casos de rotura de tendones, concretamente del tendón de Aquiles, asociado al consumo de quinolonas (141,228,231).

La hepatotoxicidad es otro de los efectos adversos relacionados con la administración de quinolonas, dándose en un 2 o 3 % de los pacientes. Se asocia a un incremento en las transaminasas y la fosfatasa alcalina a nivel sérico, que generalmente vuelve a la normalidad al abandonar el tratamiento. Sólo un muy bajo porcentaje de pacientes puede presentar serios problemas hepáticos como hepatitis, necrosis hepática o fallo hepático (141). El trovafloxacino ha sido la quinolona más relacionada con este efecto adverso.

### **1.6.1 Interacciones con otros fármacos.**

Las quinolonas, como la mayoría de antimicrobianos, presenta interacciones con otros grupos farmacológicos.

La administración de productos que contengan cationes multivalentes puede reducir la biodisponibilidad de las quinolonas, por lo que se recomienda tomar estas sustancias unas 2 h después del antibiótico.

Se pueden presentar interacciones con los AINEs, la interacción entre ellos parece ser debida a la competencia que presentan estos fármacos con los receptores del GABA. La asociación entre enoxacin y ciprofloxacina con fenbufeno produce convulsiones en ratas (22).

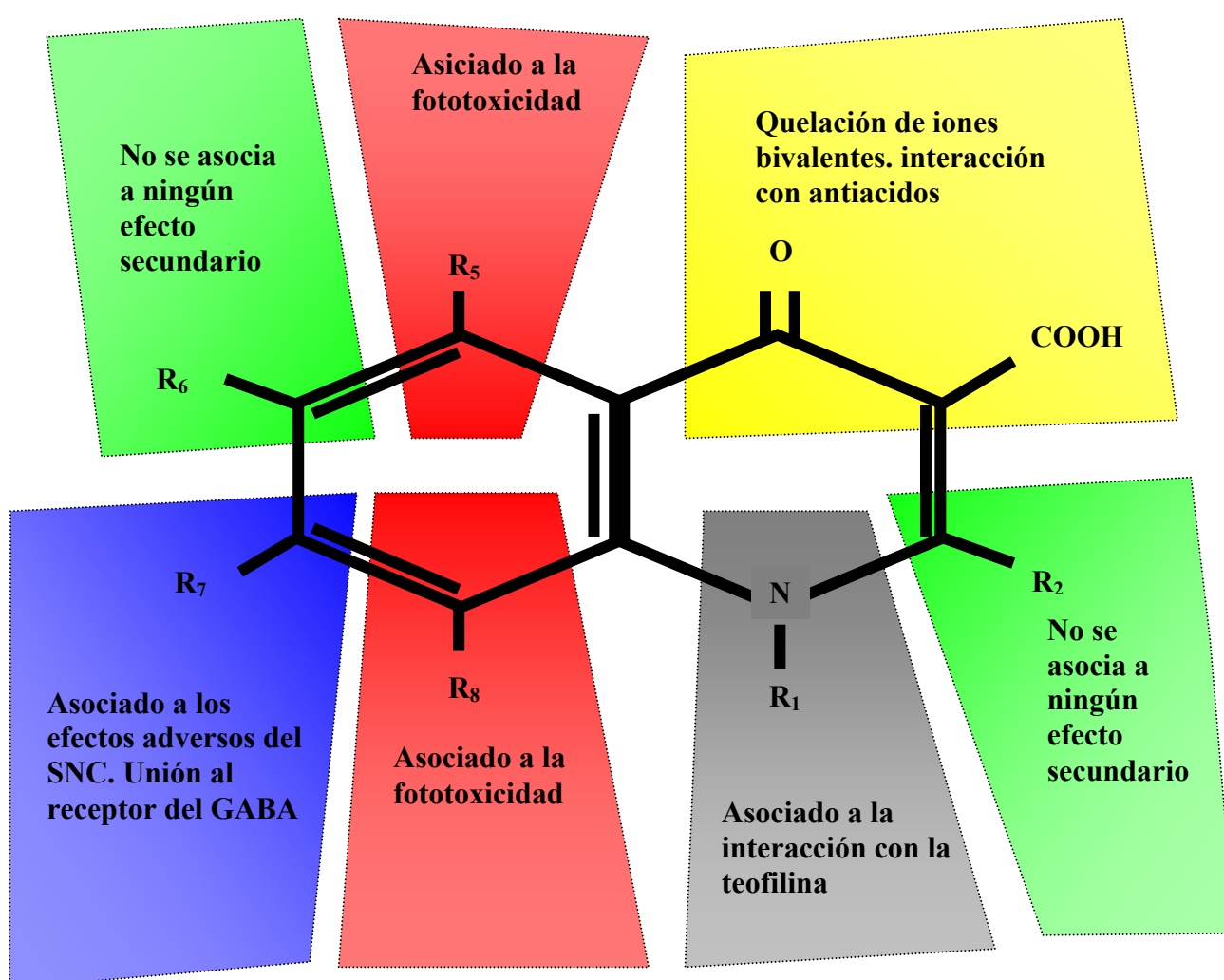
Otras importantes interacciones con las quinolonas la presentan sustancias como las xantinas, como la cafeína, y las teofilinas. En este caso las fluoroquinolonas inhiben el citocromo CYP-450 lo que provoca una reducción en la metabolización de estos fármacos, lo que requiere reajustar las dosis (22).

Por último, una de las interacciones más importantes de las quinolonas se presentan con fármacos como la warfarina y la digoxina. Estos no deberían asociarse con las fluoroquinolonas que prolongan el intervalo QT, por la posible aparición de arritmias y/o problemas cardíacos (22).

En este apartado también se pueden relacionar los diferentes radicales presentes en el núcleo de la molécula de quinolona con los diferentes efectos adversos que presentan o con las interacciones con diferentes fármacos (Figura 6).

De una forma breve, diremos que los radicales en 2 y en 6 no se han asociado a ningún efecto adverso, la posición 1 controla las interacciones con la teofilina y “toxicidad genética”,

los radicales en posiciones 3 y 4 están involucrados en la interacción con antiácidos y en la quelación de iones bivalentes como el  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ . Las posiciones 5 y 8 se han relacionado con los efectos de fototoxicidad que presentan las moléculas. Por último la posición 7 se cree responsable de los efectos adversos a nivel del sistema nervioso central, ya que este radical es el que interacciona con el receptor del GABA (204).



**Figura 6.** Relación entre la estructura y los efectos adversos producidos por las quinolonas.

## 1.7 Mecanismos de acción.

Las quinolonas penetran al interior celular por un sistema de difusión pasiva, principalmente atravesando la membrana, y a través de porinas. Parece ser que las quinolonas más hidrofóbicas penetrarían a través de la bicapa lipídica, mientras que las quinolonas más hidrofóbicas utilizarían las porinas como vía de entrada. Actúan inhibiendo la acción de las topoisomerasas tipo II, proteínas implicadas en la replicación y transcripción del ADN, en concreto, la ADN girasa y la topoisomerasa IV.

La ADN girasa y la topoisomerasa IV son tetrámeros formados por dos subunidades A y dos subunidades B, GyrA y GyrB para la ADN girasa y ParC y ParE (GrlA y GrlB en *S.aureus*) para la topoisomerasa IV. Estos dos enzimas presentan una gran homología entre ellos.

El mecanismo de acción de las quinolonas consiste en la formación de un complejo Quinolona-Enzima-ADN, el cual bloquea la acción normal del enzima lo que inhibe la síntesis de ADN y acaba por provocar la muerte celular (23,104).

Se conocen otras topoisomerasas en procariotas: las topoisomerasas de tipo I, como son las topoisomerasa I y III. Éstas se distinguen de las topoisomerasas de tipo II por ejercer su función sobre el ADN en forma de cadena sencilla en lugar de doble cadena.

Otras topoisomerasas como la topoisomerasa V y la girasa reversa (topoisomerasas de tipo I) y la topoisomerasa VI (de tipo II) han sido descritas en arqueobacterias termófilas. Las

topoisomerasas tipo I y las descritas en arqueobacterias no son diana para las quinolonas (25,172).

### 1.7.1 Modelo de acción

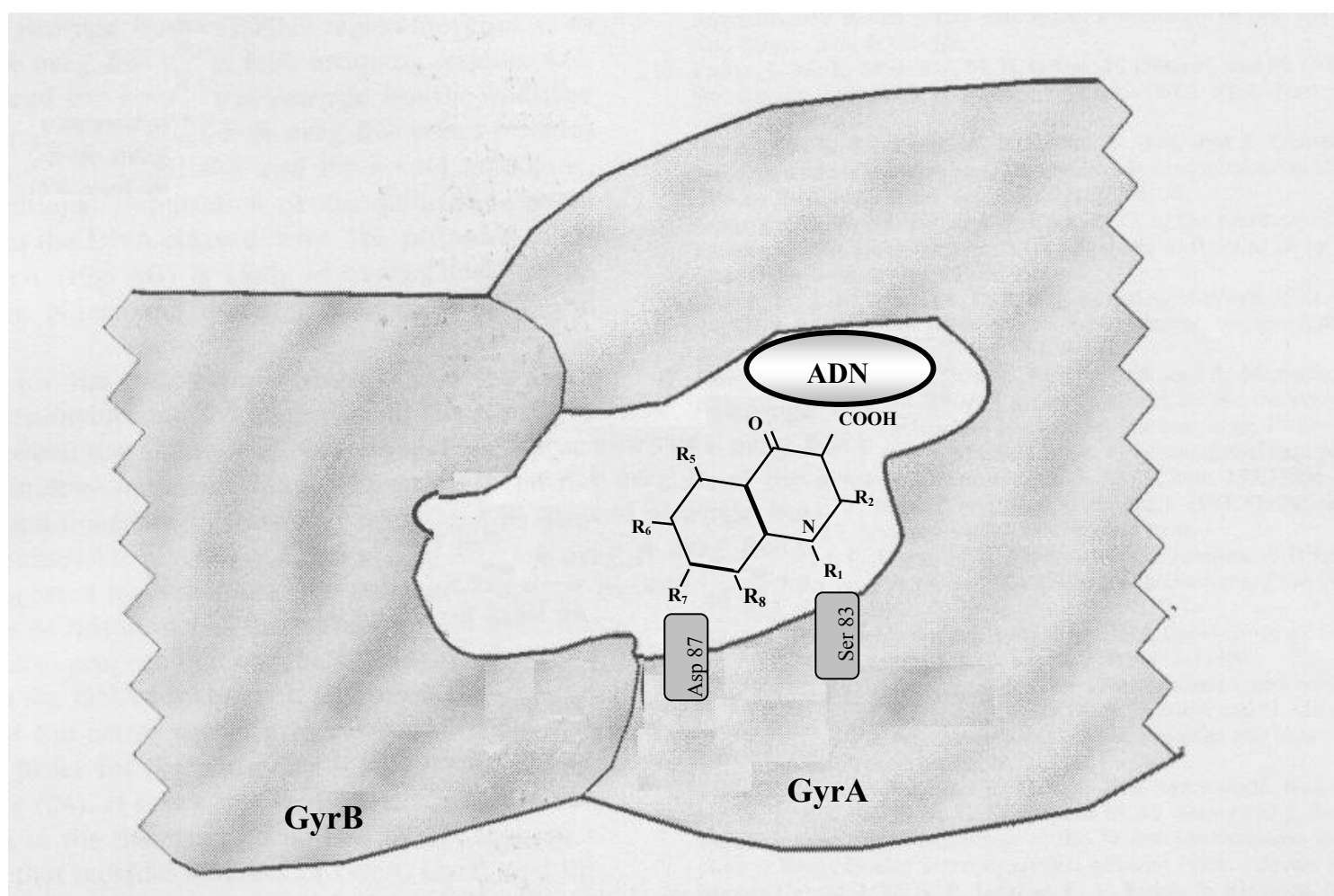
El modelo de acción de las quinolonas más aceptado actualmente es el propuesto por Palumbo *et al.* en 1993 (180). Éste consiste en la formación de un complejo entre la Topoisomerasa-ADN-Quinolona bloqueando la acción de la enzima y provocando la muerte celular.

En este modelo los radicales en posición 3 y 4 de la molécula de quinolona producirían enlaces con un átomo de  $Mg^{2+}$  y éste a su vez se uniría al ADN mediante enlaces con los grupos fosfato de los nucleótidos. Además se produciría un apilamiento entre una de las bases de la región monocatenaria de la cadena de ADN y el anillo de la molécula de quinolona. También se postula que los radicales situados en posición 1 y 7 son los responsables de la interacción con la ADN-girasa o la topoisomerasa IV. Nuestra hipótesis es que la interacción se da en concreto con las posiciones 83 y 87 en GyrA o las posiciones 80 y 84 en ParC de *E. coli* (Figura 7).

En este sentido en nuestro laboratorio en colaboración con el Departamento de Química Orgánica de la Universitat de Barcelona, para demostrar esta hipótesis se midió, mediante modelaje molecular, la distancia entre los radicales 1 y 7 de la molécula de ciprofloxacino que fue de 9 Å y la distancia entre las posiciones 83 y 87 de la subunidad A de la ADN-girasa en diferentes conformaciones proteicas, desde  $\alpha$ -hélice hasta una

conformación completamente extendida donde se obtuvo un rango de 3.5 a 14 Å, lo que indicaría que estas interacciones sí podrían realizarse sin ningún problema (252).

**Figura 7.** Modelo de interacción ADN girasa-quinolona-ADN



## 1.7.2 Moléculas diana

Como ya se ha comentado anteriormente las moléculas diana de las quinolonas son la ADN-girasa y la topoisomerasa IV.

### 1.7.2.1 ADN girasa

La ADN girasa es una proteína hetero-tetramérica formada por la unión de dos subunidades A y dos subunidades B, codificadas en los genes *gyrA* y *gyrB*, respectivamente.

La ADN girasa es la única enzima capaz de introducir un superenrollamiento negativo en la cadena de ADN (103), facilitando la separación de la doble hélice de ADN para mantener la estructura de la horquilla de replicación (51) (Figura 8).

El complejo entre la enzima y el ADN consiste en aproximadamente 130 pb localizadas en el núcleo de la proteína. La unión se realiza mediante enlaces covalentes entre la tirosina (Tyr 122) de la subunidad A con 4 bases libres que se generan después de crear una rotura en el ADN. Posteriormente, y mediante la hidrólisis de ATP (subunidad B), la ADN-girasa introduce un enrollamiento negativo en el ADN, relajando la estructura producida por la horquilla de replicación (96,158,220) y volviendo a unir las dos cadenas de ADN.

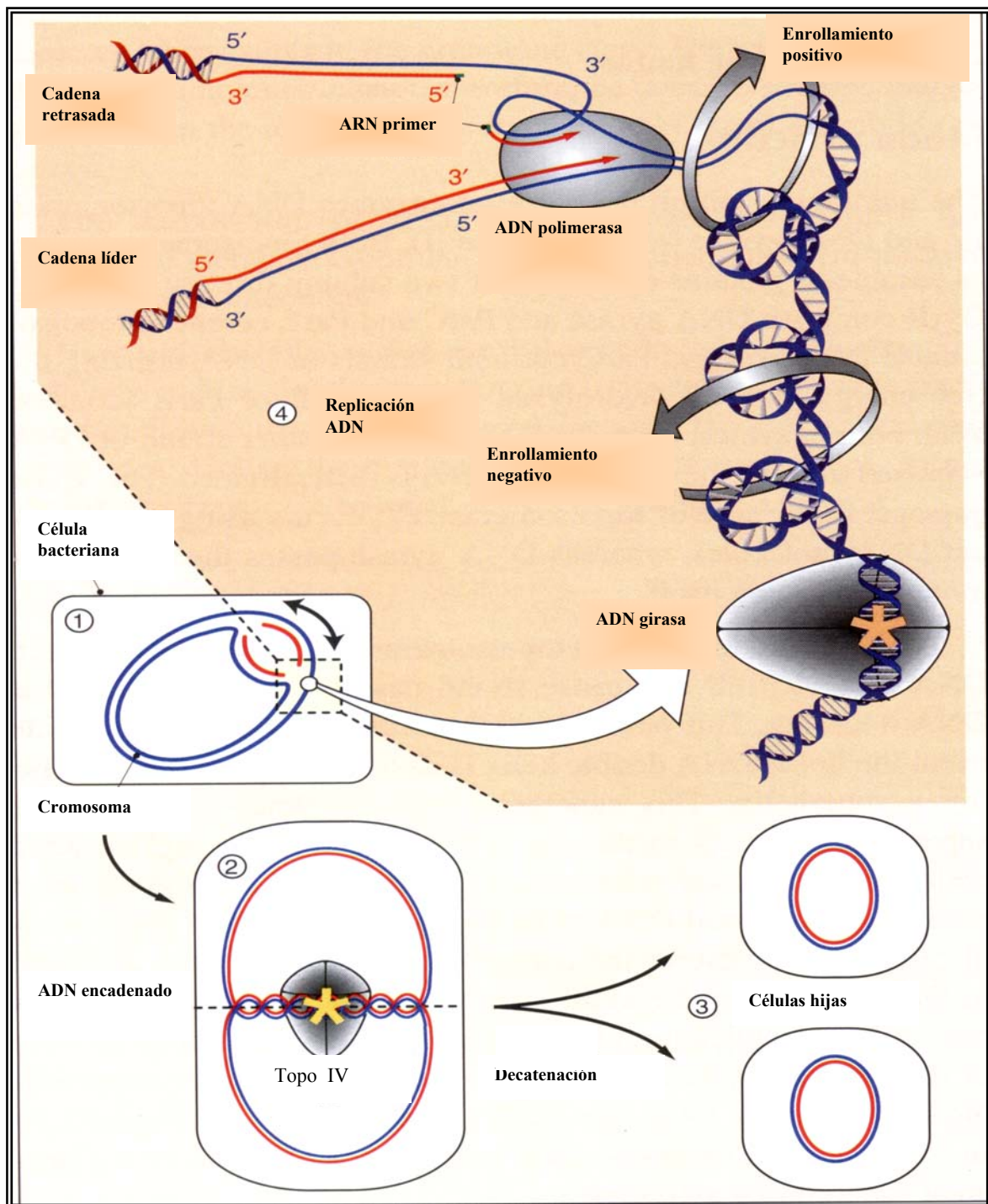
### 1.7.2.2 Topoisomerasa IV

La topoisomerasa IV también es una proteína hetero-tetramérica formada por la unión de dos subunidades A y dos subunidades B, codificadas en este caso en los genes *parC* y *parE* respectivamente (llamados *grlA* y *grlB* en *Staphylococcus aureus*).

Principalmente, la topoisomerasa IV es responsable del desencadenamiento de las dos moléculas “hijas” al finalizarse la replicación del ADN, permitiendo la segregación de los dos nuevos cromosomas bacterianos en dos nuevas células “hijas” (51). También es responsable, como todas las topoisomerasas, de la relajación del ADN (101,269). El mecanismo de acción por el cual la topoisomerasa IV desencadena las dos nuevas moléculas de ADN no se conoce en profundidad (Figura 8).

Cabe destacar en este punto un grupo de microorganismos Gram-positivos entre los cuales podemos destacar a los géneros *Corynebacterium*, *Campylobacter* y *Helicobacter* y las micobacterias, los cuales no poseen topoisomerasa IV. Un estudio realizado en *Mycobacterium smegmatis*, muestra que la ADN-girasa de este microorganismo presenta una alta eficiencia en la separación de las dos nuevas cadenas de ADN, en contraposición con la ADN-girasa de *E.coli*. En este microorganismo la ADN girasa asumiría el papel de la topoisomerasa IV y probablemente este mismo hecho lo compartan todos estos géneros que no poseen la topoisomerasa IV (146).

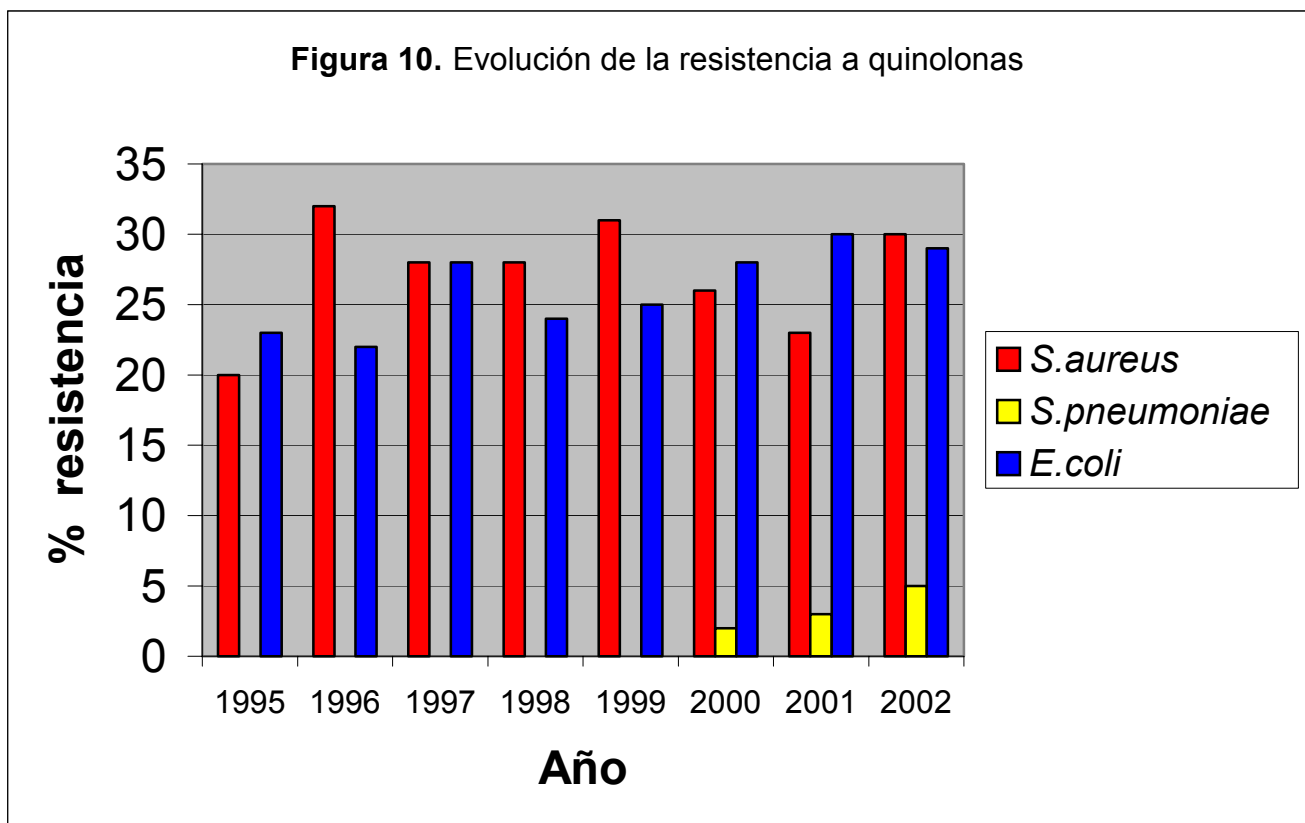




**Figura 8.** Esquema de los mecanismos de acción de las topoisomerasas.

## 1.8 Mecanismos de resistencia.

El uso de quinolonas ha llevado a la aparición de cepas resistentes a esta familia de antibióticos. En la figura 10 podemos observar la evolución del aislamiento de cepas resistentes a quinolonas de *E. coli*, *S. aureus* y *S. pneumoniae* procedentes de hemocultivos, aisladas en el Servicio de Microbiología del Hospital Clínic de Barcelona desde 1995 hasta 2002. Para *S. aureus* y *E. coli* la quinolona utilizada como marcador de resistencia fue el ciprofloxacino mientras que para *S. pneumoniae* el levofloxacino fue el antibiótico utilizado, además sólo se dispone de datos a partir de 1999.



Los mecanismos de resistencia a quinolonas en Gram-positivos se pueden agrupar en general en dos, 1) Alteración de la proteína diana, 2) Sobreexpresión de bombas de expulsión activa, 3) Protección de la diana.

## 1.8.1 Alteración de la diana

Las alteraciones de la diana consisten en sustituciones aminoacídicas en la proteína, la ADN-girasa o la topoisomerasa IV, generadas por mutaciones puntuales en sus genes codificantes. Estas mutaciones tienen como objetivo cambiar el aminoácido en la zona de interacción entre la quinolona y la proteína diana, perdiendo esta afinidad por la proteína diana con la consecuencia que las quinolonas pierden actividad mientras que la enzima sigue siendo activa.

La adquisición de resistencia a las quinolonas en general es gradual y está relacionada con el número de mutaciones que presentan los microorganismos en la región determinante de resistencia a quinolonas (RDRQ), principalmente en los genes *gyrA* y *parC* (195,208,209,223,249-252).

### 1.8.1.1 ADN girasa

#### 1.8.1.1.1 Gen *gyrA*

Las mutaciones que generan resistencia a las quinolonas en microorganismos Gram-positivos se localizan principalmente en la RDRQ. Ésta se localiza entre las bases 201 y 321 del gen *gyrA* o lo que sería lo mismo, entre los aminoácidos 67 y 107 de la proteína, pudiéndose dar pequeñas variaciones en la localización en función de los diferentes microorganismos.

La mayor parte de las mutaciones en esta región se concentran en dos aminoácidos, Ser-84 y Glu-88 en *S. aureus*, y posiciones homólogas en otros microorganismos (tabla 4), responsables de la interacción con la molécula de quinolona. Estos dos aminoácidos son unos de los más conservados entre las diferentes especies de microorganismos.

