

*Higiene y Sanidad Ambiental*, **9**: 449-466 (2009)

## Resistencias a quinolonas en aislados clínicos de *Escherichia coli* productores de betalactamasas de espectro extendido

Antonio JIMÉNEZ PACHECO,<sup>1</sup> Araceli JIMÉNEZ PACHECO,<sup>2</sup> Miguel Angel ARRABAL POLO<sup>3</sup> y Mercedes NOGUERAS OCAÑA<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Servicio de Urología. Hospital Comarcal Santa Ana. Avenida Enrique Martín Cuevas. 18600 Motril, Granada (España). Master en Investigaciones y Avances en Medicina Preventiva y Salud Pública. Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública. Universidad de Granada (España). Correo-e: [dpto\\_prev@ugr.es](mailto:dpto_prev@ugr.es)

<sup>2</sup> Servicio de Urgencias. Centro Hospitalario de Alta Resolución Sierra de Segura. Crtra Puente de Génave-La Puerta De Segura Km 3,5. 23350 Puente de Génave, Jaén (España).

<sup>3</sup> Servicio de Urología. Hospital Universitario San Cecilio. Universidad de Granada. Avenida Doctor Olóriz, 16. 18012 Granada (España).

---

### EVOLUCIÓN HISTÓRICA Y ESTRUCTURA QUÍMICA DE LAS QUINOLONAS

Las quinolonas son un grupo de antibacterianos sintéticos. En 1962, se patentó lo que sería la primera quinolona, el ácido nalidíxico (Leshner y cols., 1962), introducido en la práctica clínica en 1967 (Emmerson y cols., 2003; Sierra, 2005). El ácido nalidíxico, presentaba una modesta actividad frente a microorganismos gramnegativos, 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 (Appelbaum y cols., 2000; Emmerson y cols., 2003; Sierra, 2005).

La aparición del ácido nalidíxico marcó el inicio del desarrollo de las quinolonas, aunque no fue hasta mediados de los años 70, cuando aparecen nuevos compuestos. En primer lugar, aparecieron cinoxacino y ácido oxolínico, que no aportaban mejoras sustanciales en comparación con el ácido nalidíxico.

En 1973 apareció la primera quinolona fluorada (con un grupo flúor en la posición 6), flumequino (figura 3) (Appelbaum y cols., 2000; Rohlfing y cols., 1976; Sierra, 2005). Esta quinolona es unas diez veces más activa, en comparación con el ácido nalidíxico, frente a bacterias gramnegativas (Bryskier

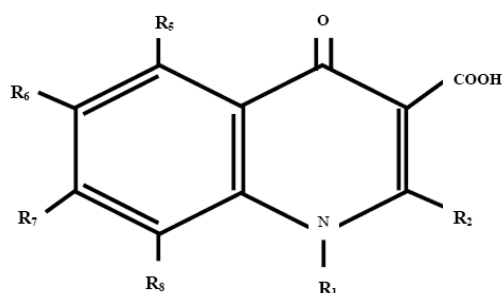
y cols., 1995; Rohlfing y cols., 1976), además de presentar actividad frente a bacterias grampositivas (Appelbaum y cols., 2000; Emmerson y cols., 2003; Rohlfing y cols., 1976).

A finales de la década de los 70 y principios de los 80 apareció el norfloxacin, primera molécula considerada como fluorquinolona (Giuliano y cols., 1989).

Posteriormente, se desarrollaron nuevas fluorquinolonas: pefloxacin, enoxacin, lomefloxacin, fleroxacin, ciprofloxacino y ofloxacino. Estas otras fluorquinolonas presentaban un mayor espectro de actividad, ampliado a organismos grampositivos, y con una gran actividad sobre gramnegativos, unas 1000 veces más que el ácido nalidíxico (Sierra, 2005).

En la década de los 90 aparecieron nuevas moléculas, temafloxacin y esperfloxacin (Andersson y cols., 2003; Emmerson y cols., 2003), las cuales, mejoraban el espectro de actividad, especialmente frente a microorganismos grampositivos, y su actividad frente a anaerobios, mientras que seguían manteniendo su actividad frente a gramnegativos (Appelbaum y cols., 2000).

Desde finales de los 90 hasta la actualidad, en un intento por mejorar la actividad frente a bacterias grampositivas y anaerobias, se han desarrollado nuevas fluorquinolonas: clinafloxacino, trovafloxacino, moxifloxacino, levofloxacino, tosufloxacino,



**FIGURA 1. Estructura básica o núcleo de las quinolonas**

gemifloxacino, grepafloxacino (Emmerson y cols., 2003; Owens y cols., 2000). Se caracterizan por tener una gran actividad frente a cocos grampositivos y

algunos patógenos intracelulares, además de mantener actividad frente a gramnegativos (Sierra, 2005). Algunas de estas moléculas no han llegado a usarse en la práctica clínica, ya que algunas se suspendieron en los ensayos clínicos o fueron retiradas por su toxicidad o efectos adversos, como es el caso de grepafloxacino (por toxicidad cardíaca), gemifloxacino y trovafloxacino (por hepatotoxicidad), temafloxacino (por toxicidad renal y hematológica) o clinafloxacino (Sierra, 2005).

Por otra parte, la posibilidad de lograr una mejor actividad a partir de nuevas modificaciones de la estructura no está cerrada, como demuestra el desarrollo de las *desfluorquinolonas* o *quinolonas no fluoradas*, que carecen en posición 6 del átomo de flúor, que se había considerado imprescindible para mantener un grado suficiente de actividad. Presentan una elevada afinidad por las topoisomerasas y un

**TABLA 1. Clasificación de las quinolonas.**

GENERACIÓN	QUINOLONA	ACTIVIDAD MICROBIOLÓGICA	CARACTERÍSTICAS FARMACOCINÉTICAS	INDICACIONES
<b>Primera</b>	Ac. nalidíxico Ac. oxolínico Cinoxacino Ac. pipemídico	Organismos gramnegativos	Administración oral Baja concentración en plasma y tejido	Infecciones urinarias no complicadas
<b>Segunda</b> <b>Clase I</b>	Norfloxacino Lomefloxacino Enoxacino	Organismos gramnegativos	Administración oral Baja concentración en plasma y tejido	Infecciones urinarias no complicadas
<b>Segunda</b> <b>Clase II</b>	Ciprofloxacino Ofloxacino	Organismos gramnegativos (incluida <i>P. aeruginosa</i> ), algunos grampositivos y patógenos atípicos	Administración oral e intravenosa Altas concentraciones en plasma y tejidos	Infecciones urinarias complicadas/no complicadas y sistémicas
<b>Tercera</b>	Esparfloxacino Levofloxacino Gatifloxacino Grepafloxacino Moxifloxacino	Organismos gramnegativos (incluida <i>P. aeruginosa</i> ), algunos grampositivos y patógenos atípicos	Administración oral e intravenosa Altas concentraciones en plasma y tejidos	Infecciones sistémicas, respiratorias y urinarias
<b>Cuarta</b>	Clinafloxacino Trovafloxacino Gemifloxacino Sitafloxacino Tosufloxacino	Organismos gramnegativos (incluida <i>P. aeruginosa</i> ), algunos grampositivos, patógenos atípicos y anaerobios	Administración oral e intravenosa Altas concentraciones en plasma y tejidos	Infecciones sistémicas, respiratorias y urinarias

reducido potencial de selección de resistencias. Garenoxacino, es el primer representante de este grupo (Loza y cols., 2003), aunque esta molécula sí presenta dos átomos de flúor en su estructura. Presenta un amplio espectro de acción y una muy buena actividad frente a grampositivos, superior a la del ciprofloxacino. También presenta actividad frente a gramnegativos y anaerobios (Loza y cols., 2003). Otros nuevos compuestos, como PGE-9262932, PGE-9509924, PGE-4175997, o T-3912, son más activos que muchas fluorquinolonas (ciprofloxacino, trovafloxacino, gatifloxacino, etc.), si nos basamos en los datos de susceptibilidad *in vitro*, siendo su actividad comparable a clinafloxacino (García y cols., 2003; Jones y cols., 2002; Roychoudhury y cols., 2002; Sierra, 2005; Yamakawa y cols., 2002).

Actualmente, existen nuevas fluorquinolonas en proceso de desarrollo, como DQ 113, con una capacidad de selección de resistencias en estafilococos muy inferior a la de otras fluorquinolonas; WCK 771A, que presenta CMI <1 mg/l frente a estafilococos resistentes a moxifloxacino y levofloxacino; DK507k, activa frente al 100% de los neumococos resistentes a levofloxacino; ABT-492, etc. (Appelbaum y cols., 2005; Browne y cols., 2003; García y cols., 2003; Nilius y cols., 2003; Sierra, 2005).

El aumento de aislamientos de bacterias multiresistentes, ha puesto en marcha el desarrollo de los denominados *antibióticos híbridos*: se unen dos núcleos de dos moléculas antibacterianas en una sola, lo que permite reducir la aparición de resistencias, al tiempo de actuar sobre dos dianas de forma simultánea. Ya hace años se desarrollaron algunas moléculas derivadas de la combinación de una quinolona y una cefalosporina. En este sentido se han diseñado y sintetizado recientemente moléculas híbridas, uniendo dos grupos de antimicrobianos: quinolonas y oxazolidinonas. Estos híbridos, muestran buena actividad frente a gran una variedad de bacterias, incluyendo a estafilococos multiresistentes, enterococos resistentes a vancomicina, estreptococos y bacterias gramnegativas (Gordeev y cols., 2003; Hubschwerlen y cols., 2003a; Hubschwerlen y cols., 2003b; Sierra, 2005). En este grupo nos encontramos con moléculas como MCB116 y MCB1033, que combinan ciprofloxacino con linezolid (García y cols., 2003). También se han diseñado moléculas híbridas entre quinolonas y cetólidos (Abbanat y cols., 2005), que mejoran la actividad de los estólidos, aunque no se ha demostrado que también actúen como quinolona (Sierra, 2005).

## ESTRUCTURA BÁSICA DE LAS QUINOLONAS

Las quinolonas de uso clínico tienen una estructura formada por dos anillos, con un nitrógeno en posición 1, un grupo carbonilo en la posición 4 y un grupo carboxilo en la posición 3 (figura 1).

