

Mecanismos de resistencia a quinolonas mediada por plásmidos

José Manuel Rodríguez-Martínez

Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina. Universidad de Sevilla. España.

La resistencia a quinolonas en bacterias gramnegativas está causada fundamentalmente por mutaciones cromosómicas. En 1998 se describió en cepas clínicas de *Klebsiella pneumoniae* la existencia de un plásmido conjugativo que confiere resistencia a quinolonas. El locus responsable de la resistencia a quinolonas en este plásmido se designó *qnr* (quinolone resistance). Se ha propuesto que la función de la proteína que expresa este locus sea proteger tanto la ADN-girasa como la topoisomerasa IV de la acción de las quinolonas. Además, *qnr* se ha localizado formando parte de una estructura de tipo integrón aguas arriba de los genes *qacEΔ1* y *sull*, sugiriendo la posibilidad de su presencia en integrones de clase 1. En este trabajo se lleva a cabo una revisión de la información obtenida en los últimos años sobre este mecanismo de resistencia.

Palabras clave: *Qnr*. Resistencia. Plásmidos. Quinolonas. Integrones.

Mechanisms of plasmid-mediated resistance to quinolones

Quinolone resistance is caused mainly by chromosomal mutations in gram negative bacteria. In 1998, plasmid-mediated resistance to quinolones in clinical isolates was first reported in a *Klebsiella pneumoniae* strain. Locus *qnr* (quinolone resistance) was responsible of the quinolone resistance in this plasmid. *qnr* codes a protein whose function is protect both DNA-girase and topoisomerase IV from these antimicrobials. Moreover, *qnr* is located in an integron-like structure upstream of *qacEΔ1* y *sull1*. A review of the information obtained in the last years about this mechanism of resistance was performed.

Key Words: *Qnr*. Resistance. Plasmids. Quinolones. Integrons.

Correspondencia: Dr. J.M. Rodríguez-Martínez.
Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina.
Universidad de Sevilla.
Sanchez Pizjuán, s/n. 41009 Sevilla. España.
Correo electrónico: jmrodriguez@us.es

Manuscrito recibido el 27-4-2004; aceptado el 9-6-2004.

Introducción

En 1962, durante el proceso de síntesis y purificación de la cloroquina (un agente contra la malaria) se descubrió un derivado de las quinolonas, el ácido nalidíxico, activo frente a algunas bacterias gramnegativas y capaz de alcanzar elevadas concentraciones en orina¹. Sin embargo, su uso clínico se limitó al tratamiento de infecciones del tracto urinario (ITU). La adición de un átomo de flúor en la posición 6 de las moléculas de quinolonas potenció en gran medida su actividad, pero no fue hasta fines de la década de 1980 y principios de 1990 cuando se introdujeron en clínica nuevas fluoroquinolonas con actividad frente a bacterias gramnegativas y a grampositivas, incluso frente a anaerobias².

En nuestros días, las fluoroquinolonas se usan en diversos tipos de infecciones, que incluyen bacteriemias, infecciones del tracto respiratorio, osteomielitis, infecciones entéricas o infecciones gonocócicas³ y, por otro lado, tienen un uso profiláctico por ejemplo en pacientes neutropénicos (aunque el riesgo de desarrollo de resistencia en bacilos gramnegativos durante este tipo de programas es alta). Además, las quinolonas, junto con otros agentes antibacterianos, se han usado en el ámbito veterinario.

El mecanismo de acción de las fluoroquinolonas 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. En bacterias grampositivas la penetración ocurre directamente a través de la envuelta celular hasta alcanzar el citoplasma. Posteriormente actúan a nivel del ADN bacteriano produciendo la inhibición de las topoisomerasas (ADN-girasa y topoisomerasa IV). Al unirse las fluoroquinolonas 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^{4,5}. El mecanismo último de acción bactericida no se conoce bien.

El extenso uso de estos antimicrobianos ha generado la aparición de bacterias resistentes a estos agentes. Hasta la fecha, los principales mecanismos implicados en esta resistencia han sido dos (ambos mediados por elementos cromosómicos): alteraciones en las dianas de las quinolonas y disminución en la acumulación del antibiótico en el interior bacteriano por impermeabilización de la membrana (pérdida de porinas o alteraciones del lipopolisacárido) o por expresión de sistemas de expulsión activa. En 1998, se describe por primera vez resistencia a quinolonas transmisible horizontalmente⁶. El gen *qnr* es el responsable genético de la resistencia y se encuentra dentro de un elemento móvil. La diseminación horizontal de mecanismos de resis-

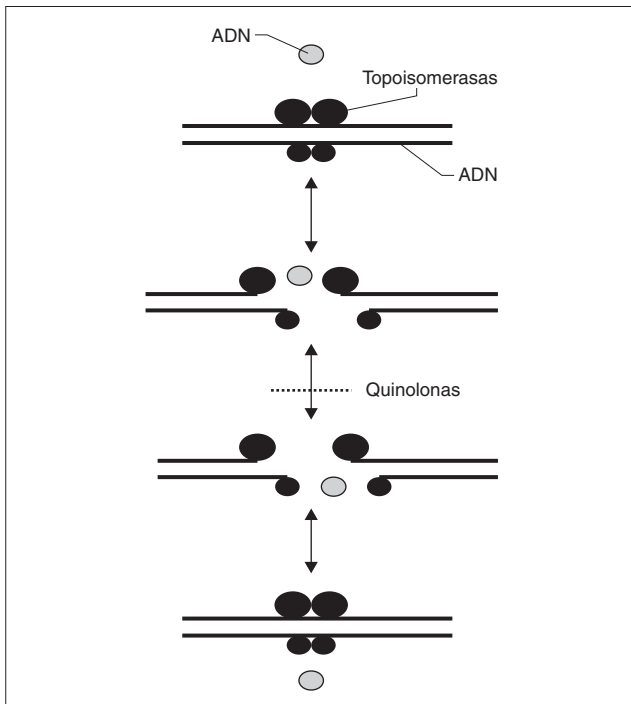


Figura 1. Mecanismo de acción de las topoisomerasas tipo II.