**Tabla 4.** Posiciones de los aminoácidos diana, de GyrA, de las quinolonas en diferentes especies.

Microorganismo	GyrA	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ser-84	Glu-88
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Ser-81	Glu-85
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Ser-84	Glu-88
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Ser-81	Glu-85
<i>Enterococcus faecalis</i>	Ser-84	Glu-88
<i>Neisseria gonorrhoea</i>	Ser 91	Asp-95
<i>Escherichia coli</i>	Ser-83	Asp-87
<i>Listeria monocytogenes</i>	Thr-84	Phe-88
<i>Corynebacterium striatum</i> *	Ser-87	Asp-91
<i>Corynebacterium amycolatum</i> *	Ser-87	Asp-91
<i>Campylobacter jejuni</i> *	Thr-86	Asp-90
<i>Helicobacter pylori</i> *	Asn-87	Asp-91
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> *	Ala-91	Asp-95

\* Estos microorganismos carecen de topoisomerasa IV

Otros aminoácidos pertenecientes a esta región también se han visto alterados, aunque con mucha menos frecuencia y algunos de ellos se han obtenido mediante selección de cepas resistentes *in vitro*. Así pues, encontramos también mutaciones en los codones de los aminoácidos Ser-85, o Asp-73 en *S. aureus* y en los aminoácidos Ala-88 y Ile-89 en *Corynebacterium* spp todas ellas relacionadas con un incremento en la CMI . Las mutaciones más frecuentes en el gen *gyrA* de *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *Corynebacterium striatum* y *Corynebacterium amycolatum* se muestran en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Mutaciones descritas en la RDRQ de GyrA de *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *Corynebacterium* spp.

Especie	codón	AA wt	AA sustituido
<i>Staphylococcus aureus</i>	73	Asp	Gly
	84	Ser	Leu,
	85	Ser	Pro
	88	Glu	Lys,
	106 *	Gly	Asp
	112 *	Ser	Arg
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	81	Ser	Phe, Tyr
	85	Glu	Lys, Gly
<i>Corynebacterium</i> spp	87	Ser	Arg, Phe, Val
	88	Ala	Pro
	89	Ile	Val
	91	Asp	Gly, Tyr, Ala,

\* sin relación con resistencia.  
AA, Aminoácido; Wt, salvaje.

Cabe destacar que la ADN girasa no es la diana principal de las quinolonas en microorganismos Gram-positivos, aunque existen diferentes estudios que demuestran que este hecho depende de la afinidad de la quinolona por su diana, por lo que dependiendo de la quinolona la diana principal puede variar, como por ejemplo en el caso del esparfloxacino cuya diana principal en los Gram-positivos sí es la ADN-girasa. (102,210).

#### **1.8.1.1.2 Gen *gyrB***

La subunidad B de la ADN-girasa también presenta mutaciones asociadas a la resistencia a las quinolonas aunque de forma más moderada; la mayor parte de estas mutaciones se presentan en mutantes resistentes obtenidos *in vitro*. Éstas se sitúan cerca del centro catalítico del enzima y junto al dominio de unión con la subunidad A, por lo que estas mutaciones serían capaces de generar cambios conformacionales y evitarían o interferirían en la unión de la quinolona con la ADN-girasa. La Tabla 6 muestra las mutaciones encontradas en la subunidad B de la ADN-girasa.

**Tabla 6.** Sustituciones encontradas en la subunidad B de la ADN-girasa.

Especie	codón	AA wt	AA sustituido
<i>Staphylococcus aureus</i>	317	Glu	Asp
	435	Asp	Gln
	461	Lys	Phe
	472 *	Asp	Val
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	405	Ser	Phe
	435	Asp	Asn
	458	Lys	Asn
	460	Ile	Val
	474	Glu	Lys
	478	Ser	Asn, Ile

\* mutación obtenida *in vitro* con una quinolona no fluorada  
 AA Aminoácido, Wt salvaje

## 1.8.1.2 Topoisomerasa IV

### 1.8.1.2.1 Gen *parC* (Gen *grlA* en *Staphylococcus aureus*)

La topoisomerasa IV es la diana principal de las quinolonas en bacterias Gram-positivas, al contrario de lo que ocurre con las Gram-negativas donde la diana principal es la ADN girasa.

Del mismo modo que en la ADN girasa, las mutaciones que confieren resistencia se concentran en la RDRQ, en este caso del gen *parC*. Esta región está comprendida también entre los aminoácidos 67 y 107. Igual que en el caso anterior la mayor parte de las mutaciones en esta región se concentran en dos aminoácidos, Ser-80 y Glu-84 en *S. aureus*, y posiciones homólogas en otros microorganismos (Tabla 7).

**Tabla 7.** Posiciones equivalentes de los aminoácidos diana, de ParC, de las quinolonas en diferentes especies.

Microorganismo	ParC	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ser-80	Glu-84
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Ser-79	Glu-83
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Ser-80	Glu-84
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Ser-67	Asp-71
<i>Enterococcus faecalis</i>	Ser-82	Glu-86
<i>Neisseria gonorrhoea</i>	Ser-87	Glu-91
<i>Escherichia coli</i>	Ser-80	Asp-84
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ser-83	Glu-87

Otras mutaciones en la RDRQ del gen *parC*, como serían las encontradas en el codón del aminoácido Ser-81 o en posiciones fuera de la RDRQ de *S. aureus* como la Ile-45 o la Ser-52, obtenidas a partir de mutantes resistentes obtenidos *in vitro*, también se han relacionado con la adquisición de resistencia, aunque lo más frecuente es encontrarlas asociadas a mutaciones en los codones de los aminoácidos 80 y 84.



En la Tabla 8 se muestra un resumen de las mutaciones más frecuentes encontradas en el gen *parC* de *S. aureus*, *S. pneumoniae*, así como algunas de las mutaciones fuera de la RDRQ de *S. aureus*. Cabe recordar que *Corynebacterium* spp no poseen topoisomerasa IV.

**Tabla 8.** Sustituciones encontradas en la RDRQ de ParC (GrlA) de *S. aureus*, *S. pneumoniae*.

Especie	codón	AA wt	AA mutado
<i>Staphylococcus aureus</i>	41 *	Val	Gly
	45 *	Ile	Met
	48 *	Ala	Thr
	52 \$	Ser	Arg
	80	Ser	Phe, Tyr
	81	Ser	Pro
	84	Glu	Val, Thr, Leu , Gly, Lys
	103 \$	His	Tyr
114 *	Pro	Ser	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	79	Ser	Phe, Tyr
	80	Ser	Pro
	81*	Ile	Trh
	83	Asp	Asn, Tyr, Thr, Gly
	84	Ala	Thr
	95	Arg	Cys
	137 *	Lys	Asn

\*no relacionadas directamente con resistencia, \$ Mutaciones *in vitro* con quinolona no fluorada  
AA Aminoácido, Wt salvaje

### 1.8.1.2.2 Gen *parE* (Gen *grlB* en *Staphylococcus aureus*)

La subunidad B de la topoisomerasa IV, también presenta mutaciones asociadas a la resistencia a las quinolonas. Éstas mutaciones se presentan en la mayoría de los casos en mutantes resistentes obtenidos *in vitro* y también, igual que en la subunidad B de la ADN girasa, se sitúan cerca del centro catalítico del enzima, y junto al dominio de unión con la subunidad A. El mecanismo por el cual estas mutaciones generarían resistencia sería el mismo que en el caso de la subunidad B de la ADN girasa y, por lo general, estas mutaciones si se encuentran sin asociación con mutaciones en los genes *gyrA* o *parC* confieren muy bajos niveles de resistencia. La Tabla 9 muestra las sustituciones encontradas en la subunidad B de la topoisomerasa IV.

**Tabla 9.** Sustituciones encontradas en la subunidad B de la topoisomerasa IV.

Especie	codón	AA wt	AA mutado
<i>Staphylococcus aureus</i>	422	Asp	Glu
	477 §	Asp	Val
	478	His	Tyr
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	368	Ile	Val
	435	Glu	Asp
	474	Asp	Lys

§ Mutaciones *in vitro* obtenidas con una quinolona no fluorada  
AA, Aminoácido; Wt, salvaje

### 1.8.1.3 Diana principal/ diana secundaria.

La diana principal será aquella proteína que se altere en primer lugar para la adquisición de resistencia a las quinolonas. De una forma general diremos que la ADN-girasa es la diana principal en microorganismos Gram-negativos (109), mientras que en bacterias Gram-positivas la diana principal es la topoisomerasa IV (60,61,264). Así , las primeras mutaciones en Gram-negativos las encontraremos en el gen *gyrA*, mientras que en Gram-positivos las encontraremos en el gen *parC* (*grlA* para *S. aureus*) (52,67).

De todos modos, y como se ha visto en el apartado de estructura-actividad, dependiendo de la molécula de quinolona la diana principal se puede ver modificada debido principalmente al radical en posición 7 de la molécula de quinolona (7).

Estos cambios en la preferencia de la diana principal de las quinolonas se han observado en bacterias Gram-positivas, especialmente en *S. aureus* y *S. pneumoniae* (67,248).

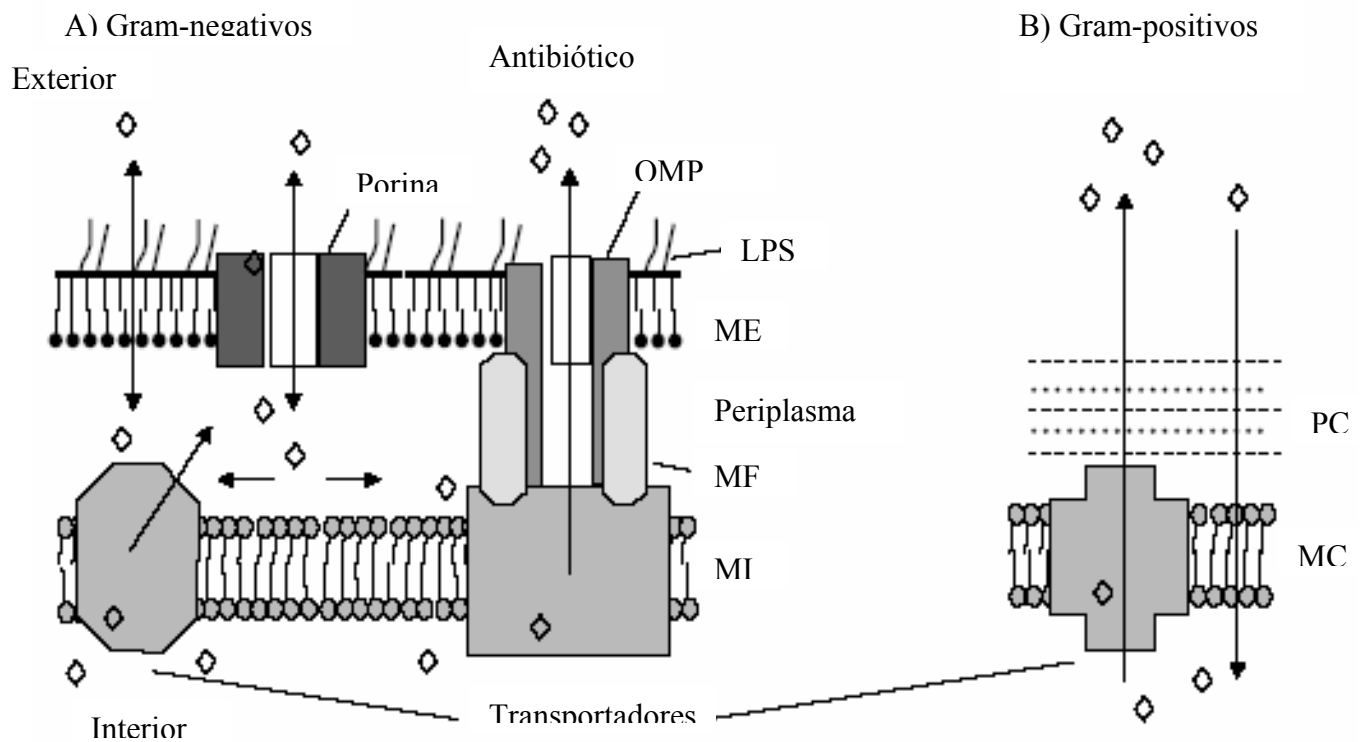
## 1.8.2 Sistemas de expulsión activa

Los sistemas de expulsión activa tienen principalmente una función fisiológica. Están involucrados en procesos de excreción de metabolitos secundarios, tóxicos, e incluso proteínas de captación de nutrientes, como sería el caso de los sideróforos, excretados al medio para la captación de hierro y posteriormente internalizarlo (139). Estos sistemas pueden ser específicos para un sustrato o por el contrario actuar sobre un grupo de sustratos similares

en estructura. Dependiendo de la clase a la cual pertenezca, estos sistemas de expulsión activa utilizan el gradiente de protones o la hidrólisis del ATP como fuente de energía.

En la Figura 9 se muestra un esquema de los diferentes sistemas de expulsión activa en bacterias Gram-negativas y Gram-positivas.

**Figura 9.** Sistemas de expulsión activa en bacterias Gram-negativas y Gram-positivas.



OMP, proteína de membrana externa. LPS, lipopolisacárido. ME, membrana externa. MFP proteína de fusión. MI, membrana interna. PC, pared celular. MC, membrana celular.

Existen 5 clases distintas de sistemas de expulsión activa:

1. **MFS** (en inglés, Major Facilitator Superfamily): Estos sistemas de expulsión están formados por proteínas que presentan 12 ó 14 segmentos transmembrana y la fuente de energía que utilizan para su funcionamiento es el gradiente de protones (139,147,184,212). Este tipo de transportadores se encuentra en todos los tipos celulares, bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y células eucariotas. En bacterias Gram-negativas estos transportadores se encuentra asociados, generalmente, a otras dos proteínas, una MFP (en inglés Membrane Fusion Protein) y a una OMP (en inglés Outer Membrane Protein). Los principales sustratos para este tipo de bombas son antibióticos, azúcares, metabolitos secundarios y aniones. Estas MFS las podemos encontrar entre otros en: *S. aureus* (NorA, QacA, QacB), *S. pneumoniae* (PmrA), *Corynebacterium* (Cmr), *Bacillus* (Bmr, Blt), *E. Coli* (MdfA, EmrB), *Acinetobacter baumannii* (MdfA).
2. **RND** (en inglés, Resistance-Nodulation Cell division family). Estos tipos de transportadores son de mayor tamaño que los anteriores, aunque sólo presentan 12 segmentos transmembrana; utilizan el flujo de protones como fuente de energía y también se asocian con MFPs y OMPs (139,244). Los principales sustratos son antibióticos, ácidos grasos, detergentes, y colorantes. Estos sistemas se encuentran en: *E. coli* (AcrB, AcrF), *Pseudomonas aeruginosa* (MexA, MexD, MexF, MexY) *Neisseria* (MtrD) *Stenotrophomonas maltophilia* (SmeB, SmeE) y *Acinetobacter baumannii* (AdeB). Recientemente se ha descrito un sistema RND localizado en un plásmido transmisible (139)

3. **SMR** (en inglés, Small Multidrug Resistance). Estos transportadores son los más pequeños, constituidos por 4 fragmentos transmembrana y probablemente actúen en forma trimérica (39,139,185). Utilizan el gradiente de protones como fuente de energía. Sólo se han descrito en procariontes, y no se asocian a ninguna proteína. Los sustratos principales suelen ser antibióticos, antisépticos, etidios y tetrafenilfosfatos. Este tipo de transportadores se han descrito por ejemplo en *S. aureus* (QacG, QacH, Smr), *Bacillus* (EbrA) y *E. coli* (EmrE).
  
4. **MATE** (en inglés, Multidrug And Toxic compound Extrusion family). Han sido descritos en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas y también en células eucariotas. Son proteínas de gran tamaño, presentan 12 segmentos transmembrana y su fuente de energía proviene del gradiente de protones (30,139,161). Como todos estos sistemas entre sus sustratos se encuentran los antimicrobianos. Algunos representantes de esta familia son NorM, en *Vibrio parahaemolyticus* y YdhE en *E. coli*.
  
5. **Transportadores tipo ABC** (en inglés, ATP-Binding Cassette). La fuente de energía de estos sistemas de transporte es la hidrólisis del ATP. Entre los sustratos se encuentran azúcares, aminoácidos, iones, antibióticos, polisacáridos y proteínas (57,97,139). Estos transportadores ABC consisten en 6 segmentos transmembrana con el dominio ATPasa localizado en el citoplasma celular. Estos sistemas no son muy comunes entre las bacterias, aunque los podemos encontrar en *Lactococcus lactis* (LmrA) y en *E. coli* (MacAB).

### **1.8.2.1 Resistencia mediada por sistemas de expulsión.**

Basándonos en la secuencia completa de varias bacterias se estima que alrededor de un 5 a un 10% de todos los genes bacterianos codifican para proteínas involucradas en sistemas de expulsión (213,258).

La mayor parte de estos sistemas se expresan de una forma basal o no se expresan. La sobreexpresión de sistemas de expulsión activa es la responsable de la resistencia. Esta sobreexpresión puede deberse a: 1) Una inducción de la expresión de los genes que codifican para estos sistemas, 2) Mutaciones en los promotores de estos genes los cuales alteran la expresión y/o 3) alteraciones en los genes o sistemas de regulación de la expresión génica (63,64,124,127). La finalidad de la sobreexpresión de estos sistemas de expulsión activa es expulsar el antibiótico del interior celular e incrementar la CMI final del microorganismo. Debido a este sistema la CMI puede incrementarse de 4 a 16 veces.

Esta sobreexpresión puede darse concomitantemente con la adquisición de mutaciones en las proteínas diana; así podemos encontrar dos cepas con las mismas mutaciones en los genes diana pero con diferentes CMIs, probablemente debida a la sobreexpresión de una bomba de expulsión en una de ellas.

Los mecanismos de expulsión mejor caracterizados en Gram-positivos son NorA (127,223,226) en *S. aureus*, PmrA (29,80,183,183) en *S. pneumoniae*, Bmr en *Bacillus* y Lde en *Listeria monocytogenes* (84). Usando inhibidores para este tipo de bombas de flujo se ha llegado a caracterizar que aproximadamente cerca de un 50% de las cepas de *S. aureus* y de

*S. pneumoniae* podrían presentar este tipo de mecanismo de resistencia (29,183,190,223). Aunque no todas las quinolonas se ven afectadas de la misma manera, probablemente por la acción conjuntamente de distintas bombas de expulsión (80,123,126,188) (**Artículo V**).

**Tabla 10.** Principales bombas de expulsión en Gram positivos.

Especie	Bombas de expulsión
<i>Staphylococcus aureus</i>	Nor A, Nor B, MsrA, QacA,B, TetK
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	PmrA, Mef E,
<i>Listeria monocytogenes</i>	MdrL, Lde
<i>Bacillus subtilis</i>	Bmr, Blt, EbrAB
<i>Enterococcus faecalis</i>	Lsa, EmeA
<i>Streptococcus pyogenes</i>	MefA
<i>Lactococcus lactis</i>	LmrA, LmrP
<i>Corynebacterium spp</i>	LmrB,

### 1.8.3 Otros mecanismos de resistencia

#### 1.8.3.1 Alteración de la expresión de las proteínas diana.

Recientemente, en *S.aureus* se ha descrito que la alteración en la expresión de los genes *gyrA/gyrB* y de *grlA/grlB* puede alterar la susceptibilidad del microorganismo frente a las quinolonas. En concreto Ince *et al.* (113) describen un aumento de resistencia debido a la reducción de la expresión de la Topoisomerasa IV, que presenta una mutación G→A 13pb gen arriba (“upstream”) del codon de inicio de transcripción. Además en el mismo mutante



encuentran un incremento de la transcripción de *gyrBA*, y de *topB*, postulando que este incremento puede compensar la reducción de la expresión de *parEC*.

Las cepas de este estudio son mutantes obtenidos *in vitro*, por lo que aún no se conoce si este sistema de resistencia se da en cepas clínicas, y con qué frecuencia.

### **1.8.3.2 Mecanismos de resistencia mediados por plásmidos.**

Hasta el día de hoy, no se han descrito mecanismos de resistencia mediados por plásmidos en bacterias Gram-positivas, mientras que sí se ha hecho en bacterias Gram-negativas tales como *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. Este mecanismo está mediado por un gen plasmídico llamado *qnr* (197,240,257). Este gen se detectó en un plásmido conjugativo, en una estructura tipo integrón, en una cepa de *E. coli* de origen urinario (155).

Este mecanismo de resistencia aumenta la resistencia de las cepas de 4 a 8 veces (196,241) y complementa a otros mecanismos de resistencia como la adquisición de mutaciones o a los sistemas de expulsión activa (240).

El mecanismo de acción de Qnr se basa en la unión de esta proteína a la ADN girasa; esta unión no requiere la presencia del complejo ADN girasa-Quinolona-ADN para su formación. Se postula que la formación del complejo Qnr-ADN girasa ocurre antes del bloqueo de la ADN girasa por parte de la quinolona. Además, se ha observado una reducción

en la formación del complejo en presencia de Qnr (241). La presencia de este gen de resistencia se ha descrito en diferentes lugares de la geografía mundial; China, USA, Alemania, Francia y Turquía, aunque con una baja prevalencia (120,144,256,257).

Recientemente, Hata *et al* (93) describieron otro gen de resistencia, *qnrS*, contenido en un plásmido transferible en una *Shigella flexneri*. Esta nueva proteína, QnrS, presenta un 59% de aminoácidos idénticos a Qnr. También en *Vibrio parahaemolyticus* se ha descrito una proteína homóloga a Qnr llamada VPA0095 (169).

### **1.8.3.3 Alteración de las porinas.**

Este mecanismo de resistencia sólo se ha descrito en bacterias Gram-negativas y consiste en disminuir o inhibir la expresión de genes que codifican para porinas, utilizadas por las quinolonas como vía de entrada al interior celular, por lo que la acumulación del antibiótico en el interior celular sería menor (36,154).

Este mecanismo de resistencia generalmente se da a la vez que la sobreexpresión de sistemas de expulsión activa, y esto es debido a los mecanismos de regulación de los genes. Así pues, con un solo regulador como *marA* en el caso de *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae* (238), tenemos una menor penetración del antibiótico (debido a la reducción en la expresión de porinas), más la eliminación del antibiótico (por la sobreexpresión de bombas de flujo), lo que acaba por generar un aumento en la CMI, es decir resistencia.

## 1.9 Mecanismos de transferencia de la resistencia.

Las resistencias generalmente aparecen por mutaciones y posterior selección en presencia de antibiótico, o mediante la adquisición de elementos móviles transmisibles, tales como plásmidos o transposones, integrones etc.

Hay diferentes mecanismos que explican la adquisición o el intercambio de material genético, (figura 11):

- 1) **La transducción**, que consiste en la vehiculización de material genético inter o intra-especie mediada por bacteriófagos, se produce generalmente en una especie particular a la cual el bacteriófago es capaz de infectar.
- 2) **La conjugación**, es capaz de cruzar la barrera entre especies, pudiéndose dar entre bacterias Gram-negativas o Gram-positivas entre sí, e incluso entre Gram-positivos y Gram-negativos. Este mecanismo necesita de un contacto célula-célula, por lo que generalmente se da entre aquellas bacterias que ocupan un mismo nicho ecológico.
- 3) **La transformación**, presente en aquellas bacterias que son capaces de adquirir ADN exógeno del ambiente que les rodea e integrarlo en su cromosoma (21). El ejemplo más claro de una bacteria con este mecanismo de adquisición de resistencias es *S. pneumoniae*.

Por otro lado, se habla de diseminación vertical cuando la diseminación de la resistencia es por causa de un brote epidémico, como por ejemplo la diseminación de un clon epidémico de *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) (21), o se habla de diseminación horizontal cuando hay intercambio genético entre bacterias o adquisición de ADN exógeno, ya sean de la misma especie o de especies diferentes (21).



**Figura 11.** Modelos de transferencia de mecanismos de resistencia.

En el caso de las quinolonas, no se han descrito mecanismos de transmisión de resistencias, debido a que las proteínas diana, ADN-girasa y topoisomerasa IV, así como los mecanismos de expulsión activa, se encuentran localizados en el cromosoma bacteriano y no se han encontrado en plásmidos u otros elementos transmisibles tales como integrones o transposones.

En cambio en Gram-negativos, sólo se ha descrito la transferencia de resistencia a quinolonas mediada por el gen plásmidico *qnr* (ver punto 8.3.2.), en concreto mediante conjugación y entre las enterobacterias (93,155,197,205,240).

En el caso de los estreptococos del grupo viridans y *Streptococcus pneumoniae* se ha descrito la transmisión de resistencia mediante transformación, ya sea *in vitro* o en cepas clínicas, de fragmentos de *gyrA* o *parC* que contienen mutaciones de resistencia (15,59,117).

Éste es un fenómeno poco habitual en el caso de la resistencia a quinolonas (18), pero en cambio es muy frecuente en el caso de la resistencia a  $\beta$ -lactámicos, donde se encuentran una gran variedad de genes mosaico.

## **1.10 Efectos producidos por la propia molécula de quinolona.**

Las quinolonas además de ejercer su función como antimicrobianos, pueden provocar otra serie de cambios en la célula, entre los que se encuentran; 1) la movilidad de elementos de inserción, ya sean transposones, integrones o islas de patogenicidad, y 2) La curación de plásmidos.

Se conoce además que las quinolonas son agentes mutagénicos, por lo que la aparición de mutantes no es sólo debida a mutaciones al azar de las proteínas diana mediante la presión selectiva de las quinolonas si no además esta característica propia de cada molécula favorecerá la aparición de estas mutaciones de manera más rápida.

### **1.10.1 Inducción de la movilidad de elementos genéticos.**

Las quinolonas provocan la movilización de secuencias de inserción, transposones o integrones. El mecanismo por el cual se produce el salto o el cambio de localización de estas estructura no se conoce, pero parece que el sistema SOS bacteriano estaría implicado.