Aunque, desde el punto de vista químico, todas las quinolonas sintetizadas se engloban en 4 grupos,

tan solo las 4-quinolonas y las 4-naftiridinas han sido desarrolladas, ya que la presencia de un nitrógeno en posición 2 (4-cinolonas) o 6 (4-pirimidonas), genera una reducción notable de la actividad (Gutiérrez, 2004; Sierra, 2005).

La presencia de un átomo de flúor en la posición 6, aumenta de manera significativa la potencia y el espectro de la molécula (de 5 a 100 veces), comparado con las anteriores moléculas, que no poseían esta sustitución, dando lugar a lo que conocemos como fluorquinolonas (Alós, 2003). En este caso, las quinolonas no fluoradas (QNF), cuyo principal representante es el garenoxacino (BMS-284756), presentan un hidrógeno en esta posición, lo que permite aumentar bastante su actividad frente a grampositivos, no influyendo tanto sobre gramnegativos (Jones y cols., 2002; Roychoudhury y cols., 2002; Sierra, 2005).

## CLASIFICACIÓN DE LAS QUINOLONAS

Al igual que las cefalosporinas, las quinolonas pueden clasificarse en generaciones. En 1997 se propuso una nueva clasificación de quinolonas que más adelante se fue ampliando con la aparición de nuevos compuestos. Dicha clasificación por generaciones se realiza en función de su estructura química, época de aparición y sobre todo, con el espectro antibacteriano (Tabla 1 y 2). Aunque no existe consenso, ya que dependiendo del autor se agrupan en una u otra generación, coinciden en agruparlas en cuatro generaciones, aunque estas clasificaciones no tienen en cuenta las quinolonas no fluoradas, ni a los híbridos entre quinolona y oxazolidinona (Ball, 2000; King y cols., 2000; Naber y cols., 1998; Oliphant y cols., 2002; Owens y cols., 2000).

## FARMACOCINÉTICA Y FARMACODINAMIA

La farmacocinética es la relación que se establece entre el antimicrobiano y el paciente, e incluye los procesos de absorción, distribución, metabolismo y eliminación, que, en su conjunto, determinan una curva concentración-tiempo. Los parámetros farmacocinéticos más relevantes son la concentración máxima ( $C_{máx}$ ) o pico (*peak*), la vida media del antimicrobiano en el plasma ( $t_{1/2}$ ) y el área bajo la curva. Diferencias en el grado de unión a proteínas plasmáticas pueden originar cambios en la concentración de antibacteriano, determinante de la penetración a tejidos y la actividad antibiótica.

### Absorción

Las quinolonas se absorben bien tras la administración oral, siendo su biodisponibilidad de buena a excelente, en casi todos los casos superior al 50% y en algunos casos cercana al 100% (Alós, 2003). Los niveles en suero tras la administración oral son parecidos a los que se alcanzan tras su administración

**TABLA 3. Parámetros farmacocinéticos de las quinolonas (Alós, 2003; Sierra, 2005).**

Quinolona	Dosis (mg)	C <sub>máx</sub> (mg/l)	T <sub>1/2</sub> (h)	V <sub>d</sub> (l/Kg)	Unión a proteínas (%)	Vía 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/otros

intravenosa, lo que tiene como ventaja la posibilidad de uso en terapia secuencial (Alós, 2003).

Las quinolonas pueden presentar interacciones con otros fármacos. Cuando entre las 2-4 h de su administración oral se ingieren productos que contienen cationes del tipo de calcio, aluminio, magnesio, hierro o cinc, la concentración sérica de las quinolonas puede reducirse entre un 25-90%. La fracción no absorbible se elimina por las heces.

Esta absorción se realiza en un tiempo que oscila entre 1 ó 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 (Sierra, 2005).

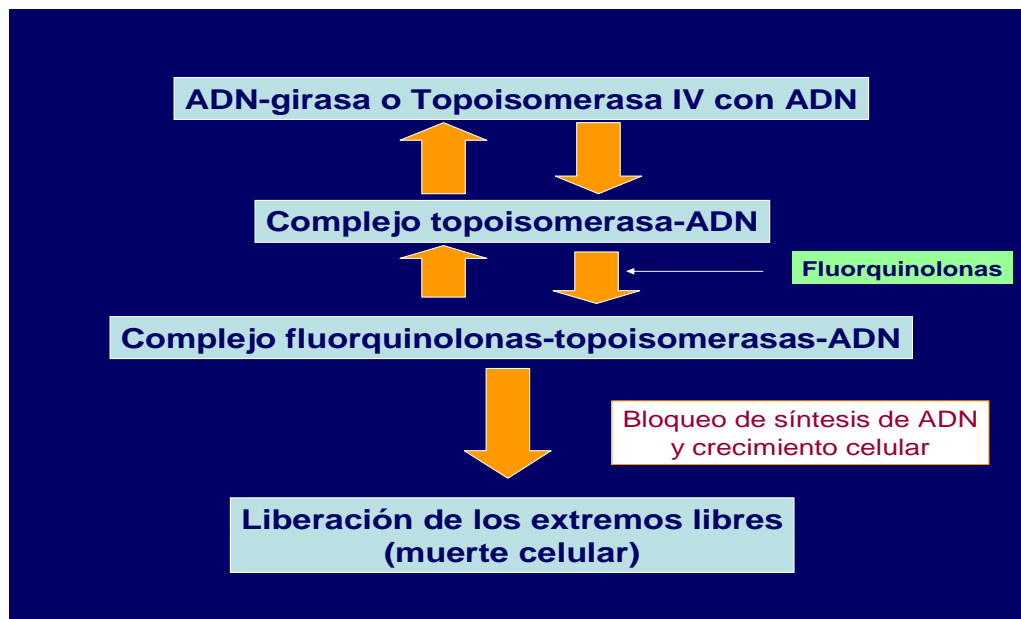
#### Distribución

Las concentraciones máximas en suero son bajas en el caso del ácido nalidíxico, pipedímico y norfloxacino, y de 2-7 mg/l para las de tercera y cuarta generación.

La unión a proteínas plasmáticas es baja, oscila entre el 20-40%, y se unen principalmente a la albúmina (Bergogne, 2002), siendo, por ejemplo, norfloxacino, quien posee una menor unión a estas proteínas plasmáticas, con un 15%, o, en el otro extremo, estarían otras quinolonas como ácido nalidíxico o garenoxacinó, con unos índices del 90 y 85%, respectivamente (Andersson y cols., 2003). La vida media plasmática varía de 1.5 a 17 horas.

Las fluorquinolonas se distribuyen ampliamente por el organismo. El volumen de distribución es alto, en muchos casos superior al volumen total de agua del cuerpo, lo que supone que alcanzan concentraciones intracelulares altas. Su concentración en tejido prostático, bilis, pulmón, neutrófilos y macrófagos es superior a la sérica, en cambio, la concentración en líquido cefalorraquídeo es, en general, inferior a la mitad de la concentración sérica (Alós, 2003), aunque las concentraciones que alcanza ciprofloxacino, pueden ser iguales o superiores a la CMI para los microorganismos causantes de meningitis (Taléns, 2001).

FIGURA 2. Interrupción de la acción de las topoisomerasas por quinolonas.



Ciprofloxacino y ofloxacino son capaces de acceder fácilmente al tejido óseo y presentan un espectro de acción adecuado sobre microorganismos causantes de infección ósea y ortopédica (Lew y cols., 1999).

### Eliminación

La mayoría de las quinolonas se eliminan por vía renal (ácido pipemídico, ofloxacino, levofloxacino), esto hace que se encuentren en altas concentraciones, y que su primera indicación fuera destinada a las infecciones urinarias, favorecido también porque no son metabolizadas. Otras quinolonas se eliminan por vías no renales, como sería la hepática, (moxifloxacino) y otras se eliminan por ambas vías (norfloxacino, ciprofloxacino) (Alós, 2003).

Como parte de la eliminación de las quinolonas, éstas 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 (Sierra, 2005).

Dependiendo del porcentaje de eliminación renal de cada compuesto debe o no ajustarse la dosis en caso de insuficiencia renal. Cuando el aclaramiento de creatinina está por debajo de 50 ml/min se recomienda reducir la dosis de ofloxacino y levofloxacino, y cuando está por debajo de 30 ml/min. la de norfloxacino y ciprofloxacino (Alós, 2003).

En la tabla 3 resumimos algunos de los parámetros farmacocinéticos de las quinolonas.

### INDICACIONES CLÍNICAS

En nuestros días, las fluorquinolonas se usan en diversos tipos de infecciones, que incluyen infecciones del tracto urinario, por su actividad frente

a enterobacterias, las principales causantes de infecciones urinarias, y porque varias se eliminan de forma significativa por vía renal. En mujeres con cistitis aguda no complicada, causada por cepas de *Escherichia coli* sensibles a quinolonas, el tratamiento de tres días ha demostrado la misma eficacia que tres días de cotrimoxazol. Dosis únicas también se han mostrado eficaces y equivalentes a tratamientos más prolongados (Auquer y cols, 2002).

Con la llegada de las nuevas fluorquinolonas, sus indicaciones se fueron diversificando, así pues, actualmente las quinolonas se utilizan en el tratamiento de bacteriemias, infecciones óseas, piel y tejidos blandos, de transmisión sexual y entéricas (en principio tenían una excelente actividad *in vitro* frente a los principales patógenos causantes de gastroenteritis, sin embargo, han surgido problemas de resistencia, sobre todo en *Campylobacter* spp., por lo que actualmente, más de la mitad de las cepas de *Campylobacter* spp. que se aíslan en España son resistentes a quinolonas) (Engberg y cols., 2001).

Por otro lado, tienen un uso profiláctico, por ejemplo, en pacientes neutropénicos, donde la combinación de un betalactámico con un aminoglucósido es una de las terapias empíricas más útiles y usadas en pacientes neutropénicos febriles, aunque en un estudio reciente el uso de tobramicina y ciprofloxacino resultó al menos tan seguro y eficaz como el uso de piperacilina y tobramicina (Peacock y cols., 2002).

Actualmente, una de las indicaciones de las modernas quinolonas (ciprofloxacino, ofloxacino, pefloxacino, levofloxacino y esparfloxacino), son las infecciones respiratorias, especialmente para el tratamiento de la neumonía, ya sea nosocomial o adquirida en la comunidad (Sierra, 2005).