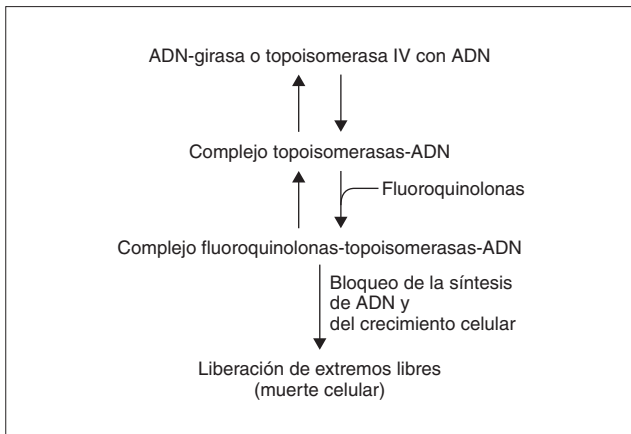


Figura 2. Interrupción de la acción de las topoisomerasas por quinolonas.

tencia a fluoroquinolonas abre la posibilidad de una rápida expansión de la resistencia a estos antimicrobianos, tanto en patógenos de animales como en seres humanos, más aún con el extenso uso que se hace de las mismas.

Mecanismo de acción y resistencia cromosómica

Las fluoroquinolonas inhiben la síntesis de ADN. La inhibición ocurre por la interacción del antibiótico con el complejo formado por la unión del ADN a las dianas de las quinolonas, la ADN-girasa y la topoisomerasa IV. Estas dos enzimas están estructuralmente relacionadas y constan de dos pares de subunidades diferentes, las subunidades GyrA y GyrB en el caso de la ADN-girasa, y las

subunidades ParC y ParE en el caso de la topoisomerasa IV. Ambas enzimas son topoisomerasas tipo II, es decir, actúan cortando ambas hebras de un segmento de ADN, pasando otro segmento de ADN a través de la rotura, y volviendo a unir los extremos libres (fig. 1). La ADN-girasa está implicada en la relajación o enrollamiento del ADN, por ejemplo, durante el proceso de síntesis de ADN. La topoisomerasa IV está implicada en la separación de los cromosomas hijos tras la replicación del ADN⁷. En ambos casos, las fluoroquinolonas actúan atrapando a la enzima sobre el ADN durante la reacción de topoisomerización, cuando la enzima ha producido la rotura del ADN y ha generado extremos libres en éste. La unión del antimicrobiano estabiliza el complejo produciéndose una barrera física para el movimiento de la horquilla de replicación⁸, la ARN polimerasa⁹ y la ADN helicasa¹⁰. La colisión de este complejo con la horquilla de replicación desencadena una serie de sucesos, entre los que se incluyen la activación del sistema SOS, pero en general poco conocidos, que tienen como resultado final la muerte celular.

La diana de las quinolonas depende del compuesto considerado, y puede diferir entre grampositivos y gramnegativos. En los grampositivos la diana primaria es, en muchos casos, la topoisomerasa IV, mientras que en los gramnegativos es la ADN-girasa. Las fluoroquinolonas desarrolladas más recientemente, como moxifloxacino y clinafloxacino, presentan una afinidad similar por ambas dianas¹¹.

En resumen, las quinolonas actúan en cuatro etapas: a) paso a través de las porinas de la pared bacteriana y b) de la membrana citoplasmática hasta llegar al citoplasma; c) inhibición de la ADN-girasa y/o topoisomerasa IV, y d) inducción de la respuesta SOS (fig. 2).

En su mayoría, la resistencia a quinolonas en bacterias gramnegativas se produce por mutaciones cromosómicas^{4,5,7}. En *Escherichia coli* la modificación de la diana es determinada por mutaciones en *gyrA* o *parC* (genes que codifican para la subunidad A de la ADN-girasa y la topoisomerasa IV, respectivamente), y en menor medida en *gyrB* o *parE* (genes que codifican para la subunidad B de la ADN-girasa y la topoisomerasa IV, respectivamente). Estudios cristalográficos sobre la estructura de *GyrA* sugieren que los cambios aminoacídicos ocurren en la región que contiene el sitio activo, donde la enzima se une al ADN e interacciona con las quinolonas¹² (tabla 1). Tanto en *E. coli* como en *Staphylococcus aureus* se ha demostrado que diferentes niveles de resistencia a quinolonas dependen de si las alteraciones ocurren en la diana primaria, la secundaria, o en ambas.

Otro factor importante para la resistencia a fluoroquinolonas se debe a mutaciones en bombas de transporte activo que expulsan compuestos tóxicos debido a su expresión o sobreexpresión provocando resistencia a diferentes grupos de antibióticos al mismo tiempo. Estos sistemas parecen estar en muchas, si no en todas las bacterias. En algunos microorganismos, como *Stenotrophomonas maltophilia*, este mecanismo puede tener una gran relevancia¹³. El gen *norA* codifica una bomba que contribuye a resistencia en *S. aureus*¹⁴, y *acrAB* codifica en *E. coli* un sistema de expulsión multidroga que asociado al producto de *tolC* modula la resistencia a quinolonas en esta especie¹⁵. La sobreexpresión de *NorA*, por una mutación en el promotor, provoca un aumento de 2 a 4 veces la concen-

tración inhibitoria mínima (CIM) de ciprofloxacino¹⁶. Parece que la simple expresión de bombas de expulsión activa tiene un efecto limitado sobre la resistencia a fluoroquinolonas, pero su expresión basal sí contribuye de modo notable a la resistencia causada por otros mecanismos. Por ejemplo, si en cepas con mutaciones en *gyrA* se muta *acrB*, el nivel de resistencia disminuye considerablemente. Por otra parte, se han caracterizado un alto número de bombas potencialmente implicadas en la resistencia, con lo cual es difícil definir con exactitud el papel de cada una de ellas (tabla 2).