Este efecto, cada vez está adquiriendo mayor importancia, ya que se ha descrito que estos elementos móviles son capaces de insertarse delante de genes capaces de generar resistencia, como bombas de expulsión activa. Al insertarse en estas posiciones en primer lugar inactivan la regulación y en segundo lugar al perder el promotor propio del gen, pasan a utilizar un promotor, de naturaleza más fuerte, contenido en las secuencias de inserción con lo que la expresión de estos genes aumenta.

Este control de la expresión de bombas de expulsión ha sido descrito en *E. coli* y *Salmonella typhimurium*, donde las secuencias de inserción se han localizado delante de *acrAB* y de *acrEF* (119,134,176) aumentando su expresión y en consecuencia la resistencia a quinolonas. Esto también se ha podido demostrar *in vitro*, donde incubando las cepas en presencia de quinolonas se ha observado que estas secuencias de inserción se colocan delante de *acrA* (119).

En nuestro laboratorio, también se ha observado la movilización de elementos de inserción, en concreto en mutantes *in vitro* de *S. aureus* obtenidos con clinafloxacino, se observó que una secuencia de inserción saltó y se localizó delante del promotor de *norA* (Sierra JM, resultados no publicados). La implicación de esta secuencia en la sobreexpresión de esta bomba está todavía por determinar.

Además, estos sistemas no solo afectan a las quinolonas, aun siendo estas quienes lo producen. En *Acinetobacter baumannii* se ha descrito una inserción ISI-Aba, la cual es movilizada por las quinolonas y se localiza delante de *ampC*, que codifica para una  $\beta$ -lactamasa constitutiva que al sobreexpresarse confiere resistencia a  $\beta$ -lactámicos y cefalosporinas. En nuestro grupo (Ruiz Chaler, M., resultados no publicados) se ha llevado un estudio sobre la inducción de esta transposición mediada por ciprofloxacino encontrándose que tiene lugar con una frecuencia de  $2 \times 10^{-4}$ .

### **1.10.2 Curación de plásmidos.**

La curación de plásmidos por parte de las quinolonas está bien documentada, aunque no se conoce bien el mecanismo por el cual se produce. En 1976, Hanh y Ciak (89) demuestran que sustancias que se intercalan entre las cadenas de ADN son capaces de eliminar plásmidos del interior celular, y entre estas sustancias encontramos al ácido nalidíxico. También describen que este fenómeno ocurre en concentraciones subinhibitorias de ácido nalidíxico. Posteriormente aparecen más trabajos (27,259) con otras quinolonas donde se observa el mismo efecto, por lo que podemos suponer que esta característica de curación de plásmidos la comparte toda la familia de las quinolonas.

Otro efecto relacionado, es la inhibición de la transferencia de plásmidos ejercida por las quinolonas. En este caso parece que la inhibición se produce por un funcionamiento ineficiente del sistema de conjugación en presencia de quinolonas (33,166,260). También en este caso las concentraciones de quinolonas están por debajo de las CMI de las cepas utilizadas en los estudios.

### 1.10.3 Mutagenicidad

El efecto mutagénico mediado por las quinolonas fue demostrado mediante el test de mutagenicidad en *Salmonella* por Levin *et al* (138), concretamente para el ácido nalidíxico y el ofloxacino. Años más tarde Ysern *et al* (268) hizo extensivo esta característica a otras quinolonas como el norfloxacino, temafloxacino y el lomefloxacino. Se ha sugerido que la mutagenicidad mediada por las quinolonas requiere que el sistema de reparación por excisión Uvr sea funcional, además de estar implicado el sistema SOS (40,83).

Esta característica, la mutagenicidad, la comparten todas las moléculas de la familia de las quinolonas, pero parece que el grado de mutagenicidad que presentan cada una de ellas es distinto (**Artículo V**) y se ha relacionado con el radical en posición 8 de la molécula de quinolona (68,217). Además en un estudio reciente (**Artículo V**) se ha relacionado el grado de mutagenicidad que presentan diferentes quinolonas, en dos tests distintos, con la capacidad o rapidez que tienen las mismas para seleccionar mutantes resistente *in vitro*.



## 1.11 El problema de la multiresistencia.

Los microorganismos no sólo presentan resistencia a las quinolonas, sino que pueden presentar resistencia a cualquier antibiótico. El problema se presenta cuando un mismo microorganismo presenta resistencia a múltiples antibióticos. Actualmente se aíslan bacterias resistentes a múltiples antibióticos causando graves problemas para el tratamiento.

Patógenos Gram-negativos tales como *E. coli*, *Samonella* spp, *Stenotrophomonas maltophilia*, y *Acinetobacter baumannii* presentan muy frecuentemente patrones de multiresistencia lo que representan un grave problema para el tratamiento de las infecciones causadas por estos microorganismos. El caso de *Acinetobacter baumannii* es especialmente grave, se han llegado a describir aislamientos clínicos que presentan resistencia a todos los antibióticos disponibles.

Por otro lado, las infecciones producidas por bacterias Gram-positivas son cada vez más importantes, particularmente las ocasionadas por aquellos patógenos que también presentan multiresistencia, como podría ser el caso de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y los enterococos resistentes a la vancomicina.

Por ello, el conocimiento de las bases moleculares de los mecanismos de resistencia es útil, en primer lugar para desarrollar nuevos fármacos que eviten los mecanismos de resistencia presentes, y en segundo lugar poder elegir nuevas combinaciones antibióticas, más eficaces para el tratamiento de las infecciones producidas por bacterias multiresistentes.

### **1.11.1 Artículo I**

***Mecanismos de acción y de  
resistencia a los antimicrobianos en  
bacterias Gram-positivas.***

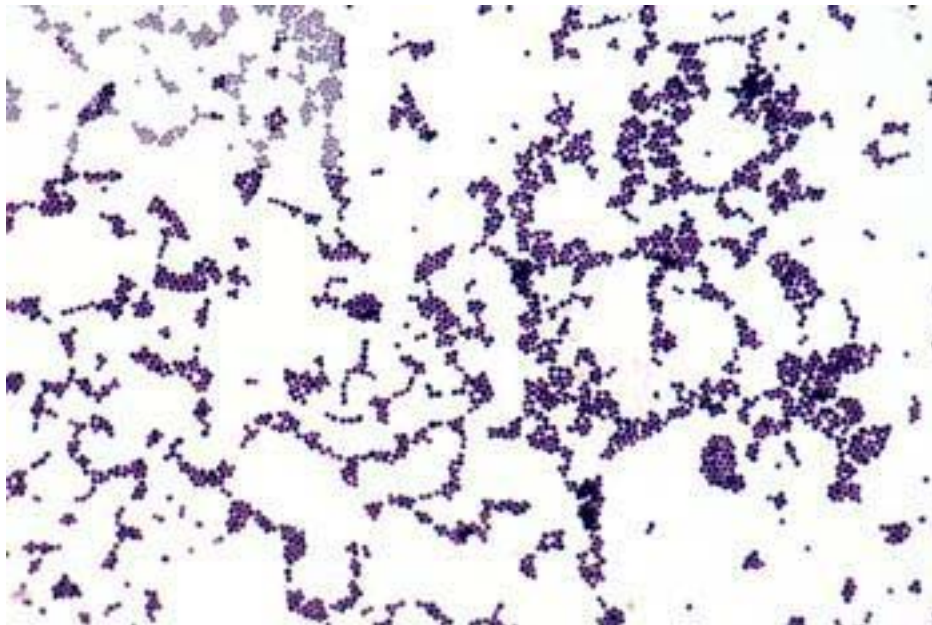
***Infecciones e Inmunología***

***2005 IV: nº1: 22-32***

**2 *Staphylococcus*  
*aureus***

El género *Staphylococcus* pertenece a la familia *Micrococcaceae*, la cual engloba también otros géneros de escasa importancia clínica. En este género se conocen más de 25 especies, de las cuales sólo cuatro tienen relevancia clínica; *S. aureus*, *S. epidermidis* y *S. saprophyticus* y *S. luguinensis*. De éstas la primera es, sin duda, la más importante causando ya sean infecciones nosocomiales como infecciones adquiridas en la comunidad..

El *S. aureus*, como todo el género al que pertenece, es un coco Gram-positivo, inmóvil, no esporulado, de forma esférica de 0,8 a 1µm de diámetro. Una de sus características es que se puede dividir en los tres planos espaciales, lo que les permite formar grupos celulares en forma de racimo, típicos de este género, aunque también se pueden encontrar en formas aisladas o en forma de cadenas cortas.



**Figura 12.** Tinción de Gram, *S. aureus*; tomada de [www.visualsunlimited.com](http://www.visualsunlimited.com)

El estafilococo crece bien en medios de cultivo enriquecidos, son organismos anaerobios facultativos, la temperatura óptima de crecimiento puede variar de 30 a 37 °C y algunas cepas se cultivan mejor en presencia de una atmósfera rica en CO<sub>2</sub>. Producen catalasa y pueden fermentar varios hidratos de carbono con producción de ácido láctico y según la especie pueden crecer en presencia de altas concentraciones de cloruro sódico. En agar las colonias son lisas, opacas, redondeadas y blancas o pigmentadas dependiendo de la especie.

La principal característica que permite diferenciar al *S. aureus* de los demás miembros de su género es la producción de coagulasa.

## **2.1 Patógenesis**

El principal reservorio de *S. aureus* es el ser humano, encontrándose en portadores sanos entre 20% - 25% de la población. Esta colonización puede afectar a la mucosa nasal, orofaringe y epidermis en general.

Tiene una gran capacidad para sobrevivir en ambientes adversos por la acción de sus determinantes de patogenicidad (cápsula polisacárida, producción de enzimas como la coagulasa, catalasa, hialurodinasa etc.), así como por su capacidad de crecer formando biopelículas (biofilm).

El *S.aureus* expresa una serie de potenciales factores de virulencia los cuales le permite en primer lugar colonizar un tejido para posteriormente infectarlo.

En primer lugar encontramos proteínas u otras estructuras que facilitan la colonización del huésped, formado por componentes de la pared celular como son el peptidoglucano y la proteína A. Además entre éstos se encuentra el “clumping factor” o factor de agregación que posee la capacidad de asociarse al fibrinógeno y le permite colonizar las mucosas. En segundo lugar encontramos distintas enzimas que participan el proceso de infección entre otras encontramos la coagulasa, que transforma el fibrinógeno en fibrina, coagulando el plasma y formando un foco aislado o absceso; las estafiloquinasas, que descomponen las mallas de fibrina contribuyendo a la capacidad invasora; y otras enzimas como fosfolipasas, fosfatasas, nucleasas que también colaboran en el proceso de infección. Por último, encontramos las toxinas, éstas son de naturaleza proteica y pueden producir su efecto en zonas distantes de la infección, entre estas las más importantes son las hemolisinas, que actúan rompiendo la membrana de distintas células como hematíes, leucocitos, fibroblastos etc.; toxinas exfoliativas; la toxina del síndrome del shock tóxico que inducen la producción de interleucinas; y por último enterotoxinas.

## **2.2 Presentaciones clínicas.**

*S. aureus* está considerado como un patógeno primario, causando infecciones ya sea a nivel nosocomial o en el ámbito comunitario.

El *S. aureus* produce infecciones superficiales como son; forúnculos, foliculitis, infecciones de herida quirúrgica. También provoca infecciones mucho más graves, especialmente en pacientes inmunodeprimidos, quemados, o con alguna enfermedad crónica. estas infecciones incluyen neumonía, abscesos, osteomielitis, endocarditis, o meningitis.

También es causa de infecciones asociadas a dispositivos intravasculares o a prótesis articulares o válvulas artificiales de corazón.

No sólo causa infecciones, sino que además es capaz de presentar cuadros clínicos debido a la excreción de toxinas, así puede producir toxoinfecciones alimentarias debido a las enterotoxina que secreta, o el síndrome del shock tóxico debido a la secreción de la toxina del shock tóxico (TSST) muy relacionada con el uso de tampones en mujeres.



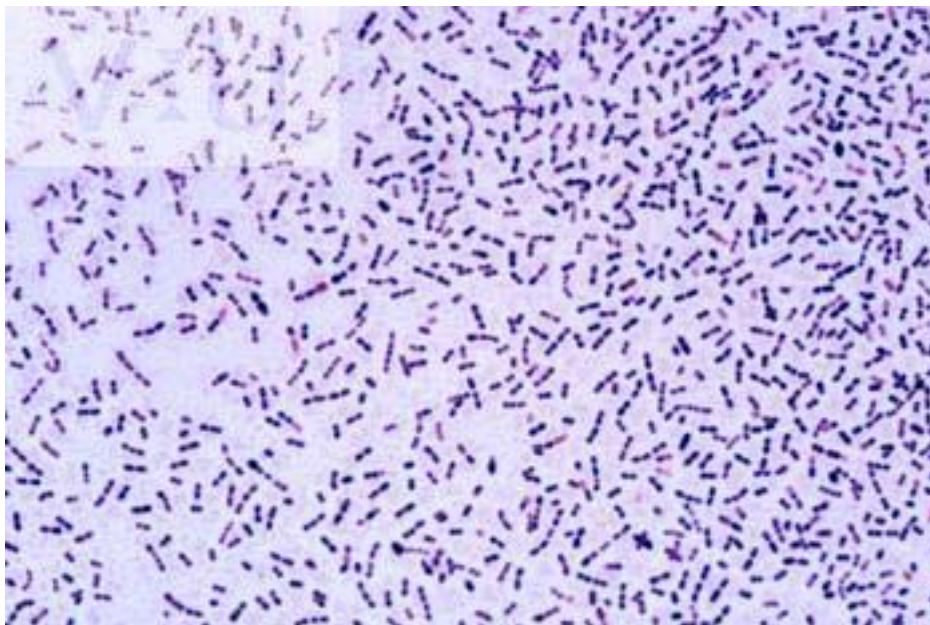
**Figura 13.** *Staphylococcus aureus* adherido a un catéter.

# ***3 Streptococcus pneumoniae***



El género *Streptococcus* es un grupo heterogéneo de bacterias Gram-positivas, de una gran importancia clínica. Algunas de las especies pertenecientes a este género son parte de la flora normal de animales y humanos, pudiendo además ocasionar enfermedades que varían desde aguda a crónicas. La nomenclatura de este grupo, especialmente en medicina está basada más en la identificación de los serogrupos, en concreto se utiliza la clasificación de Lancefield (clasificación para estreptococos  $\beta$ -hemolíticos) , más que en el nombre de las especies que forman el género. Dentro de este género encontramos dos patógenos de importancia como son *S. pneumoniae* y *S. pyogenes*.

*S. pneumoniae* es un coco Gram-positivo encapsulado, inmóvil y no esporulado, de forma oval o esférica de 0.5 a 1.25  $\mu\text{m}$  de diámetro. Generalmente esta en forma de diplococos o formando cadenas. A diferencia de los *Staphylococcus* no puede formar racimos debido a que solo tienen un plano de división.



**Figura 14.** Tinción de Gram. *Streptococcus pneumoniae*; tomada de

[www.visualsunlimited.com](http://www.visualsunlimited.com)

*Streptococcus pneumoniae* necesita de ciertos requerimientos para su aislamiento, como crecer en una atmósfera con elevada concentración de CO<sub>2</sub>, aunque son anaerobios facultativos, y pueden fermentar una amplia gama de carbohidratos. Son catalasa y oxidasa negativos, y  $\alpha$ -hemolíticos. En placas de agar-sangre las colonias de pneumococo presentan un aspecto brillante y son circulares y pequeñas, de alrededor de 1mm.

Una característica que permite diferenciar al *S. pneumoniae* del resto de *Streptococcus* del grupo viridans es la sensibilidad a la optoquina, que inhibe el crecimiento del pneumococo pero no de los estreptococos del grupo viridans.

### **3.1 Patogenesis**

El *S. pneumoniae* fue aislado por primera vez en 1881 por Stenberg y Pasteur en estudios independientes y rápidamente se relaciono con la neumonía lobular aguda. Este microorganismo infecta solo a humanos y no se ha encontrado otro reservorio, se conoce que aproximadamente un 25-35% de la población posee *S. pneumoniae* como parte de la flora normal de la orofaringe.

Es un microorganismo extremadamente lábil, es sensible a los cambios bruscos de temperatura (frio-calor) y no es resistente a los ambientes secos, por lo que la transmisión de dicho microorganismo es directa persona-persona. Provocan infecciones principalmente cuando la resistencia del huésped es menor, principalmente en niños menores de 2 años y personas mayores de unos 65 años.

Los factores de patogenicidad de *S. pneumoniae* no se conocen bien. Sí parece tener una relación directa con la virulencia de este microorganismo la posesión de cápsula. En diversos estudios con ratones se ha demostrado que las cepas que carecen de cápsula son menos virulentas, parece que la cápsula protegería a los *S. pneumoniae* de los procesos de fagocitosis. Otros factores de patogenicidad, que contribuirían a la virulencia serían componentes de la pared celular, en concreto el peptidoglucano y los ácidos teicoicos, que producen una gran respuesta inflamatoria, neumolisinas, que parecen tener un comportamiento citotóxico para las células eucariotas y otros como autolisinas y adhesinas.

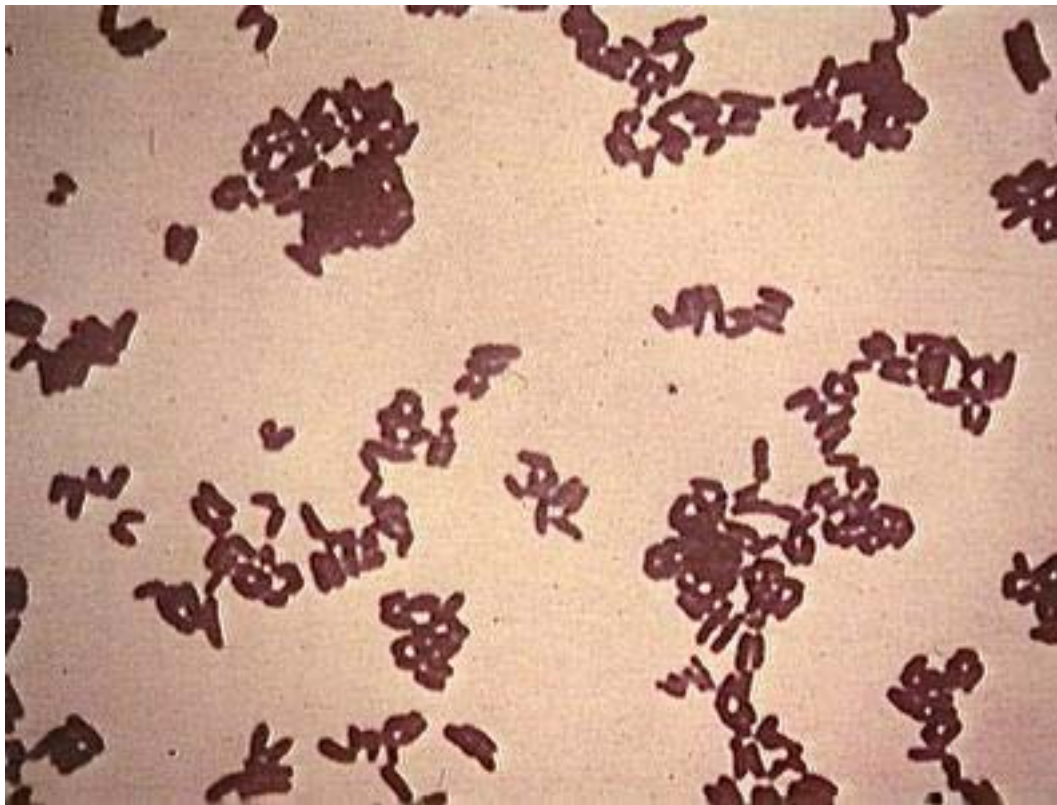
### **3.2 Presentaciones clínicas.**

El *S. pneumoniae* esta considerado como el microorganismo más importante como causa de neumonía adquirida en la comunidad.

Además de la neumonía, *S. pneumoniae*, es causa de infecciones del tracto respiratorio superior e inferior; otitis media, especialmente en niños y sinusitis. Una de las complicaciones graves, es la meningitis que generalmente ocurre por una extensión de la infección desde el oído medio, o después de una bacteriemia con foco pulmonar. Menos frecuentes son otras infecciones como la infección articular o la osteomielitis por *S. pneumoniae* debidas, generalmente, también a una bacteriemia previa y rara vez es causa de endocarditis.

# ***4 Corynebacterium*** ***SPP.***

El género *Corynebacterium* ha sido considerado durante muchos años como un género de escasa o nula implicación clínica, con excepción de *C. diphtheriae* único patógeno reconocido, dado la gravedad de la enfermedad que provoca la toxina que excreta al medio, el resto de microorganismos de este género se encuentran en la flora normal de humanos y animales. A los microorganismos pertenecientes a este género también se les conoce como difteroides o corineformes, esto es debido a que presentan una morfología parecida o idéntica a la que presenta *C. diphtheriae* en una tinción de Gram. En este tipo de tinción se observa una disposición característica de las células que recuerda al grafismo de los símbolos chinos.



**Figura 14.** Tinción de Gram de *C. diphtheriae*

Las corinebacterias son bacilos Gram-positivos, de unas 0,5 a 1-8 $\mu$ m, no esporulado, normalmente inmóviles, son generalmente aerobias o anaerobias facultativas y son productoras de catalasa. Para su crecimiento requieren de un medio enriquecido, como agar-sangre, a una temperatura de alrededor de 37 °C y una atmósfera enriquecida en CO<sub>2</sub>.

La identificación de las especies que componen este género es difícil, dada su complejidad y su escasa importancia clínica los sistemas de identificación no discriminan suficientemente y en muchas ocasiones las identificaciones no son correctas. Durante los 20 últimos años se han usado la composición de los ácidos micólicos, fermentación de azúcares, para su identificación y clasificación.

De los factores de patogenicidad se conoce muy poco o nada, con excepción de la toxina diftérica. Esto es debido a que solo se consideraba a *C. diphtheriae* como patógeno, mientras que el resto de las especies pertenecientes a este género se consideraban como especies saprofitas y su aislamiento en una muestra clínica era considerada como una contaminación de la muestra. Pero en los últimos años se ha observado un incremento de publicaciones asociando a este género con diferentes infecciones, como endocarditis, osteomielitis, probablemente asociado al incremento de personas inmunodeprimidas, ya sean por estar sometidas a inmunosupresores debido a un trasplante de órganos, o por el incremento de pacientes VIH positivos. Por este motivo hay autores que sugieren que se preste una especial atención cuando estos microorganismos se aíslan en cultivo puro, o en gran cantidad en una muestra clínica sobre todo en aquellos pacientes con algún factor que pueda predisponer a infecciones por *Corynebacterium* spp.

# ***5 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS***

Las quinolonas son un grupo de antimicrobianos sintéticos, con un amplio espectro de acción y utilizados con gran éxito para el tratamiento de muy diversas patologías. Es también un grupo en plena fase de desarrollo, donde continuamente están apareciendo nuevas moléculas más activas que las preexistentes en muchos casos.

Lamentablemente, la resistencia a quinolonas presenta entre la mayoría de sus moléculas lo que se conoce como resistencia cruzada, o susceptibilidad reducida. Por ello y para poder desarrollar nuevas moléculas dentro de esta familia es importante conocer cuales son los mecanismos de resistencia que presentan los microorganismos, en concreto las bacterias Gram-positivas, frente a estos compuestos. De este modo se podrían diseñar nuevas moléculas que no se vean afectadas por los mecanismos de resistencia ya conocidos. Otro de los parámetros importantes es conocer como las propias quinolonas seleccionan la aparición de mutantes resistentes.

Por todos estos motivos, para el presente trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

- 1- Investigar las bases moleculares de los mecanismos de resistencia en bacterias Gram-positivas. En concreto, a *S.aureus* un importante patógeno nosocomial, a *S. pneumoniae* un patógeno extrahospitalario y a *Corynebacterium* spp. un patógeno oportunista emergente, perteneciente a la flora habitual de la piel.
- 2- Estudiar la selección *in vitro* de mutantes resistentes a quinolonas en aislamientos clínicos de *S. aureus* y *S. pneumoniae*.
- 3- Determinar el grado de mutagenicidad de las diversas fluoroquinolonas y correlacionarla con la selección de mutantes resistentes.



# **6 RESULTADOS**

## **6.1 ARTICULO II**

***Correlation between the activity of  
different fluoroquinolones and  
presence of mechanisms of quinolone  
resistance in epidemiologically related  
and unrelated strains of methicillin-  
susceptible and -resistant *S. aureus****

***Clinical Microbiology and Infection,  
[2002; 8 \(12\):781-90](#)***

**RESUMEN**

**OBJETIVO:** Determinar la actividad de 5 fluoroquinolonas frente a 22 aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus* (13 resistentes a meticilina (SARM) y 9 sensibles a meticilina (SASM). En los que se caracterizaron los mecanismos de resistencia a dichos agentes antibacterianos.

**METODOS:** Las CMI a las diferentes quinolonas se realizó mediante microdilución, en presencia y ausencia de reserpina. Se amplificaron y secuenciaron las regiones determinantes de resistencia a quinolonas (RDRQ) de los genes *gyrA*, *gyrB*, *grlA* y *grlB*. La relación epidemiológica se realizó mediante el análisis de la digestión del ADN cromosómico con una enzima de restricción de baja frecuencia de corte, *SmaI*.

**RESULTADOS:** Las cepas SASM presentaron menor homología que las cepas SARM las cuales solo mostraron dos clones. Trovafloxacino fue la quinolona más activa frente a los aislamientos clínicos de *S.aureus*. Los aislamientos clínicos de *S.aureus* permanecen sensibles incluso presentando una sustitución en ambas subunidades GyrA y GrlA. Además, trovafloxacino no es un buen sustrato para NorA.