**TABLA 4. Características de las ADN topoisomerasas de *E. coli*.**

	<b>TIPO I</b>		<b>TIPO II</b>	
	<b>Topo I</b>	<b>Topo III</b>	<b>ADN girasa</b>	<b>Topo IV</b>
<b>Estructura</b>	Monómero	Monómero	GyrA <sub>2</sub> GyrB <sub>2</sub>	ParC <sub>2</sub> ParE <sub>2</sub>
<b>Peso molecular (kDa)</b>	105	74	GyrA (97) GyrB (90)	ParC (75) ParE (70)
<b>Gen</b>	<i>topA</i>	<i>topB</i>	<i>gyrA, gyrB</i>	<i>parC, parE</i>
<b>Rotura en el ADN</b>	ADN-1	ADN-1	ADN-2	ADN-2
<b>Relajación</b>	Sí	No	Sí	Sí
<b>Decatenación</b>	No	Sí	Sí	Sí
<b>Superenrollamiento</b>	No	No	Sí	No
<b>Replicación</b>	Sí	Sí	Sí	Sí
<b>Transcripción</b>	Sí	Sí	Sí	Sí
<b>Segregación cromosoma</b>	No	Sí	Sí	Sí

El uso de las quinolonas en pediatría es controvertido, debido a que uno de los efectos secundarios que presentan las quinolonas es que afectan a los cartílagos de crecimiento (Stahlmann y cols., 1999).

#### **MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS QUINOLONAS**

El mecanismo de acción de las fluorquinolonas es bastante complejo. Este tipo de fármacos penetran en bacterias gramnegativas a través de porinas, pudiendo también hacerlo directamente a través de la bicapa lipídica, y luego atraviesan la membrana interna para alcanzar el citoplasma. Posteriormente, actúan a nivel del ADN bacteriano produciendo la inhibición de las topoisomerasas (ADN girasa y topoisomerasa IV). Al unirse las fluorquinolonas a las subunidades de la ADN girasa se produce la aparición de extremos libres de ADN, sobre los cuales actuarán exonucleasas que producirán la muerte celular (Rodríguez, 2005). La figura 2, muestra un esquema de cómo actúan las quinolonas, interrumpiendo la acción de las topoisomerasas.

La ADN girasa y la topoisomerasa IV son tetrámeros formados por dos subunidades A y dos

subunidades B: GyrA (97 kDa) y GyrB (90 kDa) en el caso de la ADN girasa, y ParC (75 kDa) y ParE (70 kDa) para la topoisomerasa IV.

Todas las células tienen dos tipos de ADN topoisomerasas, que aunque se diferencian en sus propiedades, comparten un mismo mecanismo de acción. Dicho mecanismo consiste en producir una rotura en el ADN (de cadena sencilla las tipo I y de doble las de tipo II), y pasan una cadena de ADN (sencilla o doble) a través de la rotura producida, con posterior sellado de la rotura inicial. Las topoisomerasas tipo I, incluyen las topoisomerasas I y III bacterianas y la topoisomerasa I de eucariotas. Las tipo II comprenden la ADN girasa y la topoisomerasa IV bacterianas, así como las topoisomerasas II de eucariotas. Estas enzimas son esenciales para la replicación, transcripción y recombinación, jugando un papel fundamental en la estructura del cromosoma, condensación/descondensación y segregación (Balas, 2001). La tabla 4 muestra algunas de las características de las ADN topoisomerasas de *E. coli*.

#### **Topoisomerasa I**

Fue la primera topoisomerasa que se descubrió en *E. coli* (Wang, 1971). Inicialmente conocida como

proteína omega ( $\omega$ ) es un polipéptido de 864 residuos de aminoácidos con un peso molecular de 94 kDa (Tse y cols., 1986).

En *E. coli* el gen *topA* codifica la ADN topoisomerasa I (Trucksis y cols, 1981). Es un factor ESPECÍFICO en la iniciación de la replicación en el *oriC*, impidiendo la iniciación en otros sitios diferentes (Balas, 2001). La evidencia *in vitro* sugiere que, el papel celular de la topoisomerasa I es relajar superenrollamientos (DiGate y cols, 1988).

### Topoisomerasa III

La topoisomerasa III, codificada por el gen *topB* de *E. coli*, está implicada en la estabilización del genoma bacteriano, ya que deleciones en *topB* producen un aumento de las deleciones espontáneas del ADN (Balas, 2001). Es una cadena polipeptídica, con un peso molecular de 74 kDa que provoca la decatenación del ADN en ausencia de ATP (DiGate y cols., 1988; Srivenugopal y cols., 1984). Actualmente, se ha observado que esta enzima puede actuar como ARN topoisomerasa, catalizando la interconversión del ARN circular y anudado; por ello se cree que esta topoisomerasa juega un papel importante en la topología molecular del ARN (DiGate y cols., 1992; Taléns, 2001).

### Topoisomerasa II o ADN girasa

Los genes *gyrA* (2628 pb) y *gyrB* (2415 pb) codifican la girasa de *E. coli*, encontrándose en localización contigua en el cromosoma bacteriano (Balas, 2001). La masa molecular de la holoenzima es de 374 kDa, formando una partícula globular de 120150 Å que presenta actividad "ADN - cleavage" (Reece y cols., 1991).

Se requieren ambas subunidades para la plena actividad de la ADN girasa. La subunidad GyrA (875 aminoácidos) se une al ADN (en ausencia de la subunidad B), interviene en el corte y unión del ADN a través de la Tyr122, formando un enlace transitorio con el ADN cerrado; mientras que la subunidad GyrB (804 aminoácidos) posee actividad ATPasa, la cual se ve estimulada por la subunidad A. Cada monómero GyrA y GyrB presenta una cabeza amino terminal y una cola carboxi proximal.

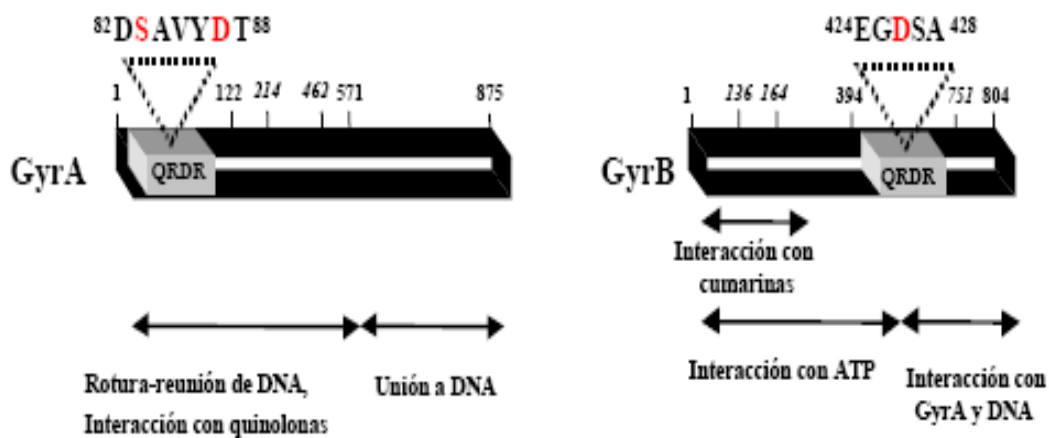
El dominio N-terminal de GyrA (64 kDa) es responsable de la reacción de rotura-reunión del ADN, mientras que el dominio C-terminal (33 kDa) es la proteína de unión al ADN cuando éste envuelve a la enzima (Balas, 2001).

El dominio N-terminal de GyrB (43 kDa) permite la transducción de energía vía hidrólisis de ATP, mientras que el dominio C-terminal (47 kDa) interacciona con GyrA y con el ADN. El fragmento N-terminal de 393 aminoácidos, que contiene el dominio de la ATPasa de GyrB de *E. coli*, ha sido cristalizado en presencia de ADPNP (5'-adenilil- $\beta$ ,  $\gamma$ -imidodifosfato) y su estructura resuelta a 2,5 Å por cristalografía de rayos X (Balas, 2001).

En la figura 3, se muestra la estructura de las subunidades GyrA y GyrB de la ADN girasa de *E. coli*. Se indica la localización de la región determinante de resistencia a quinolonas de GyrA y GyrB y en rojo los residuos implicados en resistencia a quinolonas. Los aminoácidos cuya mutación produce resistencia a distintos compuestos están numerados en cursiva.

La ADN girasa es una enzima esencial para la viabilidad celular. Su principal función consiste en catalizar el superenrollamiento negativo del ADN

FIGURA 3. Estructura de las subunidades GyrA y GyrB de la ADN girasa de *E.coli*.



circular de la bacteria, que es el estado natural en que se encuentra el cromosoma bacteriano; considerando que el ADN debe de situarse en un espacio limitado del interior de la célula, dispuesto en unos 50-80 zonas especialmente organizadas a las que se les denominó *enrollamientos o dominios*, adosados a un núcleo central de ARN y que a la vez estos dominios se hallan formando unos 400 “dominios de superenrollamiento”, cuyas espirales están dispuestas en sentido contrario a la hélice de ADN (Taléns, 2001).

Todas estas reacciones son dependientes de ATP y requieren un catión divalente, principalmente  $Mg^{2+}$ , aunque puede ser sustituido por  $Mn^{2+}$  (Reece y cols., 1991). En ausencia de ATP son eliminados los superenrollamientos negativos. El cociente ATP / ADP determina el grado final de superenrollamiento, por lo que sería un mecanismo homeostático para controlar el superenrollamiento (Drlica y cols., 1997). Esto hace pensar que el enrollamiento puede ser sensible a los cambios energéticos intracelulares y, a la vez, a ciertos parámetros del entorno extracelular, como la concentración de sales, tensión de oxígeno y temperatura (Drlica y cols., 1997).

La ADN girasa es, por tanto, la única enzima capaz de introducir un superenrollamiento negativo en la cadena de ADN (Hooper, 2000).

#### Topoisomerasa IV

Los genes *parC* (2259 pb) y *parE* (1893 pb) codifican la topoisomerasa IV de *E. coli*. Al igual que GyrA, ParC (752 aminoácidos) está implicada en el proceso de rotura-reunión de la doble cadena de ADN y ParE (630 aminoácidos), como GyrB, se requiere para la transducción de energía vía hidrólisis de ATP (Peng y cols., 1993). También es responsable, como todas la topoisomerasas, de la relajación del ADN (Hooper, 1998), aunque su función principal es el desencadenamiento de las dos moléculas hijas al finalizar la replicación del ADN, permitiendo la segregación de dos nuevos cromosomas bacterianos en dos nuevas células hijas (Sierra, 2005).