La pérdida de permeabilidad de membrana es otra de las formas de resistencia, por mutaciones en genes estructurales o reguladores que hace que disminuya el número efectivo de porinas (en *E. coli* genes *ompC* y *ompF*, en *Klebsiella pneumoniae* genes *ompK35* y *ompK36*).

Recientemente se han comunicado, por primera vez, bajos niveles de resistencia causados por la expresión reducida de la topoisomerasa IV en *S. aureus*. Niveles reducidos de *ParE* son compatibles con la supervivencia bacteriana, aunque debe suponer un coste sobre la velocidad de división celular. Parece que este fenómeno debe llevar asociado otros mecanismos compensatorios que no revierten el fenotipo de resistencia¹⁷.

Mecanismos potenciales de resistencia a quinolonas mediada por plásmidos

En principio, el carácter hereditario de las mutaciones cromosómicas que causan resistencia a quinolonas haría que estos mutantes no requiriesen mecanismos de resistencia transferibles horizontalmente, ya que su supervivencia y diseminación vertical están aseguradas. Así, al ser la cepa receptora resistente a quinolonas no tendría ninguna necesidad de que se le transfiriese otro marcador de resistencia.

Plásmidos con genes cromosómicos

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. Además, la elevada tasa de resistencia en grampositivos (en particular en estafilococos), la demostración de la transferencia natural de material genético de grampositivo a gramnegativo¹⁸ y la ausencia de barrera para la expresión de genes de grampositivos en gramnegativos¹⁹ abre una vía teórica de resistencia transferible a quinolonas. En muchas especies la presencia de una topoisomerasa mutada es recesiva frente a la topoisomerasa silvestre original del microorganismo.

Inactivación de la droga

La inactivación de la droga (por oxidación, reducción, esterificación u otras reacciones) es el mecanismo de resistencia más común entre los patógenos bacterianos, produciendo resistencia cruzada a diferentes antimicrobianos del mismo grupo. Hasta el momento sólo se han descrito hongos capaces de degradar las quinolonas^{20,21}. Puesto que estos compuestos son productos de síntesis en el laboratorio y no se producen por bacterias u hongos, es difícil pensar que existiese un proceso natural de presión hacia la re-

TABLA 1. Mutaciones descritas en las subunidades GyrA, ParC, GyrB y ParE en cepas resistentes a quinolonas en *Escherichia coli*

Codón	Aminoácido silvestre	Cambios descritos
GyrA		
51	Ala	Val
67	Ala	Ser
81	Gly	Cys, Asp
82	Asp	Gly
83	Ser	Leu, Trp, Ala, Val
84	Ala	Pro, Val
87	Asp	Asn, Gly, Val, Tyr, His
106	Gln	Arg, His
GyrB		
426	Asp	Asn
447	Lys	Glu
ParC		
78	Gly	Asp
80	Ser	Ile, Arg
84	Glu	Lys, Val, Gly
ParE		
445	Leu	His

TABLA 2. Componentes de sistemas de expulsión activa de multiresistencia en diferentes patógenos

Organismo	Componentes del sistema de flujo			
	Bomba	Proteína de unión a membrana	Proteína de membrana externa	Gen regulador o mutación
<i>Bacterias gramnegativas</i>				
<i>P. aeruginosa</i>	MexB	MexA	OprM	<i>mexR</i>
	MexD	MexC	OprJ	<i>nfxB</i>
	MexF	MexE	OprN	<i>mexT</i>
	MexY	MexX	OprM	<i>mexZ</i>
<i>E. coli</i>	AcrB	AcrA	TolC	<i>arcR</i> <i>marA</i> <i>robA</i> <i>soxS</i>
<i>Bacterias grampositivas</i>				
<i>S. aureus</i>	NorA	-	-	<i>flqB</i> Mutación en promotor <i>arlRS</i>
<i>S. pneumoniae</i>	PmrA	-	-	?

sistencia a quinolonas en microorganismos ambientales o patógenos. Sí podría ocurrir, sin embargo, que las quinolonas se inactivaran por enzimas implicadas en la degradación de otros compuestos más o menos relacionados, y para los que sí existiese presión ambiental.

Mecanismo de acción de *qnr*

En 1987 se informó de resistencia a quinolonas mediada por plásmidos en una cepa de *Shigella dysenteriae*²², que más tarde no pudo ser comprobada. En 1998 se publicó por primera vez la existencia de una cepa clínica de *K. pneumoniae* aislada de un cultivo de orina recogido en Birmingham, Alabama (EE.UU.), que contenía un plásmido con alto rango de hospedador, y cuyos transconju-

gantes en *E. coli* incrementaban la resistencia a ácido nalidíxico de 4 a 32 mg/l, y a ciprofloxacino de 0,008 a 0,25 mg/l²³. 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 activa²⁴ y facilita la selección de mutantes resistentes a quinolonas, por mecanismos que aún no se conocen. La presencia de este plásmido no alteraba el patrón de expresión de porinas en el hospedador ni reducía la acumulación de quinolonas, lo que sugirió la existencia de un nuevo mecanismo de resistencia.

Para aclarar este posible nuevo mecanismo, el gen *qnr* de pMG252 se clonó, secuenció y después se amplificó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se introdujo en un vector de expresión. De este modo se pudo purificar la proteína codificada por *qnr* y estudiar su interacción con las quinolonas y sus dianas (ADN-girasa y topoisomerasa IV) mediante estudios de movilidad electroforética. Ello permitió demostrar que, al menos *in vitro*, Qnr protege a la ADN-girasa de *E. coli* de la inhibición por ciprofloxacino²⁵. Esta protección es proporcional a la concentración de Qnr, e inversamente proporcional a la concentración de ciprofloxacino²⁵. La topoisomerasa IV, diana secundaria de las quinolonas en *E. coli*, parece también ser protegida de las quinolonas por Qnr²⁶.