**CONCLUSIONES:** Trovafloxacino fue la quinolona más activa frente a las cepas de *S. aureus*, seguido de levofloxacino y esparfloxacino, mientras que ciprofloxacino y norfloxacino fueron las menos activas, en ambas situaciones en presencia y ausencia de reserpina. Cepas epidemiológicamente relacionadas de *S. aureus* presentan diferentes mecanismos de resistencia, sugiriendo un evolución divergente del mismo clon. Finalmente, 16 *S. aureus* con una CMI a ciprofloxacino en presencia de reserpina 1mg/L ya presentan una mutación en el gen *grlA*. Esta CMI podría usarse como marcador de presencia de una mutación, contraindicando el uso de quinolonas, ya que se podría adquirir una segunda mutación durante el tratamiento.

## **6.2 ARTICULO III**

***Characterization of *in vitro* obtained  
sparfloxacin-resistant mutants of  
*S. aureus****

***International Journal of Antimicrobial  
Agents***

***2001; 18(2): 107-12***

**RESUMEN**

Un aislamiento clínico de *Staphylococcus aureus* sensible a esparfloxacino se cultivo en concentraciones crecientes de esparfloxacino. Se analizó la presencia de mutaciones en los genes *gyrA*, *gyrB*, *grlA* y *grlB*. La primera mutación encontrada se localizó en el gen *gyrA* (Glu88 a Lys). La mutación en el gen *grlA* que ocasionaba un cambio en el aminoácido Ser80 a Tyr no apareció hasta dos pasos de selección posterior. No se encontraron mutaciones en los genes *gyrB* o *grlB*. Las bombas de expulsión están involucradas en la adquisición de resistencia en concreto a norfloxacino y cirpofloxacino. La sobreexpresión de NorA puede ser responsable del incremento de la CMI del último mutante obtenido pasando de 32mg/L a >256mg/L. Diferentes incrementos en la CMI de esparfloxacino se ven afectados por algún mecanismo desconocido.

### **6.3 ARTICULO IV**

***Prevalence of two different genes  
encoding NorA in 23 clinical strain of *S.*  
*aureus****

***Journal of Antimicrobial Chemotherapy***  
**[2000; 46: 145-46](#)**

## **6.4 ANEXO**

### ***Caracterización de los mecanismos moleculares de resistencia en *S. pneumoniae****

El aislamiento de cepas de *S. pneumoniae* resistentes a múltiples antibióticos,  $\beta$ -lactámicos, macrólidos, tetraciclinas, y cotrimoxazol, es un problema de ámbito mundial mostrando un notable incremento durante la década de los 90 (116), lo que hacía indispensable la búsqueda de alternativas terapéuticas. Una alternativa se encontró en las nuevas quinolonas o respironas, como el levofloxacino, gatifloxacino, moxifloxacino, y gemifloxacino, que presentaban una muy buena actividad frente a los patógenos Gram-positivos en especial aquellos que causan infecciones respiratorias, comparándolas con las quinolonas clásicas como el ciprofloxacino u ofloxacino que presentaban limitaciones frente a este tipo de microorganismos. Actualmente, el uso de estos agentes antimicrobianos se ha generalizado de una manera muy rápida, lo que ha generado un aumento de cepas resistentes a quinolonas, hay diferentes estudios que muestran la prevalencia de cepas resistentes en diferentes países, encontrando desde un 1.4% en USA a un 7% de cepas resistentes en España (35,49,116,140,186).

La resistencia a quinolonas en *S. pneumoniae*, como en la mayoría de especies bacterianas, esta mediada por dos factores: 1) Mutaciones en las proteínas diana, la ADN-girasa (codificada en los genes *gyrA* y *gyrB*) y la topoisomerasa IV (codificada en los genes *parC* y *parE*) (181,182,187), principalmente en las subunidades A de dichos enzimas, y 2) Sobreexpresión de sistemas de expulsión activa (28,80,188). PmrA es la bomba de expulsión mejor caracterizada en *S.pneumoniae*.

La finalidad de este trabajo fue analizar los mecanismos de resistencia en aislamientos clínicos de *S. pneumoniae* para disponer de cepas bien caracterizadas para posteriores estudios, como evaluar la susceptibilidad de nuevas quinolonas frente a cepas con



mecanismos de resistencia conocidos, estudios de selección de cepas resistentes *in vitro* u otros.

### **Materiales y métodos.**

Para caracterizar los mecanismos moleculares de resistencia a quinolonas se escogieron 22 aislamientos clínicos de *S. pneumoniae*, procedentes de distintos tipos de muestras clínica remitidas al Servicio de Microbiología del Hospital Clínic de Barcelona. Catorce cepas fueron sensibles a ciprofloxacino y 8 fueron resistentes a ciprofloxacino.

**Susceptibilidad.** Se determinó la susceptibilidad (CMI) de las 22 cepas frente a 6 quinolonas: ciprofloxacino, levofloxacino, moxifloxacino, gemifloxacino trovafloxacino y clinafloxacino, siguiendo el protocolo y las recomendaciones del “National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)”.

Para determinar la presencia de sistemas de expulsión se determinó la CMI en presencia de 25 µg/ml de reserpina, un inhibidor de algunos sistemas de expulsión activa. Se entiende que hay presencia de una sobreexpresión de sistemas de expulsión activa cuando la CMI en presencia de este inhibidor se reduce un mínimo de 4 veces.

Como control se utilizó la cepa estándar ATCC 49619, de la colección de cultivos tipo americana.

**Amplificación y secuenciación de la RDRQ de los genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE* de *S. pneumoniae*.** La amplificación de dichos genes se realizó mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) siguiendo el protocolo y los cebadores utilizados por Pan *et al* (181). Para la secuenciación del la RDQR de los genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE*, se procedio a recuperar el producto de PCR mediante un kit comercial de recuperación (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System; Promega, Madison, Wis.) para su posterior secuenciación con el kit a BigDye sequence kit v3.1; Applied Biosystems, Foster City, Calif.) y su posterior detección en el secuenciador automático (Abi Prism 3100, Perkin Elmer, Foster City, CA, USA).

## RESULTADOS

**Susceptibilidad antimicrobiana.** La Tabla 1 muestra las CMI obtenidas de: ciprofloxacino, moxifloxacino, levofloxacino, gemifloxacino, trovafloxacino y clinafloxacino, en presencia y ausencia de reserpina, un inhibidor de sistemas de expulsión activa, de las 22 cepas clínicas de *S. pneumoniae* estudiadas.

Ocho de las 22 cepas presentaron resistencia a ciprofloxacino y levofloxacino, de las cuales 5 presentaban también resistencia a moxifloxacino y trovafloxacino y una cepa presentaba resistencia a moxifloxacino. En cuanto a la resistencia a gemifloxacino y clinafloxacino, no está definido un punto de corte pero si tomamos los mismos que para las quinolonas en general que suele ser de: sensible  $\leq 1\mu\text{g/ml}$  y resistente  $\geq 4\mu\text{g/ml}$ , observamos que no existiría ninguna cepa resistente.

Al evaluar la CMI en presencia de reserpina se observa que no todos los antibióticos se ven afectados. Moxifloxacino y trovafloxacino no muestran ningún cambio en las CMI en

presencia de reserpina, 1 cepa muestra un descenso en la CMI de gemifloxacino y 2 cepas presentan una disminución en la CMI de clinafloxacin. Por el contrario ciprofloxacino y levofloxacino son los dos antibióticos donde se observa un mayor efecto de la inhibición de sistemas de expulsión activa por parte de la reserpina, en este caso 7 cepas presentan una reducción de la CMI de ciprofloxacino y 12 cepas presentan una disminución de su CMI de levofloxacino.

**Tabla 1.** CMI a diferentes quinolonas en presencia y ausencia de reserpina de 23 cepas de *S. pneumoniae*.

CEPA	Cip		Mox		Lev		Gem		Trov		Clin	
	-R	+R	-R	+R	-R	+R	-R	+R	-R	+R	-R	+R
5-321	64	32	4	4	32	8	1	0.25	8	8	2	0.5
5-1	1	0.25	0.125	0.125	1	0.5	≤0.015	0.007	0.06	0.06	0.06	0.03
5-4	0.5	0.25	0.25	0.125	1	0.5	≤0.015	0.007	0.06	0.06	0.06	0.03
5-6	1	0.25	0.125	0.06	1	0.5	≤0.015	0.007	0.06	0.06	0.06	0.03
5-7	1	0.25	≤0.06	0.06	1	0.25	0.03	0.015	0.125	0.125	0.06	0.03
5-11	1	0.5	0.125	0.125	1	0.25	≤0.015	0.015	0.06	0.125	0.06	0.06
5-15	1	0.5	0.125	0.125	1	0.25	0.03	0.015	0.06	0.125	0.06	0.06
5-19	2	0.5	0.125	0.125	1	0.5	≤0.015	0.007	0.06	0.06	0.125	0.06
5-21	2	0.5	0.06	0.125	1	0.5	0.03	0.015	0.06	0.06	0.06	0.06
5-22	0.5	0.25	≤0.06	0.125	0.5	0.5	≤0.015	0.007	0.06	0.06	0.03	0.03
5-23	0.25	0.125	≤0.06	0.06	1	0.5	≤0.015	≤0.003	0.06	0.06	0.03	0.03
5-26	1	0.25	0.125	0.125	1	0.25	≤0.015	≤0.003	0.06	0.06	0.03	0.03
5-51	32	16	4	2	16	8	0.06	0.125	2	2	0.5	0.5
5-102	4	8	2	2	8	4	0.06	0.06	1	2	0.25	0.5
5-115	64	16	4	2	16	4	0.25	0.125	4	2	0.5	0.5
5-140	64	16	4	4	32	8	0.5	0.25	4	4	1	0.5
5-144	32	16	2	2	16	4	0.25	0.125	4	2	0.5	0.25
5-146	32	8	4	2	32	8	0.25	0.25	4	2	0.5	0.5
5-151	16	8	4	4	16	8	0.25	0.25	2	2	1	0.5
5-154	0.5	0.5	≤0.06	0.125	1	0.25	≤0.015	0.007	0.06	0.06	0.06	0.06
5-165	0.5	0.5	0.5	0.125	1	0.25	≤0.015	0.015	0.06	0.06	0.06	0.06
5-166	1	0.25	0.125	0.125	1	0.25	≤0.015	0.007	0.015	0.03	0.03	0.015
ATCC 49619	0.25	0.125	0.125	0.25	1	0.25	≤0.015	0.007	0.03	0.06	0.03	0.03

(+R), CMI en presencia de 25 µg/ml de reserpina. Cip, ciprofloxacino, Mox, moxifloxacino, Lev, levofloxacino, Gem, gemifloxacino, Trov, trovafloxacino, Cli, clinafloxacin

**Detección de mutaciones mediante amplificación por PCR y secuenciación de la RDRQ de los genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE* de *S. pneumoniae*.** Las mutaciones encontradas se muestran en la Tabla 2. *GyrB* y *ParE* se vieron alterados en algunas de las cepas, sin embargo, ninguna de las sustituciones encontradas se relacionó con la adquisición de resistencia. Sin tener en cuenta dichos genes, y basándonos solo en *gyrA* y *parC* que son los responsables directos de la adquisición de resistencias en 8 de las 22 cepas no presentaban ninguna mutación en las RDRQ, 6 cepas presentaban una mutación; 4 cepas mostraban un cambio en la posición 137 de *ParC*, Lys a Asn, 1 cepa presentaba una Cys en lugar de una Arg en la posición 95 de *ParC* y 1 cepa presentaba un cambio de Glu a Lys en la posición 85 de *GyrA*. Todas estas cepas (14 cepas) fueron sensibles a ciprofloxacino mostrando un rango de CMI de 0,25 a 2 µg/ml.

El resto, (8 cepas) fueron resistentes a ciprofloxacino, una cepa presentó una doble mutación de Ser a Phe en el codón 81 del gen *gyrA*, y de Lys a Asn en el codón 137 del gen *parC* con un CMI de ciprofloxacino de 4µg/ml. Una cepa presentó una doble mutación en el gen *parC*, de Ser a Phe en el codón 79, y de Lys a Asn en el 137, presentando una CMI de ciprofloxacino de 16µg/ml.. Cinco cepas presentaron también una doble mutación, en este caso se localizaron en los codones 81 del gen *gyrA* y 79 del gen *parC* y ambas fueron de Ser a Phe con un rango de CMI de ciprofloxacino de 32 a 64 µg/ml, además 4 de ellas presentaron la mutación Lys a Asn en la posición 137 de *ParC*. Finalmente, una cepa mostró 4 mutaciones una en el gen *gyrA* de Ser a Tyr en el codón 81, y tres en el gen *parC* en los codones 79, 81 y 137 cambiando de Ser a Phe, de Ile a Thr y de Lys a Asn, respectivamente, esta cepa presentó una CMI de ciprofloxacino de 64 µg/ml.

**Tabla 2.** Mutaciones en la RDRQ de los genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE* de *S. pneumoniae*

CEPA	Gyr A		Gyr B	Par C			Par E
	S 81	E85		S 79	D 83	K 137	
5-321	F	---	S 405→F	F	---	N	----
5-1	---	---	---	---	---	---	---
5-4	---	---	----	---	---	R 95→C	---
5-6	---	---	----	---	---	N	I 368→V
5-7	---	---	----	---	---	---	I 368→V
5-11	---	---	----	---	---	---	I 368→V
5-15	---	---	S 478→N	----	---	N	----
5-19	---	---	---	---	---	---	I 368→V
5-21	---	---	----	---	---	---	I 368→V
5-22	---	---	---	---	---	N	----
5-23	---	---	K 458→N S 478→I	---	---	---	---
5-26	---	---	---	---	---	N	----
5-51	F	---	----	F	---	N	I 368→V
5-102	F	---	---	---	---	N	I 368→V
5-115	Y	---	---	F	I 81→T	N	I 368→V
5-140	F	---	S 405→F	F	---	N	I 368→V
5-144	F	---	---	F	---	N	I 368→V
5-146	F	---	---	F	---	---	I 368→V
5-151	---	---	---	F	---	N	I 368→V
5-154	---	K	---	---	---	---	---
5-165	---	---	---	---	---	---	I 368→V
5-166	---	---	---	---	---	---	---

## **6.5 ARTICULO V**

***The selection of resistance to and the  
mutagenicity of different  
fluoroquinolones in *S.aureus* and  
*S. pneumoniae****

***Clinical Microbiology and Infection***

***2005 In press***

**RESUMEN**

Dos cepas de *Staphylococcus aureus* y 5 cepas de *Streptococcus pneumoniae* sensibles a quinolonas fueron escogidos para obtener mutantes *in vitro* resistentes a quinolonas, seleccionados en “múltiples-pasos”. Las fluoroquinolonas usadas fueron ciprofloxacino, moxifloxacino, levofloxacino, gemifloxacino, trovafloxacino y clinafloxacino. La mutagenicidad de estas quinolonas se testó mediante los ensayos de retromutación de *Salmonella* y *E. coli*.

La selección por “múltiples-pasos” mostró que: 1) Todos los *S. aureus* resistentes seleccionados *in vitro* presentaban al menos una mutación en el gen *grrA* y un 86.6% de los *S. pneumoniae* resistentes presentaron mutaciones en los genes *gyrA*, *parC* o en ambos genes. 2) Moxifloxacino y levofloxacino seleccionaron cepas resistentes de *S. aureus* y *S. pneumoniae* más tarde que las otras quinolonas usadas. Esta diferencia es más obvia en *S. aureus*. La acumulación de las fluoroquinolonas no explica la diferencia en la selección de mutantes, levofloxacino y moxifloxacino se acumulan en el interior celular en las mismas cantidades que clinafloxacino y trovafloxacino.

Los resultados obtenidos muestran que moxifloxacino y levofloxacino tienen menor poder mutagénico en los dos tests efectuados, sugiriendo una posible relación entre la selección de mutantes resistentes y el grado de mutagenicidad de la propia molécula. Además, gemifloxacino selecciona con más frecuencia mutantes resistentes por sobreexpresión de bombas de expulsión más frecuentemente que otras quinolonas usadas.

En conclusión, el riesgo de desarrollar resistencia a quinolonas dependería no solo del inóculo del microorganismo y de la concentración de quinolona en el sitio de infección, sino también del poder mutagénico de la quinolona usada. Siendo moxifloxacino y levofloxacino las menos mutagénicas.

## **6.6 ARTICULO VI**

***Relationship between mutations in the  
gyrA gene and quinolone resistance in  
clinical isolates of  
Corynebacterium striatum and  
Corynebacterium amycolatum***

***Antimicrobial Agents and  
Chemotherapy  
[2005; 40 \(5\): 1714-19](#)***



**RESUMEN**

La susceptibilidad a quinolonas se analizó en 17 aislamientos clínicos de *Corynebacterium striatum* y nueve aislamientos clínicos de *Corynebacterium amycolatum* mediante E-test en placas de Müller-Hinton agar. La cepas de colección ATCC 6940 se usó como control. Se caracterizó la región determinante de resistencia a quinolonas del gen *gyrA*. Se seleccionaron y analizaron 4 mutantes resistentes *in vitro* de *C. amycolatum*. Ambos tipos de cepas, *in vitro* o *in vivo* resistentes a quinolonas presentaron altos niveles de resistencia a quinolonas presentando una doble mutación, en las posiciones 87 y 91 ó en las posiciones 87 y 88 ( una mutación inusual) en GyrA, mientras que las mismas mutaciones en las posiciones 87 y 91 en *C. striatum* producían altos niveles de resistencia a ciprofloxacino y levofloxacino pero solo un moderado incremento en la CMI de moxifloxacino, sugiriendo que otros mecanismos de resistencia puede estar implicados en la resistencia a moxifloxacino en *C. amycolatum*. Además, se ha diseñado una técnica de PCR-RFLP, con el enzima de restricción *NcoI*, en el gen *gyrA* capaz de distinguir entre *C. amycolatum* y *C. striatum*.

# **7 DISCUSIÓN**

El descubrimiento de las quinolonas fue un hito importante en la historia de la antibioterapia. De hecho fue la primera familia de antibióticos compuestos únicamente por moléculas sintéticas. Esto hizo pensar en los primeros tiempos de utilización clínica de este tipo de compuestos, que debido a que las bacterias no habían estado nunca en contacto con estas nuevas moléculas, el desarrollo de resistencias a este nuevo grupo farmacológico sería difícil. Por lo que se auguraba un futuro esperanzador para el tratamiento de las infecciones.

La introducción de la primera quinolona, el ácido nalidíxico, en la práctica clínica fue alrededor del año 1967 (53), y básicamente su uso se limitó al tratamiento de infecciones urinarias (10,53). Dos años más tarde, en 1969 un estudio de Hane *et al* (90) encuentra dos genes relacionados con la resistencia a nalidíxico en cepas de *E. coli* K12. Estos dos genes los llama *nalA* y *nalB*, localizados bastante juntos en el cromosoma, a 42 y 51 minutos, en el mapa de Taylor-Trotter. En esta época ya se conocía que, las quinolonas inhibían la replicación del ADN (87). Más adelante, Gellert *et al* describen la ADN girasa por primera vez (78) y un año más tarde describen la inhibición de la actividad de la ADN girasa por el ácido nalidíxico y el ácido oxolínico (77), y se empieza a apuntar a este enzima como responsable de la resistencia (77,232). Las primeras referencias de cepas clínicas resistentes aparecen a partir de mediados de los años 80 (43,215) principalmente de cepas de *E. coli* aisladas urocultivos y ya se relaciona con mutaciones en la posición 83 del gen *gyrA* (43,177). A la vez que se empezaba también a relacionar la resistencia con una reducción en la acumulación de las quinolonas (9,106).

Con la aparición de nuevas quinolonas, más activas y con un espectro más amplio sucedía lo mismo, al cabo de un cierto tiempo de su introducción en el mercado y de su uso (y/o abuso) aparecían cepas resistentes a los microorganismos diana de las nuevas quinolonas. Así pues, después de la introducción del ciprofloxacino a mediados de los 80 y de su uso para tratar infecciones sistémicas aparecen cepas resistentes, entre otros de *S.aureus*, nuestro microorganismo sujeto a estudio (107,168,192,216,222,229). Lo mismo ocurre, con la aparición de las llamadas respironas y *S.pneumoniae* (otro de los microorganismos sujeto a estudio) a finales de los años 90 (118,162,182,236,245).

El caso de nuestro último microorganismo (*Corynebacterium* spp.) de estudio es un poco diferente, hasta hace pocos años sólo se le consideraba un contaminante de las muestras clínicas, y no se le relacionaba con la patología que sufría el paciente. Existen pocos estudios de sensibilidad antimicrobiana sobre este nuevo patógeno, y prácticamente no se encuentran citas en la literatura sobre los mecanismos de resistencia a los antibióticos de este microorganismo y si hablamos de quinolonas aún menos.

## 7.1 Artículos II, III y IV. Bases moleculares de la resistencia a quinolonas en *S. aureus*.

*S. aureus* es un importante patógeno nosocomial y frecuentemente causa brotes epidémicos intrahospitalarios. Una de las causas que pueden contribuir a la diseminación de este patógeno en el ámbito hospitalario es que suele presentar un patrón de multiresistencia que le permite sobrevivir en este tipo de ambientes y le permite diseminarse entre los pacientes, otro punto de vista alternativo sería pensar que estas cepas causantes de brotes epidémicos presentan alguna otra propiedad llamada “epidemigenicidad” o factor de virulencia que facilita la colonización y posterior infección de los pacientes, lo que se ha descrito entre los SARM que parecen ser más virulentos que los SASM ( Harnet AAC 1991, (3,92,222). En el **Artículo II** (223), se analizan los mecanismos de resistencia a quinolonas en 23 aislamientos clínicos de *S.aureus*, así como su relación epidemiológica.

En este artículo se evaluó la actividad *in vitro* de 5 quinolonas, además de establecer la resistencia a meticilina de las 23 cepas de *S. aureus*. Las quinolonas más antiguas, como el caso del ciprofloxacino, norfloxacino y esparfloxacino presentaron unos niveles de resistencia mayores, 63%, 77% y 63% respectivamente en comparación con las nuevas quinolonas, levofloxacino 40% y trovafloxacino 18% que fue la quinolona que presentó mejor actividad. Un 39.1% de las cepas fueron resistentes a meticilina. Tomando al ciprofloxacino como quinolona de referencia, podemos decir que todas las cepas resistentes a meticilina fueron también resistentes a ciprofloxacino, mientras que solo 1 cepa de las 9 sensibles a meticilina presentó resistencia a ciprofloxacino. Con esto podemos pensar que las cepas meticilin-resistentes son con mucha más frecuencia resistente también a las quinolonas, de hecho en la

literatura se puede observar que este tipo de cepas llamadas SARM presentan resistencia a múltiples antibióticos, entre ellos las quinolonas con aproximadamente un 90 % de resistencia a ciprofloxacino (62).

Actualmente, está bien establecido que la ADN girasa y la topoisomerasa IV son las proteínas diana para las quinolonas (77,232), de hecho se conoce que mutaciones en los genes *gyrA* y *parC* (*grlA* en *S. aureus*) son las responsables de la adquisición de resistencia en un gran número de especies bacterianas (por no decir todas) entre las que se incluyen *E. coli*, *Salmonella* spp, *Acinetobacter baumannii*, *Corynebacterium* spp, *Yersinia enterocolitica*, *S. aureus*, *S. pneumoniae*. (181,182,206,208,209,214,223,224,249-251).

En *S.aureus* las sustituciones más habituales que se encuentran y que generan resistencia se localizan principalmente en los aminoácidos Ser80 y Glu84 de GrlA, la subunidad A de la topoisomerasa IV y en los aminoácidos Ser84 y Glu88 de GyrA, la subunidad a de la ADN-girasa (60,61,220,223), por orden de frecuencia de aparición, generalmente, encontramos una primera sustitución en el codon Ser80 de GrlA, presentando el cambio de Ser a Phe, posteriormente aparece la segunda sustitución que en este caso se localiza en el codon Ser84 de GyrA, en este caso la Ser se sustituye por una Leu. La tercera sustitución vuelve a aparecer en GrlA, en este caso sobre el aminoácido Glu84, siendo el cambio a Gly el más común aunque también se observa un cambio de Glu a Lys. Por último se encuentra la sustitución en el codón Glu88 de GyrA. En nuestro estudio no aparece ninguna cepa que presente esta cuarta mutación. Otras sustituciones que afectan a otros codones en la RDRQ y que se relacionan con la adquisición de resistencia también se han descrito (77,107,115,229). También se han descrito otras fuera de esta región en GrlA como

son las que afectan a los aminoácidos Arg43, Pro157, y Ala 176 (112). En este caso los dos últimos aminoácidos se encuentran dentro del área que se secuenció en nuestro estudio y no se encontró ninguna mutación en estas posiciones. Con la aparición de las nuevas quinolonas no fluoradas, también se han descrito nuevas mutaciones en esta subunidad A de la topoisomerasa IV que parecen afectar solo a este nuevo grupo de la familia de las quinolonas, éstas se sitúan en los codones 52 y 103 (201-203). Todas estas mutaciones se presentan en una muy baja frecuencia y por lo general en cepas resistentes obtenidas *in vitro*, mientras que las mutaciones descritas previamente en las posiciones 84 y 88 de GrlA y 80 y 84 de GyrA se encuentran siempre en cepas clínicas resistentes.

Las mutaciones encontradas en los genes *gyrB* y *grlB* no juegan un papel importante en la adquisición de resistencia en cepas clínicas de *S. aureus*.