Las subunidades de la topoisomerasa IV y la girasa no son intercambiables, aunque la girasa puede sustituir, al menos en parte, algunas de las funciones de la topoisomerasa IV, como la partición de los cromosomas (Balas, 2001).

En concreto, las topoisomerasas I, II y IV están implicadas en la eficacia de la replicación y transcripción del ADN (Dinardo y cols., 1982) pero, mientras las topoisomerasas del tipo II son esenciales para el crecimiento bacteriano, las topoisomerasas de tipo I no lo son, puesto que su pérdida puede compensarse por alteración en los genes de las topoisomerasas del tipo II (Taléns, 2001).

#### MECANISMOS DE RESISTENCIA A LAS QUINOLONAS

La adquisición de resistencia a las quinolonas, en general, es gradual. Su efecto lo desarrollan cuando

alcanzan su diana celular, ADN girasa o topoisomerasa IV, pero para ello previamente tienen que penetrar a través de la membrana bacteriana. Por tanto, la resistencia a quinolonas puede deberse a alteraciones que afecten a cualquier paso de este proceso.

Los mecanismos de resistencia a las quinolonas en *E. coli* pueden agruparse en cuatro categorías:

1. Resistencias de tipo cromosómico, por mutaciones en segmentos definidos de los genes que codifican la ADN girasa y/o la topoisomerasa IV (Sierra, 2005; Vila y cols., 1994). Como consecuencia, al cambiar el aminoácido en la zona de interacción entre la quinolona y la proteína diana, la quinolona pierde afinidad por la proteína diana y por tanto su actividad, mientras que la enzima sigue siendo activa.
2. Resistencia por alteraciones en la membrana externa bacteriana, lo que genera un descenso en la capacidad de penetración del fármaco en el interior de la célula. Estas modificaciones se originan en las mutaciones de los genes que codifican los canales de porinas.
3. Resistencias basadas en la expulsión del antibacteriano desde el medio intracelular al extracelular por acción de transportadores endógenos activos o bombas de expulsión activa.
4. Resistencia mediada por plásmidos.

#### Resistencias de tipo cromosómico

##### *ADN girasa*

La mayoría de las mutaciones descritas se han encontrado en el N-terminal de las proteínas GyrA y GyrB, en la región QRDR, situada entre los aminoácidos Ala67 y Gln106 en *gyrA* y Asp426 y Lys447 en *gyrB* (Hopkins y cols., 2005). Las mutaciones aparecen con mayor frecuencia en los aminoácidos 83 y 87 de GyrA, los cuales están situados cerca de los sitios activos de la ADN girasa junto con un residuo de Tyr que interacciona con la hebra de ADN rota durante la reacción de la topoisomerasa. Las mutaciones en este sitio activo conducen a resistencia frente a las quinolonas (Hopkins y cols., 2005).

Mientras que se ha visto *in vitro* que, en los mutantes de *E. coli*, la frecuencia de mutaciones en *gyrA* son similares a las del *gyrB*, en aislados clínicos se ha observado que son mucho más prevalentes en *gyrA* que en *gyrB* (Everett y cols., 1996; Vila y cols., 1994). Estas mutaciones en *gyrA* ocasionan unos niveles de resistencia mayor que cuando las mutaciones ocurren en *gyrB*.

Los cambios de aminoácidos pueden afectar a la capacidad de formar puentes de hidrógeno, así como la carga negativa de los mismos en estas posiciones parece ser importante para las interacciones de la quinolona con el complejo ADN girasa-ADN (Sáenz y cols., 2003). Además, algunos aminoácidos dentro del QRDR, pueden ser más importantes para la asociación de las subunidades de GyrA y GyrB que para



la actividad de la holoenzima (Hopkins y cols., 2005). Todo esto puede ayudar a entender por qué ciertas sustituciones influyen más en la resistencia a quinolonas que otras. Mutaciones en *gyrA* confieren resistencia a estos compuestos, habiéndose demostrado que la unión de la quinolona es posterior a la rup-

tura del ADN, debido a la actividad de la ADN girasa; de este modo se impide el giro de la enzima (Reece y cols., 1991). Debido a ello, siempre se ha postulado que la ADN girasa es la diana funcional y los monómeros GyrA las dianas primarias, aunque en la actualidad, y debido al aislamiento de mutantes *gyrB*

**TABLA 5. Mutaciones detectadas en los genes de la ADN girasa y topoisomerasa IV de *E. coli* (Hopkins y cols., 2005; Sorlózano y cols., 2007b)**

GENES	POSICIÓN CODÓN	SUSTITUCIÓN
<i>gyrA</i>	Ala51	Val
	Ala67	Ser
	Gly81	Cys Asp
	Asp82	Gly
	Ser83	Leu Trp Ala Val
	Ala84	Pro Val
	Asp87	Asn Gly Tyr His Val
	Gln106	His Arg
	Ala196	Glu
<i>gyrB</i>	Asp426	Asn
	Lys447	Glu
<i>parC</i>	Ala56	Thr
	Ser57	Thr
	Gly78	Asp Lys
	Ser80	Arg Ile
	Ser83	Leu
	Glu84	Gly Lys Val
	Ala108	Val
	<i>parE</i>	Leu416
Ile444		Phe
Leu445		His
Ser458		Thr
Glu460		Asp
Ile464		Phe
Ile529		Leu
Ser458		Ala

resistentes a las quinolonas, se ha cuestionado que la subunidad GyrA sea la única diana primaria de unión de las quinolonas (Drlica y cols., 1997; Hooper, 2001).

Dentro de *gyrB* se han identificado mutaciones en dos posiciones, Asp426 por Asn y Lys447 por Glu (Yoshida y cols., 1991).

#### Topoisomerasa IV

La mayoría de las mutaciones descritas hasta la fecha se han encontrado en la región situada entre los aminoácidos 64 y 103 de *parC*, y los aminoácidos 420 y 441 en *parE*.

Estudios anteriores han demostrado que estas enzimas no son tan sensibles a las quinolonas como la ADN girasa, y por tanto, se considera un blanco secundario para las quinolonas en gramnegativos (Hopkins y cols., 2005). Las mutaciones en *parC* y *parE* se han encontrado, hasta la fecha, junto con mutaciones en *gyrA* (Everett y cols., 1996; Fendukly y cols., 2003; Komp y cols., 2003; Sáenz y cols., 2003), sugiriendo que las mutaciones en la topoisomerasa IV no ocurrían a menos que la sensibilidad de la ADN girasa a las fluorquinolonas haya sido reducida, por mutaciones de la ADN girasa (Everett y cols., 1996; Hopkins y cols., 2005). Por tanto, las mutaciones en *parC* y *parE* desempeñan un papel importante en la formación de cepas altamente resistentes, debido a la homología entre las subunidades de la ADN girasa y topoisomerasa IV (los codones 81, 83, 87 en el QRDR del *gyrA*, corresponden a los codones 78, 80 y 84 en *parC*) (Hopkins y cols., 2005).

En la tabla 5 se muestran las mutaciones detectadas en los genes de la ADN girasa y topoisomerasa IV de *E. coli*.

#### Resistencia por alteraciones en la permeabilidad bacteriana

Las quinolonas son moléculas hidrofílicas, que atraviesan la membrana externa de bacterias gramnegativas, a través de los canales de porinas OmpF y OmpC, para penetrar en el interior de la célula.

Este mecanismo de resistencia, que generalmente se da a la vez que la sobreexpresión de sistemas de expulsión activa, sólo se ha descrito en bacterias gramnegativas, y consiste en disminuir o inhibir la expresión de genes que codifican dichas porinas (Chen y cols., 2003; Martínez-Martínez y cols., 2002).

El papel que ejercen los canales de porinas en la difusión de las quinolonas hidrofílicas a través de la membrana externa de las bacterias gramnegativas, quedó respaldado por la observación de que numerosos mutantes MAR (del inglés "multiple antibiotic resistant"), que mostraban resistencias a estos agentes, tenían en común la reducción del número de OmpF, la principal y mayor proteína de las porinas de membrana externa de *E. coli*. La resistencia a quinolonas que presentan los mutantes

MAR, se asocia a menudo a resistencias cruzadas a muchos otros antibióticos sin relación estructural como betalactámicos, tetraciclinas, cloranfenicol, etc. Los mutantes MAR también son resistentes a disolventes orgánicos tales como el ciclohexano (Hopkins y cols., 2005). De esto se deduce que las mutaciones en los locus *marA* confieren resistencia a varios grupos de antibióticos, entre ellos las quinolonas. Las mutaciones que afectan a la permeabilidad confieren niveles de resistencia bajos.

#### Resistencia mediada por sistemas de expulsión

Los sistemas de expulsión activa tienen principalmente una función fisiológica, estando involucrados en procesos de excreción de metabolitos tóxicos, secundarios e incluso proteínas de captación de nutrientes, como es el caso de los sideróforos (Li y cols., 2004; Sierra, 2005). Estos sistemas se sitúan en la membrana interna.

Dependiendo de la clase a la cual pertenezcan, utilizan como fuente de energía el gradiente de protones o la hidrólisis del ATP.

Existen cinco clases de sistemas de expulsión activa:

1. *MFS* (del inglés, "Major Facilitator Superfamily"): Están constituidos por proteínas que presentan 12 ó 14 segmentos transmembrana, y la fuente de energía que utilizan es el gradiente de protones (Li y cols., 2004; Pao y cols., 1998; Saier y cols., 1999; Sierra, 2005). Este tipo de transportadores se encuentran en todos los tipos celulares. En gramnegativos, generalmente se encuentran asociados a dos proteínas, MFP (del inglés "Membrana Fusion Protein") y OMP (del inglés "Outer Membrana Protein"). Sus principales sustratos son antibióticos, aniones, etc. Se han descrito en varios microorganismos, entre ellos *E. coli* (MdfA, EmrB).
2. *SMR* (del inglés "Small Multidrug Resistance"): Constituidos por 4 segmentos transmembrana (Chung y cols., 2001; Li y cols., 2004). Utilizan como fuente de energía el gradiente de protones. Sólo se han descrito en procariotas y no se asocian a proteínas. Los sustratos principales son antibióticos, antisépticos, etc. Se han descrito en *E. coli* (EmrE), entre otros (Sierra, 2005).
3. *RND* (del inglés "Resistance-Modulation cell division family"): Presentan 12 segmentos transmembrana, utilizan el flujo de protones como fuente de energía y se asocian con MFPs y OMPs (Li y cols., 2004; Sierra, 2005). Los sustratos principales son antibióticos, ácidos grasos, etc. Se encuentran en *E. coli* (AcrB, AcrF), *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, etc., y en un plásmido transmisible (Li y cols., 2004).
4. *MATE* (del inglés "Multidrug and Toxic compound Extrusion family"): Presentan 12 segmentos transmembrana, su fuente de energía es el gradiente de protones, y se encuentran en

todas las células (Li y cols., 2004; Morita y cols., 1998; Sierra, 2005). Algunos representantes son *Vibrio parahaemolyticus* (NorM) y *E. coli* (YdhE).