Qnr pertenece a la familia de los pentapéptidos repetidos, de la que hasta el momento se conocen más de 90 miembros. Esta familia se define por la presencia de repeticiones en tándem de motivos A(D/N)LXX, donde X es cualquier aminoácido²⁷. Estas proteínas se han encontrado en muchos géneros bacterianos, pero parece común en cianobacterias, pudiendo ser tanto proteínas de membrana como citoplasmáticas. Estas proteínas presentan estructura en α -hélice en su circunferencia externa y hojas β paralelas en su circunferencia interna²⁸, una estructura apropiada para la interacción entre proteínas.

En esta familia de pentapéptidos existen dos miembros de especial relevancia en cuanto a la resistencia a quinolonas. El primero es McbG, una proteína que protege a las bacterias que sintetizan microcina B17 (MccB17) de su propia inhibición. MccB17 es un péptido modificado posttranscripcionalmente de 3,1 kDa que bloquea la replicación del ADN²⁹, y que puede, como el ciprofloxacino, inhibir la acción de la ADN-girasa³⁰ y estabilizar el complejo ADN-ADN-girasa en presencia de trifosfato de adenosina (ATP)³¹ y de extremos libres de ADN. El mecanismo de autoinmunidad conferido por *mcbG* implica a otros genes: *mcbE* y *mcbF*, relacionados con el bombeo de MccB17 fuera de la célula³². Se ha comprobado que un plásmido que lleve el operón *mcbEFG* produce un aumento en la CIM de quinolonas de 2 a 8 veces³³. En relación con este sistema, en el año 2002 se describió una nueva proteína (SbmC), que también protege a *E. coli* de la acción de MccB17³⁴.

En *E. coli*, el operón *mcb* (responsable de la producción de MccB17) y el operón *emr* (que codifica la bomba EmrAB de resistencia a múltiples compuestos) comparten un mismo represor: EmrR. Además, los compuestos que inducen el operón *emr* reprimen el operón *mcb*³³.

El segundo miembro de la familia de los pentapéptidos es MfpA, una proteína que se clonó del genoma de *Mycobacterium smegmatis* a partir de estudios sobre bombas de expulsión activa que contribuyen a la resistencia a quinolonas³⁵. Los plásmidos artificiales que codifican MfpA in-

crementan la resistencia a ciprofloxacino hasta 4 veces. El mecanismo de resistencia no ha sido aún establecido, pero se sabe que MfpA no tiene efecto sobre la acumulación de ciprofloxacino marcado con C¹⁴.

La relación de los miembros de esta familia y Qnr es difícil de establecer, entre otras razones porque el porcentaje de homología entre Qnr y McbG o MfpA es del 19,6% y 18,9%, respectivamente²⁵. Con los datos existentes sólo podemos especular con la posibilidad de que Qnr apareciera a partir de alguna proteína de inmunidad diseñada para proteger a la ADN-girasa de inhibidores naturales, o desde algún gen cromosómico de función desconocida que codificase una proteína de la familia de los pentapéptidos desde micobacterias, cianobacterias u otros grupos bacterianos.

Entorno genético de *qnr*

El gen *qnr* se encuentra, en las cepas en las que se ha descrito, en plásmidos transmisibles por conjugación. Estudios realizados con el plásmido en el que se describió por primera vez, pMG252, revelan que *qnr* se encuentra en un plásmido con amplio rango de hospedador transmisible por conjugación en especies como *K. pneumoniae*, *E. coli*, *C. freundii*, *S. typhimurium* o *P. aeruginosa*³⁶. El *qnr* se localiza en el plásmido original de donde se aisló formando parte de una secuencia nucleotídica característica originalmente de los integrones In6 (del plásmido pSa) e In7 (de pDGO100)³⁷, sugiriendo su presencia en un integrón de clase 1²⁵. Estos integrones poseen una región conservada común hacia 3' que contiene el gen *qacE δ 1* (que confiere bajo nivel de resistencias a ciertos compuestos amónicos)³⁸ y *sulI* (que confiere bajo nivel de resistencia a sulfamidas, pero que no se expresa en integrones al haber perdido su promotor)³⁹. Un número inusual de integrones de clase 1 que contienen la región común de In6 e In7 llevan un elemento inicialmente denominado *orf341*, y ahora *orf513*, el cual se postula que codifica una recombinasa específica de sitio para la adquisición de genes de resistencia³⁹. Muchos genes de resistencia, como los que codifican betalactamasas plasmídicas, se encuentran localizados dentro de elementos móviles de este tipo, y también dentro de transposones, lo cual, como se sabe, potencia su diseminación⁴⁰. En estos casetes de resistencia, incluido *qnr*, el elemento de 59 pb⁴¹ se ha perdido, indicando que, efectivamente, *orf513* debe estar implicado en la adquisición específica de sitio de genes.

Es importante señalar que existe una relación estadísticamente significativa entre la resistencia a quinolonas y betalactámicos⁴², y sea circunstancial o no, pMG252 contiene la betalactamasa de espectro ampliado FOX-5²⁵. Así, se abre una vía de coresistencia a dos familias muy importantes 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.