Existe una muy buena correlación entre la CMI que presentan las cepas a ciprofloxacino con el número de mutaciones que presentan las cepas. así vemos que las cepas más sensibles a este antibiótico como son las cepas 4-108 y 5-61 con una CMI de 0.06 µg/ml no presentan ninguna mutación. Entre las cepas SASM encontramos cepas con una sustitución en GrlA y presentan un CMI a ciprofloxacino de 1 µg/ml y la cepa con mayor CMI es la 4-10 que presenta una CMI de 4 µg/ml. Las cepas MRSA presentan al menos dos sustituciones una en GrlA y una en GyrA con unas CMI a ciprofloxacino de 8 a 64 µg/ml y la que presenta mayor CMI 128 µg/ml es la cepa 4-95 con tres sustituciones; dos en GrlA y una en GyrA. La quinolona que presentó mejor actividad frente a cepas clínicas de *S. aureus* fue trovafloxacino.

Es interesante observar el comportamiento del esparfloxacino y su relación con las mutaciones que presentan estas cepas. Como se puede observar la CMI del esparfloxacino no incrementa hasta que se produce una mutación en GyrA. Previa a esta mutación hay dos cepas, 5-96 y 5-117 que ya presentan una primera mutación en GrlA y la CMI que presentan es la misma o muy similar a las cepas que no poseen ninguna mutación. Esto nos hizo plantear la hipótesis que el sparfloxacino tiene como diana principal a la ADN girasa, en lugar de la topoisomerasa IV. Para resolver esta hipótesis nos planteamos el generar mutantes *in vitro* a esta quinolona y evaluar cual era la proteína que adquiriría la mutación en primer lugar (**Artículo III** (210)). Para apoyar esta hipótesis se contaba con algunos estudios recientes que demostraban que dependiendo de la estructura de la molécula o de su hidrofobicidad la diana primaria de las quinolonas podría ser diferente (112). También existían algunos estudios en *S. pneumoniae* donde se demostraba que la diana principal del esparfloxacino era la ADN girasa (183).

Los resultados obtenidos en el **Artículo III** (210) muestran que nuestra hipótesis fue correcta. La selección de mutantes resistentes a esparfloxacino generó una mutación en GyrA en la posición 88 sustituyendo el Glu por una Lys. Esta mutación se obtuvo cuando la cepa se seleccionó a una concentración de 1 µg/ml de esparfloxacino. En este momento la cepa pasó de tener una CMI de esparfloxacino de 0,25 µg/ml a tener una CMI de 1 µg/ml. Las CMI de ciprofloxacino y norfloxacino también se vieron afectadas aunque en menor grado.

Sustituciones que afecten la posición Glu88 ya habían sido descritas previamente (61,125,221). Pero esta sustitución es la primera vez que describe como mutación única aunque en una cepa *in vitro*. Solo un estudio previo mostraba esta misma mutación pero concomitantemente a una mutación en *grlA* en una cepa clínica (221). Otros estudios en la



misma dirección (171) muestran que una sustitución en la posición Ser 84 de GyrA no afecta la CIM de ciprofloxacino, lo que todavía induce a pensar que diferentes quinolonas muestran diferentes afinidades por las distintas topoisomerasas. Un estudio aparecido a finales del 2001 evalúa la afinidad de 15 quinolonas frente a la ADN-girasa y la topoisomerasa IV, observando que la mayoría de las quinolonas, ciprofloxacino levofloxacino, trovafloxacino o norfloxacino entre otras tienen preferencia sobre la topoisomerasa IV, algunas muestran la misma preferencia por los dos enzimas como el clinafloxacino o el moxifloxacino y quinolonas como el esparfloxacino o el ácido nalidíxico tienen como diana principal a la ADN girasa (234). Por último la adquisición de una nueva mutación en la posición 80 de Ser a Tyr en GrlA genera altos niveles de resistencia en las tres quinolonas testadas.

Se estudió, además, la implicación de otros mecanismos en la adquisición de resistencia al esparfloxacino, en concreto los sistemas de expulsión activa. Para ello se calculó la CMI que presentaban las cepas mutantes en presencia de 25 µg/ml de reserpina, un inhibidor de las bombas de expulsión (170). Se observó que el esparfloxacino no es sustrato para la bomba de expulsión NorA. Estudios previos ya apuntaban a que este tipo de bombas de expulsión activa tenían muy poca actividad sobre quinolonas hidrofóbicas como el esparfloxacino (126,266). Otros estudios, como los realizados por Piddock *et al* realizados en *S. aureus* (191), demostraron que además de la hidrofobicidad probablemente la estructura de la molécula de quinolona es importante para ser reconocida como sustrato de la bomba de expulsión.

Para norfloxacino se observó que NorA ejercía un ligero efecto sobre la adquisición de resistencia (excepto en la última cepa mutante 4-32H donde se observa un gran descenso en la

CMI de norfloxacinó en presencia de reserpina). En cambio, analizando el efecto que producía NorA en la adquisición de resistencia a ciprofloxacino se observó que en casi todos los pasos de selección, la CMI en presencia de reserpina descendía de 4 a 6 veces.

Los resultados de este trabajo, sugieren también, la presencia de algún mecanismo de resistencia de bajo nivel al esparfloxacino. Si nos fijamos en las cepas 4-32B y 4-32C se observa un incremento en la CMI de esparfloxacino de unas 5 veces pasando de 0,047  $\mu\text{g/ml}$  a 0,25  $\mu\text{g/ml}$ . Este incremento se genera sin la adquisición de ninguna mutación en las proteínas diana, y sin que se vea afectada la CMI a esparfloxacino en presencia de reserpina, además el siguiente mutante, la cepa 4-32D, sigue estable manteniendo las mismas CMI. Una posible explicación para este fenómeno sería la sobreexpresión de un sistema de expulsión activa no inhibible por reserpina y capaz de expulsar al esparfloxacino del interior celular.

La implicación la bomba de expulsión NorA en la resistencia a quinolonas en cepas clínicas también se evaluó en el **Artículo II** (223). En 1990 se caracterizó el gen *norA* que codifica para una bomba de expulsión activa, NorA (266). Esta bomba se relacionó con la resistencia a quinolonas hidrofílicas como norfloxacinó, ciprofloxacino u ofloxacino mientras que las quinolonas hidrofóbicas, esparfloxacino o el ácido nalidíxico, no eran sustrato para esta bomba.

Para observar el efecto de NorA sobre la CMI de las diferentes quinolonas, esta se realiza en presencia de un desacoplador del gradiente de protones, como el CCCP (carbonil-cianida-m-clorofenil-hidrazona) o en presencia de un inhibidor de este tipo de bombas como la reserpina. Para considerar que la resistencia a las quinolonas se debe a la presencia de este

tipo de bombas de expulsión se considera que la CMI debe reducirse un mínimo de 4 veces, de lo contrario una reducción sólo de 2 veces puede ser debida otros factores; menor inoculo, o simplemente a la variabilidad que puede presentar la cepa al estar en una CMI intermedia a las que se determinan (presentar una CMI de 3µg/ml y disponer en el banco de diluciones las correspondientes a 2µg/ml y 4µg/ml).

La CMI de diferentes quinolonas se evaluó en 23 cepas clínicas de *S.aureus* (**Artículo II (223)**) en presencia de reserpina. En este caso los resultados muestran que quinolonas como el esparfloxacino y el trovafloxacino no son susstrato para NorA, mientras que el resto de quinolonas testadas, ciprofloxacino, levofloxacino o norfloxacino, sí ven reducida su CMI en algunas cepas. Si calculamos los porcentajes de resistencia a quinolonas en presencia de reserpina, vemos que la resistencia a ciprofloxacino se ve reducida de un 63% a un 59%, a norfloxacino de un 77% a un 63% y finalmente levofloxacino de un 63% a un 37%. El esparfloxacino y el trovafloxacino no varían sus porcentajes de resistencia al no verse afectados por la inhibición de este tipo de bombas.

En nuestro estudio se observa que prácticamente un 50% de las cepas analizadas presentan una reducción de la CMI frente a norfloxacino, comparable a otros estudios que estiman que el 30% de las cepas resistentes a ciprofloxacino disminuyen su CMI a ciprofloxacino en presencia de reserpina (218). Si desglosamos el efecto de la reserpina en la CMI a norfloxacino, en función de las mutaciones en los genes *diana*, *gyrA* y *griA* vemos que: en todos los grupos, tengan 1 mutación, dos mutaciones o tres mutaciones, un 50% de las cepas presentan sobreexpresión de la bomba de expulsión activa, mientras que las cepas sin mutaciones presentan este fenotipo en un 33% de las cepas.

Una de las utilidades que se le pueden atribuir a calcular la CMI a ciprofloxacino en presencia de reserpina en cepas clínicas de *S.aureus*, es usarla como marcador de posesión de mutaciones en las proteínas diana. Como se puede observar, todas las cepas clínicas analizadas que presentan una CMI de ciprofloxacino de 1 µg/ml en presencia de reserpina, poseen al menos una sustitución en GrlA. Un sistema parecido se usa en enterobacterias donde la resistencia al ácido nalidíxico se usa como marcador de posesión de mutaciones en *gyrA* (207). Para validar esta metodología y emplearla en *S.aureus* se debería escoger un mayor número de cepas. Sería, además, recomendable establecer un marcador de este tipo ya que está bien establecido que la probabilidad de desarrollar una segunda mutación capaz de elevar los niveles de resistencia durante un tratamiento con quinolonas es mucho más alta que el adquirir una primera mutación (207).

Probablemente en *S.aureus* existen diferentes sistemas de expulsión activa inhibibles y no inhibibles por reserpina implicados en la adquisición de resistencia (126,210), aunque NorA es el más estudiado. Diversos estudios responsabilizaban directamente a este gen con la resistencia a quinolonas, aunque cual es el mecanismo responsable no se conoce bien. En 1990 Ohshita *et al.* (174) describen que una mutación que genera mayor afinidad por la quinolonas y es capaz de expulsarlas con mayor eficiencia, Schmitz *et al.* describieron una nueva mutación en la Gly 291 como posible causa del aumento de afinidad de la bomba a las quinolonas (219). Esto nos llevó a realizar el **Artículo IV**, para determinar cual si la causa de la actividad de NorA era una mutación en la zona codificante del gen.

El análisis del gen *norA*, no reveló la presencia de la mutación anteriormente encontrada por Ohshita *et al.* (174), en cambio la mutación descrita por Schmitz *et al.* (219) se encontró en aproximadamente en el 50 de las cepas estudiadas por lo que se podía concluir que esta mutación debe considerarse más como un polimorfismo que como una mutación capaz de generar resistencia (resultados no publicados) por lo que no se pudo relacionar la presencia de una mutación con el aumento de actividad (resultados no publicados). Por otro lado, se observó que entre las 23 cepas clínicas analizadas aparecían dos secuencias distintas que codificaban para NorA. La secuencia de *norA* había sido publicada anteriormente por dos grupos distintos, el primero encabezado por Yoshida *et al* en 1990 (266) (número de acceso al Genbank D90119) y el segundo liderado por Kaatz *et al* en 1993 (127) (número de acceso al Genbank M97169). Estas eran las dos secuencias que aparecían en nuestras cepas. Estas dos secuencias diferían en la secuencia de nucleótidos un 8,82% y en aminoácidos un 4,88%. Un dato curioso es que estas diferencias, parecían estar agrupadas a lo largo de la secuencia. De este modo encontrábamos que existían 4 zonas donde se agrupaban estas variaciones: la primera entre los aminoácidos 87 y 93; la segunda entre las posiciones 183 y 186; la tercera, la que acumulaba mas cambios entre los aminoácidos 277 y 297; y la última al final de la proteína entre los aminoácidos 385 y 389. Atendiendo a estas diferencias se planteó que una secuencia podría ser más prevalente que la otra en cepas clínicas de *S.aureus* por lo que se ideó un PCR para distinguir entre las dos secuencias. Para ello, y basándonos en una de las zonas que mostraban más diferencias entre los genes, se diseñaron un juego de “primers” o cebadores capaces de distinguir entre las dos secuencias.

Una vez puesta a punto la técnica, se determinó cual era la secuencia de *norA* que poseían las 23 cepas clínicas de *S.aureus*. Se encontró que la secuencia más prevalente era la descrita por Yoshida *et al.* (266) con 18 cepas (78%) mientras que solo 5 (22%) mostraron la secuencia descrita por Kaatz *et al.* (127). Se intentó correlacionar el tipo de secuencia que codifica para la bomba de expulsión con su actividad, se observa que dos de las cinco cepas cuya secuencia es la descrita por Kaatz *et al.* solo afectan a norfloxacino cuando se observa una disminución de la CMI en presencia de reserpina, en cambio las cepas que presentan la secuencia es la descrita por Yoshida *et. al* muestran una reducción de la CMI en presencia de reserpina para ciprofloxacino y norfloxacino.

Estos resultados, junto con estudios que implican a otras bombas de expulsión activa en *S. aureus* como son QacA y QacB las cuales difieren solo en 7 aminoácidos, y que presentan diferentes afinidades por los mismos sustratos (185) nos hace sugerir que nos encontramos ante la misma situación, y que las dos secuencias que codifican para NorA y que difieren un 4,88% posiblemente muestren diferentes afinidades para las mismas quinolonas. Nuestra hipótesis apunta a que las 4 regiones variables entre estas dos secuencias podrían encontrarse formando parte del canal por donde de expulsa el antibiótico o en la zona de reconocimiento de los sustratos. De esta forma se podrían explicar las diferentes afinidades por los diferentes sustratos.

Más recientemente como causa de sobreexpresión, otros autores apuntan a que una mutación en el promotor estabiliza el RNA mensajero que codifica para NorA, con lo que aumenta la traducción de esta proteína (64), o que una mutación en el promotor es la responsable de sobreexpresar este gen (127). Actualmente, se conocen dos sistemas distintos

de regulación de este gen; uno descrito por Fournier *et al.* (63) en el cual se describe un sistema de regulación por doble componente ArlS-ArlR y un segundo a través de un regulador directo, NorR (actualmente llamado MgrA) descrito en primer lugar por Troung-Bolduc *et al.* (128,242,243). Por lo que hoy por hoy debería también analizarse las posibles mutaciones en la zona del promotor del gen así como la implicación de estos nuevos reguladores, para establecer si mutaciones o alteraciones de estos estén implicados en la sobreexpresión de NorA y en consecuencia en la resistencia a quinolonas. También se debería tener en cuenta a otras bombas de expulsión, inhibibles por reserpina y que tengan como sustrato a las quinolonas. Recientemente en *S. aureus* se ha descrito una nueva bomba llamada NorB implicada en la resistencia a quinolonas (242).

Las bombas de expulsión activa no sólo afectan a las quinolonas, muchos otros grupos antimicrobianos se ven afectados por este mecanismo de resistencia, y la gran mayoría de microorganismo presentan este mecanismo de resistencia (139). Esto ha llevado a varios autores a buscar nuevos inhibidores, no tóxicos, de este tipo de bombas (37,79,150). La finalidad sería el administrar este inhibidor junto con la quinolona para reducir su CMI, y hacer más vulnerable el microorganismo al agente antimicrobiano. Otra de las ventajas que ofrece esta combinación es la reducción en la aparición de cepas resistentes (148,149).

Una vez estudiados los dos mecanismos de resistencia implicados, mutaciones en las topoisomerasas y sobreexpresión de bombas de expulsión se quiso relacionar la adquisición de resistencia con el origen clonal de las cepas. Entre las cepas SASM nos encontramos dos cepas (5-96 y 5-117) que presentan una mutación en GrlA y una CMI a ciprofloxacino de 1 µg/ml, mientras que otra cepa, la 4-49 presenta una CMI a ciprofloxacino de 2 µg/ml y no

posee ninguna mutación. Esta última cepa cuando su CMI se calcula en presencia de reserpina su CMI desciende a 0,5µg/ml, por lo que es obvio que presenta una sobreexpresión de una bomba de expulsión. Cuando se analiza la relación clonal entre estas cepas se observa que pertenecen a clones distintos, y que por una evolución diferente, llegan a la misma CMI presentando distintos mecanismos de resistencia. Por otro lado, podemos encontrar cepas que tienen el mismo origen clonal (cepas 4-46 y 4-95) y por un mecanismo de evolución divergente en la adquisición de resistencia presentan distintos mecanismos de resistencia.

Como se puede observar, el primer paso para la adquisición de en *S. aureus* puede ser indistintamente la adquisición de alguna mutación en los genes diana, así como una sobreexpresión de un sistema de expulsión activa. Por otro lado, en bacterias Gram-negativas, especialmente *E. coli*, está bien establecido que el primer paso en la adquisición de resistencia, es siempre una mutación en los genes diana y que la sobreexpresión de bombas de expulsión sólo se observa en cepas previamente resistentes (119,129,159).

Se analizó también la relación clonal de todas las cepas implicadas en el estudio, se observó que entre las cepas SASM existía una mayor heterogeneidad, es decir, aparecían más clones diferentes, mientras que entre las cepas SARM se observaba una menor diversidad ya que sólo se encontraron dos clones. Estudios previos describen la diseminación de uno o dos clones de cepas SARM nosocomiales, de entre las 5 u 8 clones que pueden estar presentes en un hospital.



## 7.2 Anexo I y Artículo V. Selección de cepas *S.aureus* y *S.pneumoniae* resistentes y mutagenicidad de las quinolonas.

Para poder escoger cepas clínicas de *S. pneumoniae* sensibles a quinolonas en primer lugar se procedió a caracterizar los mecanismos de resistencia a quinolonas en un grupo de 22 aislamientos clínicos, para ello se determinó la presencia de mutaciones en los genes *dnaA* y *dnaB* que codifican las subunidades A y B de la ADN girasa y los genes *parC* y *parE* que codifican las subunidades A y B de la topoisomerasa IV. Para determinar la implicación de bombas de expulsión en la adquisición de resistencia se determinó la CMI a 6 quinolonas: ciprofloxacina, levofloxacina, moxifloxacina, gemifloxacina, trovafloxacina y clinafloxacina, en presencia y ausencia de reserpina.

Para el estudio de selección de cepas resistentes y mutagenicidad de las quinolonas se seleccionaron dos aislamientos clínicos de *S. aureus* (caracterizadas en el **Artículo II**) y 5 aislamientos clínicos de *S. pneumoniae* caracterizadas en el **Anexo I**.

El mecanismo de resistencia mejor estudiado en bacterias Gram-positivas son las sustituciones que se encuentran en la ADN-girasa y la topoisomerasa IV, también se conoce la importancia de las bombas de expulsión en la adquisición de resistencia. Pero como las quinolonas seleccionan a las cepas resistentes no está muy claro. Esta selección de cepas resistentes parece depender de la quinolona que se administre y de la densidad bacteriana en el lugar de la infección.

Existen antecedentes que describen el bajo nivel de selección de mutantes resistentes de *S. pneumoniae* por parte de dos quinolonas, levofloxacino y moxifloxacino (24,46,56). En otro estudio llevado a cabo por Nagai et al (165) se seleccionan mutantes resistentes de *S. pneumoniae* a ciprofloxacino en un número pequeño de pases (en presencia de antibiótico), mientras que para clinafloxacino y trovafloxacino requieren algunos pases más, y ambos antibióticos presentan el mismo comportamiento.

Nuestro estudio muestra resultados muy similares, para poder seleccionar cepas resistentes a levofloxacino y moxifloxacino se requieren más subcultivos en presencia de antibiótico, que para seleccionar cepas resistentes a ciprofloxacino, gemifloxacino, trovafloxacino y clinafloxacino, ya sea para seleccionar cepas resistentes de *S. aureus* o *S. pneumoniae*.

El análisis de las cepas resistentes de *S. aureus* para las diferentes quinolonas testadas presentaron al menos una mutación en el codón Ser80 del gen *grlA*. Presente en todas las cepas obtenidas. Todos los mutantes resistentes obtenidos para cada quinolona presentan una CMI de al menos 4 veces superior a la CMI que presenta la cepa “salvaje” al antibiótico de selección. A excepción de 3 cepas que presentaban una CMI a ciprofloxacino de 32 o 64 µg/ml, del resto de las cepas se pudo explicar su CMI por la presencia de una sola mutación. Para explicar la CMI tan elevada de estas tres cepas se secuenciaron los genes *grlA* y *gyrA* y se observó que estas cepas presentaban una mutación en el codón Glu88 del gen *gyrA* que explicaba su CMI. Al determinar la CMI de los mutantes en presencia de reserpina solo se observó un mutante resistente seleccionado con trovafloxacino que presentaba un descenso en la CMI en todas las quinolonas testadas. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos

por Boss et al (24), quienes cultivaron cepas de *S. aureus* en presencia de concentraciones subinhibitorias de quinolonas y no encontraron ningún mutante resistente que presente un descenso en las CMI de las quinolonas usadas en su estudio cuando ésta se determina en presencia de reserpina.

En referencia al los *S. pneumoniae* las fluoroquinolonas usadas seleccionaron diferentes tipos de mutantes, que podemos agrupar en 4 genotipos distintos dependiendo de si el gen mutado ha sido *gyrA* o *parC*, ambos o ninguno.

Los distintos genotipos obtenidos fueron los siguientes:

- 1) Genotipo 4: Formado por 4 cepas, ninguna de ellas posee mutaciones en los codones Ser81 del gen *gyrA* o Ser79 del gen *parC*. En cambio, la CMI que presentan es como mínimo 4 veces superior a la CMI inicial al antibiótico de selección, pero al determinar la CMI en presencia de reserpina, éstas disminuyen hasta los mismo valores que la cepas “salvaje”, sugiriendo la implicación de un mecanismo de expulsión activa en la adquisición de resistencia.
- 2) Genotipo 3: Formado por 5 cepas, que presentan una mutación en el codón Ser79 del gen *parC* y ninguna en el gen *gyrA*. Cuando se evalúa la CMI de estos mutantes en presencia de reserpina se observa un descenso en las CMI, aunque estas permanecen unas dos veces por encima de las que presentan las cepas clínicas. Estos resultados sugieren que en la obtención de mutantes participan a la vez ambos mecanismos de resistencia, mutaciones en los genes diana y sobreexpresión de bombas de expulsión. También sugieren que una mutación en esta posición sólo es capaz de elevar 2 veces la CMI de las cepas obtenidas.

3) Genotipo 2: Formado por 9 cepas. En estas cepas al contrario que el genotipo 3, presentan una mutación en el codon Ser81 del gen *gyrA* y ninguna en el gen *parC*. En este grupo también se observa el efecto de una sobreexpresión de bombas de expulsión. La diferencia es que Las CMI en presencia de reserpina en este grupo se mantienen unas 8 veces superiores que las comparándolas con las obtenidas por las cepas clínicas. En este grupo nos volvemos a encontrar la acción concomitante de dos mecanismos de resistencia. Las altas CMI obtenidas en presencia de reserpina nos indica que una mutación en el codón Ser81 de GyrA permite a la bacteria alcanzar mayores niveles de resistencia que una mutación en la Ser79 de ParC.

4) Genotipo 1: Representado por 12 cepas. Estas presentan mutaciones en ambos genes, y la gran diferencia es que la mayor de las cepas que se engloban en este grupo no presentan una reducción en la CMI cuando se determina en presencia de reserpina.

Se observó que el gemifloxacino seleccionó más frecuentemente mutantes resistentes que presentaban una bomba de expulsión como mecanismo de resistencia, que el resto de quinolonas. Esta elevada frecuencia de selección de mutantes resistentes debido a bombas de expulsión activa ya se había descrito con anterioridad (24).

No todas las quinolonas se vieron afectadas del mismo modo por los sistemas de expulsión activa, clinafloxacino fue la quinolona que se vio más afectada por este tipo de mecanismo de resistencia, seguido de ciprofloxacino, gemifloxacino, levofloxacino, moxifloxacino y finalmente trovafloxacino. En cada uno de los diferentes genotipos se observan distintos perfiles de expulsión de antibióticos. Un perfil de expulsión se define como el conjunto de quinolonas en las que se ve afectada su CMI en presencia de reserpina (artículo V). El encontrar diferentes perfiles de expulsión hace pensar que probablemente más de un sistema de expulsión está implicado en la adquisición de resistencia. De hecho se han descrito diferentes sistemas de expulsión en *S. aureus* y *S. pneumoniae* (28,123,126,242). Además cabe pensar que distintos sistemas de expulsión pueden tener distintas afinidades por las diferentes quinolonas y que la sobreexpresión concomitante de varios sistemas de expulsión activa puede dar lugar a diferentes perfiles de expulsión.

Por otro lado, los estudios de mutagenicidad en *Salmonella* spp y *E. coli* indicaron que moxifloxacino y levofloxacino presentaban un menor poder mutagénico, en ambos ensayos. Estos resultados se correlacionan bien con la habilidad que presentan las quinolonas en seleccionar mutantes, siendo levofloxacino y moxifloxacino las quinolonas que tardan más en seleccionar mutantes resistentes.

Una explicación para establecer que las diferentes quinolonas presentan diferentes grados de mutagenicidad, se pensó que podía residir en la acumulación intracelular de cada quinolona. Y aunque se observó que ciprofloxacino era la quinolona que más se acumulaba en el interior celular y podía ser la causa de su poder mutagénico, los resultados de las diferentes quinolonas hizo descartar esta hipótesis, ya que se encontró otras quinolonas con una

acumulación parecida, levofloxacin, moxifloxacin, clinafloxacin y trovafloxacin, pero en cambio algunas de ellas seleccionaban mutantes resistentes más rápidamente.