5. *Transportadores tipo ABC* (del inglés "ATP-Binding Cassette"): Constituidos por 6 segmentos transmembrana. Utilizan como fuente de energía la hidrólisis del ATP. Sus sustratos son similares a los anteriores. No son muy comunes entre las bacterias, aunque los podemos encontrar, entre otros, en *E. coli* (MacAB) (Fath y cols., 1993; Li y cols., 2004).

Uno de los sistemas de expulsión más conocidos en *E. coli* es el denominado AcrAB, codificado por los genes *acrAB* y parece tener una función fisiológica que consiste en proteger a la célula frente a sales biliares y ácidos grasos, tóxicos habituales del entorno fisiológico.

Es importante destacar que la expresión de los genes *acrAB* aumenta de forma considerable en los mutantes MAR, lo que implica que el locus MarA de *E. coli* regula, no sólo la expresión de la porina OmpF, sino también la expresión de la bomba AcrAB (Helling y cols., 2002; Ma y cols., 1995).

Parece que la simple expresión de bombas de expulsión tiene un efecto limitado sobre la resistencia a fluorquinolonas, pero su expresión basal sí contribuye, de modo notable, a la resistencia causada por otros mecanismos (Rodríguez, 2005).

### Resistencia mediada por plásmidos

Una posibilidad con la que se especuló fue la adquisición de genes cromosómicos de la ADN girasa o la topoisomerasa IV con mutaciones de resistencia a quinolonas por parte de plásmidos o elementos móviles (Rodríguez, 2005). Actualmente no se han descrito mecanismos de resistencia mediados por plásmidos en bacterias grampositivas, sin embargo, en 1998 se publicó, por primera vez, la existencia de una cepa clínica de *K. pneumoniae* aislada de un cultivo de orina, que contenía un plásmido con alto rango de hospedador, y cuyos transconjugantes en *E. coli* incrementaban la resistencia a ácido nalidíxico de 4 a 32 mg/l, y a ciprofloxacino de 0.0008 a 0.25 mg/l (Martínez-Martínez y cols., 1998). Este plásmido, denominado pMG252, aumenta de 4 a 8 veces la resistencia debida a mutaciones definidas en la ADN girasa, porinas o bombas de expulsión activa (Martínez-Martínez y cols., 2003) y facilita la selección de mutantes resistentes a quinolonas por mecanismos que aún no se conocen (Rodríguez, 2005)

Este mecanismo está mediado por un gen plasmídico denominado *qnr* (Rodríguez y cols., 2003; Tran y cols., 2002; Wang y cols., 2003), transmisible por conjugación.

Se ha observado que la resistencia a quinolonas mediada por plásmido, aunque produce resistencia de bajo nivel, también facilita la selección de resistencias de alto nivel a quinolonas. Así, cuando *qnr* se

expresa en una cepa deficiente de porinas, las CMI para ciprofloxacino, levofloxacino y moxifloxacino aumentan de 8 a 32 veces, pasando las CMI de estas quinolonas de 0.25-0.5 a 4-8 mg/l (Rodríguez y cols., 2004). Existe un efecto aditivo de los distintos mecanismos de resistencia a quinolonas con la presencia de *qnr* (Rodríguez, 2005; Martínez-Martínez y cols., 2003).

El mecanismo de acción de Qnr se basa en la unión de esta proteína a la ADN girasa (dicha unión no requiere de la presencia del complejo ADN girasa-quinolona-ADN para su formación). Se piensa 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 (Tran y cols., 2005). La presencia de este gen de resistencia se ha descrito en diferentes lugares de la geografía mundial, aunque con una baja prevalencia (Jonas y cols., 2005; Mammeri y cols., 2005; Sierra, 2005; Wang y cols., 2004; Wang y cols., 2003).

Muchos genes de resistencia, como los que codifican betalactamasas plasmídicas, se encuentran localizados dentro de elementos móviles de este tipo, y también dentro de los transposones, lo cual potencia su diseminación (Arduino y cols., 2002; Rodríguez, 2005). Es importante señalar que existe una relación estadísticamente significativa entre la resistencia a quinolonas y betalactámicos (Paterson y cols., 2000), y sea circunstancial o no, pMG252 contiene la betalactamasa de espectro ampliado FOX-5 (Tran y cols., 2002). De esta manera se establece una vía de coresistencia a dos familias de antimicrobianos, sobre todo en cepas con algún mecanismo de resistencia a quinolonas como la pérdida de porinas, donde la presencia de *qnr* facilita alcanzar altos niveles de resistencia (Rodríguez, 2005).

### RESISTENCIA A QUINOLONAS, UN PROBLEMA EPIDEMIOLÓGICO

La resistencia a fluorquinolonas en aislados clínicos de *E. coli* no comienza a ser descrita hasta la década de los años 90, cuando el consumo de estos antibióticos se extendió, entre otras cosas, porque las fluorquinolonas se convirtieron en una buena alternativa para el tratamiento de las infecciones por *E. coli* (infecciones del tracto urinario, profilaxis de las infecciones en pacientes con granulocitopenia o con cirrosis hepática...), debido a la elevada frecuencia de resistencias de este microorganismo a ampicilina o cotrimoxazol (Alós y cols., 1988).

Desde entonces, la frecuencia de aparición de dicha resistencia se ha incrementado considerablemente por todo el mundo, y así, por ejemplo, en varios estudios españoles podemos constatar esta realidad. Queipo y cols. (2000), informaron de un significativo aumento de las cifras de prevalencia de resistencia a quinolonas en aislados clínicos de *E. coli* entre 1990 (3%) y 1998 (23%). A su vez, Peña y

cols. (1995), describieron un incremento desde el 0% en 1988 al 7,5% en 1992 entre aislados de *E. coli* procedentes de bacteriemias. Y Pérez-Tallero y cols. (1993), encontraron un importante aumento, desde el 0,8% en 1988 al 7,1% en 1993, de resistencia a quinolonas entre aislados obtenidos de muestras clínicas procedentes de infecciones del tracto urinario.

Las cifras de resistencia a las fluorquinolonas se han visto incrementadas debido a su uso masivo en la práctica clínica. Su amplio espectro de acción, potencia bactericida, propiedades farmacocinéticas (buena disponibilidad oral, baja unión a proteínas plasmáticas y eliminación renal) y su buena tolerancia, las han convertido en uno de los grupos de antibióticos de más amplia aceptación.

Diferentes estudios, han demostrado que el uso de fluorquinolonas es un importante factor de riesgo para la aparición de resistencias a estos antibióticos en microorganismos gramnegativos, especialmente en pacientes con ingresos prolongados en servicios hospitalarios o en residencias (Richard y cols., 1994), lo que se relaciona, evidentemente, con fallo terapéutico (Truong y cols., 1995).

Las fluorquinolonas en España se han usado como antibióticos de primera línea, en el tratamiento de infecciones del tracto urinario no complicadas y adquiridas en la comunidad. De esta forma, en las zonas donde se ha producido un consumo elevado de fluorquinolonas ha habido un significativo incremento de *E. coli* resistente a las mismas (Ena y cols., 1998).

Al igual que otros antibióticos, las quinolonas, no sólo ejercen su capacidad selectora de resistencias en el ser humano; el uso de antibióticos en animales, con fines terapéuticos o como promotores de crecimiento, selecciona igualmente resistencias que posteriormente pueden diseminarse al ser humano. Así, por ejemplo, el uso de enrofloxacin en animales de granja puede explicar el hecho de que se encuentren cepas de *E. coli* resistentes a fluorquinolonas en niños que no consumen este grupo de antibióticos (Garau y cols., 1999). En un estudio realizado se observó que el 11% de las cepas españolas de *E. coli* aisladas de sangre de niños menores de 14 años fueron resistentes a ciprofloxacino (Oteo y cols., 2002; Sierra, 2005).

Las quinolonas son la tercera familia de antibióticos más consumidos en España después de penicilinas y macrólidos. Desde 1997 a 2002 se ha producido un incremento constante de su consumo extrahospitalario del 20%, mientras que el consumo total extrahospitalario de antibióticos ha descendido un 9% en el mismo periodo (Oteo y cols., 2004). Por otra parte, España tiene una de las tasas más altas de resistencia a quinolonas de Europa en determinados patógenos; por ejemplo, la resistencia a ciprofloxacino en aislados en sangre de *E. coli* alcanzó el 19% en 2002, sólo superada por Portugal (Oteo y cols., 2004). El aumento de la prescripción de fluorquinolonas para infecciones del tracto urinario en Holanda se asoció de manera significativa con el

aumento de la resistencia a norfloxacino en *E. coli*, independientemente de otros factores como la edad, sexo o el origen del aislado (Goettsch y cols., 2000).

El consumo de fluorquinolonas en España aumentó de 1,26 DDD/1000 hab/día en 1987 a 2,4 DDD/1000 hab/día en 2000 (Lázaro y cols., 2002; Ruiz y cols., 2000). En este contexto, la resistencia a fluorquinolonas en *E. coli* pasó del 8,3% al 18% entre 1992 y 1996 en cepas aisladas de sangre en un hospital de Barcelona (Garau y cols., 1999). España está entre los cinco países más consumidores; Italia y Portugal están a la cabeza con más de 3,5 DDD/1000 hab/día mientras que en Suecia, Holanda y Reino Unido no superan 1 DDD/1000 hab/día. En relación con el principio activo utilizado también se observan importantes variaciones, así más del 50% del consumo de quinolonas en Italia se debe al uso de levofloxacino mientras que en Portugal el ciprofloxacino es la quinolona más utilizada (Oteo y cols., 2004). Este aumento de la resistencia a fluorquinolonas ha ocasionado fracasos terapéuticos con estos antibióticos.