En un estudio más reciente⁴³, se analizó el entorno genético de los transconjugantes de dos cepas de *E. coli* de un hospital de Shanghai resistentes a quinolonas en las que se había identificado la presencia de *qnr*. En estas cepas se halló que *qnr* se encuentra formando parte de un integrón de clase 1, perteneciente a la familia In4, adyacente a

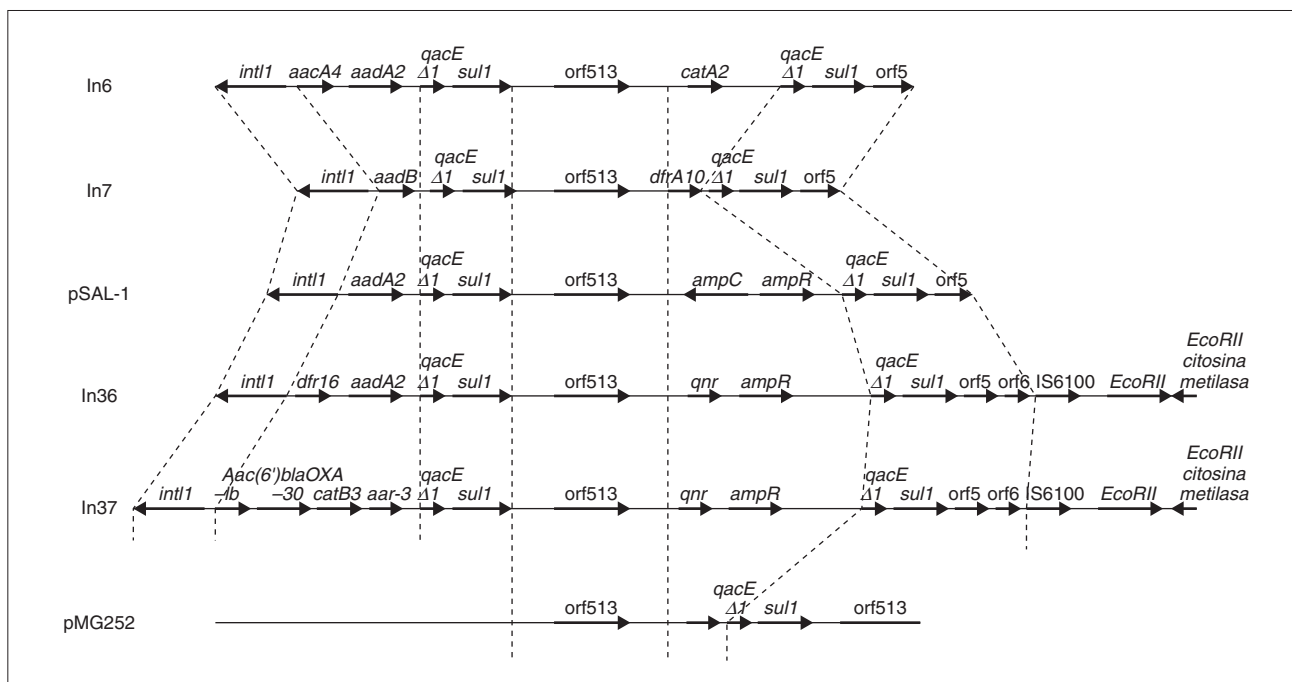


Figura 3. Entorno genético de cepas en las que se ha encontrado *qnr* y comparación de la secuencia con otros integrones de clase 1.

orf513 y aguas arriba de *ampR*, *qacE* δ 1 y *sul1* (fig. 3). El gen *qnr* del plásmido original pMG252 tiene una localización similar, pero en los plásmidos de las cepas de Shanghai, el gen *ampR* se encuentra inmediatamente aguas abajo de *qnr*, mientras que en pMG252, *qacE* δ 1 y *sul1* están directamente aguas abajo de *qnr*. En estos dos nuevos plásmidos, los integrones que contienen *qnr*, In36 e In37⁴³, presentaban una estructura similar a la de pSal-1⁴⁴, pero *ampC* se sustituye por *qnr* (fig. 3). En el resto de cepas *qnr* positivas del estudio de las cepas de Shanghai se comprobó por PCR que *ampR* se encuentra próximo a *orf513*, pero *ampC* ha sido sustituido por *qnr*.

En muchas ocasiones, la movilidad de los integrones se debe a su presencia dentro de transposones o plásmidos. Los integrones que llevan *qnr* parece que son móviles entre diferentes plásmidos. Esta interpretación se apoya en varias observaciones: en primer lugar, *qnr* se halla en plásmidos de diferentes tamaños en las cepas clínicas donde se encontró; en segundo lugar, en una de las cepas se encuentra en dos plásmidos de diferente tamaño (además, estos plásmidos son capaces de transferir *qnr* por conjugación)⁴³; en tercer lugar, en algunos transconjugantes la señal de hibridación de *qnr* se pierde, sin que se pierda la presencia del plásmido cuando se crecen a elevada temperatura o en ausencia de presión antibiótica⁴³. El mecanismo por el que los integrones se movilizan no está claro, pero esta movilidad se apoya en sus múltiples localizaciones, que indican movimientos en el pasado, y por la presencia en algunos de ellos de repeticiones directas de 5 pb que son consistentes con movimientos por algún mecanismo de transposición⁴⁵. Parece razonable pensar que los integrones de clase 1 pueden ser movilizados si poseen las secuencias características IRI e IRT, y los genes *tni* que codifican enzimas de transposición son aportados en *trans* desde otras estructuras, ya sean plasmídicas o cromosómi-

cas⁴⁵. Los dos integrones descritos que contienen *qnr*, In36 e In37, contienen tanto las secuencias IRI e IRT como las duplicaciones directas de 5 pb, indicando que es posible el movimiento por transposición⁴³. La movilidad de *qnr* podría ser posibilitada por la presencia de genes *tni* en otro transposón en estas cepas clínicas.