En base a los resultados de este estudio, sugerimos que, al menos parcialmente el poder mutagénico de cada quinolona esta involucrado en la capacidad de seleccionar mutantes resistentes y que además este potencial depende también de cada cepa en particular. En los dos test de mutagenicidad, las quinolonas menos mutagénicas fueron levofloxacin y moxifloxacin y las más mutagénicas gemifloxacin, clinafloxacin y trovafloxacin. Mientras que el ciprofloxacin fue distinto en los dos ensayos. Estos resultados concuerdan con otros encontrados en la literatura donde describen que un grupo C8-metoxil en las la molécula de quinolona reduce la selección de mutantes de *Mycobacterium bovis* (50).

### **7.3 Artículo VI. Mecanismo de resistencia a quinolonas en *Corynebacterium* spp.**

El aislamiento de una corinebacteria, generalmente se atribuye a una contaminación de la muestra, aunque en los últimos años han empezado incrementar su importancia como patógenos (55,70). Estos patógenos emergentes se han asociado a casos de neumonías, endocarditis, y osteomielitis vertebral en otras (44,55,58,133,237). El incremento en la frecuencia de aislamiento de estos nuevos patógenos hace necesario conocer cual es la sensibilidad de éstos a los antimicrobianos de que disponemos actualmente.

*Corynebacterium amycolatum* y *Corynebacterium striatum* presentan perfiles de sensibilidad distintos. El primero presenta un patrón de multirresistencia, que generalmente incluye ampicilina, aminoglucósidos, ofloxacina y doxiciclina presentando solo sensibilidad frente a glicopéptidos (69,136), mientras que *C. striatum* solo presenta altos porcentajes de resistencia a clindamicina y ampicilina (69,136).

En referencia a las quinolonas, en la literatura sólo se encuentran algunas publicaciones evaluando la actividad de las mismas frente a corinebacterias. En ellas se describe que las nuevas quinolonas como el moxifloxacino son más activas que las más antiguas como el ciprofloxacino, el cual presenta elevados niveles de resistencia (65,151-153,156,157,199,200). Este es el primer trabajo que analiza los mecanismos de resistencia a quinolonas en cepas clínicas de *C. amycolatum* y *C. striatum*.

Un dato importante a tener en cuenta en este género, es que carecen de topoisomerasa IV. No es el único microorganismo que carece de esta topoisomerasa, ya se han descrito otros como *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium* spp., o *Campylobacter* spp. con esta misma característica (12,81,235). Debido a esto la adquisición de resistencia se basa en la adquisición de mutaciones por parte de la ADN girasa, y probablemente también a la acción de bombas de expulsión.

En *Corynebacterium striatum* encontramos distintas sustituciones que afectan a las posiciones Ser87 y Glu91 de la subunidad A de la ADN-girasa. Dependiendo la mutación encontrada y cual es el codon afectado los niveles de resistencia varían, así si la mutación es localizada en el codon 87 y la mutación cambia la Ser por una Phe se incrementa moderadamente la CMI a ciprofloxacino, levofloxacino y moxifloxacino, mientras que si encontramos una Val en esta posición se observa un dramático incremento en la resistencia en ciprofloxacino con CMI > 32 µg/ml mientras que para levofloxacino las CMI aumentan a 8µg/ml, mientras que moxifloxacino mantiene una muy buena actividad con una CMI de 0.75 µg/ml. Encontramos también cepas con mutaciones en ambos codones (Ser87 a Phe y Glu91 a Ala), en este caso las cepas muestran unas CMI muy elevadas a ciprofloxacino y levofloxacino > 32µg/ml y las CMI a moxifloxacino se sitúa entrono a 8 µg/ml. Como se puede observar existe una relación entre las mutaciones y la CMI que presentan, además, podemos observar que la CMI que se presenta no depende sólo de que el codón esté alterado sino que, además, depende de cual es el nuevo aminoácido que encontramos. Este comportamiento de elevar la CMI en función del codon alterado también lo presentan otros microorganismo que no poseen topoisomerasa IV (12,135,200).



Por el contrario, *C. amycolatum* presenta un comportamiento algo diferente. Una sola mutación en el codón Ser87 (de Ser a Arg) es capaz de generar altos niveles de resistencia con unas CMI de  $>32 \mu\text{g/ml}$  a ciprofloxacino,  $8 \mu\text{g/ml}$  a levofloxacino y  $2 \mu\text{g/ml}$  a moxifloxacino. Entre las cepas clínicas de *C. amycolatum* se encontraron mutaciones en otras posiciones inusuales en otros microorganismos. Se encontró una mutación en la posición 89 que cambiaba una Ile por una Val, concomitantemente con la descrita anteriormente, lo que hacía incrementar levemente las CMI de levofloxacino y moxifloxacino. Otra de las mutaciones presentes fue en el codón del aminoácido 88 cambiando una Ala por una Pro (una mutación muy inusual en cepas clínicas en otros organismos), esta mutación también se presentaba como una segunda mutación junto con la descrita en el codón 87. En este caso todas las quinolonas presentaron una CMI  $> 32\mu\text{g/ml}$ . Se sabe que las Pro tienen un comportamiento conformacional muy distinto al resto de los aminoácidos (34), tiene tendencia a romper las conformaciones proteicas en  $\alpha$ -hélice, y si tenemos en cuenta este efecto en el motivo de unión entre la quinolona y la ADN-girasa, el cual se encuentra en forma de  $\alpha$ -hélice este aminoácido impediría la unión entre la molécula de quinolona y la ADN girasa (160).

Para comprobar si la mutación en el codón 88 ocurría de forma natural, se obtuvieron mutantes *in vitro* de *C. amycolatum* en dos pasos. En el primero, cultivando una cepa sensible a una concentración de  $1\mu\text{g/ml}$  de ciprofloxacino, se obtuvo un mutante con la mutación en la Ser87, el cual mostraba la misma CMI que la cepa clínica que poseía esta mutación. En un segundo paso, cultivando la cepa mutante obtenida anteriormente en  $32 \mu\text{g/ml}$  se obtuvieron 3 mutantes. En dos de ellos apareció la Pro en posición 88, y en uno de

ellos se obtuvo una nueva mutación en la posición 91 cambiando el Glu “salvaje” por una Tyr, en los tres casos las CMI a las tres quinolonas fue  $>32 \mu\text{g/ml}$ .

Ninguna de las cepas clínicas analizadas presentó una mutación en el codón Glu91 del gen *gyrA*.

Una de las explicaciones para el rápido incremento de aislamientos resistentes a quinolonas puede encontrarse en el incremento en la prescripción de quinolonas en España y como hemos observado en el **Artículo V**, a la habilidad por parte de las quinolonas de seleccionar mutantes resistentes. Otro de los motivos por los cuales puede deberse este incremento de cepas resistentes se encuentra en su hábitat natural. Las corinebacterias son parte de la flora normal de la piel. En diversos estudios, se ha demostrado que las quinolonas se pueden eliminar a través del sudor, y al estar en contacto las quinolonas con las bacterias, otra vez debido a la habilidad de seleccionar mutantes resistentes por parte de este grupo de antimicrobianos, aparecen cepas resistentes (94,99,100).

Un problema que presentan *C. amycolatum* y *C. striatum* es su identificación en el laboratorio. El sistema de identificación que se usa el Servicio de Microbiología del Hospital Clínic de Barcelona, basado en pruebas bioquímicas, API CORYNE (Biomérieux, Marcy-l’Etoile, France) no discrimina entre estas dos especies, por lo que es necesario efectuar otras pruebas para llegar a diferenciarlos: 1) la morfología de la colonia y 2) hidrólisis de la Tirosina. En este estudio se propone el uso de una técnica de PCR y RFLP (análisis del polimorfismo de fragmentos de restricción) para diferenciar estas dos especies. Esta técnica se basa en que la secuencia de *gyrA* de las dos especies bacterianas no es homóloga al 100%, su homología es del 80,7% y esto genera un patrón distinto de bandas cuando el fragmento

amplificado es digerido con el enzima de restricción *NcoI* y permite identificar estas dos especies. Se trata de una técnica molecular que puede sustituir a las pruebas complementarios que se necesitan para una buena identificación de estas especies. Este tipo de técnicas moleculares utilizando el gen que codifica para el ARN ribosomal 16S, se encuentra descrita para diferenciar especies de *Acinetobacter baumannii* (246) e identificar especies del género *Corynebacterium*(247).

# **8 CONCLUSIONES**

1. La diana principal de las quinolonas en bacterias Gram-positivas es la topoisomerasa IV a diferencia de lo que ocurre en bacterias Gram-negativas. Aunque depende de cada quinolona en particular
2. Los sistemas de expulsión activa, inhibibles por reserpina, tienen una alta prevalencia como mecanismo de resistencia en *S.aureus* y *S. pneumoniae*.
3. El primer paso para adquirir resistencia en *S.aureus* y *S. pneumoniae* puede ser indistintamente una mutación en los genes diana o una sobreexpresión de una bomba de expulsión.
4. Las quinolonas más hidrofóbicas no son buenos sustratos para los sistemas de expulsión activa inhibibles por reserpina.
5. La determinación de la CMI a ciprofloxacino, en presencia de reserpina en aislamientos clínicos de *S. aureus*, podría utilizarse como marcador de la presencia de mutaciones.
6. El esparfloxacino, a diferencia de la mayoría de las quinolonas, posee mayor afinidad por la ADN girasa que por la topoisomerasa IV en *S.aureus*. No viéndose alterada la CMI de este antimicrobiano en presencia de mutaciones en el gen *grlA*.

7. Debe existir un mecanismo que genera bajos niveles de resistencia a esparfloxacino en *S.aureus* distinto a las mutaciones en las proteínas diana y a las bombas de expulsión inhibibles por reserpina.
8. Existen dos secuencias codificantes para NorA en *S.aureus*, con distintas afinidades para las quinolonas. Siendo la secuencia descrita por Yoshida *et al* la más prevalente.
9. No se han encontrado mutaciones en la zona codificante del gen *norA*, que pudieran explicar el aumento de resistencia debido a esta bomba de expulsión.
10. Levofloxacino y moxifloxacino son las dos quinolonas que tardan más en seleccionar mutantes resistentes en *S.aureus* y *S. pneumoniae*. Esta capacidad se relaciona con los radicales de la molécula en posición C8.
11. La selección de mutantes resistentes en *S. pneumoniae* genera diversos genotipos, dependiendo de cual ha sido la diana alterada. Si se ha alterado GyrA o ParC, ambas o ninguna.
12. En cada uno de los de los genotipos obtenidos en los mutantes *in vitro* de *S. pneumoniae* se observan distintos perfiles de expulsión. Esto implicaría la participación de más de un sistema de expulsión activa, inhibible por reserpina, en la adquisición de resistencia.

- 
13. La mayor acumulación de ciprofloxacino en el interior celular podría explicar en parte, que éste seleccione más rápidamente mutantes resistentes, pero otras quinolonas presentan una acumulación similar y presentan diferencia en la selección de mutantes. Por lo que la capacidad mutagénica de las quinolonas debe estar relacionada, al menos en parte, con la capacidad de seleccionar mutantes resistentes.
  14. El incremento de las CMI a ciprofloxacino, levofloxacino y moxifloxacino está relacionado con las mutaciones observadas en la RDRQ de *C. striatum* y *C. amycolatum*.
  15. *Corynebacterium* spp carece de topoisomeras IV, igual que otros microorganismos como son *Mycobacterium* spp, *Campylobacter* spp, o *Helicobacter pylori*. Por lo que mutaciones en el gen *gyrA*, que codifica la subunidad A de la ADN-girasa, son suficientes para generar resistencia.
  16. Una mutación en RDRQ del gen *gyrA* de *C. amycolatum* es capaz de generar altos niveles de resistencia, mientras que *C. striatum* necesita dos mutaciones para alcanzar los mismos niveles.
  17. En *C. amycolatum* encontramos una mutación inusual, que afecta al codon 88 de GyrA. Esta mutación, probablemente, cambia la conformación de la proteína impidiendo la interacción entre la quinolona y la ADN-girasa.
  18. La técnica de PCR-RFLP con NcoI puede ser útil para distinguir entre *C. striatum* y *C. amycolatum*.
-

# **9 BIBLIOGRAFÍA**



1. **Aarestrup, F. M., E. M. Nielsen, M. Madsen, and J. Engberg.** 1997. Antimicrobial susceptibility patterns of thermophilic *Campylobacter* spp. from humans, pigs, cattle, and broilers in Denmark. *Antimicrob.Agents Chemother.* **41**:2244-2250.
2. **Abbanat, D., G. Webb, B. Foleno, Y. Li, M. Macielag, D. Montenegro, E. Wira, and K. Bush.** 2005. In vitro activities of novel 2-fluoro-naphthyridine-containing ketolides. *Antimicrob.Agents Chemother.* **49**:309-315.
3. **Aboukasm, A. G., A. Y. Buu-Hoi, N. el Solh, A. Morvan, and J. F. Acar.** 1991. Epidemiological study of *Staphylococcus aureus* resistance to new quinolones in a university hospital. *J.Hosp.Infect.* **17**:25-33.
4. **Alghasham, A. A. and M. C. Nahata.** 2000. Clinical use of fluoroquinolones in children. *Annals Pharmacother.* **34**:347-359.
5. **Allemandi, D. A., F. L. Alovero, and R. H. Manzo.** 1994. In-vitro activity of new sulphanilil fluoroquinolones against *Staphylococcus aureus*. *J.Antimicrob.Chemother.* **34**:261-265.
6. **Alos, J. I.** 2003. [Quinolones]. *Enferm.Infecc.Microbiol.Clin.* **21**:261-267.
7. **Alovero, F. L., X. S. Pan, J. E. Morris, R. H. Manzo, and L. M. Fisher.** 2000. Engineering the specificity of antibacterial fluoroquinolones: benzenesulfonamide modifications at C-7 of ciprofloxacin change its primary target in *Streptococcus pneumoniae* from topoisomerase IV to gyrase. *Antimicrob.Agents Chemother.* **44**:320-325.
8. **Andersson, M. I. and A. P. MacGowan.** 2003. Development of the quinolones. *J.Antimicrob.Chemother.* **51**:1-11.
9. **Aoyama, H., K. Sato, T. Kato, K. Hirai, and S. Mitsuhashi.** 1987. Norfloxacin resistance in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **31**:1640-1641.
10. **Appelbaum, P. C. and P. A. Hunter.** 2000. The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. *Int.J.Antimicrob. Agents* **16**:5-15.
11. **Appelbaum, P. C., G. A. Pankuch, B. Bozdogan, G. Lin, M. R. Jacobs, M. V. Patel, S. V. Gupte, M. A. Jafri, N. J. De Souza, and H. F. Khorakiwala.** 2005. Activity of the new quinolone WCK 771 against pneumococci. *Clin.Microbiol.Infect.* **11**:9-14.
12. **Bachoual, R., S. Ouabdesselam, F. Mory, C. Lascols, C. J. Soussy, and J. Tankovic.** 2001. Single or double mutational alterations of *gyrA* associated with fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Microb.Drug Resist.* **7**:257-261.
13. **Ball, P.** 2000. Quinolone generations: natural history or natural selection? *J.Antimicrob.Chemother.* **46**:17-24.

14. **Ballesta, S., A. Pascual, I. Garcia, and E. J. Perea.** 1996. [Uptake of 5 fluoroquinolones into human polymorphonuclear cells]. *Enferm.Infecc.Microbiol.Clin.* **14**:470-473.
15. **Balsalobre, L., M. J. Ferrandiz, J. Linares, F. Tubau, and A. G. de la Campa.** 2003. Viridans group streptococci are donors in horizontal transfer of topoisomerase IV genes to *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **47**:2072-2081.
16. **Barry, A. L., P. C. Fuchs, and S. D. Brown.** 1999. Antibacterial activity of moxifloxacin (Bay 12-8039) against aerobic clinical isolates, and provisional criteria for disk susceptibility tests. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.* **18**:305-309.
17. **Barton, N., A. F. Crowther, W. Hesworth, et al.** 1960. Quinolones and therapeutic compositions containing them. UK patent 830 832 .
18. **Bast, D. J., J. C. de Azavedo, T. Y. Tam, L. Kilburn, C. Duncan, L. A. Mandell, R. J. Davidson, and D. E. Low.** 2001. Interspecies recombination contributes minimally to fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **45**:2631-2634.
19. **Bauer, T. M., A. Follo, M. Navasa, J. Vila, R. Planas, G. Clemente, V. Vargas, F. Bory, P. Vaquer, and J. Rodes.** 2002. Daily norfloxacin is more effective than weekly rifloxacin in prevention of spontaneous bacterial peritonitis recurrence. *Dig.Dis.Sci.* **47**:1356-1361.
20. **Bauernfeind, A.** 1997. Comparison of the antibacterial activities of the quinolones Bay 12-8039, gatifloxacin (AM 1155), trovafloxacin, clinafloxacin, levofloxacin and ciprofloxacin. *J.Antimicrob.Chemother.* **40**:639-651.
21. **Berger-Bachi, B.** 2002. Resistance mechanisms of Gram-positive bacteria. *International Journal of Medical Microbiology* **292**:27-35.
22. **Bertino, J., Jr. and D. Fish.** 2000. The safety profile of the fluoroquinolones. *Clin.Ther.* **22**:798-817.
23. **Blondeau, J. M.** 2004. Fluoroquinolones: mechanism of action, classification, and development of resistance. *Surv.Ophthalmol.* **49 Suppl 2**:S73-S78.
24. **Boos, M., S. Mayer, A. Fischer, K. Kohrer, S. Scheuring, P. Heisig, J. Verhoef, A. C. Fluit, and F. J. Schmitz.** 2001. In vitro development of resistance to six quinolones in *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, and *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **45**:938-942.
25. **Bouthier, d. I. T., C. Portemer, R. Huber, P. Forterre, and M. Duguet.** 1991. Reverse gyrase in thermophilic eubacteria. *J.Bacteriol.* **173**:3921-3923.
26. **Bouza, E., M. D. Diaz-Lopez, J. C. Bernaldo de Quiros, and M. Rodriguez-Creixems.** 1989. Ciprofloxacin in patients with bacteremic infections. The Spanish Group for the Study of Ciprofloxacin. *Am.J.Med.* **87**:228S-231S.

27. **Brandi, L., M. Falconi, and S. Ripa.** 2000. Plasmid curing effect of trovafloxacin. *FEMS Microbiol.Lett.* **184**:297-302.
28. **Brenwald, N. P., P. Appelbaum, T. Davies, and M. J. Gill.** 2003. Evidence for efflux pumps, other than PmrA, associated with fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Clin.Microbiol.Infect.* **9**:140-143.
29. **Brenwald, N. P., M. J. Gill, and R. Wise.** 1998. Prevalence of a putative efflux mechanism among fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **42**:2032-2035.
30. **Brown, M. H., I. T. Paulsen, and R. A. Skurray.** 1999. The multidrug efflux protein NorM is a prototype of a new family of transporters. *Mol.Microbiol.* **31**:394-395.
31. **Browne, F. A., B. Bozdogan, C. Clark, L. M. Kelly, L. Ednie, K. Kosowska, B. Dewasse, M. R. Jacobs, and P. C. Appelbaum.** 2003. Antipneumococcal activity of DK-507k, a new quinolone, compared with the activities of 10 other agents. *Antimicrob.Agents Chemother.* **47**:3815-3824.
32. **Bryskier, A. and J. F. Chantot.** 1995. Classification and structure-activity relationships of fluoroquinolones. *Drugs* **49 Suppl 2**:16-28.
33. **Burman, L. G.** 1977. R-plasmid transfer and its response to nalidixic acid. *J.Bacteriol.* **131**:76-81.
34. **Cantor, C. R. and P. R. Schiemel.** 1980. Biophysical chemistry.I. the conformation of biological macromolecules, San Francisco, Calif.
35. **Chen, D. K., A. McGeer, J. C. de Azavedo, and D. E. Low.** 1999. Decreased susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* to fluoroquinolones in Canada. *Canadian Bacterial Surveillance Network. N.Engl.J.Med.* **341**:233-239.
36. **Chen, F. J., T. L. Lauderdale, M. Ho, and H. J. Lo.** 2003. The roles of mutations in *gyrA*, *parC*, and *ompK35* in fluoroquinolone resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Microb.Drug Resist.* **9**:265-271.
37. **Chevalier, J., S. Atifi, A. Eyraud, A. Mahamoud, J. Barbe, and J. M. Pages.** 2001. New pyridoquinoline derivatives as potential inhibitors of the fluoroquinolone efflux pump in resistant *Enterobacter aerogenes* strains. *J.Med.Chem.* **44**:4023-4026.
38. **Chu, D. T. and P. B. Fernandes.** 1989. Structure-activity relationships of the fluoroquinolones. *Antimicrob.Agents Chemother.* **33**:131-135.
39. **Chung, Y. J. and M. H. Saier, Jr.** 2001. SMR-type multidrug resistance pumps. *Curr.Opin.Drug Discov.Devel.* **4**:237-245.
40. **Clerch, B., J. Barbe, and M. Llagostera.** 1992. The role of the excision and error-prone repair systems in mutagenesis by fluorinated quinolones in *Salmonella typhimurium*. *Mutat.Res.* **281**:207-213.

41. **Cohen, M. A., M. D. Huband, G. B. Mailloux, S. L. Yoder, G. E. Roland, and C. L. Heifetz.** 1991. In vitro activity of sparfloxacin (CI-978, AT-4140, and PD 131501). A quinolone with high activity against gram-positive bacteria. *Diagn.Microbiol.Infect.Dis.* **14**:403-415.
42. **Cohen, M. A., S. L. Yoder, M. D. Huband, G. E. Roland, and C. L. Courtney.** 1995. In vitro and in vivo activities of clinafloxacin, CI-990 (PD 131112), and PD 138312 versus enterococci. *Antimicrob.Agents Chemother.* **39**:2123-2127.
43. **Cullen, M. E., A. W. Wyke, R. Kuroda, and L. M. Fisher.** 1989. Cloning and characterization of a DNA gyrase A gene from *Escherichia coli* that confers clinical resistance to 4-quinolones. *Antimicrob.Agents Chemother.* **33**:886-894.
44. **Daniels, C., D. Schoors, and G. Van Camp.** 2003. Native valve endocarditis with aorta-to-left atrial fistula due to *Corynebacterium amycolatum*. *Eur.J.Echocardiogr.* **4**:68-70.
45. **Davidson, R., R. Cavalcanti, J. L. Brunton, D. J. Bast, J. C. de Azavedo, P. Kibsey, C. Fleming, and D. E. Low.** 2002. Resistance to levofloxacin and failure of treatment of pneumococcal pneumonia. *N.Engl.J.Med.* **346**:747-750.
46. **Davies, T. A., G. A. Pankuch, B. E. Dewasse, M. R. Jacobs, and P. C. Appelbaum.** 1999. In vitro development of resistance to five quinolones and amoxicillin-clavulanate in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **43**:1177-1182.
47. **Davis, R. and H. M. Bryson.** 1994. Levofloxacin. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetics and therapeutic efficacy. *Drugs* **47**:677-700.
48. **Davis, R., A. Markham, and J. A. Balfour.** 1996. Ciprofloxacin. An updated review of its pharmacology, therapeutic efficacy and tolerability. *Drugs* **51**:1019-1074.
49. **Doern, G. V., K. P. Heilmann, H. K. Huynh, P. R. Rhomberg, S. L. Coffman, and A. B. Brueggemann.** 2001. Antimicrobial resistance among clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in the United States during 1999--2000, including a comparison of resistance rates since 1994--1995. *Antimicrob.Agents Chemother.* **45**:1721-1729.
50. **Dong, Y., C. Xu, X. Zhao, J. Domagala, and K. Drlica.** 1998. Fluoroquinolone action against mycobacteria: effects of C-8 substituents on growth, survival, and resistance. *Antimicrob.Agents Chemother.* **42**:2978-2984.
51. **Drlica, K.** 1999. Mechanism of fluoroquinolone action. *Curr.Opin.Microbiol.* **2**:504-508.
52. **Drlica, K. and X. L. Zhao.** 1997. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **61**:377-392.
53. **Emmerson, A. M. and A. M. Jones.** 2003. The quinolones: decades of development and use. *J.Antimicrob.Chemother.* **51**:13-20.

54. **Endtz, H. P., G. J. Ruijs, B. van Klingeren, W. H. Jansen, R. T. van der, and R. P. Mouton.** 1991. Quinolone resistance in campylobacter isolated from man and poultry following the introduction of fluoroquinolones in veterinary medicine. *J.Antimicrob.Chemother.* **27**:199-208.
55. **Esteban, J., E. Nieto, R. Calvo, R. Fernandez-Robals, P. L. Valero-Guillen, and F. Soriano.** 1999. Microbiological characterization and clinical significance of *Corynebacterium amycolatum* strains. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.* **18**:518-521.
56. **Evans, M. E. and W. B. Titlow.** 1998. Levofloxacin selects fluoroquinolone-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* less frequently than ciprofloxacin. *J.Antimicrob.Chemother.* **41**:285-288.
57. **Fath, M. J. and R. Kolter.** 1993. ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiol.Rev.* **57**:995-1017.
58. **Fernandez-Ayala, M., D. N. Nan, and M. C. Farinas.** 2001. Vertebral osteomyelitis due to *Corynebacterium striatum*. *Am.J.Med.* **111**:167.
59. **Ferrandiz, M. J., A. Fenoll, J. Linares, and A. G. de la Campa.** 2000. Horizontal transfer of *parC* and *gyrA* in fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **44**:840-847.
60. **Ferrero, L., B. Cameron, and J. Crouzet.** 1995. Analysis of *gyrA* and *grlA* mutations in stepwise-selected ciprofloxacin-resistant mutants of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **39**:1554-1558.
61. **Ferrero, L., B. Cameron, B. Manse, D. Lagneaux, J. Crouzet, A. Famechon, and F. Blanche.** 1994. Cloning and primary structure of *Staphylococcus aureus* DNA topoisomerase IV: a primary target of fluoroquinolones. *Mol.Microbiol.* **13**:641-653.
62. **Fluit, A. C., C. L. Wielders, J. Verhoef, and F. J. Schmitz.** 2001. Epidemiology and susceptibility of 3,051 *Staphylococcus aureus* isolates from 25 university hospitals participating in the European SENTRY study. *J.Clin.Microbiol.* **39**:3727-3732.
63. **Fournier, B., R. Aras, and D. C. Hooper.** 2000. Expression of the multidrug resistance transporter *NorA* from *Staphylococcus aureus* is modified by a two-component regulatory system. *J.Bacteriol.* **182**:664-671.
64. **Fournier, B., Q. C. Truong-Bolduc, X. Zhang, and D. C. Hooper.** 2001. A mutation in the 5' untranslated region increases stability of *norA* mRNA, encoding a multidrug resistance transporter of *Staphylococcus aureus*. *J.Bacteriol.* **183**:2367-2371.
65. **Fuchs, P. C., A. L. Barry, and S. D. Brown.** 2000. In vitro activity of gemifloxacin against contemporary clinical bacterial isolates from eleven North American medical centers, and assessment of disk diffusion test interpretive criteria. *Diagn.Microbiol.Infect.Dis.* **38**:243-253.