En *E. coli* aislados de orina de pacientes extrahospitalarios de España la resistencia global a ácido nalidíxico es del 20-30% y a las fluorquinolonas del 10-20%, habiéndose incrementado significativamente en los últimos años (Alós y cols., 1997). Sin embargo, es muy probable que estos datos estén sesgados, ya que los laboratorios de microbiología no reciben muchas muestras de orina de infecciones urinarias no complicadas, pero sí reciben un importante porcentaje de muestras de orina de recurrencias y de infecciones complicadas, en las que se aíslan las bacterias más resistentes (Alós, 2003).

El tratamiento con fluorquinolonas de infecciones producidas por microorganismos con alguna mutación inicial en sus topoisomerasas tiene un riesgo elevado de seleccionar resistencia de más alto nivel (aparición de nuevas mutaciones que se suman a la preexistente).

Las fluorquinolonas presentan un efecto "dependiente de la concentración", por lo que la cantidad total de fármaco administrado es el principal factor determinante de su eficacia, tanto clínica como microbiológica (Craig, 1998). El cociente inhibitorio expresado como la concentración sérica libre máxima/CMI, y el área bajo la curva concentración sérica-tiempo (AUC)/CMI son los parámetros que mejor se correlacionan con la eficacia de estos antibióticos. Cifras elevadas de ambos se asocian a una menor probabilidad de seleccionar mutantes resistentes (Oteo y cols., 2004).

Paralelamente al incremento del uso de fluorquinolonas para el tratamiento de infecciones por *E. coli*, se ha producido un aumento en la utilización de betalactámicos, especialmente de cefalosporinas de segunda y tercera generación o aztreonam, y esto ha propiciado, a su vez, la aparición de fenotipos BLEE en esta especie bacteriana.

La asociación entre la producción de BLEEs y la resistencia a fluorquinolonas es un hecho bien conocido (Lautenbach y cols., 2001b) y, en parte, se podría deber a la transferencia conjunta de ambos mecanismos a través de plásmidos, como se ha descrito por algunos autores (Poirel y cols., 2006; Wang y cols., 2004). No obstante, este hecho sólo debe justificar una mínima parte de la corresponsabilidad encontrada, ya que básicamente, los mecanismos de resistencia a fluorquinolonas pueden clasificarse en dos tipos: alteraciones en la diana (por mutaciones puntuales en los genes que codifican las topoisomerasas) y reducción de los niveles de fluorquinolonas dentro de la bacteria (disminución de la expresión de porinas o incremento de la expulsión activa), siendo, de entre ellos, el primero, el mecanismo más relevante implicado en la adquisición de resistencia a fluorquinolonas (Ruiz y cols., 2000).

Un posible aumento del uso de fluorquinolonas en infecciones por microorganismos productores de BLEEs, que no responden al tratamiento con betalactámicos, podría justificar que la corresponsabilidad haya aumentado entre éstos (Sorlózano y cols., 2007a).

#### **RESISTENCIA A QUINOLONAS EN AISLADOS CLÍNICOS PRODUCTORES DE BETA-LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEEs)**

Las betalactamasas de espectro extendido (BLEEs) son enzimas que confieren resistencia a todas las penicilinas, cefalosporinas de primera a cuarta generación y monobactámicos (aztreonam), pero no son activas frente a cefoxitina, carbapenemas e inhibidores de betalactamasas (Bradford, 2001). Están codificadas por genes plasmídicos, pero además forman parte frecuentemente de transposones o integrones, todo lo cual facilita su asociación con otros determinantes genéticos de resistencia transferibles, como los que confieren resistencia a cotrimoxazol, aminoglucósidos, tetraciclinas y otros (Lautenbach y cols., 2001a).

Se han descrito varios tipos. Las BLEEs tipo TEM y SHV derivan, por mutaciones puntuales, de las betalactamasas plasmídicas clásicas del grupo 2b de la clasificación de Bush y cols. (1995): TEM-1, TEM-2 y SHV-1. Las sustituciones en los aminoácidos que ocurren en la secuencia de la enzima TEM-1 se producen en un número limitado de posiciones. La combinación de estos cambios de aminoácidos produce la aparición de los fenotipos BLEEs, como la capacidad de hidrolizar oxiiimino-cefalosporinas como ceftazidima y cefotaxima. Por su parte, la mayor parte de las variantes SHV poseen un fenotipo BLEE que está generado por la sustitución de un aminoácido serina en lugar de glicina en la posición 238 de la secuencia de SHV-1. Esta mutación está asociada con un gran incremento de la CMI de cefotaxima y un incremento moderado en la CMI de ceftazidima

respecto a las CMIs de SHV-1 para estos mismos antibióticos (Bradford, 2001).

Otro grupo de BLEEs son las denominadas CTX-M, caracterizadas por hidrolizar mejor cefuroxima, cefotaxima y cefepime, que ceftazidima, en comparación con los tipos TEM o SHV. Otra característica de estas enzimas es que son más sensibles a tazobactam que a otros inhibidores (Bradford, 2001).

Hasta ahora se han descrito, entre las BLEEs, más de 90 enzimas tipo SHV, 155 TEM y más de 58 CTX-M.

Las betalactamasas tipo OXA son otro grupo de BLEEs, en este caso pertenecientes a la clase funcional 2d de la clasificación de Bush y cols. (1995). Han sido descritas principalmente en *P. aeruginosa*, inicialmente en Turquía y Francia (Danel y cols., 1999) Las betalactamasas tipo OXA confieren resistencia a ampicilina y cefalotina y se caracterizan por su alta capacidad hidrolítica sobre oxacilina y cloxacilina, y son pobremente inhibidas por ácido clavulánico.

Existen otras BLEEs (BES-1, PER-1, PER-2, VEB-1...) que no se han podido clasificar dentro de ninguno de los grupos anteriores. Todas estas enzimas confieren resistencia a las oxiiimino-cefalosporinas, especialmente a ceftazidima y aztreonam. Muestran cierta similitud con cefalosporinas cromosómicas de *Bacteroides* spp., pudiendo ser éste su origen filogenético (Rossolini y cols., 1999).

En España, los primeros microorganismos productores de BLEEs se describieron en 1988, aunque en estudios retrospectivos se identificaron en bacterias aisladas en Madrid entre 1985 y 1987 fenotipos de sensibilidad compatibles con la producción de BLEEs (Baquero y cols., 1988). Posteriormente, destacan los estudios realizados sobre el brote ocurrido en el hospital de Bellvitge (Barcelona) entre 1993 y 1995, durante el cual los aislados de *K. pneumoniae* productores de BLEEs supusieron el 35% del total de aislamientos de esta especie (Peña y cols., 1998).

En nuestro país se han descrito diferentes tipos de BLEEs: TEM-4, TEM-10, TEM-12, TEM-24, TEM-27, TEM-54, SHV-2, SHV-5a, SHV-12, CTX-M1, CTX-M3, CTX-M7, CTX-M9, CTX-M10, CTX-M14 y CTX-M15, entre otras (Valverde y cols., 2004). Sobre todo ha sido frecuente la descripción de BLEEs tipo CTX-M en aislados de *E. coli* (Oliver y cols., 2001; Sabaté y cols., 2000).

Su prevalencia ha ido aumentando a lo largo de los últimos años. Se detectan más en las bacterias aisladas de enfermos a los que se ha administrado antibióticos durante largos periodos de tiempo, con estancia en unidades de cuidados intensivos, ingresados en servicios de neonatología, sometidos a cirugía y ventilación mecánica, con hospitalización prolongada, afectos de enfermedades graves, que hayan recibido previamente cefalosporinas o quinolonas, con instrumentación o cateterización invasora, etc., es decir, en sujetos con enfermedades de base y factores de riesgo, con algún grado de inmuno-

supresión, que son vulnerables a la infección y, por tanto, reciben antibióticos de amplio espectro, sobre todo cefalosporinas y fluorquinolonas, y que por otro lado, están durante largos periodos de tiempo en áreas donde las bacterias productoras de BLEEs están presentes (Gobernado, 2005).

En más del 90% de los hospitales españoles se detectan este tipo de enzimas. Por comunidades, las áreas con mayor prevalencia son Madrid, Cataluña, Valencia y Andalucía, del 7% al 13%; Galicia, País Vasco y Navarra con el 5% al 6%; seguidas de Castilla-León, Castilla-La Mancha y Murcia con el 3% a 4%, y en menor proporción el resto de las comunidades (Gobernado, 2005).

Además, distintos estudios nacionales confirman que la prevalencia de estos microorganismos está adquiriendo mayor importancia en el ámbito extrahospitalario, así como que en España parecen prevalecer las enzimas del grupo CTX-M (64%), con una frecuencia sensiblemente superior a las de los grupos TEM (18%) y SHV (18%) (Rodríguez-Baño y cols., 2004).

En los últimos estudios realizados, hay que destacar los que se han llevado a cabo en 125 aislados clínicos de *E. coli*, *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* productores de BLEEs procedentes de muestras clínicas obtenidas en el Hospital "San Cecilio" de Granada. Es importante analizar qué características demográficas o epidemiológicas presentan estas betalactamasas en nuestro medio (Sorlózano, 2004):

1. Distribución por especies bacterianas: De entre los aislados productores de BLEEs el 92% correspondieron a la especie *E. coli*, 6% a *K. pneumoniae* y 2% a *K. oxytoca*.
2. Distribución por sexos: 69% de mujeres entre los aislados productores de BLEEs.
3. Distribución por el origen de las muestras: El 74% de los aislados productores de BLEEs fueron de origen extrahospitalario. Las muestras extrahospitalarias procedieron fundamentalmente de centros de Atención Primaria y de consultas hospitalarias (97,8%).
4. Distribución por tipo de muestras: Hubo un claro predominio de la orina entre los aislados productores de BLEEs (86,4%) frente a otras muestras. Este claro predominio de la orina se debe a que ésta es la muestra más frecuente recibida en los laboratorios de microbiología, la infección de orina es más frecuente en mujeres que en varones y *E. coli* es la enterobacteria más frecuentemente implicada en las ITUs. Así, el 65% de los aislados productores de BLEEs procedieron de estudios de infección urinaria en mujeres.
5. Cabe destacar que el 10,2% de los aislados pertenecientes a las especies en estudio presentaron una BLEE, predominando *E. coli* (9,4% del total de estas especies), el origen extrahospitalario de las muestras (79,6% de los aislados productores) y la orina como muestra predominante (90,7% de los aislados productores de BLEEs).