Efecto de Qnr sobre la actividad de las quinolonas

En la tabla 3 se pueden observar las CIM de diferentes quinolonas frente a algunas de las cepas clínicas publicadas y de transconjugantes obtenidas a partir de ellas. Como puede observarse, las CIM de ciprofloxacino frente a los transconjugantes están entre 0,125 y 2 mg/l, lo cual representa un aumento de 16 a 250 veces la CIM, en relación con la del recipiente. En un trabajo reciente⁴⁶ se probó la actividad de diferentes quinolonas frente a Qnr, y se vio que antimicrobianos como sitafloxacino, BAYy3118 y premafloxacinó son más activos que ciprofloxacino, tanto en los transconjugantes como en los donadores.

Hay que señalar que la presencia de *qnr* en los transconjugantes estudiados es estable tras sucesivos pases en medios sin presión antibiótica, permaneciendo el fenotipo de resistencia a quinolonas, acompañado de otras resistencias, excepto en un caso donde se perdió la resistencia a quinolonas, y también la asociada a trimetoprima+sulfametoxazol, cloranfenicol y tetraciclina⁴³. El plásmido que poseía este transconjugante en particular tenía un tamaño ligeramente inferior al esperado, indicando que al menos en este caso parte del integrón se pudo perder durante el proceso de conjugación⁴³.

Se ha observado que la resistencia a quinolonas mediada por plásmido, aunque produce resistencia de bajo nivel,

TABLA 3. Sensibilidad de distintas cepas clínicas y sus transconjugantes (TC) que contienen *qnr* a diferentes quinolonas y betalactámicos

	J53 Rif ^R	UAB1	UAB1 TC	N5	N5 TC	60	60 TC	32	4	4 TC	7	7 TC	10	10 TC	12	12 TC
Especie	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
Origen	Lab	EE.UU.	Lab	EE.UU.	Lab	EE.UU.	Lab	EE.UU.	China	Lab	China	Lab	China	Lab	China	Lab
CIM																
NAL	2	256	32	32	32	>256	32	>256								
CIP	0,008	8	0,5	0,25	0,125	1	0,125	4	64	0,25	128	0,125	128	0,25-1	128	1
CLI	0,004		0,125	0,25	0,125	0,5	0,125	2								
NOR	0,06		1	2	1	4	1	16								
TRO	0,015		1	8	2	16	0,5	32								
SPA	<0,004	16	0,5													
AMP	2			>128	>128	>128	>128	>128	>512	>512	>512	32	>512	32	>512	>512
CAZ	0,06			32	8	16	8	64								

NAL: ácido nalidíxico; CIP: ciprofloxacino; CLI: clinafloxacino; NOR: norfloxacino; TRO: trorafloxacino; SPA: esparfloxacino; AMP: ampicilina; CAZ: ceftazidina.

también facilita la selección de resistencia de alto nivel a quinolonas⁴⁷. Se sabe desde hace tiempo que los plásmidos que median resistencia a bajas concentraciones de estreptomycin incrementan la selección de niveles mayores de resistencia⁴⁸. Así, cuando *qnr* se expresa en una cepa deficiente en porinas, las CIM para ciprofloxacino, levofloxacino y moxifloxacino aumentan de 8 a 32 veces⁴⁹, pasando las CIM de estas quinolonas de 0,25-0,5 a 4-8 mg/l. Existe un efecto aditivo de los distintos mecanismos de resistencia a quinolonas con la presencia de *qnr*⁵⁰. Se piensa que la baja resistencia a un antimicrobiano permite a las poblaciones bacterianas alcanzar concentraciones a las cuales la aparición de mutaciones secundarias que permiten la aparición de alta resistencia puede ocurrir. Esto sería lo que ocurriría con la resistencia a estreptomycin y a quinolonas codificada por el plásmido original donde se describió *qnr*, pMG252, donde la frecuencia de mutaciones de alta resistencia aumenta en los transconjugante respecto del recipiente *E. coli* J53 sin plásmido⁴⁷.

Prevalencia de *Qnr*

Los integrones son elementos comunes en los aislados clínicos bacterianos en bacterias gramnegativas, estando presentes hasta en más del 40% de éstas. Además, los aislados que contienen estos elementos son significativamente más resistentes a antibióticos como quinolonas, aminoglucósidos y betalactámicos⁵¹, sugiriendo la posibilidad de que *qnr* u otro gen relacionado esté presente en cepas de este tipo, muchas de ellas con secuencias conservadas de integrones de clase 1.

Aún no se han realizado suficientes estudios para determinar la prevalencia real del determinante de resistencia a quinolonas *qnr* transferible horizontalmente. En un primer trabajo⁵², de un total de 350 cepas de 13 géneros diferentes de bacterias gramnegativas en su mayoría procedentes de Estados Unidos, sólo presentaron el gen *qnr* un aislado de *E. coli*, cuatro aislados de *K. pneumoniae* y un aislado de *Klebsiella* sp. de cultivo de orina y de esputo. En un segundo trabajo⁴³, sobre 78 cepas clínicas de *E. coli* resistentes a quinolonas recogidas de cinco hospitales de Shangai, China, entre marzo de 2000 y marzo de 2001, el 7,7%, es decir, 6 cepas, poseían el gen *qnr*. En este caso las cepas procedían del mismo hospital, pero de diferentes pacientes. Un tercer estudio⁵³, sobre un total de 266 cepas de

E. coli y 159 cepas de *K. pneumoniae* con diferentes fenotipos de resistencia a betalactámicos y quinolonas dio como resultado el hallazgo de tres cepas de *K. pneumoniae* que contenían el gen *qnr*. Por el contrario, ninguna de las cepas de *E. coli* fueron positivas. Recientemente, Wang et al⁵⁴ han publicado un trabajo sobre cepas clínicas de *K. pneumoniae* y *E. coli* de diferentes estados de Estados Unidos en el que la frecuencia de *qnr* es mayor del 11% en *K. pneumoniae* (no se detectó en ninguna cepa de *E. coli*). Alguna de estas cepas producían SHV-7, siendo ésta la primera vez que se describe una asociación entre una betalactamasa de espectro extendido y *Qnr* en la misma cepa. De estos estudios se deduce que este gen está ampliamente distribuido en cepas clínicas resistentes a quinolonas de *K. pneumoniae* en Estados Unidos y *E. coli* del sudeste asiático.