66. **Fuchs, P. C., A. L. Barry, M. A. Pfaller, S. D. Allen, and E. H. Gerlach.** 1991. Multicenter evaluation of the in vitro activities of three new quinolones, sparfloxacin, CI-960, and PD 131,628, compared with the activity of ciprofloxacin against 5,252 clinical bacterial isolates. *Antimicrob.Agents Chemother.* **35**:764-766.
67. **Fukuda, H. and K. Hiramatsu.** 1999. Primary targets of fluoroquinolones in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **43**:410-412.
68. **Fukuda, H., R. Kishii, M. Takei, and M. Hosaka.** 2001. Contributions of the 8-methoxy group of gatifloxacin to resistance selectivity, target preference, and antibacterial activity against *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **45**:1649-1653.
69. **Funke, G., V. Punter, and A. von Graevenitz.** 1996. Antimicrobial susceptibility patterns of some recently established coryneform bacteria. *Antimicrob.Agents Chemother.* **40**:2874-2878.
70. **Funke, G., A. von Graevenitz, J. E. Clarridge, III, and K. A. Bernard.** 1997. Clinical microbiology of coryneform bacteria. *Clin.Microbiol.Rev.* **10**:125-159.
71. **Garcia, I., A. Pascual, S. Ballesta, P. Joyanes, and E. J. Perea.** 2000. Intracellular penetration and activity of gemifloxacin in human polymorphonuclear leukocytes. *Antimicrob.Agents Chemother.* **44**:3193-3195.
72. **Garcia, I., A. Pascual, S. Ballesta, and E. J. Perea.** 2000. Uptake and intracellular activity of ofloxacin isomers in human phagocytic and non-phagocytic cells. *Int.J.Antimicrob.Agents* **15**:201-205.
73. **Garcia, I., A. Pascual, M. C. Conejo, and E. J. Perea.** 1996. [Intracellular penetration of 5 quinolones into non-phagocytic cells]. *Enferm.Infecc.Microbiol.Clin.* **14**:167-170.
74. **Gargallo-Viola, D., S. Ferrer, E. Tudela, M. Robert, R. Coll, R. Roser, and J. Guinea.** 2001. Antibacterial activities and pharmacokinetics of E-4767 and E-5065, two new 8-chlorofluoroquinolones with a 7-azetidin ring substituent. *Antimicrob.Agents Chemother.* **45**:3113-3121.
75. **Gascon, J., L. Ruiz, J. Canela, M. Mallart, and M. Corachan.** 1993. [Epidemiology of traveler's diarrhea in Spanish tourists travelling in developing countries]. *Med.Clin.(Barc.)* **100**:365-367.
76. **Gascon, J., J. Vila, M. E. Valls, L. Ruiz, J. Vidal, M. Corachan, G. Prats, and M. T. Jimenez de Anta.** 1993. Etiology of traveller's diarrhea in Spanish travellers to developing countries. *Eur.J.Epidemiol.* **9**:217-223.
77. **Gellert, M., K. Mizuuchi, M. H. O'Dea, T. Itoh, and J. I. Tomizawa.** 1977. Nalidixic acid resistance: a second genetic character involved in DNA gyrase activity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **74**:4772-4776.

78. **Gellert, M., K. Mizuuchi, M. H. O'Dea, and H. A. Nash.** 1976. DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **73**:3872-3876.
79. **Gibbons, S., M. Oluwatuyi, and G. W. Kaatz.** 2003. A novel inhibitor of multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. *J.Antimicrob.Chemother.* **51**:13-17.
80. **Gill, M. J., N. P. Brenwald, and R. Wise.** 1999. Identification of an efflux pump gene, *pmrA*, associated with fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **43**:187-189.
81. **Ginsburg, A. S., J. H. Grosset, and W. R. Bishai.** 2003. Fluoroquinolones, tuberculosis, and resistance. *Lancet Infect.Dis.* **3**:432-442.
82. **Giuliano, M., A. Pantosti, G. Gentile, M. Venditti, W. Arcese, and P. Martino.** 1989. Effects on oral and intestinal microfloras of norfloxacin and pefloxacin for selective decontamination in bone marrow transplant patients. *Antimicrob.Agents Chemother.* **33**:1709-1713.
83. **Gocke, E.** 1991. Mechanism of quinolone mutagenicity in bacteria. *Mutat.Res.* **248**:135-143.
84. **Godreuil, S., M. Galimand, G. Gerbaud, C. Jacquet, and P. Courvalin.** 2003. Efflux pump *Lde* is associated with fluoroquinolone resistance in *Listeria monocytogenes*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **47**:704-708.
85. **Gooding, B. B. and R. N. Jones.** 1993. In vitro antimicrobial activity of CP-99,219, a novel azabicyclo-naphthyridone. *Antimicrob.Agents Chemother.* **37**:349-353.
86. **Gordeev, M. F., C. Hackbarth, M. R. Barbachyn, L. S. Banitt, J. R. Gage, G. W. Luehr, M. Gomez, J. Trias, S. E. Morin, G. E. Zurenko, C. N. Parker, J. M. Evans, R. J. White, and D. V. Patel.** 2003. Novel oxazolidinone-quinolone hybrid antimicrobials. *Bioorg.Med.Chem.Lett.* **13**:4213-4216.
87. **Goss, W. A., W. H. Deitz, and T. M. Cook.** 1965. Mechanism of action of nalidixic acid on *Escherichia coli*. II. Inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis. *J.Bacteriol.* **89**:1068-1074.
88. **Gutierrez-Zufiaurre, N.** 2004. [Relation between structure, activity and adverse effects of quinolones]. *Rev.Esp.Quimioter.* **17**:232-243.
89. **Hahn, F. E. and J. Ciak.** 1976. Elimination of resistance determinants from R-factor R1 by intercalative compounds. *Antimicrob.Agents Chemother.* **9**:77-80.
90. **Hane, M. W. and T. H. Wood.** 1969. *Escherichia coli* K-12 mutants resistant to nalidixic acid: genetic mapping and dominance studies. *J.Bacteriol.* **99**:238-241.
91. **Hardy, D. J., R. N. Swanson, D. M. Hensey, N. R. Ramer, R. R. Bower, C. W. Hanson, D. T. Chu, and P. B. Fernandes.** 1987. Comparative antibacterial

- activities of temafloxacin hydrochloride (A-62254) and two reference fluoroquinolones. *Antimicrob.Agents Chemother.* **31**:1768-1774.
92. **Harnett, N., S. Brown, and C. Krishnan.** 1991. Emergence of quinolone resistance among clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Ontario, Canada. *Antimicrob.Agents Chemother.* **35**:1911-1913.
93. **Hata, M., M. Suzuki, M. Matsumoto, M. Takahashi, K. Sato, S. Ibe, and K. Sakae.** 2005. Cloning of a novel gene for quinolone resistance from a transferable plasmid in *Shigella flexneri* 2b. *Antimicrob.Agents Chemother.* **49**:801-803.
94. **Hawkey, P. M.** 1997. Quinolones in sweat and quinolone resistance. *Lancet* **349**:148-149.
95. **Hayashi, N., Y. Nakata, and A. Yazaki.** 2004. New findings on the structure-phototoxicity relationship and photostability of fluoroquinolones with various substituents at position 1. *Antimicrob.Agents Chemother.* **48**:799-803.
96. **Heddle, J. G., F. M. Barnard, L. M. Wentzell, and A. Maxwell.** 2000. The interaction of drugs with DNA gyrase: a model for the molecular basis of quinolone action. *Nucleos. Nucleot. Nucleic Acids* **19**:1249-1264.
97. **Higgins, C. F.** 1992. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu.Rev.Cell Biol.* **8**:67-113.
98. **Higgins, P. G., A. C. Fluit, and F. J. Schmitz.** 2003. Fluoroquinolones: Structure and target sites. *Current Drug Targets* **4**:181-190.
99. **Hoiby, N., J. O. Jarlov, M. Kemp, M. Tvede, J. M. Bangsborg, A. Kjerulf, C. Pers, and H. Hansen.** 1997. Excretion of ciprofloxacin in sweat and multiresistant *Staphylococcus epidermidis*. *Lancet* **349**:167-169.
100. **Hoiby, N. and H. K. Johansen.** 1995. Ciprofloxacin in sweat and antibiotic resistance. The Copenhagen Study Group on Antibiotics in Sweat. *Lancet* **346**:1235.
101. **Hooper, D. C.** 1998. Bacterial topoisomerases, anti-topoisomerases, and anti-topoisomerase resistance. *Clin.Infect.Dis.* **27 Suppl 1**:S54-S63.
102. **Hooper, D. C.** 1999. Mode of action of fluoroquinolones. *Drugs* **58 Suppl 2**:6-10.
103. **Hooper, D. C.** 2000. Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. *Clin.Infect.Dis.* **31**:S24-S28.
104. **Hooper, D. C.** 2002. Fluoroquinolone resistance among Gram-positive cocci. *Lancet Infectious Diseases* **2**:530-538.
105. **Hooper, D. C. and J. S. Wolfson.** 1985. The fluoroquinolones: pharmacology, clinical uses, and toxicities in humans. *Antimicrob.Agents Chemother.* **28**:716-721.



106. **Hooper, D. C., J. S. Wolfson, K. S. Souza, C. Tung, G. L. McHugh, and M. N. Swartz.** 1986. Genetic and biochemical characterization of norfloxacin resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **29**:639-644.
107. **Hopewell, R., M. Oram, R. Briesewitz, and L. M. Fisher.** 1990. DNA cloning and organization of the *Staphylococcus aureus* *gyrA* and *gyrB* genes: close homology among gyrase proteins and implications for 4-quinolone action and resistance. *J.Bacteriol.* **172**:3481-3484.
108. **Hosaka, M., T. Yasue, H. Fukuda, H. Tomizawa, H. Aoyama, and K. Hirai.** 1992. In vitro and in vivo antibacterial activities of AM-1155, a new 6-fluoro-8-methoxy quinolone. *Antimicrob.Agents Chemother.* **36**:2108-2117.
109. **Hoshino, K., A. Kitamura, I. Morrissey, K. Sato, J. Kato, and H. Ikeda.** 1994. Comparison of inhibition of *Escherichia coli* topoisomerase IV by quinolones with DNA gyrase inhibition. *Antimicrob.Agents Chemother.* **38**:2623-2627.
110. **Hubschwerlen, C., J. L. Specklin, D. K. Baeschlin, Y. Borer, S. Haefeli, C. Sigwalt, S. Schroeder, and H. H. Locher.** 2003. Structure-activity relationship in the oxazolidinone-quinolone hybrid series: influence of the central spacer on the antibacterial activity and the mode of action. *Bioorg.Med.Chem.Lett.* **13**:4229-4233.
111. **Hubschwerlen, C., J. L. Specklin, C. Sigwalt, S. Schroeder, and H. H. Locher.** 2003. Design, synthesis and biological evaluation of oxazolidinone-quinolone hybrids. *Bioorg.Med.Chem.* **11**:2313-2319.
112. **Ince, D. and D. C. Hooper.** 2000. Mechanisms and frequency of resistance to premafloxacin in *Staphylococcus aureus*: novel mutations suggest novel drug-target interactions. *Antimicrob.Agents Chemother.* **44**:3344-3350.
113. **Ince, D. and D. C. Hooper.** 2003. Quinolone resistance due to reduced target enzyme expression. *J.Bacteriol.* **185**:6883-6892.
114. **Ito, A., K. Hirai, M. Inoue, H. Koga, S. Suzue, T. Irikura, and S. Mitsuhashi.** 1980. In vitro antibacterial activity of AM-715, a new nalidixic acid analog. *Antimicrob.Agents Chemother.* **17**:103-108.
115. **Ito, H., H. Yoshida, M. Bogaki-Shonai, T. Niga, H. Hattori, and S. Nakamura.** 1994. Quinolone resistance mutations in the DNA gyrase *gyrA* and *gyrB* genes of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **38**:2014-2023.
116. **Jacobs, M. R., D. Felmingham, P. C. Appelbaum, and R. N. Gruneberg.** 2003. The Alexander Project 1998-2000: susceptibility of pathogens isolated from community-acquired respiratory tract infection to commonly used antimicrobial agents. *J.Antimicrob.Chemother.* **52**:229-246.
117. **Janoir, C., I. Podglajen, M. D. Kitzis, C. Poyart, and L. Gutmann.** 1999. In vitro exchange of fluoroquinolone resistance determinants between

- Streptococcus pneumoniae and viridans streptococci and genomic organization of the parE-parC region in *S. mitis*. *J.Infect.Dis.* **180**:555-558.
118. **Janoir, C., V. Zeller, M. D. Kitzis, N. J. Moreau, and L. Gutmann.** 1996. High-level fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae* requires mutations in *parC* and *gyrA*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **40**:2760-2764.
  119. **Jellen-Ritter, A. S. and W. V. Kern.** 2001. Enhanced expression of the multidrug efflux pumps *AcrAB* and *AcrEF* associated with insertion element transposition in *Escherichia coli* mutants Selected with a fluoroquinolone. *Antimicrob.Agents Chemother.* **45**:1467-1472.
  120. **Jonas, D., K. Biehler, D. Hartung, B. Spitzmuller, and F. D. Daschner.** 2005. Plasmid-mediated quinolone resistance in isolates obtained in german intensive care units. *Antimicrob.Agents Chemother.* **49**:773-775.
  121. **Jones, M. E., I. A. Critchley, J. A. Karlowsky, R. S. Blosser-Middleton, F. J. Schmitz, C. Thornsberry, and D. F. Sahn.** 2002. In vitro activities of novel nonfluorinated quinolones PGE 9262932 and PGE 9509924 against clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae* with defined mutations in DNA gyrase and topoisomerase IV. *Antimicrob.Agents Chemother.* **46**:1651-1657.
  122. **Juckett, G.** 1999. Prevention and treatment of traveler's diarrhea. *Am.Fam.Physician* **60**:119-6.
  123. **Kaatz, G. W., V. V. Moudgal, and S. M. Seo.** 2002. Identification and characterization of a novel efflux-related multidrug resistance phenotype in *Staphylococcus aureus*. *J.Antimicrob.Chemother.* **50**:833-838.
  124. **Kaatz, G. W. and S. M. Seo.** 1995. Inducible *NorA*-mediated multidrug resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **39**:2650-2655.
  125. **Kaatz, G. W. and S. M. Seo.** 1997. Mechanisms of fluoroquinolone resistance in genetically related strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **41**:2733-2737.
  126. **Kaatz, G. W., S. M. Seo, L. O'Brien, M. Wahiduzzaman, and T. J. Foster.** 2000. Evidence for the existence of a multidrug efflux transporter distinct from *NorA* in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **44**:1404-1406.
  127. **Kaatz, G. W., S. M. Seo, and C. A. Ruble.** 1993. Efflux-mediated fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **37**:1086-1094.
  128. **Kaatz, G. W., R. V. Thyagarajan, and S. M. Seo.** 2005. Effect of promoter region mutations and *mgrA* overexpression on transcription of *norA*, which encodes a *Staphylococcus aureus* multidrug efflux transporter. *Antimicrob.Agents Chemother.* **49**:161-169.

129. **Kern, W. V., M. Oethinger, A. S. Jellen-Ritter, and S. B. Levy.** 2000. Non-target gene mutations in the development of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **44**:814-820.
130. **Khurana, A., N. Vinayek, R. A. Recco, E. S. Go, and M. M. Zaman.** 2004. The incidence of *Clostridium difficile*-associated and non-*C. difficile*-associated diarrhea after use of gatifloxacin and levofloxacin in an acute-care facility. *Clin.Infect.Dis.* **39**:602-603.
131. **King, A., C. Warren, K. Shannon, and I. Phillips.** 1982. In vitro antibacterial activity of norfloxacin (MK-0366). *Antimicrob.Agents Chemother.* **21**:604-607.
132. **King, D. E., R. Malone, and S. H. Lilley.** 2000. New classification and update on the quinolone antibiotics. *Am.Fam.Physician* **61**:2741-2748.
133. **Knox, K. L. and A. H. Holmes.** 2002. Nosocomial endocarditis caused by *Corynebacterium amycolatum* and other nondiphtheriae corynebacteria. *Emerg.Infect.Dis.* **8**:97-99.
134. **Kobayashi, K., N. Tsukagoshi, and R. Aono.** 2001. Suppression of hypersensitivity of *Escherichia coli* *acrB* mutant to organic solvents by integrational activation of the *acrEF* operon with the IS1 or IS2 element. *J.Bacteriol.* **183**:2646-2653.
135. **Kocagoz, T., C. J. Hackbarth, I. Unsal, E. Y. Rosenberg, H. Nikaido, and H. F. Chambers.** 1996. Gyrase mutations in laboratory-selected, fluoroquinolone-resistant mutants of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. *Antimicrob.Agents Chemother.* **40**:1768-1774.
136. **Lagrou, K., J. Verhaegen, M. Janssens, G. Wauters, and L. Verbist.** 1998. Prospective study of catalase-positive coryneform organisms in clinical specimens: identification, clinical relevance, and antibiotic susceptibility. *Diagn.Microbiol.Infect.Dis.* **30**:7-15.
137. **Leshner, G. Y., E. J. Froelich, M. D. Gruett, J. H. Baiely, and R. P. Brundage.** 1962. 1,8-naphthyridine derivatives. A new class of chemotherapeutic agents. *J.Med.Pharm.Chem.* **91**:1063-1065.
138. **Levin, D. E., L. J. Marnett, and B. N. Ames.** 1984. Spontaneous and mutagen-induced deletions: mechanistic studies in *Salmonella* tester strain TA102. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **81**:4457-4461.
139. **Li, X. Z. and H. Nikaido.** 2004. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs* **64**:159-204.
140. **Liñares, J., A. G. de la Campa, and R. Pallares.** 1999. Fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *N.Engl.J.Med.* **341**:1546-1547.
141. **Lipsky, B. A. and C. A. Baker.** 1999. Fluoroquinolone toxicity profiles: a review focusing on newer agents. *Clin.Infect.Dis.* **28**:352-364.
142. **Lowe, M. N. and H. M. Lamb.** 2000. Gemifloxacin. *Drugs* **59**:1137-1147.

143. **Loza, E., R. Canton, A. Pascual, F. Tubau, M. I. Morosini, F. Almaraz, E. Perea, R. Martin, R. N. Jones, and F. Baquero.** 2003. [Comparative in vitro activity of garenoxacin (BMS-284756). Sentry program, Spain (1999-2000)]. *Enferm.Infecc.Microbiol.Clin.* **21**:404-409.
144. **Mammeri, H., L. M. Van De, L. Poirel, L. Martinez-Martinez, and P. Nordmann.** 2005. Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* in Europe. *Antimicrob.Agents Chemother.* **49**:71-76.
145. **Mandell, L. A., L. R. Peterson, R. Wise, D. Hooper, D. E. Low, U. B. Schaad, K. P. Klugman, and P. Courvalin.** 2002. The battle against emerging antibiotic resistance: Should fluoroquinolones be used to treat children? *Clin.Infect.Dis* **35**:721-727.
146. **Manjunatha, U. H., M. Dalal, M. Chatterji, D. R. Radha, S. S. Visweswariah, and V. Nagaraja.** 2002. Functional characterisation of mycobacterial DNA gyrase: an efficient decatenase. *Nucleic Acids Res.* **30**:2144-2153.
147. **Marger, M. D. and M. H. Saier, Jr.** 1993. A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport. *Trends Biochem.Sci.* **18**:13-20.
148. **Markham, P. N.** 1999. Inhibition of the emergence of ciprofloxacin resistance in *Streptococcus pneumoniae* by the multidrug efflux inhibitor reserpine. *Antimicrob.Agents Chemother.* **43**:988-989.
149. **Markham, P. N. and A. A. Neyfakh.** 1996. Inhibition of the multidrug transporter NorA prevents emergence of norfloxacin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **40**:2673-2674.
150. **Markham, P. N., E. Westhaus, K. Klyachko, M. E. Johnson, and A. A. Neyfakh.** 1999. Multiple novel inhibitors of the NorA multidrug transporter of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **43**:2404-2408.
151. **Martin, M. C., O. Melon, M. M. Celada, J. Alvarez, F. J. Mendez, and F. Vazquez.** 2003. Septicaemia due to *Corynebacterium striatum*: molecular confirmation of entry via the skin. *J.Med.Microbiol.* **52**:599-602.
152. **Martinez-Martinez, L., P. Joyanes, A. I. Suarez, and E. J. Perea.** 2001. Activities of gemifloxacin and five other antimicrobial agents against *Listeria monocytogenes* and coryneform bacteria isolated from clinical samples. *Antimicrob.Agents Chemother.* **45**:2390-2392.
153. **Martinez-Martinez, L., A. Pascual, K. Bernard, and A. I. Suarez.** 1996. Antimicrobial susceptibility pattern of *Corynebacterium striatum*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **40**:2671-2672.
154. **Martinez-Martinez, L., A. Pascual, M. C. Conejo, I. Garcia, P. Joyanes, A. Domenech-Sanchez, and V. J. Benedi.** 2002. Energy-dependent accumulation of norfloxacin and porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*

- and relationship to extended-spectrum beta-lactamase production. *Antimicrob.Agents Chemother.* **46**:3926-3932.
155. **Martinez-Martinez, L., A. Pascual, and G. A. Jacoby.** 1998. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* **351**:797-799.
156. **Martinez-Martinez, L., A. Pascual, A. I. Suarez, and E. J. Perea.** 1999. In-vitro activity of levofloxacin, ofloxacin and D-ofloxacin against coryneform bacteria and *Listeria monocytogenes*. *J.Antimicrob.Chemother.* **43 Suppl C**:27-32.
157. **Martinez-Martinez, L., A. I. Suarez, J. Winstanley, M. C. Ortega, and K. Bernard.** 1995. Phenotypic characteristics of 31 strains of *Corynebacterium striatum* isolated from clinical samples. *J.Clin.Microbiol.* **33**:2458-2461.
158. **Maxwell, A.** 1997. DNA gyrase as a drug target. *Trends Microbiol.* **5**:102-109.
159. **Mazzariol, A., Y. Tokue, T. M. Kanegawa, G. Cornaglia, and H. Nikaido.** 2000. High-level fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* overproduce multidrug efflux protein AcrA. *Antimicrob.Agents Chemother.* **44**:3441-3443.
160. **Morais Cabral, J. H., A. P. Jackson, C. V. Smith, N. Shikotra, A. Maxwell, and R. C. Liddington.** 1997. Crystal structure of the breakage-reunion domain of DNA gyrase. *Nature* **388**:903-906.
161. **Morita, Y., K. Kodama, S. Shiota, T. Mine, A. Kataoka, T. Mizushima, and T. Tsuchiya.** 1998. NorM, a putative multidrug efflux protein, of *Vibrio parahaemolyticus* and its homolog in *Escherichia coli*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **42**:1778-1782.
162. **Muñoz, R. and A. G. de la Campa.** 1996. ParC subunit of DNA topoisomerase IV of *Streptococcus pneumoniae* is a primary target of fluoroquinolones and cooperates with DNA gyrase A subunit in forming resistance phenotype. *Antimicrob.Agents Chemother.* **40**:2252-2257.
163. **Muytjens, H. L., van der Ros-van de Repe, and G. van Veldhuizen.** 1983. Comparative activities of ciprofloxacin (Bay o 9867), norfloxacin, pipemidic acid, and nalidixic acid. *Antimicrob.Agents Chemother.* **24**:302-304.
164. **Naber, K. G. and D. Adam.** 1998. Classification of fluoroquinolones. *Intern.J.Antimicrob.Agents* **10**:255-257.
165. **Nagai, K., T. A. Davies, B. E. Dewasse, M. R. Jacobs, and P. C. Appelbaum.** 2001. Single- and multi-step resistance selection study of gemifloxacin compared with trovafloxacin, ciprofloxacin, gatifloxacin and moxifloxacin in *Streptococcus pneumoniae*. *J.Antimicrob.Chemother.* **48**:365-374.
166. **Nakamura, S., S. Inoue, M. Shimizu, S. Iyobe, and S. Mitsuhashi.** 1976. Inhibition of conjugal transfer of R plasmids by pipemidic acid and related compounds. *Antimicrob.Agents Chemother.* **10**:779-785.