Algunos autores han insistido en el posible papel de antibióticos distintos de las cefalosporinas en la aparición y diseminación de estos microorganismos. Se ha observado una asociación frecuente entre la presencia de BLEEs y la resistencia a fluorquinolonas en aislados de *K. pneumoniae*, a pesar de que la codificación de la resistencia se ubica en el caso de las BLEEs en un plásmido, y en el de las quinolonas en el cromosoma (Paterson y cols., 2000). Sin embargo, Martínez-Martínez ya demostró la transferencia de resistencia a fluorquinolonas a través de plásmidos en cepas de *K. pneumoniae* (Martínez-Martínez y cols., 1998).

Es importante identificar cuáles son los factores de riesgo asociados a la resistencia a fluorquinolonas en microorganismos poseedores de BLEEs, porque así se podría preservar la utilidad de estos antibióticos en el uso de infecciones producidas por estas enzimas, reducir la dependencia a carbapenemas y limitar la aparición de microorganismos resistentes a estos últimos (Lautenbach y cols., 2001b). Según este mismo estudio, la resistencia a fluorquinolonas en *E. coli* y *K. pneumoniae* productores de BLEEs es más frecuente entre los aislados de pacientes que han recibido fluorquinolonas en los 30 días previos a la infección y también entre los pacientes que proceden de una residencia de larga estancia. Se desprende también de este estudio que la resistencia a aminoglucósidos está significativamente asociada con la resistencia a quinolonas en microorganismos productores de BLEEs, lo cual puede ser debido a que el uso de aminoglucósidos puede causar alteración de la permeabilidad de membrana y eso puede ayudar a la resistencia a fluorquinolonas.

Cuando los microorganismos productores de BLEEs son sensibles a las fluorquinolonas, éstos son antibióticos útiles en su tratamiento (Karas y cols., 1996). Sin embargo, estudios recientes demuestran que hasta un 55% de estos aislados son resistentes a fluorquinolonas (Lautenbach y cols., 2001b), alcanzando en el Hospital "San Cecilio" de Granada cifras superiores al 70% (Sorlózano, 2004).

En resumen, la aparición de resistencia a fluorquinolonas se produce, fundamentalmente, por haber realizado un uso indiscriminado de estos antibióticos. Por lo tanto, restringir el uso de los mismos, tanto en el hospital como en la comunidad, a aquellas indicaciones en las que son antibióticos de primera elección, puede reducir su uso y la aparición de resistencias.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abbanat D, Webb G, Foleno B, y cols. In vitro activities of novel 2-fluoro-naphthyridine containing ketolides. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 309-315.
- Alós JI. Quinolonas. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003; 21: 261-268.

- Alós JI, Balas D y Grupo de Estudio de Infección en Atención Primaria. Prevalencia de susceptibilidad a quinolonas y otros antibióticos en microorganismos aislados de bacteriurias extrahospitalarias de Madrid en 1995. *Rev Clin Esp* 1997; 197: 167-171.
- Alós JI y Chacón. Bacteriología de las infecciones urinarias extrahospitalarias. *Med Clin (Barc)* 1988; 90: 395-398.
- Andersson MI y MacGowan AP. Development of the quinolones. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 1-11.
- Appelbaum PC y Hunter PA. The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. *Int J Antimicrob Agents* 2000; 16: 5-15.
- Appelbaum PC, Pankuch GA, Bozdogan BG, y cols. Activity of the new quinolone WCK 771 against pneumococci. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11: 9-14.
- Arduino SM, Roy PH, Jacoby GA, y cols. Bla<sub>CTX-M-2</sub> is located in an unusual class 1 integron (In 35) wich includes Orf513. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 2303-2306.
- Auquer F, Cerdón F, Gorina E, y cols. Single-dose ciprofloxacin versus 3 days of norfloxacin in uncomplicated urinary tract infections in women. *Clin Microbiol Infect* 2002; 8: 50-54.
- Balas D. Caracterización del gen GyrA de *Streptococcus pneumoniae* y regulación de su expresión. Memoria de doctorado, Madrid; 2001.
- Ball P. Quinolone generations: natural history or natural selection? *J Antimicrob Chemother* 2000; 46: 17-24.
- Baquero F, Reguera JA, Ojeda M, y cols. *Escherichia coli* con resistencia a cefalosporinas de tercera generación codificadas por betalactamasas de tipo plasmídico: primer brote en España. *Rev Esp Microbiol Clin* 1988; 581-582.
- Bergogne E. Clinical role of protein binding of quinolones. *Clin Pharmacokinet* 2002; 41: 741-750.
- Bradford PA. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21<sup>st</sup> century: Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 933-951.
- Browne FA, Bozdogan B, Clark C, y cols. Antipneumococcal activity of DK-507k, a new quinolone, compared with the activities of 10 other agents. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 3815-3824.
- Bryskier A y Chantot JF Classification and structure-activity relationships of fluoroquinolones. *Drugs* 1995; 49: 16-28.
- Bush K, Jacoby GA y Medeiros AA. A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1211-1233.
- Chen FJ, Lauderdale TL, Ho M, y cols. The roles of mutations in *gyrA*, *parC*, and *OmpK35* in fluoroquinolone resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Microb Drug Resist* 2003; 9: 265-271.
- Chung YJ y Saier MH Jr. SMR-type multidrug resistance pumps. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2001; 4: 237-245.
- Craig WA. Pharmacokinetics and pharmacodynamics parameters: Rationale for antibacterial doping of mice and men. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 1-10.
- Danel F, Hall LMC, Duke B, y cols. OXA-17, a further extended-spectrum  $\beta$ -lactamase variant of OXA-10  $\beta$ -lactamase isolated from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1362-1366.
- DiGate RJ y Mariani KJ. Identification of a potent decatenating enzyme from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 1988; 263: 13366-13373.
- DiGate RJ y Mariani KJ. *Escherichia coli* topoisomerase III-catalyzed cleavage of RNA. *J Biol Chem* 1992; 267: 20532-20535.
- Dinardo S, Voelkel KA, Sternglanz R, y cols. *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants have compensatory mutation in DNA gyrase genes. *Cell* 1982; 31: 43-52.
- Drlica K y Zhao X. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol Mol Biol Rev* 1997; 61: 377-392.
- Emmerson AM y Jones AM. The quinolones: decades of development and use. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 13-20.
- Ena J, López-Perezagua MM, Martínez-Peinado C, y cols. Emergence of ciprofloxacin resistance in *Escherichia coli* isolates after widespread use of fluoroquinolones. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998; 30: 103-107.
- Engberg J, Aarestrup M, Taylor DE, y cols. Quinolone and macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*: Resistance mechanisms and trends in human isolates. *Emerg Infect Dis* 2001; 7: 24-34.
- Everett MJ, Jin YF, Ricci V, y cols. Contributions of individual mechanisms to fluoroquinolone resistance in 36 *Escherichia coli* strains isolated from humans and animals. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 2380-2386.
- Fath MJ y Kolter R. ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiol Rev* 1993; 57: 995-1017.
- Fendukly F, Karisson I, Hanson HS, y cols. Patterns of mutations in target genes in septicemia isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* with resistance or reduced susceptibility to ciprofloxacin. *APMIS* 2003; 111: 857-866.
- Garau J, Xercavins M, Rodríguez M, y cols. Emergent and dissemination of quinolone-resistant *Escherichia coli* in the community. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 2736-2741.

- García JA y Muñoz JL. ¿Qué nuevas quinolonas podemos esperar?. *Rev Esp Quimioter* 2003; 16: 49-54.
- Giuliano M, Pantosti A, Gentile G, y cols. Effects on oral and intestinal microflora of norfloxacin and pefloxacin for selective decontamination in bone marrow transplant patients. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33: 1709-1713.
- Gobernado M. Betalactamasas de espectro extendido en aumento. *Rev Esp Quimioterap* 2005; 18: 115-117.
- Goettsch W, Van Pelt W, Nagelkerke N, y cols. Increasing resistance to fluorquinolones in *Escherichia coli* from urinary tract infections in the Netherlands. *J Antimicrob Chemother* 2000; 46: 223-228.
- Gordeev MF, Hackbarth C, Barbachyn MR, y cols. Novel oxazolidinone-quinolone hybrid antimicrobials. *Bioorg Med Chem Lett* 2003; 13: 4213-4216.
- Gutiérrez N. Relation between structure, activity and adverse effects of quinolones. *Rev Esp Quimioter* 2004; 17: 232-243.
- Helling RB, Janes BK, Kimball H, y cols. Toxic waste disposal in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2002; 184: 3699-3703.
- Hooper DC. Bacterial topoisomerases, anti-topoisomerases, and anti-topoisomerase resistance. *Clin Infect Dis* 1998; 27: 54-63.
- Hooper DC. Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. *Clin Infect Dis* 2000; 31: 24-28.
- Hooper DC. Mechanisms of action of antimicrobials: focus on fluoroquinolones. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 9-15.
- Hopkins KL, Davies RH y Threlfall EJ. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: Recent developments. *Int J Antimicrob Agents* 2005; 25: 358-373.
- Hubschwerlen C, Specklin JL, Baeschlin DK, y cols. 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* 2003a; 13: 4229-4233.
- Hubschwerlen C, Specklin JL, Sigwalt C, y cols. Design, synthesis and biological evaluation of oxazolidinone-quinolone hybrids. *Bioorg Med Chem Lett* 2003b; 11: 2313-2319
- Jonas D, Biehler K, Hartung D, y cols. Plasmid-mediated quinolone resistance in isolates obtained in german intensive care units. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 773-775.
- Jones ME, Critchley IA, Karlowsky JA, y cols. 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* 2002; 46: 1651-1657.
- Karas JA, Pillay DG y Muckart D. Treatment failure due to extended-spectrum  $\beta$ -lactamase. *J Antimicrob Chemother* 1996; 37: 203-204.
- King D, Malone R y Lilley S. New classification and update on the quinolone antibiotics. *Am Fam Physician* 2000; 61: 2741-2748.
- Komp LP, Karlsson A y Hughes D. Mutation rate and evolution of fluorquinolone resistance in *Escherichia coli* isolates from patients with urinary tract infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 3222-3232.
- Lautenbach E, Patel JB, Bilker WB, y cols. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: risk factors for infection and impact of resistance on outcomes. *Clin Infect Dis* 2001a; 32: 1162-1171.
- Lautenbach E, Strom BL, Bilker WB, y cols. Epidemiological investigation of fluoroquinolone resistance in infections due to extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Clin Infect Dis* 2001b; 33: 1288-1294.
- Lázaro E, Madurga M y De Abajo FJ. Evolución del consumo de antibióticos en España, 1985-2000. *Med Clin (Barc)* 2002; 118: 561-568.
- Leshner GY, Froelich EJ, Gruett MD, y cols. 1,8-naphthyridine derivatives. A new class of chemotherapeutic agents. *J Med Pharm Chem* 1962; 91: 1063-1065.
- Lew DP y Waldvogel FA. Use of quinolones in osteomyelitis and infected orthopaedic prosthesis. *Drugs* 1999; 58: 85-91.
- Li XZ y Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs* 2004; 64: 159-204.
- Loza E, Cantón R, Pascual A, y cols. Comparative in vitro activity of garenoxacin (BMS-284756). Sentry program, Spain (1999-2000). *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003; 21: 404-409.
- Ma D, Cook DN, Alberti M, y cols. Genes *acrA* y *acrB* encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*. *J Mol Microbiol* 1995; 16: 45-55.
- Mammeri H, Van De LM, Poirel L, y cols. Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* in Europe. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 71-76.
- Martínez-Martínez L, Pascual A, Conejo MC, y cols. 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* 2002; 46: 3926-3932.