Conclusiones y perspectivas

La identificación de *qnr* en cepas clínicas de *K. pneumoniae* productoras de betalactamasas plasmídicas aisladas en Estados Unidos, y su hallazgo en cepas de *E. coli* procedentes del sudeste asiático indican la emergencia de este nuevo mecanismo de resistencia a quinolonas en cepas clínicas. Además, la posibilidad de su diseminación a otros géneros de bacterias gramnegativas podría agravar el problema; *qnr* media la resistencia a quinolonas desde integrones de clase 1, unido a otros genes de resistencia, lo cual tiene un efecto adicional, ya que la disminución de sensibilidad a quinolonas en presencia de otras resistencias promueve la selección de genes de este tipo que se encuentran en el mismo integrón. Son necesarios nuevos estudios que aclaren la prevalencia real de este mecanismo (incluyendo grampositivos), los mecanismos de resistencia y selección de mutantes en presencia de *qnr*, así como modelos animales para el estudio de la trascendencia clínica e *in vivo*.

Bibliografía

- Leshner GY, Froelich EJ, Gruett MD, Bailey JH, Brundage RP. 1,8-Naphtidine derivatives. A new class of chemotherapeutic agents. *J Med Pharm Chem* 1962;91:1063-5.
- Spangler SK, Visalli MA, Jacobs MR, Appelbaum PC. Susceptibilities of non-*Pseudomonas aeruginosa* gram-negative nonfermentative rods to ciprofloxacin, ofloxacin, levofloxacin, D-ofloxacin, sparfloxacin, ceftazidime, piperacillin, piperacillin-tazobactam, trimethoprim-sulfamethoxazole, and imipenem. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:772-5.