167. **Nakamura, S., A. Minami, K. Nakata, N. Kurobe, K. Kouno, Y. Sakaguchi, S. Kashimoto, H. Yoshida, T. Kojima, T. Ohue, and .** 1989. In vitro and in vivo antibacterial activities of AT-4140, a new broad-spectrum quinolone. *Antimicrob.Agents Chemother.* **33**:1167-1173.
168. **Nakanishi, N., S. Yoshida, H. Wakebe, M. Inoue, T. Yamaguchi, and S. Mitsuhashi.** 1991. Mechanisms of clinical resistance to fluoroquinolones in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **35**:2562-2567.
169. **Nazic, H., L. Poirel, and P. Nordmann.** 2005. Further identification of plasmid-mediated quinolone resistance determinant in enterobacteriaceae in Turkey. *Antimicrob.Agents Chemother.* **49**:2146-2147.
170. **Neyfakh, A. A., C. M. Borsch, and G. W. Kaatz.** 1993. Fluoroquinolone resistance protein NorA of *Staphylococcus aureus* is a multidrug efflux transporter. *Antimicrob.Agents Chemother.* **37**:128-129.
171. **Ng, E. Y., M. Trucksis, and D. C. Hooper.** 1996. Quinolone resistance mutations in topoisomerase IV: Relationship to the flqA locus and genetic evidence that topoisomerase IV is the primary target and DNA gyrase is the secondary target of fluoroquinolones in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **40**:1881-1888.
172. **Nichols, M. D., K. DeAngelis, J. L. Keck, and J. M. Berger.** 1999. Structure and function of an archaeal topoisomerase VI subunit with homology to the meiotic recombination factor Spo11. *EMBO J.* **18**:6177-6188.
173. **Nilius, A. M., L. L. Shen, D. Hensey-Rudloff, L. S. Almer, J. M. Beyer, D. J. Balli, Y. Cai, and R. K. Flamm.** 2003. In vitro antibacterial potency and spectrum of ABT-492, a new fluoroquinolone. *Antimicrob.Agents Chemother.* **47**:3260-3269.
174. **Ohshita, Y., K. Hiramatsu, and T. Yokota.** 1990. A point mutation in norA gene is responsible for quinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **172**:1028-1034.
175. **Oliphant, C. M. and G. M. Green.** 2002. Quinolones: a comprehensive review. *Am.Fam.Physician* **65**:455-464.
176. **Olliver, A., M. Valle, E. Chaslus-Dancla, and A. Cloeckaert.** 2005. Overexpression of the multidrug efflux operon *acrEF* by insertional activation with IS1 or IS10 elements in *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT204 *acrB* mutants selected with fluoroquinolones. *Antimicrob.Agents Chemother.* **49**:289-301.
177. **Oram, M. and L. M. Fisher.** 1991. 4-Quinolone resistance mutations in the DNA gyrase of *Escherichia coli* clinical isolates identified by using the polymerase chain reaction. *Antimicrob.Agents Chemother.* **35**:387-389.
178. **Owens, R. C., Jr.** 2001. Risk assessment for antimicrobial agent-induced QTc interval prolongation and torsades de pointes. *Pharmacotherapy* **21**:301-319.

179. **Owens, R. C., Jr. and P. G. Ambrose.** 2000. Clinical use of the fluoroquinolones. *Med.Clin.North Am.* **84**:1447-1469.
180. **Palumbo, M., B. Gatto, G. Zagotto, and G. Palu.** 1993. On the mechanism of action of quinolone drugs. *Trends Microbiol.* **1**:232-235.
181. **Pan, X. S., J. Ambler, S. Mehtar, and L. M. Fisher.** 1996. Involvement of topoisomerase IV and DNA gyrase as ciprofloxacin targets in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **40**:2321-2326.
182. **Pan, X. S. and L. M. Fisher.** 1996. Cloning and characterization of the *parC* and *parE* genes of *Streptococcus pneumoniae* encoding DNA topoisomerase IV: role in fluoroquinolone resistance. *J.Bacteriol.* **178**:4060-4069.
183. **Pan, X. S. and L. M. Fisher.** 1997. Targeting of DNA gyrase in *Streptococcus pneumoniae* by sparfloxacin: selective targeting of gyrase or topoisomerase IV by quinolones. *Antimicrob.Agents Chemother.* **41**:471-474.
184. **Pao, S. S., I. T. Paulsen, and M. H. Saier, Jr.** 1998. Major facilitator superfamily. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **62**:1-34.
185. **Paulsen, I. T., M. H. Brown, and R. A. Skurray.** 1996. Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol.Rev.* **60**:575-608.
186. **Perez-Trallero, E., C. Fernandez-Mazarrasa, C. Garcia-Rey, E. Bouza, L. Aguilar, J. Garcia-de-Lomas, and F. Baquero.** 2001. Antimicrobial susceptibilities of 1,684 *Streptococcus pneumoniae* and 2,039 *Streptococcus pyogenes* isolates and their ecological relationships: results of a 1-year (1998-1999) multicenter surveillance study in Spain. *Antimicrob.Agents Chemother.* **45**:3334-3340.
187. **Pestova, E., R. Beyer, N. P. Cianciotto, G. A. Noskin, and L. R. Peterson.** 1999. Contribution of topoisomerase IV and DNA gyrase mutations in *Streptococcus pneumoniae* to resistance to novel fluoroquinolones. *Antimicrob.Agents Chemother.* **43**:2000-2004.
188. **Pestova, E., J. J. Millichap, F. Siddiqui, G. A. Noskin, and L. R. Peterson.** 2002. Non-PmrA-mediated multidrug resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *J.Antimicrob.Chemother.* **49**:553-556.
189. **Peterson, L. R.** 2001. Quinolone molecular structure-activity relationships: What we have learned about improving antimicrobial activity. *Clin.Infect.Dis.* **33**:S180-S186.
190. **Piddock, L. J.** 1999. Mechanisms of fluoroquinolone resistance: an update 1994-1998. *Drugs* **58 Suppl 2**:11-18.
191. **Piddock, L. J., Y. F. Jin, and D. J. Griggs.** 2001. Effect of hydrophobicity and molecular mass on the accumulation of fluoroquinolones by *Staphylococcus aureus*. *J.Antimicrob.Chemother.* **47**:261-270.

192. **Piercy, E. A., D. Barbaro, J. P. Luby, and P. A. Mackowiak.** 1989. Ciprofloxacin for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Antimicrob.Agents Chemother.* **33**:128-130.
193. **Price, J. R.** 1949. Some reactions of 1-methyl- $\gamma$ -quinolone-3-carboxylic acid, a degradation product of the alkaloids. *Aust.J.Sci.Res* **217**:272-281.
194. **Ramirez, J. A., I. Morrissey, and J. E. Ambler.** 2002. Serious infections and fluoroquinolones. Science Press.
195. **Ribera, A., A. Domenech-Sanchez, J. Ruiz, V. J. Benedi, M. T. Jimenez de Anta, and J. Vila.** 2002. Mutations in *gyrA* and *parC* QRDRs are not relevant for quinolone resistance in epidemiological unrelated *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates. *Microb.Drug Resist.* **8**:245-251.
196. **Rodriguez-Martinez, J. M.** 2005. [Mechanisms of plasmid-mediated resistance to quinolones]. *Enferm.Infecc.Microbiol.Clin.* **23**:25-31.
197. **Rodriguez-Martinez, J. M., A. Pascual, I. Garcia, and L. Martinez-Martinez.** 2003. Detection of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnr* among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing AmpC-type beta-lactamase. *J.Antimicrob.Chemother.* **52**:703-706.
198. **Rohlfing, S. R., J. R. Gerster, and D. C. Kvam.** 1976. Bioevaluation of the antibacterial flumequine for urinary tract use. *Antimicrob.Agents Chemother.* **10**:20-24.
199. **Rolston, K. V., S. Frisbee-Hume, B. LeBlanc, H. Streeter, and D. H. Ho.** 2003. In vitro antimicrobial activity of moxifloxacin compared to other quinolones against recent clinical bacterial isolates from hospitalized and community-based cancer patients. *Diagn.Microbiol.Infect.Dis.* **47**:441-449.
200. **Rolston, K. V., S. Frisbee-Hume, B. M. LeBlanc, H. Streeter, and D. H. Ho.** 2002. Antimicrobial activity of a novel des-fluoro (6) quinolone, garenoxacin (BMS-284756), compared to other quinolones, against clinical isolates from cancer patients. *Diagn.Microbiol.Infect.Dis.* **44**:187-194.
201. **Roychoudhury, S., C. E. Catrenich, E. J. McIntosh, H. D. McKeever, K. M. Makin, P. M. Koenigs, and B. Ledoussal.** 2001. Quinolone resistance in *Staphylococci*: activities of new nonfluorinated quinolones against molecular targets in whole cells and clinical isolates. *Antimicrob.Agents Chemother.* **45**:1115-1120.
202. **Roychoudhury, S. and B. Ledoussal.** 2002. Non-fluorinated quinolones (NFQs): new antibacterials with unique properties against quinolone-resistant gram-positive pathogens. *Curr.Drug Targets.Infect.Disord.* **2**:51-65.
203. **Roychoudhury, S., T. L. Twinem, K. M. Makin, M. A. Nienaber, C. Li, T. W. Morris, B. Ledoussal, and C. E. Catrenich.** 2001. *Staphylococcus aureus* mutants isolated via exposure to nonfluorinated quinolones: detection of known and unique mutations. *Antimicrob.Agents Chemother.* **45**:3422-3426.



204. **Rubinstein, E.** 2001. History of quinolones and their side effects. *Chemotherapy* **47 Suppl 3**:3-8.
205. **Ruiz, J.** 2003. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**:1109-1117.
206. **Ruiz, J., L. Capitano, L. Nunez, D. Castro, J. M. Sierra, M. Hatha, J. J. Borrego, and J. Vila.** 1999. Mechanisms of resistance to ampicillin, chloramphenicol and quinolones in multiresistant *Salmonella typhimurium* strains isolated from fish. *J. Antimicrob. Chemother.* **43**:699-702.
207. **Ruiz, J., J. Gomez, M. M. Navia, A. Ribera, J. M. Sierra, F. Marco, J. Mensa, and J. Vila.** 2002. High prevalence of nalidixic acid resistant, ciprofloxacin susceptible phenotype among clinical isolates of *Escherichia coli* and other Enterobacteriaceae. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **42**:257-261.
208. **Ruiz, J., P. Goni, F. Marco, F. Gallardo, B. Mirelis, d. A. Jimenez, and J. Vila.** 1998. Increased resistance to quinolones in *Campylobacter jejuni*: a genetic analysis of *gyrA* gene mutations in quinolone-resistant clinical isolates. *Microbiol.Immunol.* **42**:223-226.
209. **Ruiz, J., F. Marco, P. Goni, F. Gallardo, J. Mensa, A. Trilla, d. A. Jimenez, and J. Vila.** 1995. High frequency of mutations at codon 83 of the *gyrA* gene of quinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. *J.Antimicrob.Chemother.* **36**:737-738.
210. **Ruiz, J., J. M. Sierra, M. T. J. De Anta, and J. Vila.** 2001. Characterization of sparfloxacin-resistant mutants of *Staphylococcus aureus* obtained in vitro. *Intern. J. Antimicrob. Agents* **18**:107-112.
211. **Saenz, Y., L. Brinas, E. Dominguez, J. Ruiz, M. Zarazaga, J. Vila, and C. Torres.** 2004. Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins. *Antimicrob.Agents Chemother.* **48**:3996-4001.
212. **Saier, M. H., Jr., J. T. Beatty, A. Goffeau, K. T. Harley, W. H. Heijne, S. C. Huang, D. L. Jack, P. S. Jahn, K. Lew, J. Liu, S. S. Pao, I. T. Paulsen, T. T. Tseng, and P. S. Virk.** 1999. The major facilitator superfamily. *J.Mol.Microbiol.Biotechnol.* **1**:257-279.
213. **Saier, M. H., Jr. and I. T. Paulsen.** 2001. Phylogeny of multidrug transporters. *Semin.Cell Dev.Biol.* **12**:205-213.
214. **Sanchez-Cespedes, J., M. M. Navia, R. Martinez, B. Orden, R. Millan, J. Ruiz, and J. Vila.** 2003. Clonal dissemination of *Yersinia enterocolitica* strains with various susceptibilities to nalidixic acid. *J.Clin.Microbiol.* **41**:1769-1771.
215. **Sato, K., Y. Inoue, T. Fujii, H. Aoyama, M. Inoue, and S. Mitsuhashi.** 1986. Purification and properties of DNA gyrase from a fluoroquinolone-resistant strain of *Escherichia coli*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **30**:777-780.

216. **Schaeffler, S.** 1989. Methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* resistant to quinolones. *J.Clin.Microbiol.* **27**:335-336.
217. **Schmitz, F. J., M. Boos, S. Mayer, D. Hafner, H. Jagusch, J. Verhoef, and A. C. Fluit.** 2001. Propensity of fluoroquinolones with different moieties at position 8 to cause resistance development in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:2666-2667.
218. **Schmitz, F. J., A. C. Fluit, S. Brisse, J. Verhoef, K. Kohrer, and D. Milatovic.** 1999. Molecular epidemiology of quinolone resistance and comparative in vitro activities of new quinolones against European *Staphylococcus aureus* isolates. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* **26**:281-287.
219. **Schmitz, F. J., B. Hertel, B. Hofmann, S. Scheuring, J. Verhoef, A. C. Fluit, H. P. Heinz, K. Kohrer, and M. E. Jones.** 1998. Relationship between mutations in the coding and promoter regions of the *norA* genes in 42 unrelated clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and the MICs of norfloxacin for these strains. *J.Antimicrob.Chemother.* **42**:561-563.
220. **Schmitz, F. J., P. G. Higgins, S. Mayer, A. C. Fluit, and A. Dalhoff.** 2002. Activity of quinolones against gram-positive cocci: Mechanisms of drug action and bacterial resistance. *Eur. J Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **21**:647-659.
221. **Schmitz, F. J., M. E. Jones, B. Hofmann, B. Hansen, S. Scheuring, M. Luckefahr, A. Fluit, J. Verhoef, U. Hadding, H. P. Heinz, and K. Kohrer.** 1998. Characterization of *grlA*, *grlB*, *gyrA*, and *gyrB* mutations in 116 unrelated isolates of *Staphylococcus aureus* and effects of mutations on ciprofloxacin MIC. *Antimicrob.Agents Chemother.* **42**:1249-1252.
222. **Shalit, I., S. A. Berger, A. Gorea, and H. Frimerman.** 1989. Widespread quinolone resistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in a general hospital. *Antimicrob.Agents Chemother.* **33**:593-594.
223. **Sierra, J. M., F. Marco, J. Ruiz, M. T. J. De Anta, and J. Vila.** 2002. Correlation between the activity of different fluoroquinolones and the presence of mechanisms of quinolone resistance in epidemiologically related and unrelated strains of methicillin-susceptible and -resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Infect.* **8**:781-790.
224. **Sierra, J. M., L. Martinez-Martinez, F. Vazquez, E. Giralt, and J. Vila.** 2005. Relationship between mutations in the *gyrA* gene and quinolone resistance in clinical isolates of *Corynebacterium striatum* and *Corynebacterium amycolatum*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **49**:1714-1719.
225. **Sierra, J. M., M. M. Navia, M. Vargas, H. Urassa, D. Schelleberg, J. Gascon, J. Vila, and J. Ruiz.** 2001. In vitro activity of rifaximin against bacterial enteropathogens causing diarrhoea in children under 5 years of age in Ifakara, Tanzania - *J Antimicrob Chemother* 2001; 47 : 904-905. *J. Antimicrob. Chemother.* **47**:904-905.

- 
226. **Sierra, J. M., J. Ruiz, M. T. J. De Anta, and J. Vila.** 2000. Prevalence of two different genes encoding NorA in 23 clinical strains of *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* **46**:145-146.
227. **Sierra, J. M., J. Ruiz, M. M. Navia, M. Vargas, J. Gascon, and J. Vila.** 2001. In vitro activity of rifaximin against enteropathogens producing traveler's diarrhea. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:643-644.
228. **Sprandel, K. A. and K. A. Rodvold.** 2003. Safety and tolerability of fluoroquinolones. *Clin. Cornerstone. Suppl 3*:S29-S36.
229. **Sreedharan, S., M. Oram, B. Jensen, L. R. Peterson, and L. M. Fisher.** 1990. DNA gyrase *gyrA* mutations in ciprofloxacin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*: close similarity with quinolone resistance mutations in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**:7260-7262.
230. **Stahlmann, R.** 2002. Clinical toxicological aspects of fluoroquinolones. *Toxicol. Lett.* **127**:269-277.
231. **Stahlmann, R. and H. Lode.** 1999. Toxicity of quinolones. *Drugs* **58 Suppl 2**:37-42.
232. **Sugino, A., C. L. Peebles, K. N. Kreuzer, and N. R. Cozzarelli.** 1977. Mechanism of action of nalidixic acid: purification of *Escherichia coli* nalA gene product and its relationship to DNA gyrase and a novel nicking-closing enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **74**:4767-4771.
233. **Sumano, L. H., O. L. Gutierrez, and Q. M. Zamora.** 2003. Strategic administration of enrofloxacin in poultry to achieve higher maximal serum concentrations. *Vet. J.* **165**:143-148.
234. **Takei, M., H. Fukuda, R. Kishii, and M. Hosaka.** 2001. Target preference of 15 quinolones against *Staphylococcus aureus*, based on antibacterial activities and target inhibition. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:3544-3547.
235. **Tankovic, J., C. Lascols, Q. Sculo, J. C. Petit, and C. J. Soussy.** 2003. Single and double mutations in *gyrA* but not in *gyrB* are associated with low- and high-level fluoroquinolone resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:3942-3944.
236. **Tankovic, J., B. Perichon, J. Duval, and P. Courvalin.** 1996. Contribution of mutations in *gyrA* and *parC* genes to fluoroquinolone resistance of mutants of *Streptococcus pneumoniae* obtained in vivo and in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:2505-2510.
237. **Tarr, P. E., F. Stock, R. H. Cooke, D. P. Fedorko, and D. R. Lucey.** 2003. Multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* pneumonia in a heart transplant recipient. *Transpl. Infect. Dis.* **5**:53-58.
238. **Tavio, M. M., J. Vila, M. Perilli, L. T. Casanas, L. Macia, G. Amicosante, and M. T. Jimenez de Anta.** 2004. Enhanced active efflux, repression of porin
-

- synthesis and development of Mar phenotype by diazepam in two enterobacteria strains. *J.Med.Microbiol.* **53**:1119-1122.
239. **Tellier, R. and J. S. Keystone.** 1992. Prevention of traveler's diarrhea. *Infect.Dis.Clin.North Am.* **6**:333-354.
240. **Tran, J. H. and G. A. Jacoby.** 2002. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:5638-5642.
241. **Tran, J. H., G. A. Jacoby, and D. C. Hooper.** 2005. Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicrob.Agents Chemother.* **49**:118-125.
242. **Truong-Bolduc, Q. C., P. M. Dunman, J. Strahilevitz, S. J. Projan, and D. C. Hooper.** 2005. MgrA is a multiple regulator of two new efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. *J.Bacteriol.* **187**:2395-2405.
243. **Truong-Bolduc, Q. C., X. Zhang, and D. C. Hooper.** 2003. Characterization of NorR protein, a multifunctional regulator of *norA* expression in *Staphylococcus aureus*. *J.Bacteriol.* **185**:3127-3138.
244. **Tseng, T. T., K. S. Gratwick, J. Kollman, D. Park, D. H. Nies, A. Goffeau, and M. H. Saier, Jr.** 1999. The RND permease superfamily: an ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins. *J.Mol.Microbiol.Biotechnol.* **1**:107-125.
245. **van den Bogaard, A. E.** 1997. Antimicrobial resistance--relation to human and animal exposure to antibiotics. *J.Antimicrob.Chemother.* **40**:453-454.
246. **Vanechoutte, M., L. Dijkshoorn, I. Tjernberg, A. Elaichouni, P. de Vos, G. Claeys, and G. Verschraegen.** 1995. Identification of *Acinetobacter* genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis. *J.Clin.Microbiol.* **33**:11-15.
247. **Vanechoutte, M., P. Riegel, D. de Briel, H. Monteil, G. Verschraegen, A. De Rouck, and G. Claeys.** 1995. Evaluation of the applicability of amplified rDNA-restriction analysis (ARDRA) to identification of species of the genus *Corynebacterium*. *Res.Microbiol.* **146**:633-641.
248. **Varon, E., C. Janoir, M. D. Kitzis, and L. Gutmann.** 1999. ParC and GyrA may be interchangeable initial targets of some fluoroquinolones in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **43**:302-306.
249. **Vila, J., J. Ruiz, P. Goni, and M. T. De Anta.** 1996. Detection of mutations in *parC* in quinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **40**:491-493.
250. **Vila, J., J. Ruiz, P. Goni, and d. A. Jimenez.** 1997. Quinolone-resistance mutations in the topoisomerase IV *parC* gene of *Acinetobacter baumannii*. *J.Antimicrob.Chemother.* **39**:757-762.

- 
251. **Vila, J., J. Ruiz, P. Goni, A. Marcos, and d. A. Jimenez.** 1995. Mutation in the *gyrA* gene of quinolone-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **39**:1201-1203.
  252. **Vila, J., J. Ruiz, F. Marco, A. Barcelo, P. Goni, E. Giralt, and d. A. Jimenez.** 1994. Association between double mutation in *gyrA* gene of ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* and MICs. *Antimicrob.Agents Chemother.* **38**:2477-2479.
  253. **Vila, J., J. Sanchez-Cespedes, J. M. Sierra, M. Piqueras, E. Nicolás, J. Freixes, and E. Giralt.** 2005. Design and antibacterial evaluation of new ciprofloxacin derivatives for multiresistant Gram-negative bacteria. *J Med Chem.* **In press.**
  254. **Vila, J., M. Vargas, C. Casals, H. Urassa, H. Mshinda, D. Schelleberg, and J. Gascon.** 1999. Antimicrobial resistance of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from children under the age of 5 years from Ifakara, Tanzania. *Antimicrob.Agents Chemother.* **43**:3022-3024.
  255. **Vila, J., M. Vargas, J. Ruiz, M. Espasa, M. Pujol, M. Corachan, M. T. Jimenez de Anta, and J. Gascon.** 2001. Susceptibility patterns of enteroaggregative *Escherichia coli* associated with traveller's diarrhoea: emergence of quinolone resistance. *J.Med.Microbiol.* **50**:996-1000.
  256. **Wang, M., D. F. Sahn, G. A. Jacoby, and D. C. Hooper.** 2004. Emerging plasmid-mediated quinolone resistance associated with the *qnr* gene in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in the United States. *Antimicrob.Agents Chemother.* **48**:1295-1299.
  257. **Wang, M., J. H. Tran, G. A. Jacoby, Y. Zhang, F. Wang, and D. C. Hooper.** 2003. Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. *Antimicrob.Agents Chemother.* **47**:2242-2248.
  258. **Webber, M. A. and L. J. Piddock.** 2003. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *J.Antimicrob.Chemother.* **51**:9-11.
  259. **Weisser, J. and B. Wiedemann.** 1985. Elimination of plasmids by new 4-quinolones. *Antimicrob.Agents Chemother.* **28**:700-702.
  260. **Weisser, J. and B. Wiedemann.** 1987. Inhibition of R-plasmid transfer in *Escherichia coli* by 4-quinolones. *Antimicrob.Agents Chemother.* **31**:531-534.
  261. **Wexler, H. M., E. Molitoris, D. Molitoris, and S. M. Finegold.** 1996. In vitro activities of trovafloxacin against 557 strains of anaerobic bacteria. *Antimicrob.Agents Chemother.* **40**:2232-2235.
  262. **Wiedemann, B. and P. Heisig.** 1997. Antibacterial activity of grepafloxacin. *J.Antimicrob.Chemother.* **40 Suppl A**:19-25.
  263. **Wise, R., J. M. Andrews, and L. J. Edwards.** 1983. In vitro activity of Bay 09867, a new quinoline derivative, compared with those of other antimicrobial agents. *Antimicrob.Agents Chemother.* **23**:559-564.
-

- 
264. **Yamagishi, J., T. Kojima, Y. Oyamada, K. Fujimoto, H. Hattori, S. Nakamura, and M. Inoue.** 1996. Alterations in the DNA topoisomerase IV *grlA* gene responsible for quinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:1157-1163.
265. **Yamakawa, T., J. Mitsuyama, and K. Hayashi.** 2002. In vitro and in vivo antibacterial activity of T-3912, a novel non-fluorinated topical quinolone. *J. Antimicrob. Chemother.* **49**:455-465.
266. **Yoshida, H., M. Bogaki, S. Nakamura, K. Ubukata, and M. Konno.** 1990. Nucleotide sequence and characterization of the *Staphylococcus aureus* *norA* gene, which confers resistance to quinolones. *J. Bacteriol.* **172**:6942-6949.
267. **Yoshida, T., Y. Yamamoto, H. Orita, M. Kakiuchi, Y. Takahashi, M. Itakura, N. Kado, K. Mitani, S. Yasuda, H. Kato, and Y. Itoh.** 1996. Studies on quinolone antibacterials. IV. Structure-activity relationships of antibacterial activity and side effects for 5- or 8-substituted and 5,8-disubstituted-7-(3-amino-1-pyrrolidinyl)-1-cyclopropyl-1, 4-dihydro-4-oxoquinoline-3-carboxylic acids. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **44**:1074-1085.
268. **Ysern, P., B. Clerch, M. Castano, I. Gibert, J. Barbe, and M. Llagostera.** 1990. Induction of SOS genes in *Escherichia coli* and mutagenesis in *Salmonella typhimurium* by fluoroquinolones. *Mutagenesis* **5**:63-66.
269. **Zechiedrich, E. L., A. B. Khodursky, and N. R. Cozzarelli.** 1997. Topoisomerase IV, not gyrase, decatenates products of site-specific recombination in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* **11**:2580-2592.