- Martínez-Martínez L, Pascual A, García I, y cols. Interaction of plasmid and host quinolone resistance. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 1037-1039.
- Martínez-Martínez L, Pascual A y Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* 1998; 351: 797-799.
- Morita Y, Kodama K, Shiota S, y cols. NorM, a putative multidrug efflux protein, of *Vibrio parahaemolyticus* and its homolog in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 1778-1782.
- Naber KB y Adam D. Classification of fluorquinolones. *Int J Antimicrob Agents* 1998; 10: 255-257.
- Nilius AM, Shen LL, Hensey-Rudloff D, y cols. In vitro antibacterial potency and spectrum of ABT-492, a new fluoroquinolone. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 3260-3269.
- Oliphant CM y Green GM. Quinolones: a comprehensive review. *Am Fam Physician* 2002; 65: 455-464.
- Oliver A, Pérez-Díaz JC, Coque TM, y cols. Nucleotide sequence and characterization of a novel cefotaxime-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase (CTX-M-10) isolated in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 616-620.
- Oteo J y Campos J. Uso de quinolonas y resistencia. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004; 22: 201-203.
- Oteo J, Campos J, Baquero F, y cols. Antibiotic resistance in 1962 invasive isolates of *Escherichia coli* in 27 Spanish hospitals participating in the European Antimicrobial Resistance Surveillance System (2001). *J Antimicrob Chemother* 2002; 50: 945-952.
- Owens RC y Ambrose PG. Clinical use of the fluorquinolones. *Med Clin North Am* 2000; 84: 1447-1469.
- Pao SS, Paulsen IT y Saier MH. Major facilitator superfamily. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62: 1-34.
- Paterson DL, Mulazimoglu L, Casellas JM, y cols. Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended-spectrum betalactamase production in *Klebsiella pneumoniae* isolates causing bacteremia. *Clin Infect Dis* 2000; 30: 473-478.
- Peacock JE, Herrington DA, Wade JC, y cols. Ciprofloxacin plus piperacillin compared with tobramycin plus piperacillin as empirical therapy in febrile neutropenic patients. A randomized, double-blind trial. *Ann Intern Med* 2002; 137: 77-87.
- Peng H y Marians J. *Escherichia coli* topoisomerase IV. Purification, characterization, subunit structure, and subunit interactions. *J Biol Chem* 1993; 268: 24481-24490.
- Peña C, Albareda JM, Pallarés R, y cols. Relationship between quinolone use and emergence of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* in bloodstream infections. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 520-524.
- Peña C, Pujol M, Ardanuy C, y cols. Epidemiology and successful control of a large outbreak due to *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 53-58.
- Pérez-Tallero E, Urbieta M, Jiménez K, y cols. Ten-year survey of quinolone resistance in *Escherichia coli* causing urinary tract infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993; 2: 349-351.
- Poirel L, Pitout JDD, Calvo L, y cols. In vivo selection of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* isolates expressing plasmid-mediated quinolone resistance and expanded-spectrum beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 1525-1527.
- Queipo JA, Budía A, Jiménez MJ, y cols. Evolución de la resistencia microbiana a fluorquinolonas en un hospital terciario. *Actas Urol Esp* 2000; 24: 381-387.
- Reece R y Maxwell A. DNA gyrase: structure and function. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1991; 26: 335-375.
- Richard P, Delangle MH, Merrien D, y cols. Fluoroquinolone use and fluoroquinolone resistance: is there an association? *Clin Infect Dis* 1994; 19: 54-59.
- Rodríguez JM. Mecanismos de resistencia a quinolonas mediada por plásmidos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2005; 23: 25-31.
- Rodríguez JM, Pascual A, García I, y cols. Detection of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnr* among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing AmpC-type beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52: 703-706.
- Rodríguez JM, Pascual A, Martín A, y cols. Bactericidal activity of fluoroquinolones against *Klebsiella pneumoniae* containing the plasmid mediated resistance determinant *qnr*. 13<sup>th</sup> ESCMID (Glasgow, Escocia) 2004; P1555.
- Rodríguez-Baño J, Navarro MD, Romero L, y cols. Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum betalactamase-producing *Escherichia coli* in non hospitalized patients. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 1089-1094.
- Rohlfing SR, Gerster JR y Kvam DC. Bioevaluation of the antibacterial flumequine for urinary tract use. *Antimicrob Agents Chemother* 1976; 10: 20-24.
- Rossolini GM, Franceschini N, Lauretti L, y cols. Cloning of a *Chryseobacterium (Flavobacterium) meningosepticum* chromosomal gene (*bla<sub>CME</sub>*) encoding an extended-spectrum class A beta-lactamase related to the *Bacteroides* cephalosporinases and the VEB-1 and PER beta-

- lactamasas. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 2193-2199.
- Roychoudhury S y Ledoussal B. Non-fluorinated quinolones (NFQs): New antibacterials with unique properties against quinolone-resistant gram-positive pathogens. *Curr Drug Targets Infect Disord* 2002; 2: 51-65.
- Ruiz A, Ruiz M, Pérez B, y cols. Non-hospital consumption of antibiotics in Spain: 1987-1997. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45: 395-400.
- Sabaté M, Tarrago R, Navarro F, y cols. Cloning and sequence of the gene encoding a novel cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase (CTX-M-9) from *Escherichia coli* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1970-1973.
- Sáenz Y, Zarazaga M, Briñas L, y cols. Mutations in *gyrA* and *parC* genes in nalidixic acid-resistant *Escherichia coli* strains from food products, humans and animals. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 1001-1005.
- Saier MH Jr., Beatty JT, Goffeau A, y cols. The major facilitator superfamily. *J Mol Microbiol Biotechnol* 1999; 1: 257-279.
- Sierra JM. Bases moleculares de resistencia a quinolonas en *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Corynebacterium* spp. Tesis doctoral. Departamento de microbiología y parasitología. Facultad de Barcelona; 2005.
- Sorlózano A. Betalactamasas de espectro extendido en nuestro medio: Aportaciones científicas. Tesis doctoral. Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Granada; 2004.
- Sorlózano A, Gutiérrez J, Luna JD, y cols. High presence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamasas and resistance to quinolones in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Microbiol Res.* 2007a; 162:347-54.
- Sorlózano A, Gutiérrez J, Jiménez A, Luna JD, y cols. Contribution of a New Mutation in *parE* to Quinolone Resistance in Extended-Spectrum-Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolates. *J Clin Microbiol.* 2007b; 45:2740-2.
- Srivenugopal KS, Lockshon D y Morris DR. *Escherichia coli* DNA topoisomerase III: purification and characterization of a new type I enzyme. *Biochemistry* 1984; 23: 1899-1906.
- Stahlmann R y Lode H. Toxicity of quinolones. *Drugs* 1999; 58: 37-42.
- Taléns, R. Actividad antimicrobiana in vitro de nuevas 6-fluoroquinolonas de administración por vía oral. Relación estructura – actividad. Tesis doctoral. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Valencia; 2001.
- Tran JH y Jacoby GA. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 5638-5642.
- Trucksis M y Depew R. Identification and localization of a gene that specifies production of *Escherichia coli* DNA topoisomerase I. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 2164-2168.
- Truong QC, Ouabdesselam S, Hooper DC, y cols. Sequential mutations of *gyrA* in *Escherichia coli* associated with quinolone therapy. *J Antimicrob Chemother* 1995; 36: 1055-1059.
- Tse YC y Wang JC. Complete nucleotide sequence of the *topA* gene encoding *Escherichia coli* DNA topoisomerase I. *J Mol Biol* 1986; 191: 321-331.
- Valverde A, Coque TM, Sánchez MP, y cols. Dramatic increase in prevalence of fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* during nonoutbreak situations in Spain. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 4769-4775.
- Vila J, Ruiz J, Marco F, y cols. Association between double mutation in *gyrA* gene of ciprofloxacin resistant clinical isolates of *Escherichia coli* and MICs. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 2477-2479.
- Wang JC. Interaction between DNA and an *Escherichia coli* protein omega. *J Mol Biol* 1971; 55: 523-533.
- Wang M, Sahm DF, Jacoby GA, y cols. Emerging plasmid-mediated quinolone resistance associated with the *qnr* gene in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1295-1299.
- Wang MJ, Tran H, Jacoby GA, y cols. Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 2242-2248.
- Yamakawa T, Mitsuyama J y Hayashi K. In vitro and in vivo antibacterial activity of T-3912, a novel non-fluorinated topical quinolone. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49: 455-465.
- Yoshida H, Bogaki M, Nakamura M, y cols. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrB* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 1647-1650.