3. Davis R, Markham A, Balfour JA. Ciprofloxacin. An updated review of its pharmacology, therapeutic efficacy and tolerability. *Drugs* 1996;51:1019-74.
4. Drlica K, Zhao X. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol Mol Biol Rev* 1997;61:377-92.
5. Hooper DC. Bacterial topoisomerases, anti-topoisomerases, and anti-topoisomerase resistance. *Clin Infect Dis* 1998;27(Suppl 1):S54-S63.
6. Martínez-Martínez L, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* 1998;351:797-9.
7. Hooper DC. Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerg Infect Dis* 2001;7:337-41.
8. Hiasa H, Yousef DO, Mariani KJ. DNA strand cleavage is required for replication fork arrest by a frozen topoisomerase-quinolone-DNA ternary complex. *J Biol Chem* 1996;271:26424-9.
9. Willmott CJ, Critchlow SE, Eperon IC, Maxwell A. The complex of DNA gyrase and quinolone drugs with DNA forms a barrier to transcription by RNA polymerase. *J Mol Biol* 1994;242:351-63.
10. Shea ME, Hiasa H. Interactions between DNA helicases and frozen topoisomerase IV-quinolone-DNA ternary complexes. *J Biol Chem* 1999;274:22747-54.
11. Takei M, Fukuda H, Kishii R, Hosaka M. Target preference of 15 quinolones against *Staphylococcus aureus*, based on antibacterial activities and target inhibition. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:3544-7.
12. Morais Cabral JH, Jackson AP, Smith CV, Shikotra N, Maxwell A, Liddington RC. Crystal structure of the breakage-reunion domain of DNA gyrase. *Nature* 1997;388:903-6.
13. Ribera A, Doménech-Sánchez A, Ruiz J, Benedi VJ, Jiménez de Anta MT, Vila J. Mutations in *gyrA* and *parC* QRDRs are not relevant for quinolone resistance in epidemiologically unrelated *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates. *Microb Drug Resist* 2002;8:245-51.
14. Muñoz-Bellido JL, Alonzo MM, Martínez Andrés JA, Gutiérrez Zufiaurre MN, Ortiz G, Segovia HM, et al. Efflux pump-mediated quinolone resistance in *Staphylococcus aureus* strains wild type for *gyrA*, *gyrB*, *griA*, and *norA*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:354-6.
15. Helling RB, Janes BK, Kimball H, Tran T, Bundesmann M, Check P, et al. Toxic waste disposal in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2002;184:3699-703.
16. Courvalin P. Plasmid-mediated 4-quinolone resistance: a real or apparent absence? *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34:681-4.
17. Ince D, Hooper DC. Quinolone resistance due to reduced target enzyme expression. *J Bacteriol* 2003;185:6883-92.
18. Trieu-Cuot P, Gerbaud G, Lambert T, Courvalin P. *In vivo* transfer of genetic information between gram-positive and gram-negative bacteria. *EMBO J* 1985;4:3583-7.
19. Courvalin P, Fiant M. Aminoglycoside-modifying enzymes of *Staphylococcus aureus*; expression in *Escherichia coli*. *Gene* 1980;9:247-69.
20. Parshikov IA, Freeman JP, Lay JO Jr, Beger RD, Williams AJ, Sutherland JB. Microbiological transformation of enrofloxacin by the fungus *Mucor ramannianus*. *Appl Environ Microbiol* 2000;66:2664-7.
21. Wetzstein HG, Stadler M, Tichy HV, Dalhoff A, Karl W. Degradation of ciprofloxacin by basidiomycetes and identification of metabolites generated by the brown rot fungus *Gloeophyllum striatum*. *Appl Environ Microbiol* 1999;65:1556-63.
22. Munshi MH, Sack DA, Haider K, Ahmed ZU, Rahaman MM, Morshed MG. Plasmid-mediated resistance to nalidixic acid in *Shigella dysenteriae* type 1. *Lancet* 1987;2:419-21.
23. Martínez-Martínez L, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* 1998;351:797-9.
24. Martínez-Martínez L, Pascual A, García I, Tran J, Jacoby GA. Interaction of plasmid and host quinolone resistance. *J Antimicrob Chemother* 2003;51:1037-9.
25. Tran JH, Jacoby GA. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:5638-42.
26. Tran J, Jacoby GA, Hooper DC. The Plasmid-Mediated Protein Qnr Protects topoisomerase IV from Ciprofloxacin Inhibition and Interacts with the ParE Subunit 2004;C1-604.
27. Bateman A, Murzin AG, Teichmann SA. Structure and distribution of pentapeptide repeats in bacteria. *Protein Sci* 1998;7:1477-80.
28. Kobe B, Deisenhofer J. A structural basis of the interactions between leucine-rich repeats and protein ligands. *Nature* 1995;374:183-6.
29. Herrero M, Moreno F. Microcin B17 blocks DNA replication and induces the SOS system in *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* 1986;132(Pt 2):393-402.
30. Zamble DB, Miller DA, Heddle JG, Maxwell A, Walsh CT, Hollfelder F. *In vitro* characterization of DNA gyrase inhibition by microcin B17 analogs with altered bisheterocyclic sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:7712-7.
31. Heddle JG, Blance SJ, Zamble DB, Hollfelder F, Miller DA, Wentzell LM, et al. The antibiotic microcin B17 is a DNA gyrase poison: characterisation of the mode of inhibition. *J Mol Biol* 2001;307:1223-34.
32. Garrido MC, Herrero M, Kolter R, Moreno F. The export of the DNA replication inhibitor Microcin B17 provides immunity for the host cell. *EMBO J* 1988;7:1853-62.
33. Lomovskaya O, Kawai F, Matin A. Differential regulation of the *mcb* and *emr* operons of *Escherichia coli*: role of *mcb* in multidrug resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:1050-2.
34. Romanowski MJ, Gibney SA, Burley SK. Crystal structure of the *Escherichia coli* SbmC protein that protects cells from the DNA replication inhibitor microcin B17. *Proteins* 2002;47:403-7.
35. Montero C, Mateu G, Rodríguez R, Takiff H. Intrinsic resistance of *Mycobacterium smegmatis* to fluoroquinolones may be influenced by new pentapeptide protein MfpA. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:3387-92.
36. Martínez-Martínez L, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* 1998;351:797-9.
37. Stokes HW, Tomaras C, Parsons Y, Hall RM. The partial 3'-conserved segment duplications in the integrons In6 from pSa and In7 from pDGO100 have a common origin. *Plasmid* 1993;30:39-50.
38. Paulsen IT, Littlejohn TG, Radstrom P, Sundstrom L, Skold O, Swedberg G, et al. The 3' conserved segment of integrons contains a gene associated with multidrug resistance to antiseptics and disinfectants. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:761-8.
39. Valentine CR, Heinrich MJ, Chisoso SL, Roe BA. DNA sequence of direct repeats of the *sulI* gene of plasmid pSa. *Plasmid* 1994;32:222-7.
40. Arduino SM, Roy PH, Jacoby GA, Orman BE, Pineiro SA, Centron D. blaCTX-M-2 is located in an unusual class 1 integron (In35) which includes Orf513. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:2303-6.
41. Hall RM, Collis CM. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol Microbiol* 1995;15:593-600.
42. Paterson DL, Mulazimoglu L, Casellas JM, Ko WC, Goossens H, Von Gottberg A, et al. Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended-spectrum beta-lactamase production in *Klebsiella pneumoniae* isolates causing bacteremia. *Clin Infect Dis* 2000;30:473-8.
43. Wang M, Tran JH, Jacoby GA, Zhang Y, Wang F, Hooper DC. Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:2242-8.
44. Verdet C, Arlet G, Barnaud G, Lagrange PH, Philippon A. A novel integron in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, carrying the bla(DHA-1) gene and its regulator gene ampR, originated from *Morganella morganii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:222-5.
45. Partridge SR, Brown HJ, Hall RM. Characterization and movement of the class 1 integron known as Tn2521 and Tn1405. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:1288-94.
46. Wang M, Sahn DF, Jacoby GA, Zhang Y, Hooper DC. Activities of newer quinolones against *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* containing the plasmid-mediated quinolone resistance determinant qnr. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:1400-1.
47. Martínez-Martínez L, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* 1998;351:797-9.
48. Pearce LE, Meynell E. Mutation to high-level streptomycin-resistance in R+ bacteria. *J Gen Microbiol* 1968;50:173-6.
49. Rodríguez-Martínez JM, Pascual A, Matin D, García I, Pachón J, Martínez-Martínez L. Bactericidal activity of fluoroquinolones (FQ) against *Klebsiella pneumoniae* containing the plasmid-mediated resistance determinant qnr. 13th ESCMID (Glasgow, Escocia) 2004; P1555.
50. Martínez-Martínez L, Pascual A, García I, Tran J, Jacoby GA. Interaction of plasmid and host quinolone resistance. *J Antimicrob Chemother* 2003;51:1037-9.
51. Martínez-Freijo P, Fluit AC, Schmitz FJ, Grek VS, Verhoef J, Jones ME. Class I integrons in Gram-negative isolates from different European hospitals and association with decreased susceptibility to multiple antibiotic compounds. *J Antimicrob Chemother* 1998;42:689-96.
52. Jacoby GA, Chow N, Waites KB. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:559-62.
53. Rodríguez-Martínez JM, Pascual A, García I, Martínez-Martínez L. Detection of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant qnr among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing AmpC-type beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother* 2003;52:703-6.
54. Wang M, Sahn DF, Jacoby GA, Hooper DC. Emerging plasmid-mediated quinolone resistance associated with the qnr gene in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:1295-9.